

Nieves Movilla Meno

Análisis del efecto de la matriz  
extracelular en la migración 3D de  
fibroblastos y osteoblastos  
humanos.

Director/es

Borau Zamora, Carlos  
García Aznar, José Manuel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA MATRIZ  
EXTRACELULAR EN LA MIGRACIÓN 3D DE  
FIBROBLASTOS Y OSTEOBLASTOS HUMANOS.**

Autor

**Nieves Movilla Meno**

Director/es

Borau Zamora, Carlos  
García Aznar, José Manuel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

2021





**Universidad**  
Zaragoza



instituto  
de investigación  
en ingeniería de Aragón



# Análisis del efecto de la matriz extracelular en la migración 3D de fibroblastos y osteoblastos humanos



Tesis presentada por

**Nieves Movilla Meno**

*para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular y Celular*

Directores

**José Manuel García Aznar**

**Carlos Borau Zamora**

*Multiescala en Ingeniería Mecánica y Biológica (M2BE)*

*Instituto de investigación de Ingeniería de Aragón (I3A)*

*Universidad de Zaragoza, 2021*

Tutor

**José Alberto Carrodegas Villar**

*Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI)*

*Universidad de Zaragoza, 2021*



*Si crees que puedes, ya estás a medio camino.*  
~Theodore Roosevelt



*A mis padres, a mi marido, a mis hermanas  
y muy especialmente a mis hijos*



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTADO DE ABREVIACIONES .....</b>	<b>xxi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Migración celular .....	3
1.1.1. Migración celular individual y colectiva .....	7
1.1.2. Mecanismos reguladores de la migración celular.....	10
1.1.2.1. Haptotaxis .....	11
1.1.2.2. Quimiotaxis .....	12
1.1.2.3. Durotaxis .....	13
1.2. La adhesión celular y la matriz extracelular .....	13
1.2.1. La adhesión celular .....	13
1.2.2. La matriz extracelular .....	15
1.3. El citoesqueleto y la movilidad celular .....	21
1.3.1. El citoesqueleto de actina .....	21
1.3.2. Protrusiones.....	22
1.4. Papel de la migración celular en la regeneración de tejidos.....	25
1.4.1. Curación de heridas .....	26
1.4.2. Regeneración ósea .....	29
1.5. Cultivos celulares 3D mediante dispositivos microfluídicos.....	34
1.6. Justificación y objetivos .....	38

<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
2.1. Fabricación de dispositivos de microfluídica .....	41
2.2. Líneas celulares.....	45
2.2.1. Generación de la línea celular de fibroblastos humanos con GFP (NHDF-GFP) .....	46
2.3. Preparación de los hidrogeles de colágeno y siembra celular .....	47
2.3.1. Siembra de fibroblastos NHDF-GFP en monocapa en hidrogeles de colágeno .....	48
2.3.2. Migración y protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno .....	49
2.4. Generación de gradientes químicos en los dispositivos de microfluídica.....	50
2.4.1. Cuantificación de la concentración de PDGF-BB-Alexa 647 .....	52
2.5. Caracterización biomecánica de los hidrogeles de colágeno .....	53
2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	54
2.7. Cuantificación del alineamiento de fibras de colágeno.....	55
2.8. Microscopía de inmunofluorescencia.....	56
2.9. Inhibición de la degradación de la matriz.....	57
2.10. Inhibición de las proteínas del citoesqueleto .....	57
2.11. Ensayo de adhesión celular con fibronectina .....	58
2.12. Cuantificación de metaloproteasas de matriz mediante zimografía cuantitativa en gel .....	58
2.13. Adquisición y procesamiento de imágenes .....	59
2.14. Análisis de imágenes.....	60
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
3.1. Cuantificación de la migración colectiva de fibroblastos en respuesta a un gradiente químico en 3D.....	67
3.1.1. Ensayos de motilidad celular .....	67

3.1.1.1.	Aplicación de un gradiente haptotáctico con PDGF-BB para la migración celular dirigida de una monocapa de fibroblastos NHDF-GFP .....	69
i.	Efecto del pretratamiento con PDGF-BB en haptotaxis, en hidrogeles de 2.5 mg/ml, con eliminación del factor químico no adherido .....	69
ii.	Efecto del pretratamiento con PDGF-BB en haptotaxis, en hidrogeles de 2.5 mg/ml, sin eliminación del factor químico no adherido.....	75
iii.	Influencia del pretratamiento con fibronectina en haptotaxis en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml .....	78
3.1.1.2.	Efecto de un gradiente quimiotáctico con PDGF-BB para migración celular dirigida de la monocapa de fibroblastos NHDF-GFP en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml.....	82
i.	Efecto del entrecruzante TG2 en la motilidad celular de la monocapa de fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, aplicando un gradiente quimiotáctico con PDGF-BB .....	88
ii.	Análisis del movimiento de la monocapa de fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml, aplicando un gradiente quimiotáctico de PDGF-BB ....	91
3.1.1.3.	Efecto de la durotaxis colectiva de la monocapa de fibroblastos en hidrogeles de colágeno con gradiente creciente y decreciente estimulados adicionalmente con gradiente de PDGF-BB .....	96
3.1.1.4.	Discusión y conclusiones .....	103
3.2.	La degradación de la matriz extracelular regula la migración de los osteoblastos .....	107
3.2.1.	Análisis de la microestructura y la respuesta mecánica de los hidrogeles de colágeno. ....	107
3.2.2.	Efecto del factor químico PDGF-BB en la migración de células HOB .....	109
3.2.3.	Efecto de los hidrogeles de colágeno entrecruzados con TG2 en la migración de células HOB.....	110
3.2.4.	Análisis de la dirección del movimiento de la migración de HOB en 3D..	115

3.2.5. Efecto de la capacidad de degradación de la línea celular HOB en la migración.....	118
3.2.6. Discusión y conclusiones .....	125
3.3. La degradación de la matriz regula la dinámica de las protrusiones de los osteoblastos y su migración individual.....	131
3.3.1. Análisis de la dinámica de protrusiones en hidrogeles de 4 mg/ml de colágeno .....	133
3.3.2. Efecto del entrecruzante TG2 en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml.....	134
3.3.3. Efecto del inhibidor marimastat en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml.....	135
3.3.4. Efecto combinado del entrecruzante TG2 y la inhibición de la degradación en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml.....	136
3.3.5. Análisis del entrecruzante TG2 y del inhibidor marimastat en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml ...	137
3.3.6. Efecto del entrecruzante TG2 y de la inhibición de protrusiones en la velocidad de migración de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml .....	138
3.3.7. Análisis de la organización del citoesqueleto, forma y trayectorias de las protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml .....	139
3.3.8. Efecto de la inhibición del complejo Arp2/3 en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml .....	141
3.3.9. Efecto de la blebistatina (inhibidor de miosina) en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml .....	143
3.3.10. Influencia del tratamiento con fibronectina en la formación de protrusiones de los osteoblastos en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml .....	146
3.3.11. Análisis de la dinámica de protrusiones en hidrogeles de 2 mg/ml de colágeno .....	149

3.3.12. Efecto de la inhibición de las protrusiones de osteoblastos HOB mediada por marimastat en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml.....	154
3.3.13. Protrusiones de osteoblastos HOB: comparativa global de las distintas condiciones analizadas.....	156
3.3.14. Discusión y conclusiones .....	159
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>163</b>
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>167</b>
<b>6. TRABAJO FUTURO .....</b>	<b>171</b>
<b>7. NOTA BIOGRÁFICA .....</b>	<b>177</b>
7.1. Publicaciones obtenidas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral .....	179
7.2. Contribuciones en conferencias y congresos .....	179
7.3. Docencia.....	181
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>183</b>
A.1. Marcaje del PDGF-BB con Alexa Fluor 647 para la estimación de la cantidad de factor químico unido al hidrogel de colágeno .....	185
A.2. Estudio del efecto de los entrecruzantes en los hidrogeles de colágeno .....	191
A.3. Análisis de la degradación de la matriz de colágeno mediante DQ colágeno .....	196
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>199</b>



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis directores de Tesis Dr. José Manuel García Aznar y Dr. Carlos Borau, por su apoyo en el ámbito científico, por su motivación y supervisión. Gracias Manu por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar la Tesis doctoral al mismo tiempo que llevar a cabo mi trabajo como técnico de laboratorio.

Especial mención merecen el Dr. Xosé Ramón Bustelo porque ha sido clave en mi vida como científica aportándome conocimientos, entusiasmo y rigurosidad científica y el Dr. José Antonio Enríquez por todo su apoyo científico y personal.

Gracias a Cristina y a Chema por todos esos buenos momentos que pasamos juntos. Gracias a todos los demás compañeros que están y han pasado por el laboratorio. Nombrar a todos sería muy extenso y podría cometer algún olvido injusto, por ello, ¡gracias a todos!

Y con todo mi amor, gracias a las personas con las que comparto mi vida por estar incondicionalmente conmigo durante todos estos años. Siempre. Mis hermanas Marola e Isabel por apoyarme en todos los momentos importantes de mi vida, la abuela Carmen y el abuelo Manolo que ya no está con nosotros, mis suegros Isabel y José Manuel y mis cuñados y sobrinos Tere, Miguel, Ángel y Mateo.

También tengo que agradecer a quienes me dan alegría, cariño y compañía cuando llego a casa cada día, a mi perrita Goli y a mi gata Dori.

A mis queridos padres, a mi padre Pepe, aunque ya no está con nosotros desde hace más de 30 años ha sido y es el que desde lo más profundo de su corazón deseó e impulsó este momento. A mi madre Carmen, no la hay mejor en el mundo, jamás he visto un sacrificio igual por sus hijas y gracias al cual hoy puedo estar aquí. Esta Tesis es también vuestra.

A Cote, mi compañero de vida, por compartir el recorrido que llevamos juntos en la ciencia de la vida y por ser mi gran apoyo tanto en buenos como en malos momentos. Gracias por tu comprensión, tu paciencia y apoyo incondicional para lograr esta meta. Soy muy afortunada de tenerte conmigo. ¡Gracias por todo!

Finalmente, a mis queridos hijos Diego y Paula, muchas gracias por ser el motor de mi vida y llenarla de luz cada día. La motivación y vuestro sacrificio para llevar a cabo este trabajo también os los debo a vosotros. ¡Os quiero!

## **RESUMEN**

Las células utilizan múltiples modos de migración para desplazarse en matrices tridimensionales (3D), tanto de forma individual como colectiva, rigiéndose por la interacción de las células con el microambiente extracelular y con otras células. Este entorno extracelular es un desafío porque requiere que la célula se filtre a través de estructuras complejas o densas, y para ello se requieren adaptaciones celulares a la matriz extracelular e incluso la remodelación de la misma.

Este trabajo se centra en mejorar el entendimiento del papel que tiene la matriz extracelular que rodea a las células en procesos de cicatrización de heridas y regeneración ósea. Para ello se utilizan experimentos *in vitro* mediante plataformas microfluídicas que permiten el cultivo celular en 3D, las cuales facilitan la observación de la respuesta celular en tiempo real de una forma más fisiológica que con otros métodos más clásicos. En primer lugar, se realizó el estudio del comportamiento migratorio de una monocapa de fibroblastos en presencia de gradientes químicos de unión a la matriz y solubles con el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), los cuales también se combinaron con distintas concentraciones de colágeno para analizar el efecto mecánico de la matriz. En segundo lugar, se cuantificó la migración 3D de osteoblastos ante gradientes de PDGF-BB y mediante la utilización de un inhibidor de amplio espectro de las metaloproteasas (marimastat) se reguló la actividad de degradación de la matriz extracelular. También se analizó el efecto de la modificación de la arquitectura de la matriz mediante el entrecruzamiento de las fibras y se estudiaron las propiedades biomecánicas y microestructurales de las distintas matrices extracelulares utilizadas. Finalmente, se analizó la capacidad de los osteoblastos para formar protrusiones en distintas concentraciones de colágeno de la matriz extracelular, en presencia de inhibidores de actina y de metaloproteasas.

Los resultados que se muestran indican que la microestructura de los hidrogeles utilizados determina las propiedades migratorias tanto de fibroblastos humanos en respuesta a gradientes quimiotácticos como de osteoblastos, dependiendo de la degradación de la matriz.

## **ABSTRACT**

Cells use multiple migration modes to move inside three-dimensional (3D) matrices, both individually and collectively, a process that is governed by the interaction of cells with the extracellular microenvironment as well as with other cells. This extracellular environment is a challenge because it requires the cell to filter through complex or dense extracellular structures, which requires adaptations to the extracellular matrix and its remodeling.

This work focuses on improving the understanding of the role of the extracellular matrix that surrounds cells in the processes of wound healing and bone regeneration. In order to achieve this, *in vitro* experiments are used via microfluidic platforms that allow 3D cell culture, which facilitates the observation of the cell response in real time in a more physiological way than with other more classical methods. Firstly, the migratory behavior of a monolayer of fibroblasts in the presence of soluble and matrix-binding chemical gradients with the platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) was studied, which were also combined with different collagen concentrations to analyze the mechanical effect of the matrix. Secondly, the 3D migration of osteoblasts in PDGF-BB gradients and the degradation activity (or proteolysis) was regulated by using a generic metalloprotease inhibitor (marimastat). The effect of modifying the matrix architecture by means of fiber crosslinking was also analyzed and the biomechanical and microstructural properties of the different extracellular matrices used were studied. Finally, the ability of osteoblasts to form protrusions at different collagen concentrations in the extracellular matrix, in the presence of actin and metalloproteases inhibitors, was analyzed.

The results obtained suggest that the microstructure of the hydrogels used determines the migratory properties of both human fibroblasts in response to chemotactic gradients and in osteoblasts depending on the regulation of matrix degradation.

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Pasos de migración celular en 3D .....	5
<b>Figura 1.2.</b> Rho GTPasas y migración celular.....	6
<b>Figura 1.3.</b> Funcionamiento de Rho GTPasas.....	7
<b>Figura 1.4.</b> Tipos de migración celular y transiciones .....	9
<b>Figura 1.5.</b> Haptotaxis .....	12
<b>Figura 1.6.</b> Quimiotaxis .....	12
<b>Figura 1.7.</b> Durotaxis .....	13
<b>Figura 1.8.</b> Esquema de la estructura de las integrinas .....	14
<b>Figura 1.9.</b> Matriz extracelular .....	16
<b>Figura 1.10.</b> Estructura de la triple hélice de colágeno.....	16
<b>Figura 1.11.</b> Tipos de matrices extracelulares.....	17
<b>Figura 1.12.</b> Esquema representativo de las MMPs.....	18
<b>Figura 1.13.</b> Estructura de una metaloproteasa .....	19
<b>Figura 1.14.</b> Polimerización y despolimerización de actina .....	21
<b>Figura 1.15.</b> Protrusiones celulares y Rho GTPasas .....	23
<b>Figura 1.16.</b> Cicatrización de heridas .....	28
<b>Figura 1.17.</b> Progresión temporal de la curación ósea .....	32
<b>Figura 1.18.</b> Cultivo 3D en hidrogel.....	35
<b>Figura 1.19.</b> Clasificación de hidrogeles para cultivo celular en 3D.....	36
<b>Figura 2.1.</b> Litografía blanda.....	42
<b>Figura 2.2.</b> Geometrías de los dispositivos de microfluídica.....	44
<b>Figura 2.3.</b> Estructura tridimensional del PDGF-BB .....	51
<b>Figura 2.4.</b> Reómetro Haake Rheostress 1 .....	54
<b>Figura 2.5.</b> Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo CSEM-FEG INSPECT F50 .....	55
<b>Figura 2.6.</b> Ratio de direccionalidad.....	61
<b>Figura 2.7.</b> MSD (Desplazamiento de mínimos cuadrados) .....	62
<b>Figura 2.8.</b> Imagen de protrusiones de la célula .....	63
<b>Figura 2.9.</b> Esquema de seguimiento de protrusiones de una célula .....	63

<b>Figura 3.1.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa con pretratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la monocapa	70
<b>Figura 3.2.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con pretratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.....	71
<b>Figura 3.3.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con pretratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	72
<b>Figura 3.4.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa con pretratamiento de PDGF-BB, en ambos canales y en el canal de siembra de la monocapa, en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno.....	73
<b>Figura 3.5.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con pretratamiento de PDGF-BB añadido en ambos canales y en el canal de siembra de la monocapa .....	74
<b>Figura 3.6.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en ambos canales y en el canal de siembra de la monocapa.....	75
<b>Figura 3.7.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa con PDGF-BB añadido en el canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto.....	76
<b>Figura 3.8.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal de la monocapa y en el canal opuesto.....	77
<b>Figura 3.9.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto.....	78
<b>Figura 3.10.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa, sin y con pretratamiento de fibronectina, y sin y con pretratamiento con PDGF-BB añadido en el canal opuesto ...	79
<b>Figura 3.11.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, sin y con pretratamiento de fibronectina, y sin y con pretratamiento con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	80

<b>Figura 3.12.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con y sin pretratamiento con fibronectina, y sin y con pretratamiento con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	81
<b>Figura 3.13.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal de siembra de monocapa y en el canal opuesto .....	83
<b>Figura 3.14.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, sin y con tratamiento de PDGF-BB en canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto .....	84
<b>Figura 3.15.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto.....	85
<b>Figura 3.16.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa en dispositivos de tres cámaras.....	86
<b>Figura 3.17.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto en dispositivos de tres cámaras .....	87
<b>Figura 3.18.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa en dispositivos de tres cámaras .....	88
<b>Figura 3.19.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles entrecruzados con TG2, con tratamiento de PDGF-BB en canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	89
<b>Figura 3.20.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml entrecruzados con TG2, con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	90
<b>Figura 3.21.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml entrecruzados con TG2, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.....	91
<b>Figura 3.22.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de 4 mg/ml, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .	92

<b>Figura 3.23.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml, con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	93
<b>Figura 3.24.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	94
<b>Figura 3.25.</b> Morfología de los fibroblastos en hidrogeles de 2.5 mg/ml con gradiente de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa y con TG2 y gradiente químico .....	94
<b>Figura 3.26.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de gradiente creciente de 1.5-2-2.5 mg/ml de colágeno sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto.....	97
<b>Figura 3.27.</b> Migración de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de gradiente creciente de 2.5-2-1.5 mg/ml de colágeno, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.....	98
<b>Figura 3.28.</b> Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de gradiente creciente de colágeno de 2.5-2-1.5 mg/ml, con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	99
<b>Figura 3.29.</b> Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5-2-1.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa .....	100
<b>Figura 3.30.</b> Interfaz generada entre dos hidrogeles de diferentes concentraciones de colágeno .....	100
<b>Figura 3.31.</b> Imágenes de SEM de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml y con y sin TG2 .....	108
<b>Figura 3.32.</b> Índice de alineación de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml con y sin TG2 .....	109
<b>Figura 3.33.</b> Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con PDGF-BB.....	110
<b>Figura 3.34.</b> Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con 25 µg/ml de TG2 .....	111

<b>Figura 3.35.</b> Imágenes de SEM de fibras de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml con TG2 .....	111
<b>Figura 3.36.</b> Índice de alineación de hidrogeles de colágeno de 4mg/ml con 50 µg/ml de TG2.....	112
<b>Figura 3.37.</b> Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con 50 µg/ml de TG2 .....	112
<b>Figura 3.38.</b> Cuantificación de las membranas en hidrogeles de colágeno de 4mg/ml con 25 y 50 µg/ml de TG2 .....	113
<b>Figura 3.39.</b> Medición de las membranas de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml + TG2 .....	114
<b>Figura 3.40.</b> Correlación de velocidades .....	115
<b>Figura 3.41.</b> Trayectorias de las células cuyo punto de partida fue centrado en el origen de las coordenadas.....	116
<b>Figura 3.42.</b> Polarización de la velocidad .....	117
<b>Figura 3.43.</b> Índice de anisotropía.....	118
<b>Figura 3.44.</b> Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con marimastat .....	119
<b>Figura 3.45.</b> Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con marimastat y TG2 .....	120
<b>Figura 3.46.</b> Zimografía de gelatina del medio de cultivo de células HOB control y de HOB tratadas con marimastat .....	120
<b>Figura 3.47.</b> Actividad gelatinolítica de la MMP-9 en HOB tratadas y sin tratar con marimastat .....	121
<b>Figura 3.48.</b> Coeficiente de difusión.....	124
<b>Figura 3.49.</b> Velocidades de persistencia .....	125
<b>Figura 3.50.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno .....	133
<b>Figura 3.51.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno entrecruzado con TG2.....	134
<b>Figura 3.52.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con marimastat .....	136

<b>Figura 3.53.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con TG2 y marimastat .....	137
<b>Figura 3.54.</b> Cuantificación de las protrusiones en 4 mg, con TG2, marimastat y TG2 con marimastat .....	138
<b>Figura 3.55.</b> Cuantificación de la velocidad de los osteoblastos .....	139
<b>Figura 3.56.</b> Tinción del núcleo, actina y tubulina en osteoblastos en distintas condiciones .....	140
<b>Figura 3.57.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con CK-636 .....	141
<b>Figura 3.58.</b> Trayectoria de migración de un osteoblasto con el inhibidor CK-636.....	142
<b>Figura 3.59.</b> Cuantificación de las protrusiones con CK-636.....	143
<b>Figura 3.60.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con blebistatina.....	144
<b>Figura 3.61.</b> Trayectoria de migración de un osteoblasto con el inhibidor blebistatina .....	145
<b>Figura 3.62.</b> Cuantificación de las protrusiones con el inhibidor de miosina blebistatina .....	146
<b>Figura 3.63.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno tratado con fibronectina .....	147
<b>Figura 3.64.</b> Trayectoria de migración de un osteoblasto en un hidrogel de colágeno tratado con fibronectina.....	148
<b>Figura 3.65.</b> Cuantificación de las protrusiones de osteoblastos en 4 mg/ml de colágeno tratados con fibronectina .....	149
<b>Figura 3.66.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 2 mg/ml de colágeno .....	150
<b>Figura 3.67.</b> Trayectoria de migración de un osteoblasto en un hidrogel de 2 mg/ml de colágeno .....	151
<b>Figura 3.68.</b> Cuantificación de las protrusiones en 2 mg/ml de colágeno.....	152
<b>Figura 3.69.</b> Imagen de protrusiones de un osteoblasto en 2 y 4 mg/ml en un hidrogel de colágeno .....	152
<b>Figura 3.70.</b> Orientación y movimiento de un osteoblasto en colágeno a 2 y 4 mg/ml .....	153

<b>Figura 3.71.</b> Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 2 mg/ml de colágeno con marimastat .....	154
<b>Figura 3.72.</b> Trayectoria de migración de un osteoblasto en un hidrogel de 2 mg/ml de colágeno con marimastat .....	155
<b>Figura 3.73.</b> Cuantificación de las protrusiones en 2 mg/ml de colágeno con marimastat .....	156
<b>Figura 3.74.</b> Cuantificación de las protrusiones en las distintas condiciones analizadas .....	157
<b>Figura 6.1.</b> Hidrogel de PEG-RGD.....	174
<b>Figura 6.2.</b> Técnica de TFM 3D (Microscopía de fuerzas de tracción 3D).....	175
<b>Figura A.1.1.</b> Morfología de los fibroblastos NHDF-BB en presencia de PDGF-BB-Alexa Fluor 647.....	186
<b>Figura A.1.2.</b> Geometría del dispositivo microfluídico .....	186
<b>Figura A.1.3.</b> Perfil de difusión de la molécula de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en la concentración de 5 ng/ $\mu$ l a través del hidrogel de colágeno de 2.5 mg/ml .....	187
<b>Figura A.1.4.</b> Proceso de lavado de la molécula de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en la concentración de 10 ng/ $\mu$ l a través del hidrogel de colágeno de 2.5 mg/ml .....	188
<b>Figura A.1.5.</b> Difusión de la molécula de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en hidrogeles de colágeno de 2.5 y 4 mg/ml .....	189
<b>Figura A.1.6.</b> Análisis del PDGF-BB-Alexa Fluor 647 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida .....	190
<b>Figura A.2.1.</b> Viabilidad de los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml, tratados con distintas concentraciones de GA.....	192
<b>Figura A.2.2.</b> Velocidad media y efectiva de migración de los fibroblastos con LOX..	193
<b>Figura A.2.3.</b> Imágenes de microscopía de reflexión en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml .....	194



## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Clasificación de las MMPs.....	19
<b>Tabla 1.2.</b> Principales factores biológicos implicados en regeneración ósea.....	33
<b>Tabla 2.1.</b> Líneas celulares utilizadas en esta Tesis doctoral.....	45
<b>Tabla 2.2.</b> Condiciones analizadas, número de experimentos y pasaje de las células en hidrogeles de 2 mg/ml.....	49
<b>Tabla 2.3.</b> Condiciones analizadas, número de experimentos y pasaje de las células en hidrogeles de 4 mg/ml.....	50
<b>Tabla 3.1.</b> Valores promedio del número de fibroblastos.....	95
<b>Tabla 3.2.</b> Resultados del análisis de haptotaxis de los fibroblastos de la monocapa	101
<b>Tabla 3.3.</b> Resultados del análisis de quimiotaxis de los fibroblastos de la monocapa	102
<b>Tabla 3.4.</b> Resultados del análisis de durotaxis de los fibroblastos de la monocapa ..	102
<b>Tabla 3.5.</b> Propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno utilizados para los experimentos <i>in vitro</i> .....	108
<b>Tabla 3.6.</b> Cuantificación de la MMP-9 en HOB con y sin marimastat .....	121
<b>Tabla 3.7.</b> Velocidades, direccionalidad y difusividad.....	122
<b>Tabla 3.8.</b> Tiempo de persistencia, velocidad de persistencia y coeficiente de difusión .....	123
<b>Tabla 3.9.</b> Resultados del análisis de diferentes experimentos con osteoblastos HOB en distintas condiciones .....	158
<b>Tabla 3.10.</b> Resultados de la velocidad de osteoblastos HOB .....	158
<b>Tabla A.2.1.</b> Análisis de citotoxicidad del GA en fibroblastos y osteoblastos primarios.	192



## LISTADO DE ABREVIACIONES

<b>2D</b>	Dos dimensiones
<b>3D</b>	Tres dimensiones
<b>ACF</b>	Función de correlación automática
<b>AF</b>	Adhesión focal
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>AMT</b>	Transición ameboide-mesenquimal
<b>APRW</b>	Modelo de caminos aleatorios persistentes anisotrópicos
<b>Arp2/3</b>	Proteínas relacionadas con la actina
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BIFI</b>	Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos
<b>BMP</b>	Proteína morfogénica ósea
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>CAFs</b>	Fibroblastos asociados a cáncer
<b>CAMs</b>	Moléculas de adhesión celular
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>Cys</b>	Aminoácido cisteína
<b>D</b>	Coefficiente de difusión
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>DH</b>	Homología con la proteína Dbl
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Dnp</b>	Coefficiente de difusión en el eje secundario de migración celular
<b>Dp</b>	Coefficiente de difusión en el eje primario de migración celular
<b>DPBS</b>	Buffer fosfato salino de Dulbecco
<b>dR</b>	Ratio de direccionalidad
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>FACS</b>	Separación celular activada por fluorescencia

<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FGM-2</b>	Medio de crecimiento de fibroblastos con suplementos
<b>FN</b>	Fibronectina
<b>FT</b>	Transformada de Fourier
<b>G´</b>	Módulo de rigidez
<b>GA</b>	Glutaraldehído
<b>GAG</b>	Glucosaminoglicanos
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GEFs</b>	Factores intercambiadores de nucleótido de guanina
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>GTPasas</b>	Trifostatasas de guanosina
<b>HEK 293T</b>	Células embrionarias de riñón humano 293
<b>HIF</b>	Factor de transcripción de hipoxia
<b>HOB</b>	Osteoblastos humanos
<b>HT-1080</b>	Línea celular de fibrosarcoma humano
<b>IACS</b>	Instituto aragonés de ciencias de la salud
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
<b>IGF-2</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>ITMP</b>	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>LOX</b>	Lisil oxidasa
<b>MAT</b>	Transición mesenquimal-ameboide
<b>MATLAB</b>	Laboratorio de matrices
<b>M2BE</b>	Multiescala en ingeniería mecánica y biológica
<b>MCF 10A</b>	Células epiteliales mamarias no malignas
<b>MC3T3</b>	Línea celular preosteoblástica murina
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MIT</b>	Instituto de Tecnología de Massachusetts

<b>MMP-9</b>	Metaloproteasa de matriz 9
<b>MMPIs</b>	Inhibidores de la metaloproteasa de matriz de amplio espectro artificial
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas de matriz
<b>MSC</b>	Células madre mesenquimales
<b>MSD</b>	Desplazamiento de mínimos cuadrados
<b>MT1-MMP</b>	Metaloproteasa tipo I
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NHDF</b>	Fibroblastos dermales humanos
<b>NHDF-GFP</b>	Fibroblastos dermales humanos unidos a la proteína verde fluorescente
<b>np</b>	Dirección secundaria
<b>OGM</b>	Medio de crecimiento de osteoblastos
<b>OP-1</b>	Proteína osteogénica 1
<b>p</b>	Dirección primaria
<b>P</b>	Tiempo de persistencia
<b>P<sub>p</sub></b>	Tiempo de persistencia en dirección principal
<b>P<sub>np</sub></b>	Tiempo de persistencia en dirección secundaria
<b>PAA</b>	Poliacrilamida
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDGF-BB</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB
<b>PDL</b>	Poli-D-lisina
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEO</b>	Óxido de polietileno
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PG</b>	Proteoglicanos
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-kinasa
<b>PRW</b>	Modelo de caminos aleatorios persistentes
<b>RGD</b>	Arginina-Glicina-Aspartato
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>S</b>	Velocidad de persistencia
<b>S<sub>np</sub></b>	Velocidad de persistencia en dirección secundaria

<b>S<sub>p</sub></b>	Velocidad de persistencia en dirección principal
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>TFM 3D</b>	Microscopía de fuerza de tracción tridimensional
<b>TG2</b>	Transglutaminasa 2
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TIMPs</b>	Inhibidores de metaloproteasas de matriz
<b>TRITC</b>	Tetrametil-rodamina-isotiocianato
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>WASP</b>	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich

---

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR  
EN LA MIGRACIÓN 3D  
DE FIBROBLASTOS Y OSTEÓBLASTOS HUMANOS**

---



# **1. INTRODUCCIÓN**

---

---



### **1.1. Migración celular**

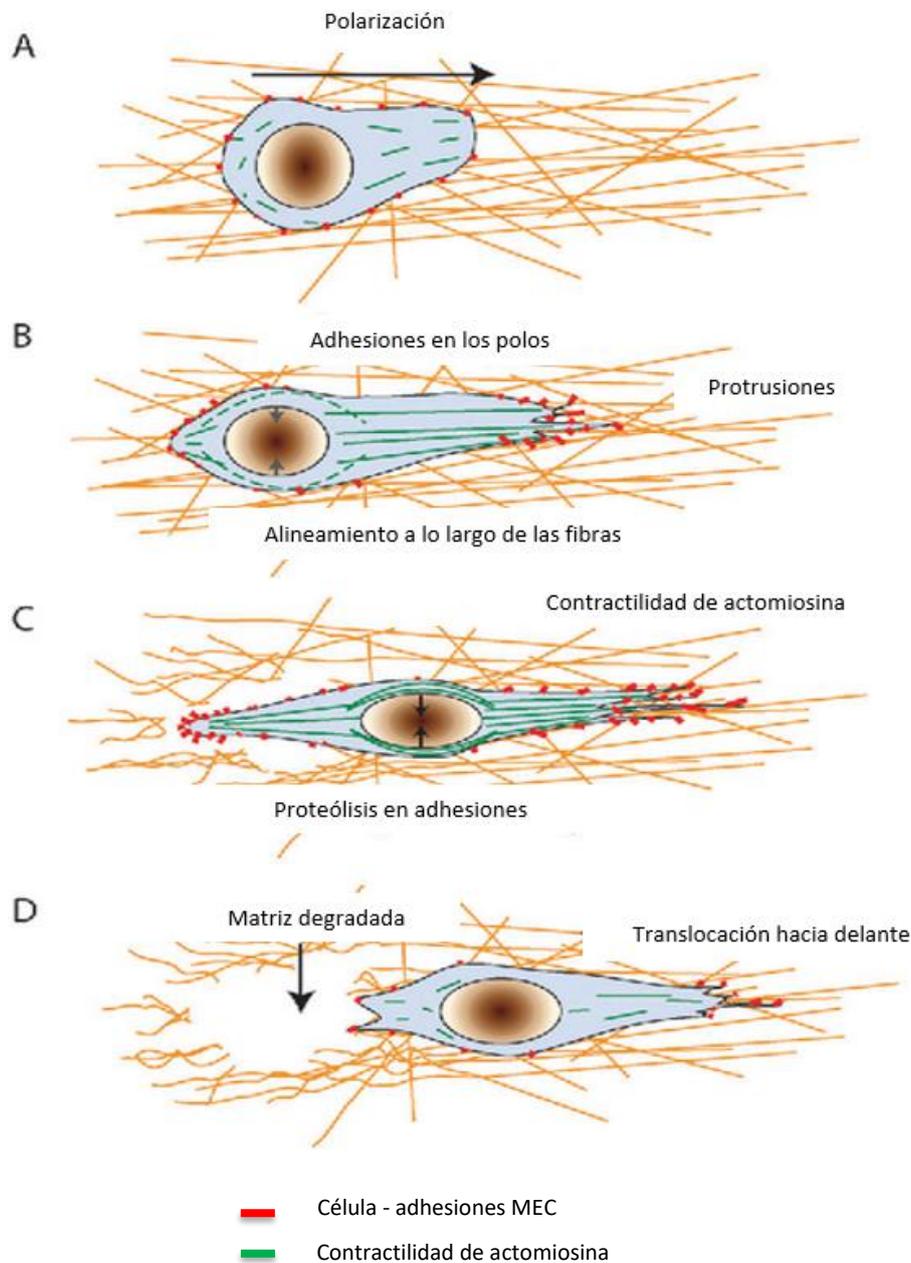
La migración celular es un proceso fundamental tanto en el desarrollo embrionario como a lo largo de la vida del organismo, formando parte de muchos procesos biológicos en condiciones fisiológicas, así como en diversas patologías. La migración celular está implicada en respuestas inflamatorias, en la formación de las capas germinales de un embrión, en cicatrización de heridas y en metástasis [1]. Este proceso complejo de migración está controlado por distintos mecanismos celulares que hacen posible el movimiento celular.

La migración celular se considera un proceso cíclico. Este ciclo comienza cuando la célula se polariza con implicación de rutas reguladoras complejas debidas a la recepción de señales externas, estímulos quimiotácticos, factores de crecimiento o proteínas de la matriz extracelular (MEC) que determinan la dirección del movimiento de la célula y son necesarias para el mismo [2]. Esta polarización genera una asimetría entre el frente de avance y el extremo posterior de la célula y, durante este proceso, se puede ver la formación de protrusiones y la retracción de las mismas. La célula interpreta la señal extracelular y el citoesqueleto cambia su dinámica en función del estímulo, provocando el crecimiento de protrusiones y el desplazamiento de la célula [3]–[5]. La polarización celular conlleva la extensión de procesos activos de membrana que definen el extremo guía como pueden ser lamelipodios, filopodios, protuberancias irregulares e invadopodios, que se explican con mayor detalle en el apartado 1.3.2 de protrusiones. Estas estructuras contribuyen a la migración de la célula y pueden coincidir en el frente de avance [6] variando en tamaño y forma según la dimensionalidad (2D, 3D) y la microestructura de su entorno extracelular, siendo en muchos casos indispensables para la motilidad celular. Posteriormente, gracias a receptores transmembrana, estas protrusiones se unen a las fibras de la matriz extracelular formando un complejo de adhesión focal (AF). La mayoría de los estudios relacionados con los complejos focales se han realizado con células en superficies 2D recubiertas de componentes de matriz extracelular. Este ambiente es muy diferente al fisiológico en el que se encuentran normalmente las células, donde están en contacto con múltiples componentes de matriz la extracelular con activación de diferentes integrinas y en un

entorno biofísico heterogéneo. Recientes estudios en matrices 3D, demuestran como las adhesiones focales tiene una composición, tamaño y señalización diferente, lo que conlleva un comportamiento migratorio distinto [7]–[9]. Las integrinas, que son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina y la célula, regulan esta unión entre los componentes de la matriz, las cuales se detallan en el apartado 1.2.1 de adhesión celular. El correcto establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular se requiere para el desarrollo y la homeostasis, tanto a nivel celular como multicelular. La polaridad celular en células con migración individual es dinámica, lo que permite a las células orientarse en entornos complejos. Las células que migran colectivamente pueden tener distintos estados de polaridad, dependiendo de la interacción con las otras células, de forma que su comportamiento es diferente si se encuentran como células líderes o en el interior de la capa celular [10], [11]. La pérdida de la polaridad celular es una de las características más importantes para la progresión tumoral [12]. La célula va avanzando, desacoplándose de la MEC mediante el uso de una combinación de adhesión y proteólisis. Las fibras se van desplazando a medida que la red de actina se expande, formando adherencias y escindiendo las fibras de la MEC, generando suficiente espacio para que la célula avance. Para la degradación de la matriz se requieren metaloproteasas (MMPs), sobre todo la metaloproteasa de membrana tipo 1 (MT1-MMP), que se encarga de la fragmentación del colágeno y de otras moléculas de la matriz haciéndolas accesibles para su degradación por gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) o serín proteasas [13]–[15]. A medida que la célula avanza y degrada la matriz, deja atrás una vía que puede servir como camino de migración para otras células (Figura 1.1) [16], [17].

Este proceso migratorio está regulado por proteínas GTPasas de la familia Rho que actúan sobre el citoesqueleto de actina para inducir cambios morfológicos característicos [18]. Las proteínas más estudiadas son Cdc42, Rac1 y RhoA. La activación de Cdc42 produce un incremento de filopodios y regula la polaridad celular [18], [19], mientras que Rac1 genera lamelipodios constituidos de filamentos de actina tanto ramificados como sin ramificar y ondulaciones de membrana [18], [20], [21]. Ésta también juega un papel importante durante la fase de secreción de proteasas, ya que su activación induce la expresión de MMPs [22]. La translocación celular llevada a cabo por la fuerza contráctil de la actomiosina está regulada por RhoA, controlando la fosforilación de la miosina. RhoA tiene que ser inhibida en la parte posterior para

desestabilizar las uniones de la célula a la matriz, a la vez, produce contracción del cuerpo celular mediante su interacción con la miosina (Figura 1.2) [20], [23].



**Figura 1.1. Pasos de migración celular en 3D**

(A) El proceso migratorio se inicia cuando la célula se polariza y se produce la formación de lamelipodios y filopodios en la zona donde avanza la célula. (B) Cuando la célula se extiende se forman nuevas adhesiones con las fibras de la matriz extracelular en la zona de avance de la célula. (C) Luego, el núcleo y el cuerpo celular se translocan hacia adelante debido a fuerzas contráctiles intracelulares y la degradación proteolítica de la matriz en las uniones célula-MEC. (D) Las adhesiones en la parte posterior se pierden y la célula avanza dejando un camino de fibras remodeladas. El núcleo se deforma para adaptarse al poro, y una vez que penetra en el poro, la célula puede avanzar. *Imagen adaptada de [24].*

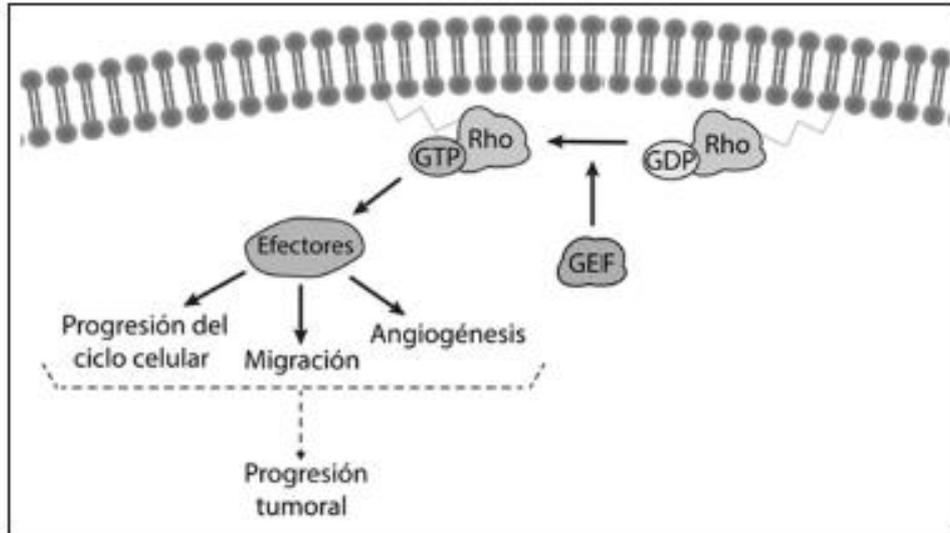


**Figura 1.2. Rho GTPasas y migración celular**

La familia de las Rho GTPasas: Cdc42, Rac y RhoA actúan en diferentes regiones en la célula (indicadas por las flechas) para llevar a cabo el proceso migratorio. Cdc42 generalmente controla la polaridad celular, la formación de los filopodios y adhesiones focales nacientes. Rac induce la extensión de lamelipodios y de adhesiones a la matriz extracelular. RhoA influye en la maduración de las adhesiones celulares y en la contracción de actomiosina en el cuerpo celular para impulsar la célula hacia adelante y para el desprendimiento de la parte posterior de la célula. *Imagen adaptada de [25].*

Las Rho GTPasas presentan dos estados conformacionales que dependen de su unión a GTP (activa) o GDP (inactiva) (Figura 1.3). Esta regulación depende de proteínas activadoras llamadas GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) que catalizan la unión de las proteínas a GTP. Estos GEFs presentan dominios catalíticos que catalizan la unión de las GTPasas a GTP, en el caso de RhoGEF es el dominio DH (dominio con homología a DBL) y unos de los mejores caracterizados son los de la familia Vav (Vav1, Vav2 y Vav3) [26]. Vav se ha implicado en la regulación de la proteína Rac1 y tienen un papel activador de la migración tanto en estado inhibido (células dendríticas) [27] como en estado activado (células epiteliales y fibroblastos) [28]. Se ha demostrado que mutaciones de Vav pueden disminuir la activación de Rac1, impidiendo así la migración de células en cultivo [29].

El proceso de migración celular en 3D y los mecanismos moleculares por los cuales las Rho GTPasas y sus activadores, los GEFs, regulan la migración celular en situaciones fisiológicas se deben estudiar en mayor profundidad, ya que es importante conocer las respuestas de las células en diferentes entornos celulares y a diferentes señales extracelulares.



**Figura 1.3. Funcionamiento de Rho GTPasas**

La activación de las Rho GTPasas está mediada por los factores intercambiadores de guanina. Variaciones en esta activación pueden producir desbalances en distintos procesos celulares, tales como progresión del ciclo celular, angiogénesis y migración, teniendo como consecuencia la progresión tumoral. *Imagen tomada de [30].*

### 1.1.1. Migración celular individual y colectiva

Existen dos formas de movimiento celular durante el desarrollo: la migración individual (ameboide o mesenquimal) y la migración colectiva (Figura 1.4). Estas formas de migración varían según la forma, la fuerza de adhesión y la velocidad de migración de la célula, así como de las uniones célula-célula. Es un gran desafío intentar resolver cómo las señales de orientación funcionan a nivel individual y a nivel colectivo.

Durante mucho tiempo se ha estudiado *in vitro* la migración de células individuales y se sabe que participan en muchos procesos fisiológicos *in vivo*, como el desarrollo, respuesta inmune y cáncer metastásico [31].

Es importante distinguir entre dos tipos de migración individual: ameboide y mesenquimal. La migración individual ameboide se caracteriza por ciclos de expansión y contracción del cuerpo celular, ya que estas células carecen de adhesiones focales y fibras de estrés [32], [33]. Esta migración se lleva a cabo principalmente, mediante la contractilidad de actomiosina regulada por la ruta de señalización de RhoA y por la inhibición de la actividad de Rac1 que impide la formación de lamelipodios [21], [34], como se ha mencionado anteriormente. Este tipo de migración no requiere la degradación de la matriz por metaloproteasas, aunque se ha visto que células con este

tipo de movimiento sí que las secretan para invadir a través de colágeno tipo I [35], [36]. Las células tumorales con migración ameboide adoptan una morfología redondeada en sustratos 3D. La protrusión típica que aparece en este tipo de movimiento es similar a una burbuja o ampolla, llamada *bleb* en inglés, generada por la presión desde el citoplasma. Esta presión generada por la contracción de actomiosina produce una entrada de citosol en la burbuja o ampolla y de este modo la protrusión se expande. Durante la retracción se regenera la corteza de actomiosina y la burbuja se retrae [37].

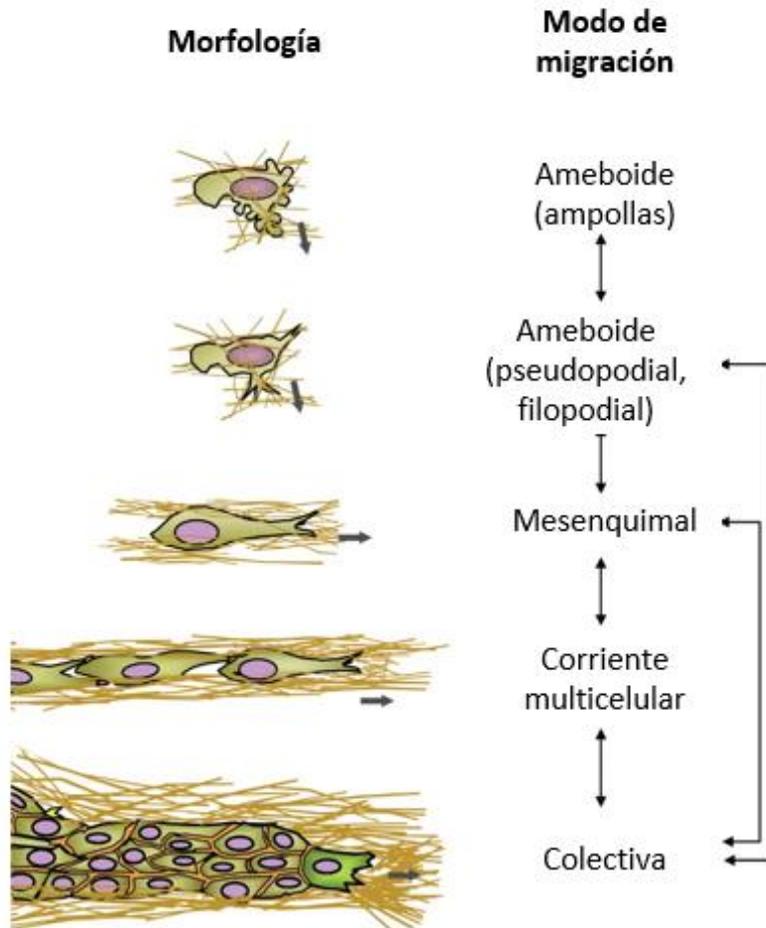
La migración mesenquimal se caracteriza porque las células adoptan una morfología alargada en forma de huso, siendo un proceso reversible utilizado por fibroblastos, mioblastos y muchas células cancerosas [38], [39]. La adhesión a la matriz extracelular que rodea las células está regulada por integrinas que funcionan como puntos de anclaje para la tracción y arrastre del cuerpo celular y por la degradación de la matriz extracelular por proteasas [40]. En modelos de migración 3D, los elementos básicos de este tipo de migración se mantienen: polarización, extensión de protrusiones en el frente de avance y adhesión, contracción del cuerpo celular, y liberación de adhesiones posteriores [41].

Los mecanismos de migración ameboide y mesenquimal son intercambiables dependiendo de los genes involucrados en la ruta de señalización (Figura 1.4). Estos procesos se conocen como transición mesenquimal-ameboide (MAT), o ameboide-mesenquimal (AMT). Estas transiciones se dan como respuesta a cambios específicos en el ambiente celular y requieren cambios rápidos en la célula [42].

Las células que se mueven individualmente pueden regularse por moléculas de adhesión célula-célula y agregarse, llevándose a cabo una transición de movilidad individual a colectiva [43].

La migración colectiva es el segundo modo principal de movimiento celular [43] y es altamente relevante en muchos tipos de células, especialmente aquellos relacionados con las células tumorales [44], [45], la cicatrización de heridas [46] y la remodelación de tejidos [47]. La migración colectiva se entiende como el movimiento de un grupo de células de forma coordinada, sin interrumpir por completo sus contactos célula-célula. La organización del citoesqueleto de actina genera tracción y protrusión para mantener las uniones célula-célula y es donde se puede modificar la matriz extracelular durante la migración [39]. Este tipo de migración es esencial para construir,

moldear y remodelar tejidos complejos y compartimentos de tejidos, como epitelios, conductos, glándulas y vasos, pero también contribuye a la progresión del cáncer por invasión local [39], [48].



**Figura 1.4. Tipos de migración celular y transiciones**

Las células pueden migrar individual o colectivamente como grupos multicelulares. Cada modo de migración se rige por un conjunto de mecanismos moleculares cuya regulación puede cambiar el estilo de migración. Los ejemplos más ampliamente estudiados para las alteraciones del modo de migración son la transición mesenquimal a ameboide y la transición colectiva a individual. Las flechas indican la dirección de la migración. *Imagen adaptada de [40].*

En la migración colectiva la adhesión célula-célula se define por proteínas de uniones adherentes tales como las cadherinas, miembros de la familia de las inmunoglobulinas e integrinas, las cuales se conectan directa o indirectamente a la actina o a los filamentos intermedios del citoesqueleto y proporcionan un acoplamiento mecánico y dinámico. La unión cadherina-cadherina entre las células puede ser rápidamente remodelada y esto permite a la célula cambiar su posición en el grupo [49],

[50]. La transición de migración colectiva a migración individual se desencadena por la unión de la proteína Rac1, que permite el desprendimiento de la célula de la matriz. Este proceso se ve facilitado por la regulación negativa de adhesión celular basada en la E-cadherina, que debilita las uniones celulares. Estos datos sugieren que la E-cadherina es un importante mediador en las interacciones célula-célula implicadas en la migración colectiva [51], [52]. En este tipo de migración a veces hay una conectividad intracelular bien establecida, pero otras veces el mecanismo de migración no tiene un patrón claramente definido. Las células pueden migrar coordinadamente, pero con una migración libre [53], [54].

Algunas formas de migración celular colectiva se caracterizan por la presencia de células líderes que perciben el microambiente para proporcionar orientación direccional a las células seguidoras [55]–[57]. En cualquier caso, es importante tener en cuenta que los modos de migración individual y colectiva son interconvertibles debido a que las uniones célula-célula pueden formarse y romperse nuevamente.

Los factores que pueden influir en la migración individual o colectiva son la adhesión célula-célula y célula-matriz, la señalización, la tasa de degradación de la matriz (ej. células epiteliales) y el nivel de oxígeno. En hidrogeles, reduciendo la tasa de degradación de la matriz, las células en migración individual se convierten en cadenas celulares invasivas similares a los brotes endoteliales. La migración colectiva ayuda a las células a superar la resistencia de la MEC y otras barreras a la migración moviéndose como una cuña en lugar de como células aisladas, aumentando así la eficiencia migratoria [58]. Por otro lado, la hipoxia activa el factor de transcripción de hipoxia (HIF) lo que puede llevar a una transición de migración colectiva a migración individual [59].

### **1.1.2. Mecanismos reguladores de la migración celular**

La comunicación entre células es un proceso esencial en la vida de los organismos. A diferencia de los sistemas de cultivo *in vitro*, donde las variables externas se pueden manipular fácilmente, no es fácil controlar las señales químicas y físicas que afectan a la migración celular *in vivo*, que son de naturaleza y funcionalidad variada. Los mecanismos moleculares de la señalización celular son diversos y consisten en redes de interacciones activadas en el interior de las células como respuesta a hormonas o

estímulos extracelulares. Las proteínas receptoras se encuentran en la membrana celular y a través de reacciones químicas con otras proteínas intracelulares participan en cascadas de señalización [60].

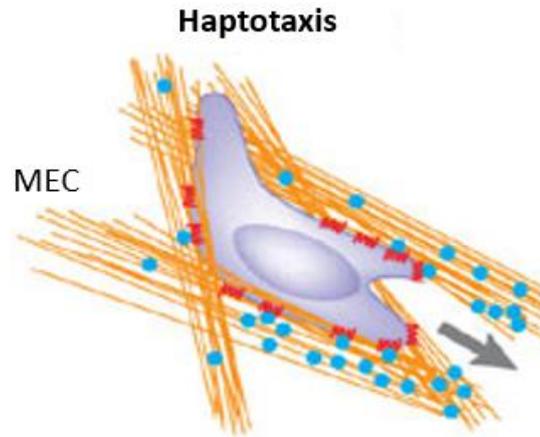
Diferentes mecanismos determinan la inducción extracelular de la migración, que incluyen factores químicos que pueden difundir libremente (quimiotaxis), unidos a las moléculas de la matriz extracelular (haptotaxis), lo que lleva a la señalización mediada por receptores y a la polarización de las células [61] o a la respuesta mecánica (durotaxis).

Para estudiar los mecanismos reguladores de la migración celular *in vitro* la microfluídica es una excelente herramienta, ya que ofrece un control del microentorno celular tanto físico como químico. La distribución de microcanales ha permitido generar gradientes mecanoquímicos precisos en los dispositivos microfluídicos durante periodos largos de tiempo [62].

#### **1.1.2.1. Haptotaxis**

La haptotaxis es un movimiento celular direccional en respuesta a las diferencias de adhesión en la matriz extracelular que rodea la célula (Figura 1.5) [63], [64]. La MEC se ve afectada por el tipo celular, la composición y el proceso de degradación proteolítica y por los tipos de integrinas expresadas por las células. Este tipo de movimiento celular desempeña un papel importante en varios procesos biológicos, como la cicatrización de heridas [65], [66] y la invasión de células tumorales [67], [68]. Se ha demostrado que gradientes de ligandos adhesivos inducen la migración celular dirigida en fibroblastos dérmicos humanos *in vitro* [69]. Sin embargo, la haptotaxis podría verse influenciada por la rigidez del sustrato que regula la migración de las células, ya que es un importante regulador del destino de las células madre [70], [71].

La haptotaxis es tal vez la forma menos entendida de migración direccional y los mecanismos moleculares de este proceso son poco conocidos. La haptotaxis probablemente involucre proteínas adhesivas y/o citoesqueléticas dado su papel en otros mecanismos de control migratorio como la quimiotaxis [72], la polaridad y la forma celular [73], [74].

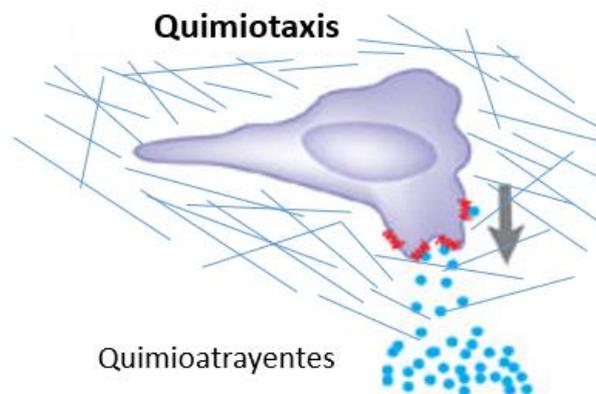


**Figura 1.5. Haptotaxis**

Haptotaxis inducida por gradientes de adhesión o por moléculas unidas a sustrato (principalmente citoquinas) que combina principios de orientación mecánica y química en el mismo proceso. *Imagen adaptada de [75].*

### 1.1.2.2. Quimiotaxis

La quimiotaxis es la capacidad de las células para detectar un gradiente químico y responder al mismo mediante migración direccional (Figura 1.6). Es un proceso esencial para el desarrollo celular y la curación de heridas, el cual desempeña un papel importante en el cáncer y en procesos inflamatorios o en las enfermedades autoinmunes [76], [77]. Las células detectan señales extracelulares mediante receptores de membrana, dando lugar a una respuesta al gradiente químico que se les aplica. Los cambios en la polimerización de la actina y la tensión de la membrana pueden regular la polarización celular y la formación de protrusiones en la dirección del gradiente químico [31], [78], [79].



**Figura 1.6. Quimiotaxis**

Las células se estimulan mediante un gradiente químico. *Imagen adaptada de [75].*

### 1.1.2.3. Durotaxis

La durotaxis es una forma de migración celular en la que las células se guían por los gradientes de rigidez, donde las propiedades estructurales diferenciales de la matriz extracelular determinan estos gradientes (Figura 1.7). La capacidad de las células para sentir estos gradientes de rigidez es fundamental en el proceso de migración celular y se relacionan con el desarrollo, la cicatrización de heridas y la invasión colectiva de las células cancerosas [55], [80], [81]. La durotaxis colectiva es mucho más eficiente que la unicelular y se transmite a partir de fuerzas físicas contráctiles a través de las uniones célula-célula [78]. La mayoría de las células migran hacia zonas de mayor rigidez. La mayor parte de los estudios realizados hasta ahora han utilizado células aisladas individuales, sin embargo, los mecanismos de migración colectiva en durotaxis todavía no están claros. En cualquier caso, la durotaxis colectiva es muy importante y se ha demostrado que cuanto mayor es el grupo de células, más eficiente es su movimiento [82]. Además, la velocidad de migración celular en durotaxis no depende de la rigidez del sustrato, sino tanto del gradiente de rigidez del mismo [83].

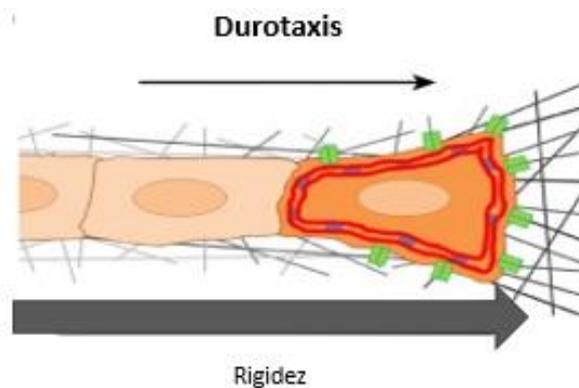


Figura 1.7. Durotaxis

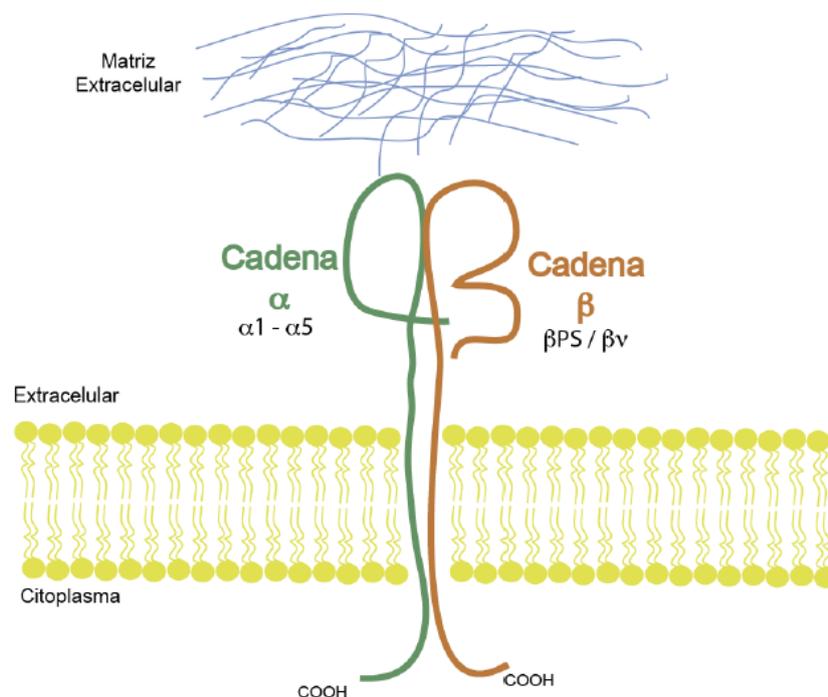
Los grupos celulares pueden ejercer fuerzas de tracción detectando y siguiendo mecánicamente los gradientes de rigidez de la matriz para guiar la migración celular, un proceso que depende de la señalización de adhesión y la actomiosina. *Imagen adaptada de [55].*

## 1.2. La adhesión celular y la matriz extracelular

### 1.2.1. La adhesión celular

La adhesión celular es la capacidad de una célula para adherirse a otra célula o a una matriz extracelular. Los sitios de adhesión están formados por proteínas

transmembrana llamadas moléculas de adhesión celular (CAMs). Entre estas proteínas se encuentran las integrinas que son proteínas heterodiméricas formadas por dos subunidades, una  $\alpha$  y una  $\beta$  [84], y las moléculas de adhesión que están unidas a filamentos de actina, a través del complejo de adhesión focal (AF) (Figura 1.8) [85]. La capacidad de las integrinas para unirse a moléculas de la matriz extracelular y al citoesqueleto facilita una continuidad estructural mecánica entre el interior y el exterior de la célula, facilitando la transmisión de fuerzas, pero además permite modificar el comportamiento celular en función de las moléculas presentes en la matriz extracelular, es decir, actúan como receptores. Después de la unión, las integrinas se agrupan en complejos de AFs que transmiten fuerzas de tracción y adhesión [86], [87]. La adhesión celular es importante para activar determinadas señales que pueden cambiar la expresión génica y como consecuencia el comportamiento celular, siendo por lo tanto muy importante en el desarrollo y mantenimiento de tejidos. Esta adhesión participa en señales que regulan la diferenciación celular, el ciclo celular, la migración y la supervivencia celular [88], [89]. Las células tumorales se caracterizan por cambios en la adhesividad a la MEC, que pueden relacionarse con el potencial invasivo y metastásico.



**Figura 1.8. Esquema de la estructura de las integrinas**

Las integrinas están compuestas por dos subunidades diferentes (heterodímero): subunidad alfa y subunidad beta que forman un complejo no covalente. Cada subunidad contiene un gran dominio extracelular y otro pequeño citoplasmático. *Imagen tomada de [90].*

### 1.2.2. La matriz extracelular

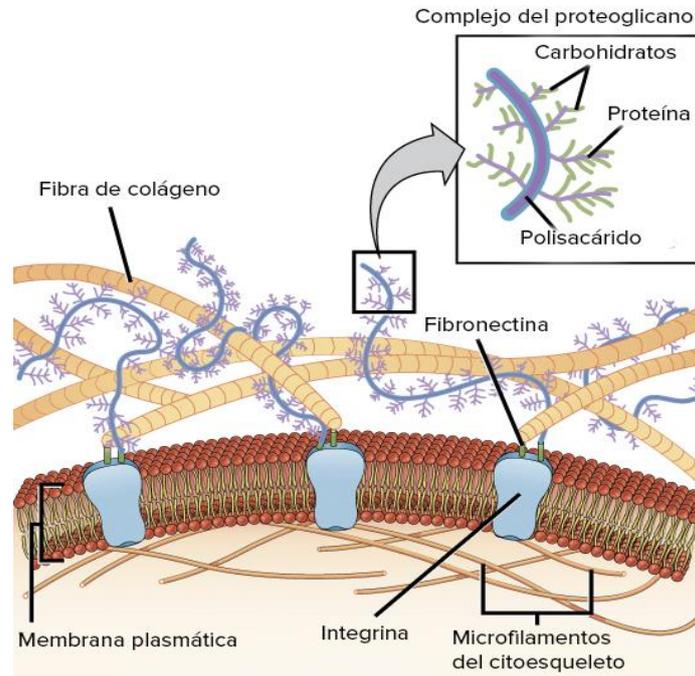
La matriz extracelular es una parte esencial del entorno de las células en los tejidos conectivos cuya composición es específica, siendo capaz de generar un ambiente definido para cada tejido y para las distintas células del cuerpo. La matriz extracelular está presente desde el desarrollo embrionario y durante toda la vida del organismo [91]. Además de sus funciones estructurales y mecánicas, las moléculas de la MEC regulan diversas funciones celulares y desempeñan un papel importante en varios procesos fisiológicos y patológicos, como el desarrollo embrionario, la inflamación y cicatrización de heridas, homeostasia, fibrosis de diversos órganos, el crecimiento tumoral y metástasis, y la angiogénesis [92], entre otros.

Varios tipos de células (epiteliales, fibroblastos, células inmunes y células endoteliales) sintetizan y secretan macromoléculas de matriz bajo el control de múltiples señales que participan en la formación de la MEC. Los principales componentes de la MEC son proteínas formadoras de fibras, como colágenos, elastina, fibronectina (FN), lamininas, glucoproteínas, proteoglicanos (PG) y glucosaminoglicanos (GAG), que son moléculas altamente ácidas e hidratadas.

En la mayoría de los tejidos, el colágeno formador de fibrillas tipo I y principalmente el colágeno del cartílago tipo II son los componentes principales de las MECs. Se asocian con otros colágenos, así como con proteínas de la MEC y proteoglicanos para construir estructuras fibrilares grandes. Estas estructuras multimoleculares están interconectadas con moléculas de la matriz extracelular, que también se asocian entre sí, construyendo la compleja red de la matriz tridimensional (Figura 1.9) [93].

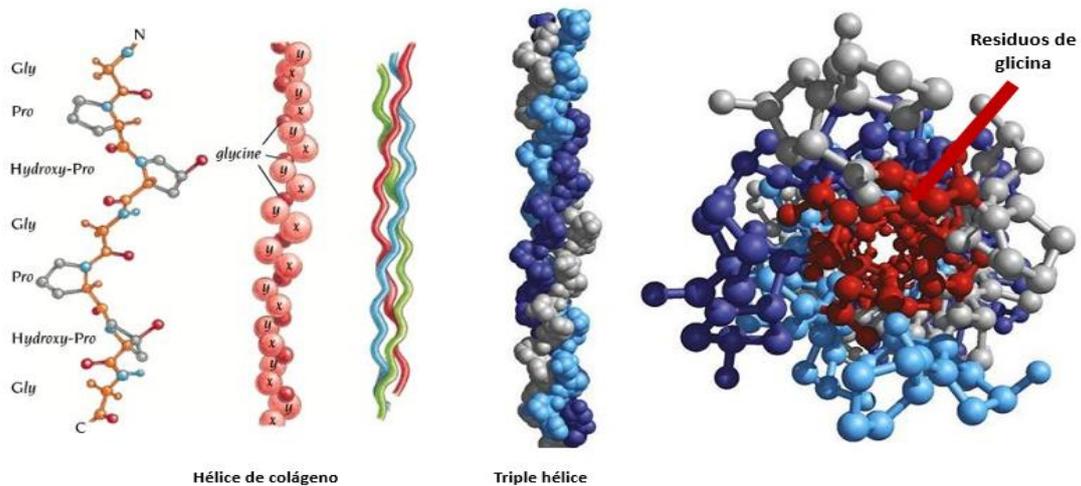
Las proteínas estructurales más abundantes son el colágeno en un 90% (del cual el 95% es de tipo I y el 5% del tipo V) y las fibras elásticas como la elastina, que permite que los tejidos recuperen su forma original tras una distensión mecánica. El colágeno tiene una composición donde abunda el aminoácido glicina y otros menos comunes como son la prolina y la hidroxiprolina, y puede organizarse formando fibras, mallas o especializarse en formar uniones entre moléculas (Figura 1.10). La malla formada por estas proteínas participa en muchos mecanismos celulares como son la diferenciación, la adhesión celular, la forma celular y la migración celular [94]–[97]. La síntesis y

producción de estos componentes la llevan a cabo los fibroblastos [98], [99], los condrocitos [100] y los osteoblastos [101].



**Figura 1.9. Matriz extracelular**

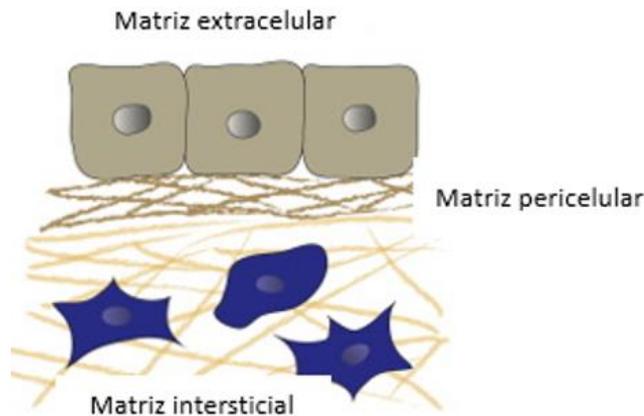
En la matriz extracelular, las fibras de colágeno se entretajan con proteoglicanos que tienen carbohidratos unidos a ellos, como el esqueleto de polisacáridos. La matriz extracelular también contiene otros tipos de proteínas y carbohidratos. Está conectada con las células que rodea a través de integrinas que se encuentran en la membrana plasmática. Las moléculas de fibronectina pueden actuar como puentes entre las integrinas y otras proteínas de la matriz extracelular como el colágeno. *Imagen tomada de [102].*



**Figura 1.10. Estructura de la triple hélice de colágeno**

La molécula de colágeno consiste en tres cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene el aminoácido no polar glicina situado en cada tres posiciones. Esta estructura permite que las cadenas se enrollen entre sí generando una larga triple hélice regular (tropocolágeno). *Imagen adaptada de [103].*

Las matrices extracelulares se pueden clasificar en dos tipos principales que varían en composición y estructura: las matrices intersticiales y las pericelulares (Figura 1.11). Las matrices intersticiales rodean las células y determinan las características principales de un tejido conectivo, mientras que las matrices pericelulares están en contacto cercano con las células [104].



**Figura 1.11. Tipos de matrices extracelulares**

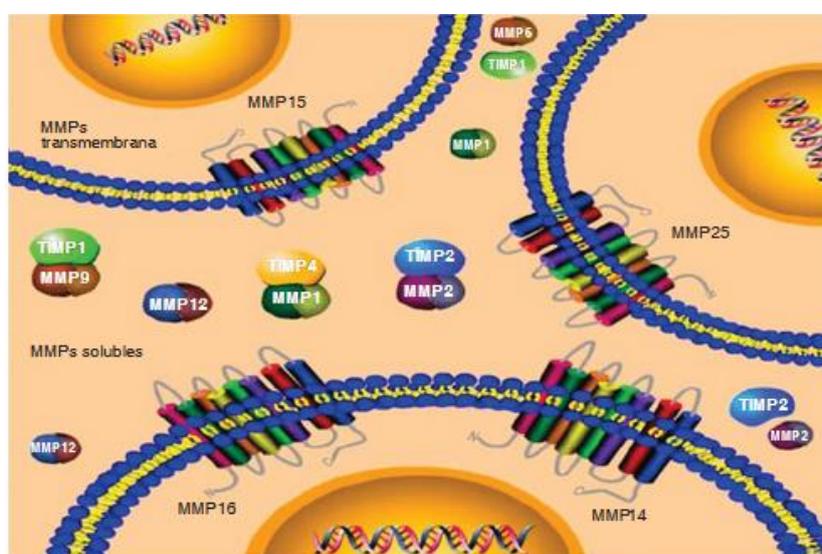
Las matrices extracelulares se clasifican en dos tipos principales: intersticiales y pericelulares. *Imagen adaptada de* [104].

La membrana basal es un tipo de matriz pericelular que se encuentra entre las células epiteliales y el tejido conectivo. Esta capa está formada por una red de colágeno tipo IV que se asocia con otros componentes de la MEC incluyendo laminina, nidogen, perlecan y otros tipos de colágeno. Las células epiteliales están ancladas a las membranas basales por hemidesmosomas formados por interacciones de integrinas con lamininas [105]. Las matrices intersticiales están compuestas por fibras de colágeno, elastina, proteoglicanos y ácido hialurónico secretados y por proteínas matricelulares que no contribuyen directamente a la formación de elementos estructurales de la matriz, pero modulan las funciones celulares y la interacción entre la célula y la matriz extracelular [106], [107]. Estas moléculas interactúan entre sí creando una red tridimensional dinámica y compleja. La migración celular a través del tejido intersticial es un proceso que se produce por interacción de la célula y la MEC a través de sus receptores de superficie localizados en la membrana plasmática [108].

Las células perciben las propiedades mecánicas y las convierten en respuestas biológicas a través del citoesqueleto mediante fuerzas de tracción, modificando la tensión celular e iniciando una cascada de señales [109]–[111]. Las variaciones en la

composición y estructura de los componentes de la MEC afectan tanto a la estructura general como a las propiedades biomecánicas de la red formada, pero también a las señales transmitidas a las células que modulan sus respuestas. Los factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas se depositan dentro de la MEC mediante la unión a moléculas específicas de la matriz, como los proteoglicanos que se encuentran en compartimentos intracelulares y en la superficie de la célula, pero son también abundantes en las matrices extracelulares. Estos factores de crecimiento se pueden liberar y operar en el momento fisiológicamente relevante para el desarrollo después de la degradación de la MEC, uniéndose a receptores de factores de crecimiento específicos y activando varias vías de señalización [112], [113].

La matriz extracelular es una estructura altamente dinámica que está siendo remodelada constantemente por las células mediante metaloproteasas de matriz (MMPs), cuya misión es degradar las proteínas integrantes de la MEC en su ambiente y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión y por inhibidores de tejido de las metaloproteasas de matriz (TIMPs) (Figura 1.12) [114], [115].

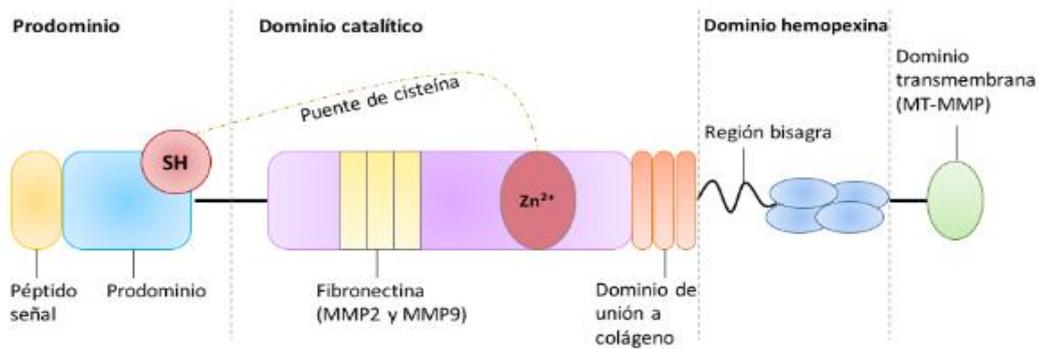


**Figura 1.12. Esquema representativo de las MMPs**

Las MMPs son enzimas que degradan componentes de la MEC y participan en el mantenimiento y remodelación de tejidos. Se encuentran asociadas a la membrana plasmática, o en forma soluble. En condiciones fisiológicas la actividad de las MMPs está regulada por inhibidores endógenos de metaloproteasas tisulares (TIMPs), que actúan a través de su unión directa y reversible al dominio catalítico de las MMPs. La imagen muestra una representación de algunos miembros de esta familia de proteínas. *Imagen tomada de [116].*

Las MMPs se sintetizan como zimógenos inactivos, donde un residuo de cisteína en el prodominio forma un puente con el zinc en el dominio catalítico, y evita la actividad

enzimática (Figura 1.13). Son activadas a pH neutro o ligeramente alcalino y participan en procesos de remodelación tisular, crecimiento y reabsorción ósea, cicatrización de heridas, invasión tumoral y metástasis, entre otros [117]. La capacidad degradativa de las MMPs se puede controlar por inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIM) que son capaces de bloquear la invasión tumoral tanto *in vivo* como *in vitro* [114].



**Figura 1.13. Estructura de una metaloproteasa**

Presenta 4 dominios principales: Prodominio, dominio catalítico, dominio hemopexina y dominio transmembrana. *Imagen tomada de [118].*

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc formada por más de 25 MMPs humanas, capaces de degradar los componentes esenciales de la matriz [119], [120]. Según la estructura de su dominio se pueden dividir en ocho clases, tres de las cuales están unidas a la membrana. Las MMPs pueden degradar colectivamente la mayoría de los componentes de la MEC, incluidos los colágenos desnaturalizados (colagenasas) o los parcialmente degradados (gelatinasas), lamininas, así como moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento, a través de los cuales también influyen en la señalización celular y en su función (Tabla 1.1).

Estudios recientes, además de los llevados a cabo en este trabajo, sobre la estructura y composición de la MEC indican que modificaciones en la misma afectan a las células que están en su entorno. La remodelación de la matriz normalmente es un proceso controlado, pero cuando este proceso se ve alterado puede resultar en un ambiente favorable para el desarrollo y la progresión de enfermedades. Por lo tanto, la mejor comprensión de las propiedades de la MEC y de las actividades biológicas de las células ayudará a desarrollar nuevas intervenciones terapéuticas dirigidas para el tratamiento de enfermedades [104].

**Tabla 1.1. Clasificación de las MMPs**

Tabla adaptada de [121].

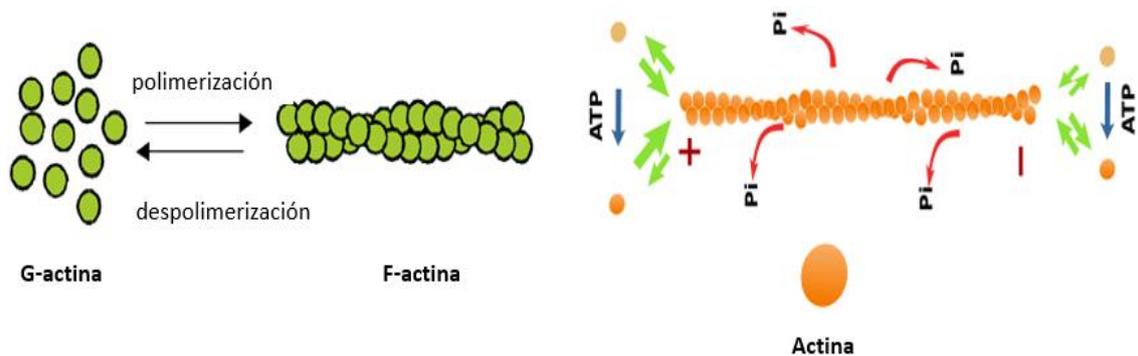
CLASIFICACIÓN	NÚMERO DE MMP	NOMBRE COMÚN
<b>Colagenasas</b>	MMP-1	Intersticial, colagenasa 1, colagenasa de vertebrados
	MMP-5	Colagenasa 3/4, colagenasa tisular y tipo 4, gelatinasa A
	MMP-8	Colagenasa del neutrófilo, colagenasa 2
	MMP-13	Colagenasa 3, colagenasa rata
	MMP-18	Colagenasa 4
	MMP-19	RASI-1, RASI-6, MMP19
<b>Gelatinasas</b>	MMP-2	Gelatinasa A, colagenasa 3/4, colagenasa tisular, colagenasa tipo 4
	MMP-9	Gelatinasa B, gelatinasa del macrófago gelatinasa del neutrófilo, colagenasa tipo 5, colagenasa tipo 4
<b>Estromelisinasa Matrilisinasa Metaloelastasa</b>	MMP-3	Estromelisinasa 1, colagenasa activadora de proteína y procólagenasa, proteoglicanasa, transinasa
	MMP-10	Estromelisinasa 2, tansinasa 2
	MMP-11	Estromelisinasa 3
	MMP-7	Matrilisinasa, matrinasina, melaloproteinasa-1 metaloendopeptidasa uterina
	MMP-26	Matrilisinasa, endometasa
	MMP-12	Elastasa del macrófago, metaloelastasa
<b>Metaloproteasas tipo membrana</b>	MMP-14	Metaloproteasa de la Matriz tipo 1, MT1-MMP, membrana tipo 1
	MMP-15	Metaloproteasa de la Matriz tipo 2, MT2-MMP, SMCP-2, membrana tipo 2
	MMP-16	Metaloproteasa de la Matriz tipo 3, MT3-MMP, metaloproteasa ovárica
	MMP-17	Metaloproteasa de la Matriz tipo 4, MT4-MMP, membrana tipo 4
	MMP-24	Metaloproteasa de la Matriz tipo 5, MT5-MMP
	MMP-25	Metaloproteasa de la Matriz tipo 5, MT6-MMP, leucolisina
<b>Otras</b>	Envelisinasa	No reportado
	MMP-20	Enamelisinasa
	MMP-21	Metaloproteasa de la Matriz 21, XMMP (Xenopus)
	MMP-22	Metaloproteasa de la Matriz 22, MMP-27 (Homo sapiens)
	MMP-23	Metaloproteasa de la Matriz 23, CA-MMP, proteína MIRF (Homo sapiens)
	MMP-28	Epilisinasa
	MMP-4	Telopectidasa
	MMP-6 (MMP-3)	MMP ácida

### 1.3. El citoesqueleto y la movilidad celular

#### 1.3.1. El citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina es responsable del funcionamiento de numerosos procesos vitales, como la migración, el transporte intracelular y la citocinesis. Los filamentos de actina constituyen la columna vertebral física de una protuberancia. Su polimerización y organización también determinan la forma general de la célula y contribuyen a su organización interna. Los filamentos de actina están formados por monómeros de actina globular (G)-actina que se polimerizan en un proceso catalizado por hidrólisis de ATP. Durante el proceso de polimerización, el ATP unido a la (G)-actina se hidroliza a ADP·Pi a medida que se forma el enlace entre los dos monómeros. En la actina filamentosa (F), ADP·Pi-actina forma filamentos estables y la liberación del fosfato desestabiliza la estructura, provocando la despolimerización (Figura 1.14) [122], [123].

Al igual que los microtúbulos, los filamentos de actina se polarizan intrínsecamente, lo que refleja la estructura orientada de la cabeza a la cola de los monómeros constituyentes, y muestran un extremo de púas de rápido crecimiento, donde se incorporan nuevos monómeros y un extremo con punta, que representa el origen del filamento en crecimiento y muestra el envejecimiento del filamento (unido a ADP solo) [123], [124].



**Figura 1.14. Polimerización y despolimerización de actina**

El filamento de actina presenta disposición helicoidal de las proteínas de actina. Estos filamentos son estructuras polarizadas (extremo positivo y negativo). Las constantes de asociación y disociación de la actina son diferentes en los dos extremos (flechas verdes). Las proteínas ATP-actina libres se unen al microfilamento por polimerización y después de un tiempo el ATP se hidroliza liberando Pi y produciendo proteínas ADP-actina. La forma ADP-actina constituye la mayoría del filamento. *Imagen adaptada de [125].*

Los filamentos de actina adoptan diferentes morfologías según el número de filamentos y el tipo y número de proteínas de unión a actina que se asocian con ellos. Las proteínas de unión a actina, como las miosinas, las  $\alpha$ -actininas, las filaminas y otras, tienen actividad de reticulación y pueden organizar los filamentos de actina en haces o en una red ramificada y la consiguiente organización puede dar lugar a diferentes estructuras celulares.

En situaciones de reposo celular, el citoesqueleto de actina se encuentra continuamente remodelándose gracias al equilibrio entre polimerización y despolimerización sin producirse cambios en los niveles de F-actina [126]. En este estado activo basal la célula es capaz de responder a señales externas que requieren una reorganización celular mediada por el citoesqueleto de actina que es esencial para la migración celular.

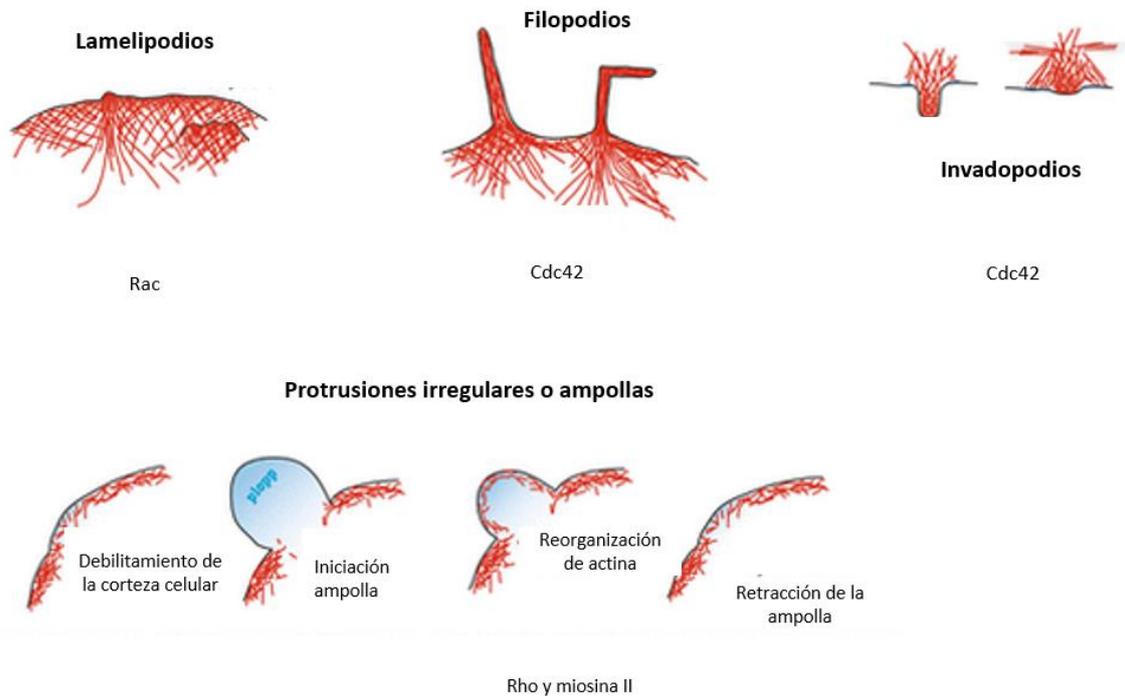
### **1.3.2. Protrusiones**

Las protrusiones implican la extensión de las membranas celulares y se clasifican de acuerdo con la estructura del frente celular en los distintos modos de migración. Estas protrusiones se llaman lamelipodios, filopodios, protuberancias irregulares e invadopodios y son las responsables del movimiento celular, como se ha mencionado en el apartado 1.1 de migración celular. Cada una de estas estructuras contribuye a la migración dependiendo de las circunstancias específicas, y la actina es una molécula importante presente en estas prolongaciones (Figura 1.15).

Los lamelipodios son protuberancias principales impulsadas por la polimerización de actina y adhesión de integrina [127] que apuntan en el sentido del movimiento pero que no sólo avanzan hacia delante, sino que también los bordes exploran lateralmente el entorno junto al eje principal de la célula y pueden extenderse a largas distancias a través de la matriz extracelular *in vivo* [39]. Son activados por la GTPasa Rac, que transmite señales a las proteínas WAVE y WASP que a su vez estimulan el complejo Arp2/3, el cual participa en la nucleación y ensamblaje de la actina [128].

Los filopodios son extensiones de actina y pueden extenderse grandes distancias hacia los lados, exploran el ambiente celular y son particularmente importantes para

guiar el crecimiento de las neuronas y para la angiogénesis de los vasos sanguíneos [129]–[131]. La Rho GTPasa Cdc42 regula la dinámica de estos filopodios [127], [128].



**Figura 1.15. Protrusiones celulares y Rho GTPasas**

La formación de protrusiones celulares está regulada por la familia de las Rho GTPasas. Rac controla el ensamblaje de actina y la formación de lamelipodios. Cdc42 actúa en la formación de filopodios e invadopodios, controlando la polaridad celular, y la activación de Rho induce la contractilidad de la miosina II, regulando la formación de las protrusiones irregulares o ampollas. La figura muestra representaciones gráficas de la morfología de estas protrusiones. *Imagen adaptada de [132].*

Los invadopodios son protrusiones que permiten la degradación de la matriz extracelular [14], [133], probablemente mediante la facilitación de la invasión a través del tejido por medio de MMP-1 (Metaloproteasa de membrana tipo I) [134], [135]. Estas protuberancias están presentes en células cancerosas y se relacionan con la invasión y metástasis. La principal Rho GTPasa que está involucrada es la Cdc42 [128].

Las protuberancias irregulares o ampollas son protrusiones de membrana esféricas que son producidas por contracciones de la miosina II y parece ocurrir en ausencia de conjuntos de actina [39], [136]. Estas estructuras contribuyen a la migración de la célula que se describe ocasionalmente como migración ameboidea y se observa en ambientes 3D [37], [137]. La presión hidrostática es la que regula este tipo de migración y no la polimerización de actina. El ensamblaje de actina se produce en las últimas etapas de la protrusión para proporcionar estabilidad a las ampollas (llenado de la ampolla, que

luego evoluciona en un filopodio o lamelipodio), o para retraerla nuevamente dentro de la membrana celular. Estas protuberancias se han relacionado con el establecimiento de la dirección de la migración celular durante el desarrollo y enfermedades [138]. Recientemente se han descrito en células tumorales, células de *Dictyostelium in vitro* y varios tipos celulares *in vivo* [136]. Estas protuberancias se vinculan a altos niveles de señalización de RhoA/ROCK [128].

La protuberancia generalmente se produce en respuesta a señales quimioatrayentes en el microambiente que son detectadas por la célula; por ejemplo, las amebas migratorias responden al AMP cíclico, mientras que los leucocitos son inducidos a moverse hacia las citoquinas proinflamatorias liberadas por el tejido lesionado. Sin embargo, algunas células extienden las protuberancias de forma exploratoria, en ausencia de estimulación direccional [139]. De esta forma, las células pueden detectar el entorno para llevar a cabo la migración.

Estos diferentes tipos de protrusiones pueden coexistir en el frente de avance; así por ejemplo se han observado en la migración de las células en el pez cebra durante la gastrulación [6]. Muchas moléculas y vías de señalización coordinan la migración celular, pero el citoesqueleto de actina y su dinámica participan en todos los tipos de protrusiones.

La formación de protrusiones requiere la integración de varios procesos celulares. La fuerza para la deformación de la membrana la proporciona el citoesqueleto de actina, cuya polimerización dinámica empuja la membrana hacia adelante. La propia membrana se expande bajo tensión, un proceso que requiere el tráfico de membranas y la fusión de vesículas que contienen membranas para soportar el aumento de la superficie de la membrana. Finalmente, las protuberancias deben adherirse a la matriz extracelular mediante adhesiones focales en el frente de avance de la célula y la parte posterior debe retraerse para permitir el movimiento celular. Si no se adhieren, las protuberancias son improductivas y tienden a moverse hacia atrás en ondas en respuesta a la tensión generada en la célula, en un proceso conocido como "ondulación de la membrana". En este proceso participa la familia de las Rho GTPasas, en concreto la proteína Rho, la cual se inhibe para que la célula se pueda mover al interactuar con la miosina [20], [23], [140].

En resumen, la mayoría de las protrusiones son el resultado de la polimerización y reorganización de la actina activa y la extensión dirigida de la membrana. La adhesión desempeña un papel clave en las protrusiones proporcionando tracción para que las extensiones de la membrana se vuelvan estables y regulando los componentes de señalización que controlan la reorganización de la actina, la endocitosis y la exocitosis de la membrana.

#### **1.4. Papel de la migración celular en la regeneración de tejidos**

Las células reciben señales desde el entorno que las rodea y cada señal puede iniciar o modular una serie de respuestas que deciden qué sucederá con la célula. Estas células interactúan con el ambiente que las rodea y se organizan en tejidos y órganos.

La medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos se incluyen en una nueva rama de la medicina que intenta cambiar el curso de las enfermedades crónicas y, en muchos casos, regenera los sistemas orgánicos que fallan debido a la edad, enfermedades, daños o defectos genéticos. El cuerpo humano utiliza sus propios mecanismos para restaurar, mantener o mejorar los tejidos dañados reemplazando las funciones biológicas. Para ello utiliza células madre que son las encargadas de la renovación celular y se pueden diferenciar en distintos tipos de células o en un tipo celular con una función especializada.

Una ingeniería de tejidos exitosa es indispensable para crear un ambiente artificial que permita a las células estimular la regeneración de tejidos [141]. La recreación del entorno se puede lograr utilizando materiales biológicos externos combinados con factores de crecimiento. Los factores de crecimiento a menudo son necesarios para promover la regeneración de los tejidos, ya que pueden estimular la formación de vasos sanguíneos, que suministran oxígeno y nutrientes a las células trasplantadas para reemplazar el órgano y mantener sus funciones biológicas [142]. Estos requisitos no solo son importantes para la migración celular, sino también para suministrar nutrientes y eliminar las moléculas de desecho. El desafío en la ingeniería de tejidos es desarrollar una arquitectura tridimensional organizada con características funcionales que imiten la matriz extracelular.

Los mecanismos celulares y moleculares que sustentan la reparación del tejido y su incapacidad para sanar aún no se conocen bien, y las terapias actuales son limitadas. La mala cicatrización de heridas después de traumas, cirugías, enfermedades agudas o enfermedades crónicas afecta a millones de personas en todo el mundo cada año y es consecuencia de elementos mal regulados de la respuesta de reparación de tejidos sanos, que incluyen inflamación, angiogénesis, depósito de matriz y reclutamiento de células. El fallo de uno o varios de estos procesos celulares generalmente se relaciona con una condición clínica subyacente, como una enfermedad vascular, diabetes o envejecimiento, que con frecuencia se asocian con patologías curativas. La búsqueda de estrategias clínicas que puedan mejorar los mecanismos de reparación naturales del cuerpo deberá basarse en un conocimiento profundo de la biología básica de reparación y regeneración tisular [143].

#### **1.4.1. Curación de heridas**

La reparación de heridas implica la regeneración parcial del tejido original, con hiperproducción de colágeno organizado, que puede conducir a la producción de tejido nuevo con un 80% de similitud al tejido original. Cualquier herida dérmica en un humano adulto, provocará cicatrices [144].

Los fibroblastos son las células más abundantes en la dermis. Su principal función se relaciona con el mantenimiento del tejido conectivo, el cual está formado por fibras (colágenas, reticulares y elásticas) y la matriz extracelular. Los fibroblastos mantienen la matriz extracelular de los tejidos, sintetizando ciertos compuestos que la componen, en estado de precursores y también algunas fibras. Pero no solamente los sintetizan, también son capaces de fagocitar algunos de estos componentes en procesos de remodelación tisular [145]. El proceso de síntesis y remodelación de la matriz extracelular que llevan a cabo los fibroblastos, lo realizan a través de la producción de una amplia variedad de enzimas pertenecientes a la familia de las metaloproteasas. Estas enzimas son la colagenasa intersticial, la gelatinasa A, las proteoglicanasas, las glicosaminoglicanasas y los inhibidores tisulares de las metaloproteasas, las cuales participan en la síntesis de diversas sustancias como las colagenasas del tipo 1 y 3, fibras elásticas, fibronectina, proteoglicanos, glicoproteínas, proteínas y proteasas. Un defecto

en la remodelación de la matriz extracelular da lugar a lesiones cutáneas crónicas que no responden a tratamientos. La deposición anormal de colágeno bloquea la acción de los fibroblastos y la reepitelización se detiene, lo que resulta en un proceso inflamatorio que se convierte en crónico debido a las citoquinas presentes que impiden la curación de la lesión.

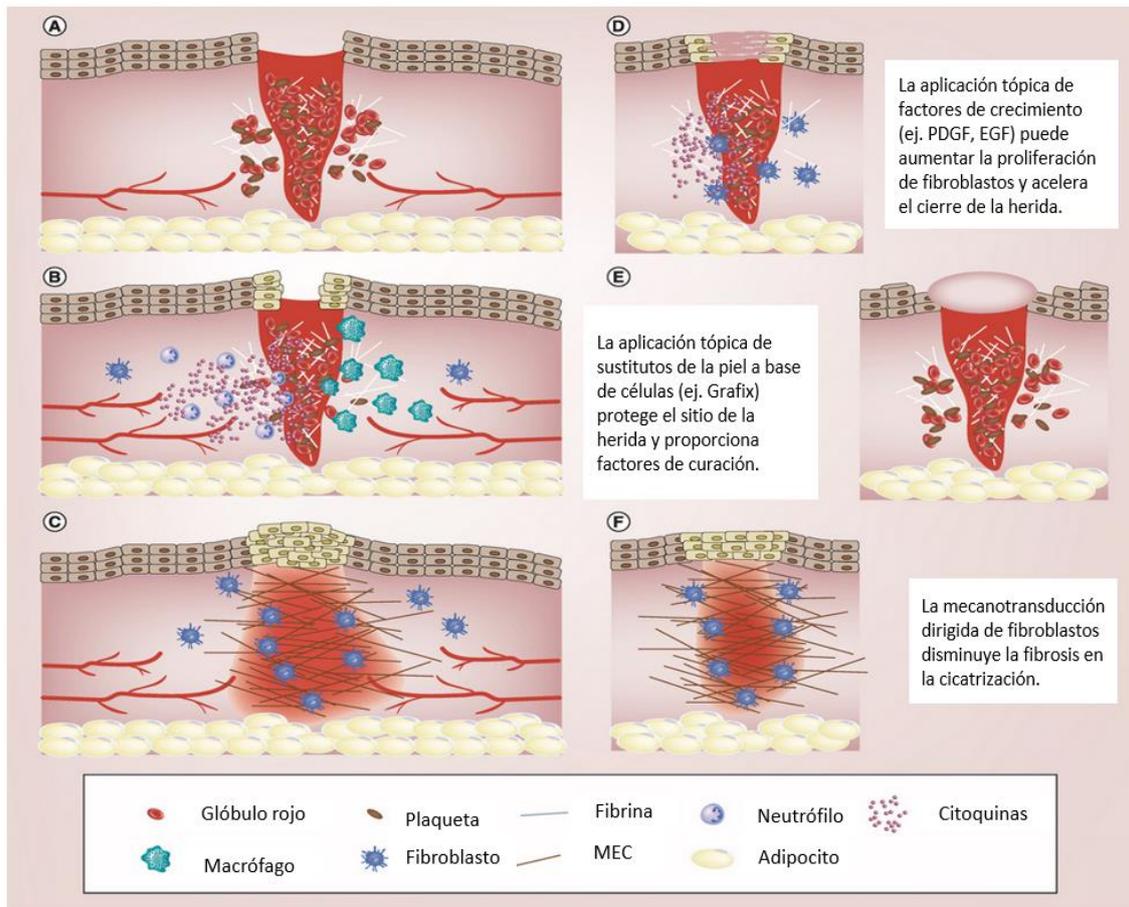
En una lesión cutánea, después de la hemostasia donde las plaquetas entran en contacto con el colágeno activando la enzima trombina que inicia la formación de una malla de fibrina para formar un coágulo estable, comienza la cicatrización de heridas. Este proceso ocurre en tres etapas complejas: proceso inflamatorio, proliferación celular y remodelación de la matriz extracelular (Figura 1.16A–C) [146]. Los fibroblastos son críticos en las tres fases, desempeñando un papel clave en el depósito de componentes de la MEC, la contracción de la herida y la remodelación de la nueva MEC.

El proceso inflamatorio, llevado a cabo por neutrófilos, se enfoca en destruir bacterias y eliminar residuos para preparar la herida para el crecimiento de nuevo tejido. Los neutrófilos desaparecen y los macrófagos continúan limpiando y secretando factores de crecimiento y proteínas que atraen a las células del sistema inmune para facilitar la reparación tisular.

La fase de proliferación celular se da cuando se regenera el tejido y se cubre la herida. Se forman nuevos vasos sanguíneos y las células epiteliales surgen del lecho o los márgenes de la herida hasta que cubren todo el epitelio.

La fase de remodelación de la matriz celular consiste en que las fibras de colágeno se reorganizan, el tejido se regenera con formación de nuevos vasos sanguíneos y regeneración de nervios y aumenta la resistencia a la tracción [147].

Las nuevas terapias para la curación de heridas con tratamientos efectivos requieren un entorno complejo formado por células y factores de crecimiento. Una primera aproximación se llevó a cabo colocando células viables, incluidos fibroblastos, en la zona de la herida para que sirvan como fuente de factores de crecimiento y citoquinas para apoyar la función de las propias células del paciente. En otras aproximaciones se añadieron tópicamente estos factores de crecimiento (ej. PDGF, EGF) para aumentar la proliferación de fibroblastos y acelerar el cierre de la herida [148].



**Figura 1.16. Cicatrización de heridas**

(A) Durante las primeras etapas de la cicatrización de la herida, las plaquetas se desplazan hacia la herida y depositan fibrina (que sirve como matriz extracelular preliminar) para detener el sangrado. (B) Durante las siguientes etapas de la cicatrización de la herida, las células inmunes, incluidos los neutrófilos seguidos de los macrófagos, se desplazan a la herida y eliminan el tejido muerto para prepararlo para la curación. Alrededor brotan nuevos vasos sanguíneos. Los fibroblastos son desplazados al lugar de la herida antes de la formación de cicatrices. Los queratinocitos comienzan a migrar para cubrir la superficie de la herida cutánea. (C) Finalmente, durante las fases de remodelación de la cicatrización de heridas, los queratinocitos han recubierto la zona. Debajo de los fibroblastos depositan una nueva matriz extracelular que reemplaza el tapón de fibrina, que luego se remodela para formar la cicatriz final. Se forman nuevos vasos sanguíneos y los nervios comienzan a regenerarse en la zona de la herida. (D – F) Nuevas terapias para la curación de heridas. (D) Se pueden proporcionar factores de crecimiento tales como el PDGF directamente a la herida para estimular la proliferación de fibroblastos y acelerar el cierre de la herida. (E) Los sustitutos de la piel basados en células (p. ej., Graftix®, Osiris Therapeutics, MD, EE. UU.) se pueden aplicar directamente en el sitio de la herida para protegerlo y proporcionar directamente factores que incluyen células involucradas en la curación de heridas. (F) La mecanotransducción de fibroblastos desempeña un papel importante en la estimulación en el entorno de la herida para disminuir la fibrosis de las cicatrices. *Imagen adaptada de [147].*

Las terapias basadas en células se usan con mayor frecuencia en heridas crónicas, que pueden estar formadas por tejido placentario crioconservado que incluye matriz

extracelular y fibroblastos [149]. Estos productos se usan clínicamente, aunque su mecanismo de acción sigue siendo desconocido y no son siempre eficaces [150].

La mecanotransducción es una nueva aproximación que puede tener resultados prometedores [151]. Las fuerzas mecánicas juegan un papel en el desarrollo de cicatrices patológicas [152]. En los fibroblastos de la herida, la mecanotransducción se lleva a cabo mediante complejos de adhesión focal, que unen la MEC con el citoesqueleto intracelular (Figura 1.16D–F) [147], [153].

#### **1.4.2. Regeneración ósea**

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que tiene tres funciones fundamentales: mecánica para dar soporte a la inserción muscular, protectora de los órganos y la médula ósea y metabólica, como reserva de calcio y fósforo, necesaria para mantener la homeostasis del organismo [154]. El tejido óseo tiene capacidad de regenerarse como respuesta a una lesión, así como durante el desarrollo del esqueleto, y se remodela continuamente a lo largo de la vida adulta [155], [156]. Existe una necesidad de desarrollar metodologías para mejorar la curación ósea con nuevas terapias regenerativas las cuales permitan entender mejor la curación de fracturas óseas. Los nuevos tratamientos en el futuro serán individualizados y se basarán en los requisitos temporales y espaciales de la carga mecánica, las células, los factores de crecimiento y la vascularización para tener el tratamiento terapéutico ideal.

La comprensión y la regulación de la regeneración ósea es un desafío médico, ya que patologías y traumatismos que afectan al tejido óseo, como fracturas óseas, tumores, osteoporosis, escoliosis y enfermedades reumáticas producen lesiones que la propia regeneración ósea no puede resolver por sí sola. Los dos casos clínicos más comunes son la pérdida ósea sistémica (osteoporosis y osteopenia) y las fracturas. El proceso biológico de reparación implica la regeneración y la restauración del tipo de tejido original en lugar de reemplazarlo con tejido cicatricial. Es un proceso complejo regulado por varios factores que incluyen citoquinas proinflamatorias, proteínas que pertenecen a la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y factores angiogénicos. Estos factores osteoinductores están típicamente incrustados dentro de la matriz extracelular, desde donde se liberan durante la remodelación o el trauma.

Cuando se liberan estas proteínas, pueden unirse a receptores específicos en las células para iniciar cascadas de señalización, lo que en última instancia puede conducir a la inducción de osteogénesis.

Es importante destacar que las actividades biológicas de los factores osteoinductores se producen de una manera espacio-temporal controlada, desencadenando procesos biológicos superpuestos y coordinando las interacciones entre las diferentes poblaciones celulares [157].

Tras la fractura, se rompe el hueso cortical y el tejido perióstico, junto con los tejidos blandos circundantes. El proceso de curación de fracturas se inicia de inmediato y tienen lugar una serie de eventos moleculares y celulares que conducen a la restauración del tejido. Esto da como resultado la realineación anatómica, y la restauración de la función fisiológica del hueso y el retorno completo a la función fisiológica. Los estudios intensivos en esta área indican que el proceso de curación ósea implica una interacción coordinada de células, factores de crecimiento y matriz extracelular. Consta de varias etapas bien organizadas que comienzan inmediatamente después de que ocurre la lesión, con una respuesta inflamatoria local seguida de la movilización de células madre hematopoyéticas y mesenquimales al sitio de la lesión para formar nuevas redes vasculares, matriz de tejidos blandos, cartílago y hueso induciendo finalmente la formación de hueso maduro [158], [159]. Los cuatro componentes involucrados en el sitio de la lesión son el hueso cortical, el periostio, la médula ósea y el tejido blando externo que a su vez depende de parámetros como factores de crecimiento, hormonas y nutrientes, pH, tensión de oxígeno, el entorno eléctrico y la estabilidad mecánica [160], [161].

La primera fase de la curación de una fractura es la fase inflamatoria, donde se forma un hematoma o coágulo en la zona de la lesión que se caracteriza por una respuesta inflamatoria, hipoxia y una fase destructiva [159], [162]. Las primeras células que llegan al lugar de la fractura son neutrófilos y después macrófagos y linfocitos. Los macrófagos no solamente fagocitan el tejido necrótico, sino que también liberan factores de crecimiento y citoquinas que inician el proceso de curación de la herida ósea (Figura 1.17) [163], [164]. Posteriormente se lleva a cabo la inducción del sistema inmunitario, reclutamiento de células madre mesenquimales (MSC), angiogénesis (tres días después de la fractura) y formación de tejido de granulación. Los factores

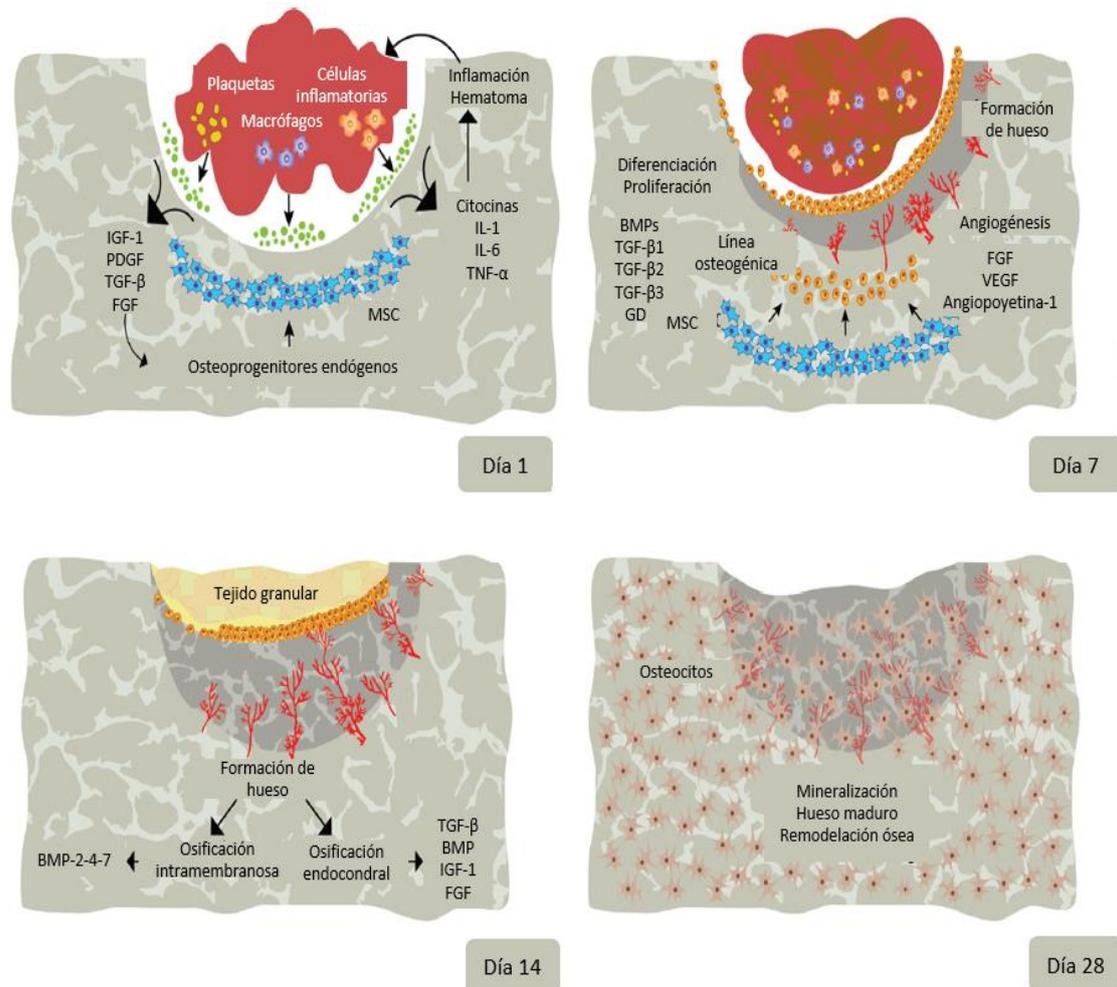
secretados por las plaquetas, los macrófagos y las células óseas incluyen el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las interleuquinas (IL-1 e IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la proteína morfogénica ósea (BMP) [162], [165], el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1 e IGF-2) (Tabla 1.2)[162]. Estos factores estimulan la migración de células madre, probablemente originadas en el periostio, médula ósea, vasos sanguíneos y el tejido blando que las rodea e induce la diferenciación de las células a diferentes tipos de células mesenquimales que incluyen angioblastos, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos [162], [164].

La siguiente fase de construcción se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos y la reorganización del trombo en tejido de granulación que forma el callo blando, el cual actúa como una estructura de estabilización para la posterior mineralización (4-14 días después de la fractura) (Figura 1.17) [166].

Dependiendo del tipo de hueso, el tipo de lesión ósea, la morfología y estructura del tejido y el método de fijación, la curación ósea puede tomar dos formas: curación primaria, donde los osteoblastos secretan una matriz osteoide para la mineralización futura (osificación intramembranosa) y la curación secundaria, que se produce a través de la formación de una matriz de cartílago producida por los condrocitos, que luego se reemplaza por una matriz osteoide con posterior mineralización (osificación endocondral) (Figura 1.17) [159], [162], [164], [165]. Los factores de crecimiento más comunes relacionados con la regeneración ósea, la osteoinducción y la osteoconducción son el PDGF, BMP, IGF, FGF, EGF y VEGF (Tabla 1.2).

La vascularización local en el sitio de la lesión se ha identificado como uno de los parámetros más importantes que influyen en el proceso de curación [167]–[169]. La formación de hueso solo puede proceder con éxito si el tejido se encuentra vascularizado adecuadamente [170], por lo tanto, la angiogénesis es un componente clave en la reparación ósea. Los nuevos vasos sanguíneos transportan oxígeno y nutrientes al callo metabólicamente activo, permitiendo el intercambio de gases y la salida de productos de desecho, y sirven como una ruta para las células inflamatorias y las células precursoras de cartílago y hueso [171], [172], y también proporcionan la puerta de entrada de factores de circulación sistémica que pueden modificar el proceso

de curación ósea [173]. La vascularización es necesaria tanto para la formación de hueso intramembranoso como endocondral. La angiogénesis y la migración de las células endoteliales vasculares se estimulan por factores pro-angiogénicos como VEGF, BMP, TGF-B, FGF y angiopoyetinas I y II (Tabla 1.2) [162].



**Figura 1.17. Progresión temporal de la curación ósea**

Inmediatamente después de la lesión ósea, se forma el hematoma como resultado de la coagulación de la sangre. Durante la fase inflamatoria inicial se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento que inician el proceso de curación de heridas. Entre los días 1-7, las MSC proliferan y se diferencian en los linajes osteogénicos o condrogénicos y aumentan la producción de vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Durante la fase de reparación, los macrófagos son fundamentales para la osificación intramembranosa y para la endocondral que finalmente se mineralizará formando un hueso maduro que se remodelará continuamente a lo largo de la vida. *Imagen adaptada de [164].*

**Tabla 1.2. Principales factores biológicos implicados en regeneración ósea**

Moléculas de señalización esenciales en la regeneración ósea: su patrón de expresión y sus funciones principales [164]

MOLECULAS DE SEÑALIZACIÓN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	FUNCIÓN
<b>IGFs</b> (factores de crecimiento análogos a la insulina 1 y 2)	Expresados a lo largo de la curación de la fractura y de la osificación endocondral.	Incrementan el número y función de los osteoblastos. Estimulan la síntesis de matriz extracelular y angiogénesis. Regulados por hormonas de crecimiento, estrógenos, progesterona y glucocorticoides.
<b>TGF-<math>\beta</math></b> (factor de crecimiento transformante $\beta$ )	Se expresa en las etapas tempranas durante la curación de la fractura.	Potente mitogénico y quimiotáctico en la formación ósea. Se activan durante la reabsorción osteoclástica.
<b>BMPs</b> (proteínas morfogenéticas óseas, familia TFG- $\beta$ )	Varios patrones de expresión temporal.	Osteoinductivas. Estimulan la osteogénesis e inhiben la osteoclastogénesis. Son los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica.
<b>PDGF</b> (factor de crecimiento derivado de las plaquetas)	Liberado en etapas tempranas de la curación de la fractura.	Mitogénico y quimiotáctico. Favorece la reabsorción ósea y estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos.
<b>FGFs</b> (factores de crecimiento fibroblástico)	Expresados desde etapas tempranas hasta la formación de osteoblastos.	Angiogénico y mitogénico de células mesenquimales y epiteliales, osteoblastos y chondriocitos.
<b>EGF</b> (factor de crecimiento epidérmico)	Expresado desde etapas tempranas y durante la remodelación ósea.	Mitogénico. Doble acción formadora y destructora de hueso.
<b>VEGFs</b> (factores de crecimiento vascular endotelial)	Expresados durante la formación ósea y la osificación endocondral.	Potente estimulador de angiogénesis y proliferación de células endoteliales. Factor clave en la reparación de fracturas y la regeneración ósea por aumento de vasodilatación.
Citoquina <b>TNF-<math>\alpha</math></b> (factor de necrosis tumoral $\alpha$ )	Niveles aumentados del día 1 al 3 y durante la remodelación ósea.	Estimula la reabsorción ósea.
Citoquinas (Interleucinas <b>IL-1 e IL-6 y TNF-<math>\alpha</math></b> )	Niveles aumentados en los días 1 a 3 y durante la remodelación ósea.	Efecto quimiotáctico en células inflamatorias. Estimulación de síntesis de matriz extracelular y angiogénesis.
<b>Angiopoyetina I y II</b>	Expresadas desde etapas tempranas hasta la curación de la fractura.	Formación de estructuras vasculares y ramificaciones a partir de vasos existentes.

Finalmente, en el transcurso de meses o años, se produce la tercera etapa, la fase de remodelación de la curación ósea, cuyo objetivo principal es remodelar el hueso para restaurar su estructura y rigidez originales. Durante esta fase, los osteoclastos reabsorben tejido óseo recientemente formado, debido a la estimulación de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la osteoclastogénesis como TNF- $\alpha$ , TGF y BMPs. Los osteoblastos depositan osteoide y fosfato de calcio en el hueso recién regenerado, lo que aumenta la densidad de la matriz mineralizada. Por lo tanto, el diámetro transversal del hueso disminuye, pero la densidad de la estructura interna aumenta, asemejándose cada vez más a la arquitectura del hueso intacto. A medida que esta etapa continúa, la celularidad se reduce gradualmente y la densidad ósea aumenta [162], [164].

Las MMP son importantes para reconstruir el hueso, ya que coordinan el mecanismo de remodelación de las proteínas de la MEC, debido a su expresión temporal y coexpresión local (MMP-2/MMP-14 y MMP-9/MMP-13), y diferentes etapas durante la curación de las fracturas óseas y los defectos óseos de tamaño crítico son cruciales para el éxito de la reparación ósea [120].

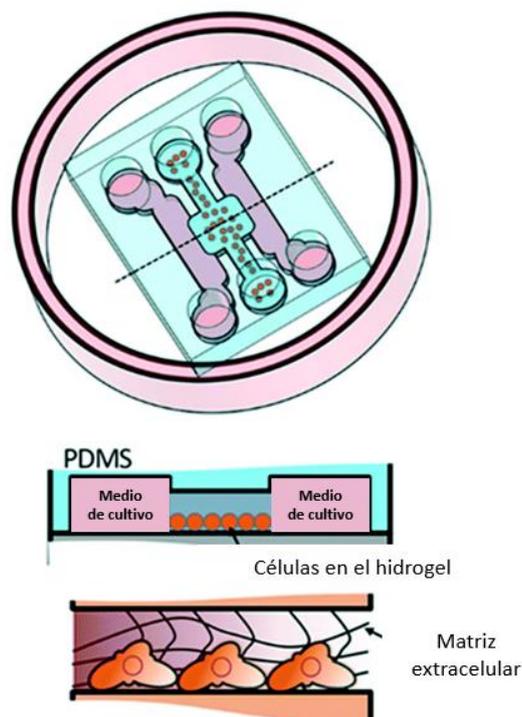
Cuando los enfoques disponibles actualmente para la regeneración ósea no son suficientes, la bioingeniería ósea, que emplea conceptos que combinan células autólogas, biomateriales o andamios y moléculas de señalización para crear un injerto óseo tridimensional *in vitro* para implantarse en el hueso fracturado, puede abrir nuevas posibilidades para diseñar protocolos modernos para la regeneración o reparación ósea.

### **1.5. Cultivos celulares 3D mediante dispositivos microfluídicos**

Los hidrogeles y sus propiedades se han convertido en los materiales más utilizados como plataformas para el cultivo tridimensional (3D) de células de mamífero. Estos hidrogeles permiten diseñar andamios con unas propiedades mecánicas predefinidas, así como una biofuncionalidad deseada. Se han utilizado para una variedad de aplicaciones en muchas áreas de investigación como son la ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y en el desarrollo de nuevos fármacos. Además, el cultivo 3D se aplica para estudiar los mecanismos de interacción entre la matriz extracelular y las células (Figura 1.18). La información obtenida de este tipo de cultivos es más fisiológica que en cultivos 2D, ya que representan con mayor precisión el microambiente donde las células residen en los tejidos. Las células en un entorno en 3D difieren morfológica y fisiológicamente de las células en un entorno 2D [174], [175]. Los cultivos en 3D muestran mayor grado de complejidad y de homeostasis estructural al igual que ocurre en tejidos y órganos.

Las nuevas tecnologías de cultivo celular en 3D han mejorado el conocimiento del comportamiento celular, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los contactos y las interacciones entre células, así como el comportamiento en relación a la matriz que las rodea, juegan un papel crucial en la detección y respuesta a estímulos externos [176]. Numerosos estudios en varias líneas celulares, incluyendo células primarias, revelaron cambios

significativos en la expresión de los genes en 3D en relación con condiciones de cultivo celular 2D [177]–[179].



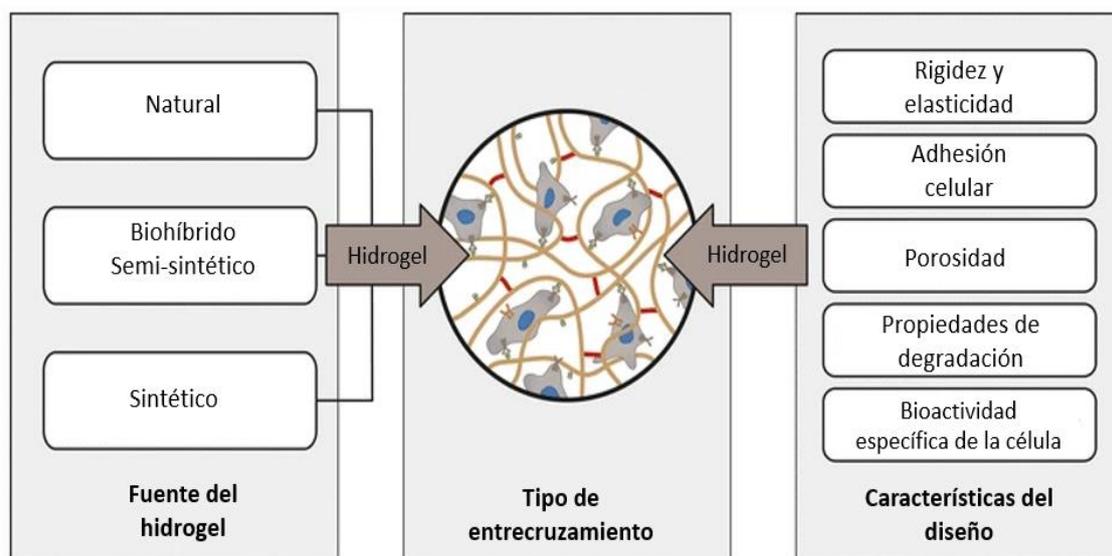
**Figura 1.18. Cultivo 3D en hidrogel**

Esquema de cultivo celular 3D en un hidrogel que permite controlar el flujo a escala micrométrica, basado en el transporte por difusión, creando un ambiente más fisiológico. Las células están inmersas en una matriz extracelular de hidrogel flexible que pueden deformar y degradar. La imagen superior representa una visión superior de un modelo de chip de microfluídica; la imagen central, un corte transversal del mismo (indicado con una línea discontinua en la imagen superior); la imagen inferior, una ampliación de la imagen central en la zona de las células. *Imagen adaptada de [180].*

Los hidrogeles se pueden preparar desde completamente sintéticos [181] a naturales [182] y se pueden usar en combinaciones diferentes [183], [184]. Estas combinaciones pueden utilizar moléculas para ayudar a la adhesión celular, factores de crecimiento para aumentar la proliferación y guiando la diferenciación. Además, la rigidez y la porosidad se puede variar fácilmente, así como sus gradientes. Se ha demostrado que la rigidez de la matriz desempeña un papel crucial en la expresión génica [185], arquitectura del citoesqueleto [186] y destino celular [187], [188]. Esta enorme versatilidad de los hidrogeles hace actualmente que sean el material biomimético de elección para realizar cultivos celulares en 3D.

Los hidrogeles se pueden clasificar atendiendo a varios criterios, entre ellos el tipo de entrecruzamiento, la fuente del hidrogel y las características del diseño, que son

importantes para decidir la aplicación adecuada para el cultivo celular en los experimentos en 3D (Figura 1.19). La formación de los hidrogeles se puede llevar a cabo usando un entrecruzamiento físico (no covalente) a través de interacciones moleculares como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas o hidrofóbicas, siendo su polimerización reversible, o mediante entrecruzamiento químico (covalente) entre las moléculas individuales.



**Figura 1.19. Clasificación de hidrogeles para cultivo celular en 3D**

Los hidrogeles se pueden clasificar en diferentes categorías basadas en tres criterios principales: la fuente del hidrogel, el tipo de entrecruzamiento y las características del diseño. *Imagen adaptada de [189].*

La mayoría de las aplicaciones de cultivo celular 3D requieren que las células se dispersen en la mezcla del hidrogel antes del entrecruzamiento para asegurar una distribución homogénea dentro de la matriz celular. Esto implica que el método de entrecruzamiento no debe afectar a la viabilidad celular. Los hidrogeles pueden entrecruzarse por métodos físicos como alginato [190] o covalentemente en reacciones de polimerización como con luz UV o mediante entrecruzamiento enzimático con enzimas como la transglutaminasa (TG2), lisil oxidasa (LOX), glutaraldehído (GA) o poliacrilamida entre otros [191].

Según la fuente de los polímeros los hidrogeles se pueden clasificar en naturales, sintéticos o semisintéticos. Los naturales son proteínas derivadas de fuentes biológicas tales como colágeno, albúmina, fibrina, glucano, ácido hialurónico, quitosano, agarosa

y alginato. El colágeno, fibrina y el ácido hialurónico son componentes naturales de la MEC. El alginato y la agarosa derivan de algas marinas. Los hidrogeles naturales presentan una excelente biocompatibilidad y baja toxicidad, y como desventaja la variación entre lote y lote lleva a una baja reproducibilidad en los experimentos por cambios tanto estructurales como en las propiedades mecánicas [189], [192].

Algunos de los hidrogeles sintéticos son el polietilenglicol (PEG), poliacrilamida (PAA) o el óxido de polietileno (PEO). Estos materiales compensan algunas desventajas de los materiales naturales, ya que se pueden fabricar con una calidad uniforme, tener una estructura definida y se pueden controlar propiedades mecánicas como la viscoelasticidad. La limitación que presentan es que su estructura no ofrece información biológica a las células.

Actualmente, se intentan combinar hidrogeles semi-sintéticos que contienen un polímero hidrofílico que se conjuga con un polisacárido o fracción de una proteína. Se puede crear un hidrogel con propiedades definidas, pero que ofrece información biológica a las células como puede ser el PEG. Éste es un material inerte para proteínas y células, pero a través de una modificación con secuencias peptídicas como la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) derivada de fibronectina, laminina o colágeno [193], [194] se ha podido crear una estructura híbrida que promueve la adhesión celular [189], [195].

Las propiedades mecánicas de un hidrogel también dependen del grado de degradación que ocurre durante el movimiento de la célula. La tasa de degradación debe controlarse cuidadosamente para que las células puedan migrar y sintetizar sus propios componentes de matriz [196]. La mayoría de los hidrogeles naturales (por ejemplo, fibrina, colágeno o ácido hialurónico) se degradan naturalmente por las acciones de enzimas secretadas por las células [197]. La introducción de entrecruzantes que sirven como dianas para enzimas proteolíticas es otra estrategia para controlar la degradación de un hidrogel biohíbrido, éstas incluyen secuencias peptídicas que son reconocidas como dianas por proteasas asociadas a la matriz extracelular [189], [198]–[200].

Otra propiedad importante de los hidrogeles es la capacidad para proporcionar un transporte adecuado de nutrientes, productos de desecho y gases a lo largo del hidrogel. El transporte dentro del hidrogel se realiza por difusión y depende de la arquitectura del hidrogel, teniendo en cuenta que la capacidad de difusión del oxígeno es limitada a una distancia de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  [201].

## **1.6. Justificación y objetivos**

El principal objetivo de esta Tesis es el de avanzar en el entendimiento de cómo distintos tipos de matrices extracelulares pueden regular la migración celular en procesos biológicos relacionados con la cicatrización de heridas y la curación de fracturas óseas. Para llevar a cabo este objetivo se han utilizado dispositivos de microfluídica fabricados en polidimetilsiloxano, los cuales constan de una o varias microcámaras centrales donde se siembran las células involucradas (fibroblastos y osteoblastos) y dos microcanales laterales donde se inyecta el medio de cultivo. Utilizando estos dispositivos, se plantearon tres bloques de trabajo interpretables como subobjetivos de la meta principal:

- Estudio de la migración de una monocapa de fibroblastos en distintas concentraciones y gradientes de colágeno combinado con gradientes químicos para inducir haptotaxis y quimiotaxis, así como en procesos de durotaxis.
  
- Análisis del impacto de la concentración de colágeno de la matriz extracelular y de los gradientes de factores de crecimiento en el movimiento de los osteoblastos en 3D, así como el estudio del papel de la degradación de la matriz extracelular.
  
- Estudio de la dinámica de las protrusiones de osteoblastos en hidrogeles de colágeno en presencia del entrecruzante transglutaminasa, de los inhibidores de actina (CK-636 y blebistatina) y del inhibidor de metaloproteasas marimastat.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

---



En esta sección se explicarán las principales técnicas y el material utilizado en el desarrollo de esta Tesis.

### **2.1. Fabricación de dispositivos de microfluídica**

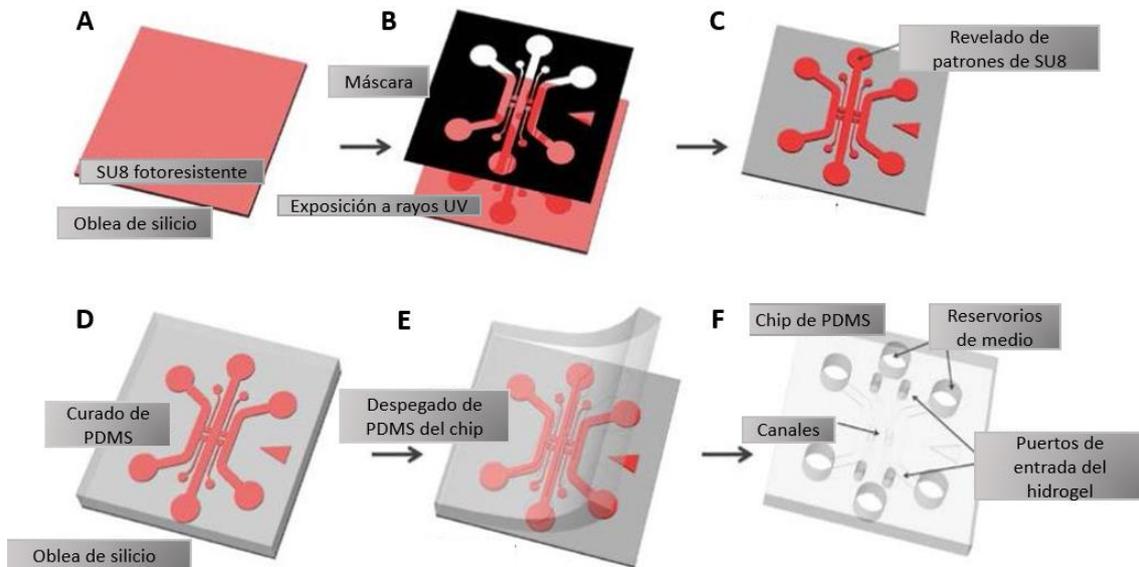
Los primeros dispositivos de microfluídica demostraron que se podrían miniaturizar e integrarse entre sí, lo que llevó a la idea de que uno podría encajar un "laboratorio en un chip" [202]. Desde entonces, ha habido un enorme interés en aprovechar todo el potencial de este enfoque y, en consecuencia, el desarrollo de innumerables dispositivos de microfluídica y métodos de fabricación. Polímeros orgánicos como el polidimetilsiloxano PDMS han surgido como una excelente alternativa al silicio y al vidrio utilizados en los primeros dispositivos, siendo éste un material que puede alcanzar grandes deformaciones. También es un material biocompatible, de bajo coste, ópticamente transparente y propicio para el uso de métodos de detección óptica y adquisición de imagen.

Una ventaja de la microfluídica es que los componentes y procesos miniaturizados utilizan volúmenes más pequeños de fluido, lo que lleva a un consumo reducido de reactivos y esto también disminuye los costos.

La microfluídica permite recrear un ambiente más complejo replicando mejor las interacciones de factores químicos con la complejidad del tejido inherente a las condiciones *in vivo* [203], [204].

Los dispositivos de microfluídica usados en este trabajo se diseñaron originalmente en el laboratorio de Roger Kamm en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) [205] y se han adaptado en función de las necesidades propias. Se utilizaron técnicas de fotolitografía para generar los moldes de SU-8 (resina epoxi fotosensible), mediante las cuales se obtiene una réplica utilizando PDMS. La plantilla usada para generar la geometría deseada es una fina película de resina que se llama máscara. Ésta se coloca directamente en la superficie de la oblea y todo el conjunto se expone a luz ultravioleta, la cual cambia la composición de la resina sobre la que incide. Después del lavado y la deshidratación de la oblea de silicio se añade el SU-8, se centrifuga y se coloca a 95 °C durante 30 min. Posteriormente se expone a la luz UV para fijar la geometría a la máscara en la oblea. Ésta se hornea nuevamente a 95°C durante

30 min y después se aplica el revelador para eliminar las zonas no expuestas a la luz, éste se neutraliza en alcohol isopropílico y luego se enjuaga con agua desionizada. Finalmente, la oblea se seca mediante presurización con gas nitrógeno. La Figura 2.1 muestra un resumen del proceso.



**Figura 2.1. Litografía blanda**

Fotolitografía y procedimientos de litografía blanda (A–F). Esquemas de los procedimientos de la fotolitografía (A–C) y litografía blanda (D–F). (A) El SU-8 es depositado mediante centrifugación y precocido en una oblea dejando una película uniforme. (B) Con una fotomáscara de transparencia (negro), se expone a la luz UV el SU-8. (C) El SU-8 expuesto se cuece después de su exposición a rayos UV y se revela para definir los patrones de los canales. (D) Se vierte la solución mixta de PDMS sobre la oblea y se cura. (E) El PDMS curado se despegar de la oblea. (F) El dispositivo se recorta, se perfora y se esteriliza en autoclave hasta que esté listo para el montaje. *Imagen adaptada de [205].*

El PDMS es el elastómero más usado en la fabricación de dispositivos de microfluídica. Se forma por dos componentes, una base y un agente curante que se mezclan y se curan por temperatura. Presenta baja autofluorescencia, transparencia óptica en longitudes de onda tan cortas como  $\sim 300$  nm de luz y permite la microscopía de luz visible, siendo útil para el análisis y el seguimiento óptico de la morfología y la motilidad celular [206]. Es biocompatible y permeable a los gases  $O_2$  y  $CO_2$ , lo que facilita su uso en la experimentación *in vitro* [207]. Además, su versatilidad de fabricación, su capacidad para unirse fácilmente a diferentes materiales no polares y poder despegarse fácilmente sin romper materiales frágiles, ha facilitado la adaptación de los dispositivos para cada experimento.

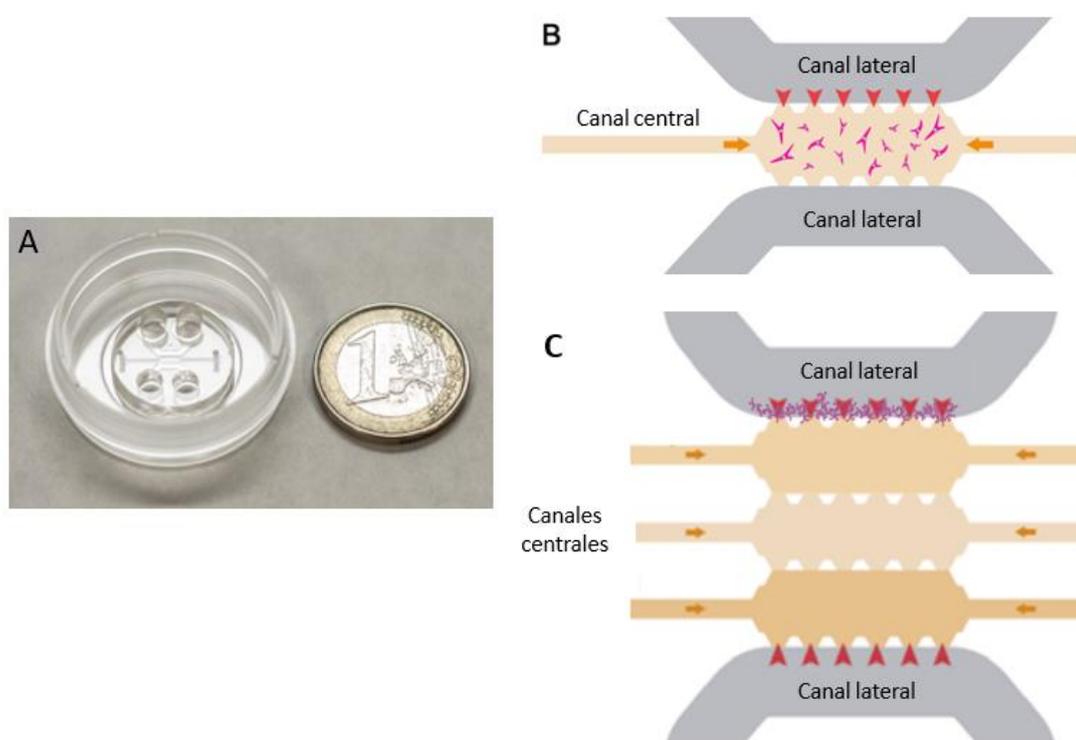
El procedimiento seguido para la fabricación de dispositivos microfluídicos con PDMS se explica a continuación.

Las obleas de SU-8 utilizadas fueron de  $300 \pm 30 \mu\text{m}$  obtenidas mediante la técnica de litografía descrita anteriormente. Primero, la oblea de SU-8 se silaniza mediante la adición de  $10 \mu\text{l}$  de triclorosilano perfluorado (UCT Specialties, T2492-KG), durante 2 h para evitar la unión de PDMS con la oblea. Después, el PDMS (Polydimethylsiloxane, Sylgard 184, Dow Corning GmbH) se añade en una proporción de 10:1 de base y agente curante y se desgasifica antes y después de la adición sobre la oblea de silicio. La polimerización del PDMS se lleva a cabo en el horno a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 12 h aproximadamente. Luego, la capa de PDMS se retira del molde con la geometría de la réplica y esta primera capa después del tratamiento se deshecha para evitar cualquier residuo tóxico del tratamiento. Se añade una nueva capa de PDMS y después del curado se perforan las geometrías de los dispositivos con diferentes punzones para individualizar los dispositivos, utilizando distintos diámetros de acuerdo con la geometría utilizada (Figura 2.1D–F). Se usan de 18 mm o 20 mm para extraer la geometría, 1.5 mm de diámetro para el canal de carga del hidrogel y 4 mm de diámetro para los reservorios. A continuación, se lleva a cabo la esterilización de los dispositivos con un ciclo húmedo y uno seco mediante un proceso de autoclavado y posterior secado en una estufa a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 12 h aproximadamente. Seguidamente, se procede al pegado de los dispositivos de PDMS a placas con fondo de vidrio de 35 mm mediante un tratamiento de 2 min con plasma a baja presión, en una cámara cerrada en condiciones de vacío. Este tratamiento además de hacer que las superficies no polares o hidrofóbicas del PDMS y del vidrio se transformen en superficies polares o hidrofílicas, facilitando así la unión del PDMS con el vidrio, también tiene un efecto de esterilización sin dejar residuos tóxicos.

Inmediatamente después del pegado, se añade PDL (bromhidrato de poli-D-lisina, Sigma-Aldrich) a  $1 \text{ mg/ml}$ . El PDL es una molécula sintética que mejora la adhesión celular y la absorción de proteínas, alterando las cargas superficiales del sustrato de cultivo. Esta molécula no estimula la actividad biológica en las células y no contiene impurezas que se pueden encontrar en polímeros naturales. Se añaden  $40\text{--}80 \mu\text{l}$  dentro del dispositivo de un canal o tres canales en la cámara central, respectivamente, se mantiene a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 h y así se mejora la unión de la superficie del hidrogel con el

PDMS. Finalmente, los dispositivos se lavan varias veces con agua estéril para evitar la toxicidad del PDL y se secan en la estufa a 80 °C durante 48 h, aproximadamente. Los dispositivos después de este proceso están listos para ser usados para cultivo celular.

Para llevar a cabo los experimentos de los dispositivos colocados en placas de 35 mm (Figura 2.2A) se utilizaron dos geometrías, una con un canal en la cámara central (con dimensiones de 2.5 x 1.3 mm) y otra con una cámara central dividida en tres canales (con dimensiones de 2.5 x 3 mm), tal y como se muestra en las Figura 2.2B y C. El hidrogel se confina por tensión superficial gracias a unos micropilares en las cámaras centrales, y a ambos lados hay dos canales laterales para añadir el medio de cultivo a las células. Estos canales laterales permiten introducir el medio de cultivo y factores de crecimiento para crear un gradiente químico.



**Figura 2.2. Geometrías de los dispositivos de microfluídica**

(A) Imagen del dispositivo microfluídico colocado dentro de una placa de 35 mm. (B) Esquema de la parte central del dispositivo de un canal. El canal central se llena con el hidrogel de colágeno y células a través de los canales auxiliares (flechas horizontales naranjas). Los dos canales laterales se utilizan para añadir el medio de cultivo para asegurar la hidratación y difusión de factores de crecimiento a través del hidrogel. Las flechas rojas indican la dirección del gradiente químico. Es importante destacar que la altura de los canales es de  $300 \pm 30 \mu\text{m}$  para toda la geometría. Otros detalles de la geometría se pueden encontrar en la bibliografía [208]. (C) Esquema de la cámara central dividida en tres canales mostrando la localización de la monocapa.

## 2.2. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se indican a continuación:

- Fibroblastos dermales humanos (Lonza, NHDF, CC-2511 y NHDF-GFP). Los fibroblastos se encuentran en el estroma del tejido y tienen funciones tan importantes como sintetizar la matriz extracelular y el colágeno. Los fibroblastos mantienen la estructura de los tejidos animales y tienen un papel muy importante en la curación de heridas.
- Osteoblastos primarios humanos (Promocell, HOB-c, C-12720) aislados del tejido óseo trabecular femoral. La principal ventaja del uso de osteoblastos primarios es que conservan su fenotipo diferenciado *in vitro* y además representan una población heterogénea de células exhibiendo diferencias fenotípicas relacionadas con la ubicación esquelética desde la cual se aislaron [209], [210]. La proliferación de estas células, su expresión génica y la síntesis de proteínas asociadas al fenotipo de osteoblastos depende de la edad del donante, lugar de aislamiento y las diferencias de género son incluso más notables. Esto implica tener en cuenta la importancia de saber los factores que influyen para llevar a cabo experimentos con células primarias para fines de investigación y, por lo tanto, los resultados obtenidos serán en función de las características del tipo de células estudiadas.

Las líneas celulares, los requerimientos nutricionales, los pasajes utilizados y las especificaciones se detallan en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1. Líneas celulares utilizadas en esta Tesis doctoral.**

LÍNEA CELULAR	CASA COMERCIAL	MEDIO DE CULTIVO	PASAJES
HOB-c	PromoCell, C-12720	Osteoblast Growth Medium, C-27001	2-7
NHDF	Lonza, CC-2511	FGM-2, Lonza, CC-4126	2-11
NHDF-GFP	Generada en laboratorio-IACS	FGM-2, Lonza, CC-4126	9-16

Las líneas celulares se mantienen en cultivo en incubadores en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37 °C. Las líneas celulares utilizadas en el estudio son adherentes por lo que el cultivo se lleva a cabo en frascos de cultivo. El proceso de subcultivo se realiza cuando llegan al 80-90% de confluencia, lavando con

PBS (1X, Lonza) y añadiendo una solución enzimática de Tryple Express (Invitrogen). A continuación, se neutraliza la reacción de tripsinización añadiendo medio de cultivo y se centrifuga durante 5 min a 1200 r.p.m. Finalmente, se siembran a la concentración deseada en medio de cultivo fresco.

La congelación de las células se lleva a cabo en suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) con el 5% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Se congelan gradualmente en un contenedor de viales (Mr. Frosty, Thermo Scientific) que contiene isopropanol y, por último, se almacenan en nitrógeno líquido a -195 °C.

### **2.2.1. Generación de la línea celular de fibroblastos humanos con GFP (NHDF-GFP)**

Se procedió a la transducción de la línea celular NHDF (Fibroblastos dermales humanos) con la proteína fluorescente verde (GFP) mediante lentivirus para facilitar el procesamiento de las imágenes de los ensayos mediante algoritmos del programa MATLAB.

El servicio del cultivo celular del IACS (Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud) llevó a cabo la transducción utilizando HEK 293T (células de riñón embrionario humano) para generar los virus portadores de la proteína GFP.

Las células NHDF se cultivaron en medio basal de células de fibroblastos con suplementos de crecimiento (Lonza) en un incubador de cultivos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivaron células HEK 293T (riñón embrionario humano) en DMEM que contenía 10% de FBS (Lonza) y 100 U/ml de penicilina (Life Technologies) para generar los virus. Las células 293T se sembraron a 4 x 10<sup>6</sup> células en placa de 100 mm y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, un día antes de la transfección. Estas células embrionarias se cotransfectaron con 3 µg de pLOX-CWgfp (Addgene, Plasmid 12241), 3 µg de psPAX2 (Addgene, Plasmid 12260) y 3 µg de pMD2G (Addgene, Plasmid 12259), plásmidos cedidos por la Dra. Pilar Bayona, (investigadora del grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial), utilizando el reactivo Eugene 6 (Promega). Aproximadamente a las 18 h posteriores a la transfección, los medios se reemplazaron con medios nuevos, y a las 48 y 72 h se recogió el sobrenadante que contenía los virus, se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0.45 µm (Whatman) y se añadió 1 µl de polibreno (10 mg/ml) a 1 ml

del sobrenadante para mejorar la transducción lentiviral. Los virus infecciosos se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Por otro lado, las células NHDF se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos a  $1 \times 10^5$  células por pocillo y se incubaron 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se añadieron las partículas lentivirales y se incubaron durante 48 h. Después de la transducción, se agregó medio de cultivo y se comprobó la expresión de GFP mediante microscopía de fluorescencia. Para asegurarse de tener una población homogénea de células con GFP se procedió a utilizar la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

### **2.3. Preparación de los hidrogeles de colágeno y siembra celular**

Se utilizó el colágeno tipo I de rata (BD Biosciences, 354236 y 354249) que es uno de los más abundantes en la matriz extracelular (huesos, piel o vasos sanguíneos) para hacer los hidrogeles en los distintos experimentos.

El procedimiento para la preparación de los hidrogeles se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Shin y col. [205]. Dependiendo del volumen total que se quiera preparar las proporciones son las siguientes:

- 10% de 10X DPBS con rojo fenol a 0.159 g/l
- Colágeno a la concentración requerida para el experimento
- 0.5M NaOH para ajustar el pH a 7.4
- Células en la concentración deseada
- Medio de cultivo hasta completar el volumen requerido

La mezcla del hidrogel de colágeno se introduce dentro de los dispositivos colocándolos en una caja húmeda a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min para su polimerización. En los experimentos de la monocapa de fibroblastos se deja polimerizar el hidrogel y, posteriormente, se añaden las células en el canal lateral del dispositivo con orientación vertical durante 30 min. Los experimentos de migración y protrusiones de osteoblastos, con células en la mezcla del hidrogel, se les da la vuelta a los dispositivos cada 5 min durante la polimerización, para asegurarse que la mayoría de las células están en 3D.

Finalmente, los dispositivos se hidratan con el medio y los factores de crecimiento requeridos para cada experimento, y se colocan en placas estériles dentro del incubador de cultivo celular a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Los hidrogeles de los experimentos de la monocapa de fibroblastos y migración de osteoblastos se estabilizan durante 24 h para favorecer la estabilización de la matriz y facilitar la adhesión celular, y los de protrusiones de osteoblastos se empiezan a analizar al finalizar la polimerización.

### **2.3.1. Siembra de fibroblastos NHDF-GFP en monocapa en hidrogeles de colágeno**

Los experimentos de la monocapa de fibroblastos NHDF-GFP para estudiar la quimiotaxis y haptotaxis se llevaron a cabo con hidrogeles de 2.5 y 4 mg/ml de colágeno en dispositivos de un canal con distintas condiciones, con y sin tratamiento de fibronectina y con el agente entrecruzante TG2.

Se utilizaron varios métodos de entrecruzamiento en estos hidrogeles de colágeno con GA, LOX y TG2 y los resultados obtenidos llevaron a seleccionar la TG2 debido a la mayor viabilidad celular y estabilidad de los hidrogeles. Los datos obtenidos de estos experimentos se muestran en el Apéndice 2.

En los dispositivos de una cámara central se prepararon los hidrogeles de 2.5 y 4 mg/ml con el procedimiento descrito anteriormente. Se añadieron 20 µl de células NHDF-GFP en el canal lateral a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/ml para formar la monocapa de fibroblastos. Los dispositivos sembrados se colocaron durante 30 min orientados verticalmente para favorecer la deposición de las células en el hidrogel de colágeno. Posteriormente a la incubación de las células, el canal de siembra fue lavado para eliminar las células no adheridas. Finalmente, se hidrató con medio de cultivo FGM-2 añadiendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) como se explica en el siguiente apartado. Los experimentos de durotaxis se prepararon con hidrogeles de colágeno a distintas concentraciones en el dispositivo de tres canales a 1.5, 2 y 2.5 mg/ml y a 2.5, 2 y 1.5 mg/ml en concentración creciente y decreciente, respectivamente. Se preparó primero el hidrogel de la cámara central de colágeno y se dejó polimerizar durante 20 min en una cámara húmeda, a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Utilizando las mismas condiciones de polimerización antes descritas, se prepararon los hidrogeles en los canales laterales. A continuación, se añadieron las células en contacto con el

correspondiente hidrogel, según el gradiente de dureza requerido en el experimento, con la misma metodología descrita anteriormente para una sola cámara, creando tanto un gradiente creciente como decreciente de concentración de colágeno. Se realizaron entre uno y cuatro experimentos independientes, con entre una y diez réplicas técnicas cada uno.

### 2.3.2. Migración y protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno

Los experimentos de migración de osteoblastos HOB se realizaron utilizando hidrogeles de colágeno a una concentración final de 4 mg/ml y los de protrusiones a 2 y 4 mg/ml. Las células se resuspendieron en medio de cultivo mezclándolas con el hidrogel de colágeno a una dilución final de  $1 \times 10^5$  células/ml, la cual fue pipeteada en la cámara central del dispositivo. Posteriormente, la solución del hidrogel de colágeno se polimerizó y se hidrató siguiendo el protocolo descrito. Los experimentos de migración se repitieron entre dos y cuatro veces, con dos o tres replicas en cada experimento para cada condición, y los experimentos de protrusiones con las distintas condiciones analizadas se explican en la Tabla 2.2 para hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml y en la Tabla 2.3 para los de 4 mg/ml.

Tabla 2.2. Condiciones analizadas, número de experimentos y pasaje de las células en hidrogeles de 2 mg/ml

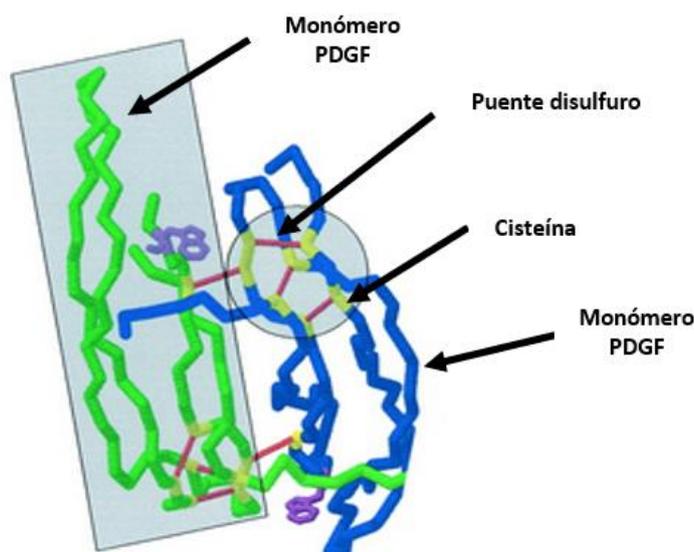
CONDICIÓN	NÚMERO DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES	NÚMERO DE CÉLULAS ANALIZADAS	PASAJE
Control	4	1	2
		2	3
		1	1
		2	2
Marimastat	2	3	1
		1	2

**Tabla 2.3. Condiciones analizadas, número de experimentos y pasaje de las células en hidrogeles de 4 mg/ml**

CONDICIÓN	NÚMERO DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES	NÚMERO DE CÉLULAS ANALIZADAS	PASAJE
Control	2	3	1
		2	6
TG2	4	2	3
		1	3
		1	4
		1	3
Marimastat	3	1	1
		2	3
		2	5
Marimastat + TG2	2	3	3
		2	4
CK-636	2	3	5
		2	1
Blebistatina	2	3	1
		2	2
Fibronectina	1	5	2

#### **2.4. Generación de gradientes químicos en los dispositivos de microfluídica**

Los factores de crecimiento son proteínas que estimulan el crecimiento y la división celular. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) con peso molecular de 25.4 KDa, utilizado en este trabajo, está implicado en diferentes vías de señalización, tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas, y juega un papel crítico en la proliferación y desarrollo celular [211], [212]. Participa también en procesos de mitogénesis, diferenciación, angiogénesis y cáncer. La forma biológicamente activa del PDGF es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro (Figura 2.3) [213]. Puede estar presente como homodímero o como heterodímero, dependiendo del tipo de dímero formado muestra una actividad diferencial, y las citoquinas pueden ser parte del mecanismo que regula la expresión de las integrinas por los fibroblastos dérmicos durante la reparación de heridas [214].



**Figura 2.3. Estructura tridimensional del PDGF-BB**

Los dos monómeros del PDGF (verde y azul) se unen por puentes disulfuro (rojo) intermoleculares formados entre cisteínas altamente conservadas (amarillo). *Imagen modificada* [215].

Los experimentos de monocapa de fibroblastos NHDF-GFP se llevaron a cabo añadiendo la isoforma recombinante humana de PDGF-BB (Invitrogen) a una concentración de 5 ng/ml en las condiciones que se indican: i) en el canal lateral opuesto a la monocapa y en el mismo canal de la monocapa, en los experimentos de quimiotaxis y ii) se incluyó la adición del factor químico en ambos canales en los experimentos de haptotaxis.

Los experimentos de haptotaxis se llevaron a cabo en dos condiciones, añadiendo el factor químico durante 24 h y, posteriormente, eliminando el factor no adherido químicamente a la matriz de colágeno antes de la siembra de la monocapa de fibroblastos, y la otra condición sin eliminar el factor.

Los experimentos de durotaxis con PDGF-BB se realizaron añadiendo el factor químico en el canal lateral más lejano a la monocapa de fibroblastos para determinar si su efecto estaba influenciado por los gradientes de concentración de colágeno.

El factor químico fue renovado en todos los casos cada 48 h, al igual que el medio de cultivo. Este proceso se llevó a cabo retirando el medio de uno de los reservorios de cada canal equilibrándose por diferencias de presión antes de que comience el proceso de difusión y logrando la misma altura de líquido en ambos reservorios del mismo lado del dispositivo [216]–[218].

El factor químico PDGF-BB también se utilizó en los ensayos de migración de osteoblastos para intentar recrear las condiciones locales que ocurren en el ambiente de una fractura o lesión ósea. Después de 24 h de siembra celular, en los dispositivos microfluídicos, se aplicó un gradiente por un proceso difusivo a través del hidrogel con PDGF-BB en dos condiciones, añadiendo 5 y 50 ng/ml, respectivamente. El factor químico se añadió en un canal y en el otro canal se añadió medio de cultivo.

#### **2.4.1. Cuantificación de la concentración de PDGF-BB-Alexa 647**

Hay datos que indican que existen uniones específicas de los factores de crecimiento a las proteínas-MEC tanto *in vivo* como *in vitro* [219]–[222]. Por esto, es fundamental distinguir entre gradientes quimiotácticos (factores químicos solubles regulados por difusión con el medio soluble) y haptotácticos (factores químicos que se unen a la MEC).

Para intentar determinar el gradiente químico haptotáctico generado en el dispositivo microfluídico, se utilizó la proteína marcada Alexa Fluor 647, con peso molecular de 1.25 KDa (excitación máxima a 650 nm y emisión máxima a 655 nm) (Thermo Scientific, A 33084) para unirla al factor de crecimiento PDGF-BB, cuyo peso molecular es 25.4 KDa. EL procedimiento de unión se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Julián Pardo (investigador del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud). Se utilizó para ello el kit de unión de proteínas Alexa Fluor 647 (A20173) de Molecular Probes. Después de la unión, se procedió a realizar una cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel para eliminar el Alexa Fluor no unido al PDGF-BB, usando columnas de sephadex de G-25 (Carboquímica) que permiten el paso de moléculas en el rango de 1.000 – 5.000 Dalton.

Para caracterizar el transporte de esta biomolécula se prepararon hidrogeles de colágeno de 2.5 y de 4 mg/ml, los cuales se dejaron polimerizar durante la noche y se hidrataron con PBS. Los primeros ensayos se llevaron a cabo añadiendo PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en concentraciones de 50 y 100 ng/ml, y posteriormente se utilizaron concentraciones crecientes de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ng/ $\mu$ l.

El procedimiento llevado a cabo consistió en eliminar el PBS de los reservorios, y a continuación añadir el PDGF-BB-Alexa 647 simultáneamente en ambos reservorios de

un mismo canal, mientras que en los reservorios del canal opuesto se añadió PBS para equilibrar el sistema. Para facilitar el paso del PDGF-BB-Alexa 647 de los reservorios al hidrogel, en algunos casos, se aplicó presión con unas columnas en los reservorios. El proceso de difusión del PDGF-BB-Alexa Fluor 647 se analizó directamente después de la carga en el microscopio en un ensayo *in vivo*.

## **2.5. Caracterización biomecánica de los hidrogeles de colágeno**

Para conocer mejor los factores biomecánicos que afectan a la migración de las células, se procedieron a caracterizar los hidrogeles de colágeno utilizados en este trabajo mediante reología. Los experimentos se llevaron a cabo con la colaboración del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón, en el departamento de Ciencia y Tecnología de Materiales y Fluidos en la Universidad de Zaragoza, con el objetivo de determinar la respuesta mecánica de los distintos hidrogeles.

Los hidrogeles se caracterizan por una red de fibras y sus propiedades mecánicas se definen principalmente por la formación de esa red y por sus propiedades. Para aumentar la rigidez de los hidrogeles nativos de colágeno, esta red de fibras se modificó añadiendo el entrecruzante TG2, el cual alteró la arquitectura de la red incrementando la unión entre las fibras, por lo que aumenta la rigidez del hidrogel y de los biopolímeros a la digestión proteolítica [223], [224].

El procedimiento para el análisis de los hidrogeles se llevó a cabo con la mezcla de colágeno (275  $\mu$ l) preparada en hielo. Ésta se depositó en el reómetro con control de la tensión (Haake Rheostress 1) (Figura 2.4), previamente calentado a 20 °C, bien nivelado y con la muestra centrada. Todas las muestras se analizaron utilizando una placa cónica con un diámetro de 35 mm y un ángulo de cono de 1 °. A continuación, se bajó el sensor cónico y se comprobó que el hidrogel quedase confinado. Para evitar evaporación y deshidratación del hidrogel durante la medida se cubrió con aceite de baja viscosidad (0,1 Pa) el anillo del hidrogel alrededor del sensor. El hidrogel se dejó polimerizar durante 24 h a 37 °C para su estabilización y las medidas se realizaron aplicando una deformación cíclica de 0.5% de amplitud y 0.1 Hz de frecuencia de excitación. Las propiedades mecánicas analizadas en los hidrogeles de colágeno fueron el módulo de almacenamiento o módulo elástico ( $G'$ ), su valor  $G'$  máxima y la tensión al

máximo orden de  $G'$ . Todos ellos permiten caracterizar la respuesta elástica de los hidrogeles de colágeno. De esta forma, el módulo de almacenamiento está asociado con la energía en el material y se determina como el cociente entre la tensión aplicada que está en fase con la deformación y la propia deformación.



**Figura 2.4. Reómetro Haake Rheostress 1**

*Imagen tomada de internet de Hilco Global Company.*

## **2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para obtener información microestructural de las fibras de colágeno se utilizó la Microscopía Electrónica de Barrido. Esta técnica es capaz de obtener imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra mediante el barrido de la misma con un haz de electrones focalizado.

Este procedimiento se llevó a cabo con la colaboración del Servicio de microscopia del INA en la Universidad de Zaragoza. Se adquirieron imágenes utilizando un SEM Inspect™ F50 (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) en un rango de energía entre 0 y 30 KeV (Figura 2.5).

Los hidrogeles, para el estudio de su microestructura, se prepararon como ya se describió anteriormente y se dejaron estabilizar durante 24 h en una cámara húmeda a 37 °C. Primero, se sometieron a un proceso de deshidratación gradual en soluciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 80, 95 y 100%) y se congelaron individualmente en

nitrógeno líquido. Después, se colocaron en tubos en el liofilizador (Telstar cryodos Freeze Drier) durante al menos 24 h. Finalmente, los hidrogeles se recubrieron con una película de carbono antes de ser examinados con la técnica SEM.



Figura 2.5. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo CSEM-FEG INSPECT F50

Imagen tomada del Laboratorio de microscopías avanzadas.

## 2.7. Cuantificación del alineamiento de fibras de colágeno

La alineación de las fibras de las redes de colágeno se obtuvo analizando sus imágenes SEM (hasta diez para cada muestra) a diferentes niveles de zoom. El estudio de alineamiento lo llevó a cabo el Dr. Carlos Borau, investigador del grupo de Multiescala en Ingeniería Mecánica y Biológica (M2BE). El índice de alineación ( $\alpha$ ) se estimó utilizando un método discreto de Transformada de Fourier (FT), siguiendo el protocolo descrito en Sander y col. [225] y Fraley y col. [226]. En términos generales, FT permite la descripción de una imagen digital (tamaño  $M \times N$ ) en términos de la frecuencia de sus componentes y puede calcularse como:

$$FT(u, v) = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-i2\pi(ux/M + vy/N)}$$

donde  $x$  e  $y$  son las coordenadas espaciales de la imagen,  $u$  y  $v$  son los componentes de frecuencia a lo largo de  $x$  e  $y$  en el dominio de Fourier, e  $i = \sqrt{-1}$ . La magnitud del FT se expresa como:

$$|FT(u, v)|^2 = R^2(u, v) + I^2(u, v)$$

donde R e I son las partes real e imaginaria de FT respectivamente. Luego, la intensidad integrada ( $F_1(\theta)$ ) se puede calcular a través del centro de la imagen en diferentes orientaciones, en coordenadas polares, para finalmente transformarla en coordenadas cartesianas y obtener:

$$C_{xy}(\theta) = [F_1(\theta)\cos(\theta), F_1(\theta)\sin(\theta)]$$

que se utiliza, junto con su transposición ( $[C_{xy}^T C_{xy}]$ ), para extraer los valores propios ( $\lambda_2 > \lambda_1$ ) que determinan el índice de alineación, que varía de 0 (estructuras completamente isotrópicas) a 1 (estructuras completamente alineadas):

$$\alpha = 1 - \lambda_2 / \lambda_1$$

## **2.8. Microscopía de inmunofluorescencia**

La visualización de la distribución del citoesqueleto de los filamentos de actina y los microtúbulos de tubulina, en los experimentos de protrusiones de osteoblastos HOB, se llevó a cabo con el Microscopio Confocal Zeiss LSM 880 en el Servicio Científico Técnico de Microscopía e Imagen del Instituto de Ciencias de la Salud de Aragón (IACS) siguiendo el protocolo que a continuación se indica.

Las células se fijaron después de 4 h de siembra con 4% paraformaldehído durante 20 min y se lavaron 5 veces con solución salina tamponada con buffer fosfato 1X (PBS) a temperatura ambiente. A continuación, se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 (Calbiochem) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente, y se lavaron 3 veces con PBS. El bloqueo se llevó a cabo con 5% de albúmina de suero bovino en PBS (Sigma, BSA/PBS) con 3% de suero de cabra (Sigma, G 9053), durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se incubaron con faloidina-TRITC (50 µg/ml, isotiocianato de faloidina-tetratilrodamina B (TRITC), Sigma) para teñir el citoesqueleto de actina y  $\alpha$ -tubulina (1 µg/ml, clon DMA1A Alexa Fluor 488 conjugado, Sigma) a 4 °C durante la noche en oscuridad y se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min cada lavado. Finalmente, se incubaron con una solución de DAPI (100 µg/ml, 4',6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen) durante 2 h para teñir los núcleos celulares y se lavaron tres veces con PBS.

## **2.9. Inhibición de la degradación de la matriz**

Para avanzar en la comprensión de la actividad de las metaloproteasas, se realizaron experimentos de migración y de formación de protrusiones en presencia del inhibidor de MMP de amplio rango marimastat (Sigma), el cual une átomos de zinc en el sitio activo de las metaloproteasas de la matriz inhibiendo la acción de las MMP y bloqueando su función [227]. La actividad proteolítica de los osteoblastos HOB se inhibió con marimastat en DMSO (Amresco) y se mezcló con la solución del hidrogel de colágeno a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Después de la polimerización, la matriz se hidrató con medio de crecimiento de osteoblastos (OGM) y con 10  $\mu\text{M}$  marimastat. Los experimentos llevados a cabo indicaron que el marimastat no afecta a la viabilidad de los osteoblastos HOB en concentraciones por debajo de 15  $\mu\text{M}$ .

Por otro lado, se intentó cuantificar la degradación de la matriz extracelular mediante un ensayo de proteólisis extracelular, cultivando los osteoblastos en presencia de DQ colágeno y obteniendo imágenes de fluorescencia mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes, no obstante, se muestran en el Apéndice 3.

## **2.10. Inhibición de las proteínas del citoesqueleto**

Los experimentos de formación de protrusiones de osteoblastos se llevaron a cabo en presencia del inhibidor blebistatina (EMD Millipore), un inhibidor de la actividad de la ATPasa de las isoformas de miosina II, bloqueando la contracción [228], y del inhibidor CK-636 (Sigma), un inhibidor de la polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3 que reduce la formación de filamentos de actina e inhibe la formación de lamelipodios. La blebistatina se añadió a una concentración final de 30  $\mu\text{M}$  y el CK-636 de 100  $\mu\text{M}$  [208], [229]. Se mezclaron con el hidrogel de colágeno y se añadieron las mismas concentraciones en el medio de hidratación, después de la polimerización. Los experimentos con estos inhibidores se llevaron a cabo de forma separada y se comprobó la viabilidad celular con azul de tripano comprobando que la citotoxicidad no excediera el 10% de muerte celular después de la incubación en las concentraciones indicadas.

### **2.11. Ensayo de adhesión celular con fibronectina**

Con el fin de mejorar la unión de las células a la matriz de colágeno se llevó a cabo un tratamiento con fibronectina, una glucoproteína abundante en la MEC que une eficientemente colágenos, fibrina y proteoglicanos con moléculas de adhesión celular como las integrinas, regulando la adhesión, migración, proliferación y supervivencia de las células. La concentración de fibronectina utilizada fue de 10 µg/ml y el pretratamiento de las superficies se llevó a cabo durante 24 h en los ensayos de migración colectiva de fibroblastos y en los de protrusiones de osteoblastos se aplicó en el momento de la siembra de los mismos.

### **2.12. Cuantificación de metaloproteasas de matriz mediante zimografía cuantitativa en gel**

El siguiente procedimiento se desarrolló en el Servicio Científico de la Unidad de Proteómica del Instituto de Ciencias de la Salud de Aragón (IACS).

La actividad inestable de las MMPs se une a muchas condiciones fisiopatológicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, sobre todo si se asocia con la remodelación de la matriz extracelular.

La zimografía es una técnica que permite visualizar la presencia de actividad enzimática, en este caso proteasas, mediante electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida que contienen diversos sustratos de las proteasas. La principal ventaja de la zimografía en gel es que permitió visualizar tanto las formas latentes como las activas, además de la separación de las bandas MMP-2 y MMP-9 en la misma muestra biológica.

Las muestras se cuantificaron con el ensayo Bradford compatible con el detergente Pierce de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Pierce). Se diluyeron (1:1) con tampón de muestra no desnaturizante (Tampón de muestra Laemmli sin mercaptoetanol, BioRad Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se sometieron a SDS-PAGE utilizando un 5% de poliacrilamida (para el gel concentrador) y un gel de SDS-poliacrilamida al 8% que contenía 1 mg/ml de gelatina, para el gel separador. La electroforesis se realizó a 80 V durante 10 min, seguido de 100 V hasta 2 h. Después de 2 h, el gel se retiró y se lavó con 100 ml de

tampón de renaturalización (2.5% v/v de Tritón X-100) a temperatura ambiente con agitación suave. Después de 30 min, el gel se lavó con 100 ml de tampón de revelado (Tris HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.9). La reacción gelatinolítica se indujo mediante incubación a 37 °C en un tampón de revelado fresco durante la noche (16-18 h). El gel se retiró del tampón de revelado y se lavó suavemente tres veces con 100 ml de agua desionizada durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, el gel se tiñó con 100 ml de azul de Coomassie al 0.5% en metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 2 h a temperatura ambiente, y luego se destiño con 100 ml de agua desionizada con agitación suave durante 2 h a temperatura ambiente. Para obtener mejores resultados, se realizaron dos o tres lavados con agua. La adquisición de imágenes de gel se llevó a cabo mediante un densitómetro calibrado BioRad modelo DS800 y su análisis mediante el software “Quantity One” (BioRad Laboratories, Hercules, CA).

### **2.13. Adquisición y procesamiento de imágenes**

La adquisición de imágenes en los experimentos de la monocapa de fibroblastos NHDF-GFP, migración y protrusiones de osteoblastos HOB se llevó a cabo con el Microscopio Confocal Nikon D-Eclipse C1 y las de inmunofluorescencia de protrusiones con el Microscopio Confocal Zeiss LSM 880 con el objetivo EC Plan-Neofluor 63X/1.25 Oil M27.

El objetivo utilizado para la adquisición de imágenes de monocapa de fibroblastos NHDF-GFP fue el CFI PL Fluor DLL 10X AN 0.30 WD 16MM DLL, las cuales se tomaron cada 24 h en contraste de fases y fluorescencia (GFP), durante 24-312 h dependiendo del experimento. El plano focal se eligió aproximadamente en la mitad del dispositivo a lo largo del eje z del dispositivo, enfocando las células que estaban completamente en la matriz 3D. La referencia tomada para las imágenes de los mosaicos fue el punto central del dispositivo que se corresponde con el tercer pilar en el centro del dispositivo, el cual divide la cámara central en dos.

Las imágenes de migración de osteoblastos HOB se obtuvieron capturando fotos en contraste de fases cada 20 min durante 24 h con el objetivo CFI PL Fluor DLL 10X AN 0.30 WD 16MM. El plano focal se eligió como se mencionó anteriormente.

La adquisición de imágenes de protrusiones de osteoblastos HOB se realizó con el objetivo CFI PL Fluor ELWD ADM 20X AN 0.45 en microscopía de contraste de fases. Para la cuantificación de la dinámica de protrusiones durante su inicio, y una vez que se identificó la célula de interés, se capturaron automáticamente una serie de 49 imágenes (24 cortes horizontales sobre y bajo el plano focal) cada 5  $\mu\text{m}$  a intervalos de 5 min durante 4 h, comenzando inmediatamente después de la polimerización de la matriz.

La cuantificación de la concentración de PDGF-BB-Alexa 647 se llevó a cabo tomando imágenes utilizando el objetivo CFI PL Fluor DLL 10X AN 0.30 WD 16MM con el filtro Cy5 (excitación 620/60 nm). Se capturaron imágenes desde tiempo 0, a distintos intervalos, hasta 5 h en algunos casos. El tiempo de exposición se modificó en función de la concentración añadida de factor de marcaje, desde 900 ms hasta 2 s.

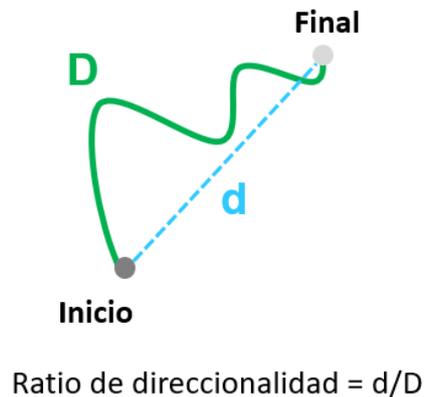
Las imágenes de microscopía confocal de reflexión se adquirieron utilizando el microscopio Nikon D-Eclipse C1 con el objetivo Plan Apo VC 60XP.

#### **2.14. Análisis de imágenes**

Las imágenes de la monocapa de fibroblastos NHDF-GFP se analizaron de una forma semi-automática con un código generado con el programa MATLAB por el Dr. Carlos Borau, que consta de un conjunto completo de algoritmos, funciones y aplicaciones dedicadas al procesamiento, el análisis y la visualización de imágenes. Dichos códigos se utilizaron para encontrar y seguir los centroides celulares, haciendo corrección visual cuando era necesario, y finalmente se procesaron los resultados. Con dicho programa se llevó a cabo el conteo de las células y el avance de monocapa celular en las distintas condiciones, representando la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la dirección del movimiento de la misma.

El análisis de las imágenes de migración de osteoblastos HOB se llevó a cabo aproximadamente con 130 células de cada experimento en las distintas condiciones. El seguimiento de la trayectoria de las células se llevó a cabo utilizando un código de MATLAB semiautomático, ya utilizado en trabajos anteriores [141], [230], [231]. Se han analizado varios parámetros de migración, como la velocidad media (instantánea) y la efectiva (euclídea), así como las velocidades de persistencia que indican la capacidad de las células para mantener una dirección de movimiento, el desplazamiento de mínimos

cuadrados (MSD) o la ratio de direccionalidad (Figura 2.6), es decir la relación promedio del desplazamiento dirigido (neto) y la longitud total de la trayectoria celular en función del tiempo. La trayectoria total de la célula aparece marcada y en los histogramas polares se muestran la direccionalidad de la migración de las células con respecto al punto final que alcanza.

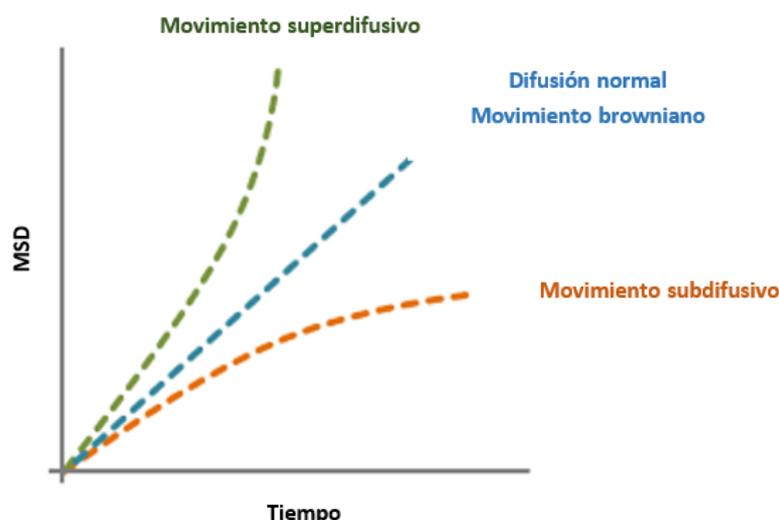


**Figura 2.6. Ratio de direccionalidad**

La ratio de direccionalidad se calcula entre el inicio y el final de la trayectoria de cada célula.

Se observó la autocorrelación (ACF) de las velocidades celulares, siendo ésta una medida entre dos variables separadas por  $k$  unidades de tiempo que indica que los valores que toma una variable en el tiempo no son independientes entre sí, sino que un valor determinado depende de los valores anteriores. Por tanto, un valor de  $ACF = 0$  significaría que el movimiento es completamente aleatorio. La isotropía (aleatoriedad) o anisotropía (alineamiento) del entorno celular se refiere a la dirección del movimiento celular que actúa de forma independiente de la contractibilidad en sinergia con la contractilidad de la actomiosina en el caso de anisotropía. El análisis de la difusividad viene dado por el MSD que corresponde a la medición de la aleatoriedad migratoria [232], donde un MSD lineal significa que las células se desplazan aleatoriamente en el tiempo y un MSD que incrementa en el tiempo (superdifusivo) es indicativo de movimiento dirigido. Las células tienen movimientos dirigidos, durante un periodo corto de tiempo, lo que significa que tienden a moverse en línea recta (en una dirección persistente); no obstante, si se observa un movimiento dirigido durante bastante tiempo es indicativo de pérdida de aleatoriedad en el movimiento debido quizás a un gradiente químico y/o mecánico. Un MSD que decrece en el tiempo (subdifusivo) es indicativo de que las células están limitadas por alguna variable extracelular, por ejemplo,

interacciones inhibitorias célula-célula o célula-sustrato [233] (Figura 2.7). Las curvas MSD se ajustaron tanto a un modelo de caminos aleatorios persistentes (PRW) como a un modelo de caminos aleatorios persistentes anisotrópicos (APRW) [234] que proyectaron las trayectorias en una dirección primaria (p) y una secundaria (np) para analizar su anisotropía inherente. Por lo tanto, se determinó el índice de anisotropía y el coeficiente de difusión en las direcciones primaria y secundaria siguiendo el trabajo de Wu y col. [235].

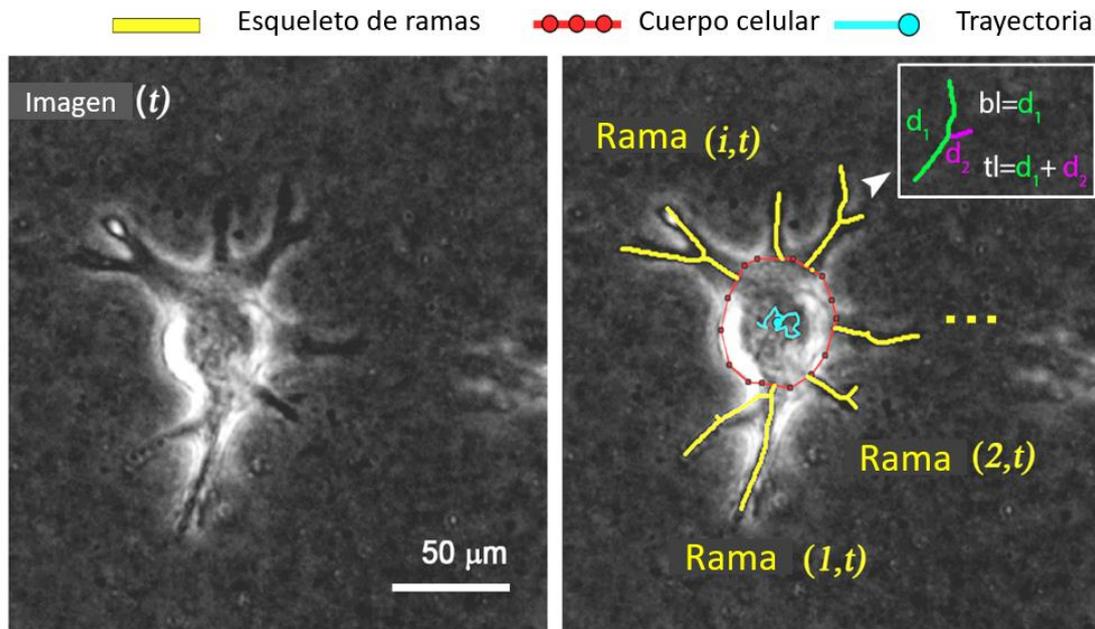


**Figura 2.7. MSD (Desplazamiento de mínimos cuadrados)**

El desplazamiento de mínimos cuadrados de las trayectorias seguidas (MSD) incrementa exponencialmente en el tiempo por movimiento dirigido (superdifusivo), aumenta linealmente cuando el movimiento es aleatorio (movimiento browniano) y decrece en el tiempo por limitaciones extracelulares (subdifusivo).

El análisis cuantitativo de las imágenes de las protrusiones permitió determinar la longitud de cada protrusión, el número de brazos activos, las ramificaciones (entendidas como bifurcaciones o división de una protrusión), la vida útil y la trayectoria de las células. Los datos se adquirieron mediante un código de MATLAB semiautomático codificado a mano (Figura 2.8 y Figura 2.9). Los pasos llevados a cabo fueron: i) analizar las imágenes del z-stack en los distintos tiempos y ii) seleccionar el mejor plano enfocado (z) de la célula deseada. A continuación, iii) se dibujó manualmente el contorno del cuerpo celular, así como sus brazos y ramificaciones en cada tiempo a groso modo, de forma que el software busca el esqueleto morfológico de las máscaras dibujadas por el usuario. Es importante destacar que, dado que el análisis de la imagen se realiza en 2D, las células con protrusiones en el plano xy se seleccionaron preferentemente para

disminuir el error de las mediciones geométricas. Se realizaron ANOVA seguidos de pruebas post-hoc de Tukey-Kramer para determinar la significación estadística entre los parámetros mencionados anteriormente en las diferentes condiciones.



**Figura 2.8. Imagen de protrusiones de la célula**

Imagen original (izquierda) frente a la procesada (derecha). El cuerpo inicial de la célula se traza manualmente (línea de puntos roja). Se actualiza en cada imagen a lo largo del tiempo y se usa como máscara de sustracción del esqueleto de segmentación celular para obtener las ramas/protrusiones individuales (líneas amarillas) y para obtener la trayectoria de la célula (azul celeste). El algoritmo mide automáticamente la longitud y las ramificaciones de los brazos y su evolución en el tiempo. Como ejemplo, la célula que se muestra en ese paso de tiempo en particular tiene 6 brazos activos, 4 de ellos con ramificaciones. En cuanto a las mediciones, se tiene en cuenta que la longitud del brazo (bl) se toma como la distancia desde el cuerpo celular hasta la punta de la rama más alejada (es decir, la ruta más larga), que ignoran las bifurcaciones. La longitud total (tl), sin embargo, considera (suma) todos los segmentos que forman el brazo (véase la nota de la figura en la esquina superior derecha). La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.9. Esquema de seguimiento de protrusiones de una célula**

Procedimiento esquemático de los pasos seguidos para cuantificar la geometría de los brazos y ramificaciones.



### **3. RESULTADOS**

---

---



Esta sección se centra, por un lado, en el estudio del efecto de la matriz extracelular en la migración de una monocapa de fibroblastos ante distintas rigideces de colágeno en procesos de haptotaxis, quimiotaxis y durotaxis. Por otro lado, se enfoca en el papel que desempeñan las propiedades mecanoquímicas de la matriz extracelular y los gradientes de factor químico en la migración y en la dinámica de las protrusiones de osteoblastos en 3D, así como en su regulación mediante la degradación de la matriz y en presencia de inhibidores de proteínas del citoesqueleto.

### **3.1. Cuantificación de la migración colectiva de fibroblastos en respuesta a un gradiente químico en 3D**

#### **3.1.1. Ensayos de motilidad celular**

La migración de fibroblastos juega un papel clave durante varios procesos fisiológicos y patológicos que incluyen la cicatrización de heridas [31], [236] y el desarrollo del cáncer [168], [237]. Durante estos procesos, los fibroblastos remodelan las fibras de colágeno, degradando y sintetizando matriz extracelular [238]. Aunque la migración de fibroblastos individuales ha sido bien estudiada, la migración *in vivo* a menudo implica el movimiento de fibroblastos colectivo con interacciones célula-célula.

Este estudio tiene como objetivo intentar comprender los efectos de la densidad de la matriz extracelular en las interacciones célula-matriz y célula-célula durante la migración de una monocapa de fibroblastos, así como el efecto de los factores químicos en respuesta a señales de unión (haptotaxis), solubles (quimiotaxis) y mecánicas (durotaxis).

Para el estudio de estas condiciones, se llevó a cabo la siembra de una monocapa de fibroblastos en dispositivos microfluídicos de una o tres cámaras, según las condiciones analizadas, para poder visualizar la distribución de la migración de los fibroblastos en función del tiempo. La migración se observó desde el momento de siembra de la monocapa de fibroblastos en 2D (línea base), viendo su evolución en el hidrogel de colágeno en 3D, desde el inicio de entrada de las células en la matriz de colágeno. El número inicial de células adheridas en la monocapa de fibroblastos varía ligeramente en cada dispositivo, pero esta variación no repercute en los resultados de

los experimentos llevados a cabo, ya que solamente implica un avance más o menos rápido en función del tiempo. En los experimentos analizados no se encontraron diferencias significativas en los resultados respecto a la densidad sembrada y adherida. El avance de los fibroblastos de la monocapa se analizó desde el momento en que las células comenzaron a invadir la matriz de colágeno en 3D desde la línea base, cada 24-48 h, hasta un máximo de 312 h en los ensayos de durotaxis. Las distintas condiciones analizadas incluyeron un rango de 68 a 254 células, las cuales se rastrearon aproximadamente en tiempos de 48, 72 y 96 h, dependiendo del experimento. Es importante destacar que la migración de los fibroblastos de la monocapa, una vez se encuentran en 3D en el hidrogel de colágeno, se realiza de una forma individual.

El efecto quimiotáctico del factor de crecimiento derivado de plaquetas humano (PDGF-BB) en fibroblastos ha sido estudiado ampliamente en diferentes concentraciones [239], [240], y en este trabajo se analizó su efecto en la monocapa, tanto quimiotáctico como haptotáctico. En el proceso de quimiotaxis, las células pueden percibir la señal direccional pasivamente por difusión; sin embargo, en la haptotaxis se requiere que las células migren hacia una señal unida al sustrato.

Por otro lado, para analizar el efecto mecánico de la matriz extracelular mediante durotaxis en la migración de los fibroblastos de la monocapa, se utilizaron dispositivos de microfluídica de tres cámaras con distintas concentraciones de hidrogel de colágeno (Figura 2.2C). Dicho efecto es necesario para poder entender el movimiento de las células en su entorno, ya que éste puede tener un papel importante en la cicatrización de heridas.

Las células utilizadas para estos ensayos fueron fibroblastos que expresan la proteína GFP (proteína fluorescente verde), lo cual facilita el seguimiento de las células, así como el análisis de las imágenes. La viabilidad de las células se confirmó con la expresión de la proteína GFP, además de verificar su morfología elongada y aspecto normal en 3D. Las imágenes correspondientes a este apartado se tomaron con el microscopio Nikon D-Eclipse con el objetivo Plan Fluor 10X, tal y como se indica en el apartado 2.13 de material y métodos.

La concentración del factor de crecimiento PDGF-BB aplicada en estos experimentos fue de 5 ng/ml, basada en los resultados obtenidos de trabajos previos

[230], [241]. El PDGF-BB y el medio de cultivo de todos los experimentos llevados a cabo se renovó cada 48 h.

Los resultados de las distintas condiciones analizadas de haptotaxis, quimiotaxis y durotaxis se explican a continuación.

#### **3.1.1.1. Aplicación de un gradiente haptotáctico con PDGF-BB para la migración celular dirigida de una monocapa de fibroblastos NHDF-GFP**

La haptotaxis es el proceso por el cual las células responden a gradientes de señales unidas a sustrato, tales como proteínas de la matriz extracelular. Desde hace tiempo, se conoce que las células pueden migrar *in vitro* en un gradiente de sustrato adherido (haptotaxis) [242]; sin embargo, el mecanismo celular de esta respuesta sigue siendo poco conocido y se ha estudiado principalmente, comparando el comportamiento celular en matrices extracelulares uniformes con diferentes concentraciones de factores químicos. Es probable que la haptotaxis contribuya a muchos eventos fisiopatológicos, como la cicatrización de heridas cutáneas [65], [66], la respuesta a la enfermedad cardiovascular [243], aterosclerosis y a la progresión del cáncer [68], [244], [245].

Para estudiar la haptotaxis en respuesta a gradientes químicos, se utilizan dispositivos microfluídicos en los que se genera un gradiente del factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas en distintas condiciones, y se analizan las imágenes de la respuesta de la migración celular de los fibroblastos de la monocapa.

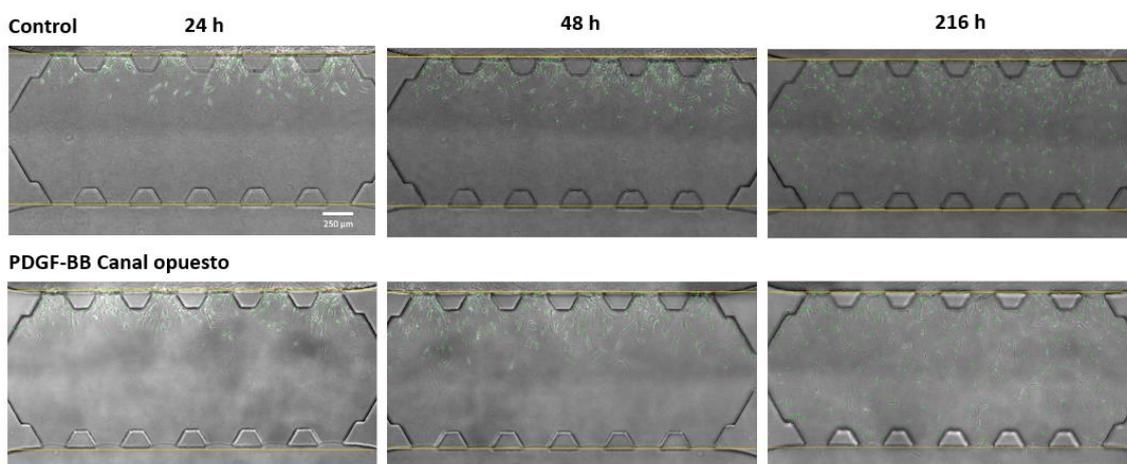
En los siguientes apartados se explica el efecto del pretratamiento con y sin eliminación del PDGF-BB no adherido y con pretratamiento con fibronectina en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno para generar el gradiente haptotáctico.

##### **i. Efecto del pretratamiento con PDGF-BB en haptotaxis, en hidrogeles de 2.5 mg/ml, con eliminación del factor químico no adherido**

Los experimentos se llevaron a cabo en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, a los cuales se añadieron 5 ng/ml de PDGF-BB. Las distintas condiciones analizadas consistieron en la adición del factor químico en el canal opuesto a la siembra de la monocapa de fibroblastos, en el canal de la monocapa y en ambos canales a la vez. Al

cabo de 24 h se eliminó de los canales el factor químico no adherido, mediante dos lavados con medio de cultivo, y se procedió a la siembra de la monocapa de fibroblastos, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1 de material y métodos.

El primer experimento de haptotaxis se llevó a cabo pretratando los hidrogeles de colágeno con el factor químico PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa de fibroblastos, y la migración de los mismos se puede ver en la cámara central de un dispositivo microfluídico en la Figura 3.1. Los resultados obtenidos muestran una distribución más homogénea de los fibroblastos en el hidrogel que fue pretratado con el factor químico, tal y como se puede visualizar al cabo de 216 h, lo cual es indicativo de que se ha producido unión del factor químico al colágeno.

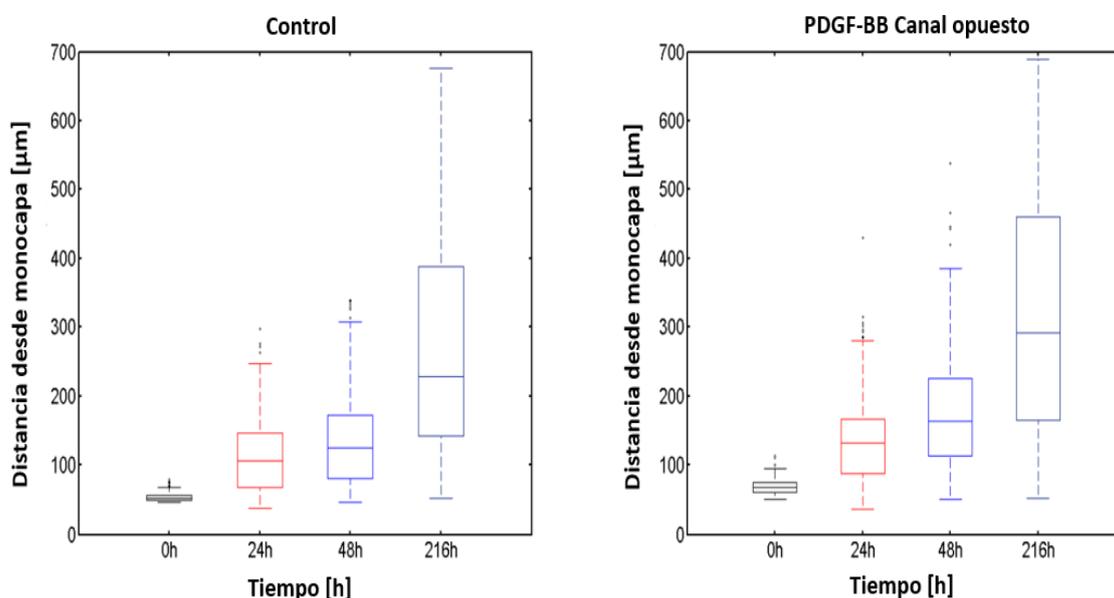


**Figura 3.1. Migración de los fibroblastos de la monocapa con pretratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la monocapa**

Se muestran imágenes de la migración de los fibroblastos, a las 24, 48 y 216 h, en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno control y con pretratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto al de la siembra de la monocapa de fibroblastos. Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentra confinado el hidrogel de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en el hidrogel. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3.2 y la Figura 3.3 muestran la distancia perpendicular a la monocapa recorrida por los fibroblastos. Al cabo de 48 h, tal y como se puede ver en la Figura 3.2, la mediana de los valores de la distancia recorrida en los hidrogeles de la condición control fue de 124.8  $\mu\text{m}$  y en los pretratados con PDGF-BB fue de 164  $\mu\text{m}$ , es decir, la distancia recorrida por los fibroblastos en presencia del factor químico aumentó un 31%. Para comprobar si este efecto se mantenía en el tiempo, se midió la distancia recorrida en los hidrogeles de los fibroblastos a las 216 h, y la mediana de los valores obtenida fue de 228.8 y 292  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles control y en los pretratados con PDGF-BB,

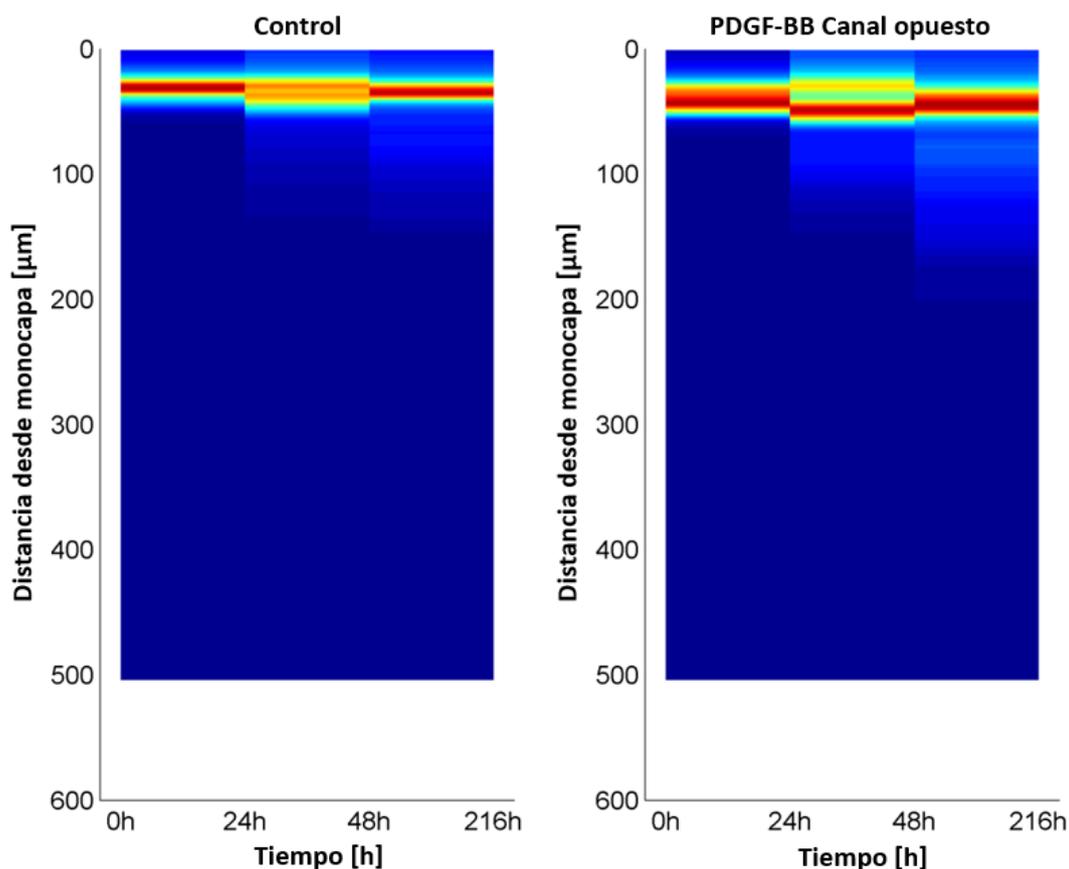
respectivamente, lo cual representa un aumento de un 28%. Estos valores confirman que el efecto del PDGF-BB producido por haptotaxis, en la migración de los fibroblastos al cabo de 48 h se mantiene también al cabo de 216 h.



**Figura 3.2. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con pretratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos, a las 24, 48 y 216 h, en los hidrogeles control y en los pretratados con factor químico en el canal opuesto a la siembra de la monocapa, durante 24 h, eliminando el PDGF-BB no adherido antes de la siembra de la monocapa. Se realizaron dos experimentos independientes con cinco réplicas técnicas en el control y cuatro con pretratamiento con factor químico en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.

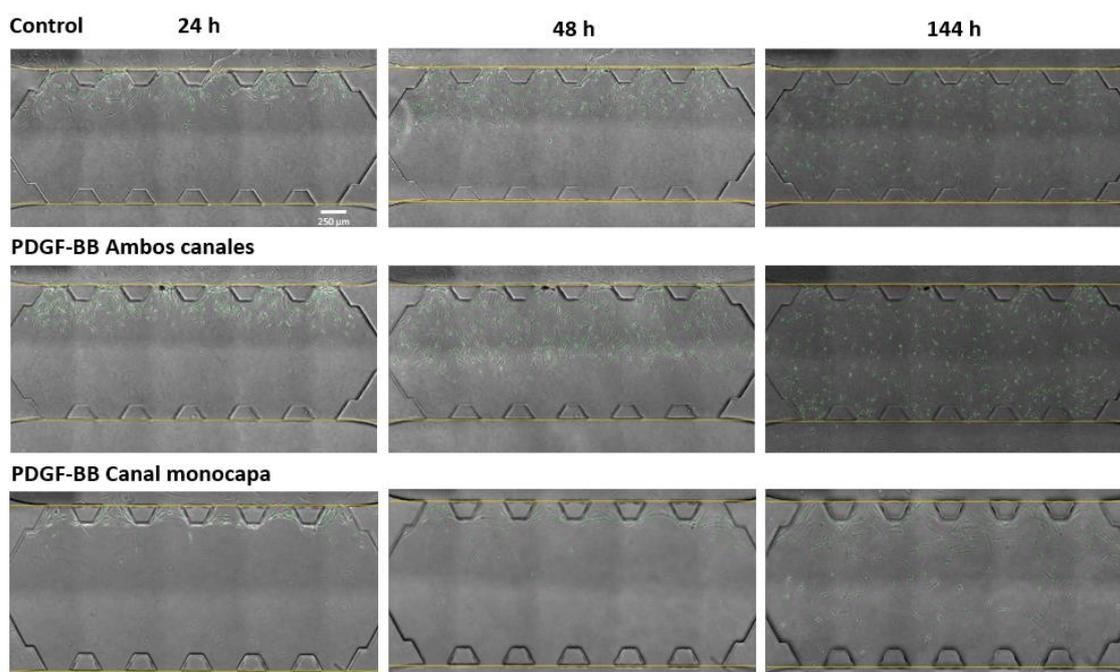
En la Figura 3.3 se puede ver la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la dirección del movimiento de los fibroblastos en perpendicular a la monocapa (eje Y) y a lo largo del tiempo (eje X), correspondiendo el color rojo más oscuro a zonas con mayor cantidad de células y el azul oscuro a zonas sin fluorescencia. Es decir, esta figura, correspondiente a dos experimentos independientes, muestra para cada intervalo entre el tiempo de inicio y el tiempo final, la suma de intensidades de fluorescencia (normalizada en cada tiempo) para cada línea de píxeles partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo. Se puede observar que los fibroblastos en los hidrogeles pretratados con PDGF-BB alcanzan mayor distancia que los controles (franja de azules claros alejándose de la línea roja que indica la posición de las células de la monocapa).



**Figura 3.3. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con pretratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

La intensidad de fluorescencia representa la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles de colágeno en el control y en el pretratado con PDGF-BB, en los intervalos de 0-24, 24-48 y 48-216 h, partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo; es decir, a mayor fluorescencia, mayor número de células.

El segundo experimento de haptotaxis se llevó a cabo pretratando los hidrogeles de colágeno con PDGF-BB, bien en el canal de siembra de la monocapa de fibroblastos o en ambos canales a la vez (canal de siembra de la monocapa y canal opuesto). La Figura 3.4 muestra la migración de los fibroblastos en estas condiciones en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno de un dispositivo microfluídico. Al igual que en la condición anterior, al cabo de 144 h, se muestra una distribución más homogénea de los fibroblastos en el hidrogel que fue pretratado con el factor químico en ambos canales con respecto al control; sin embargo, en el hidrogel pretratado en el canal de la monocapa la distribución celular está más concentrada en la zona más cercana a la siembra en el hidrogel de colágeno.

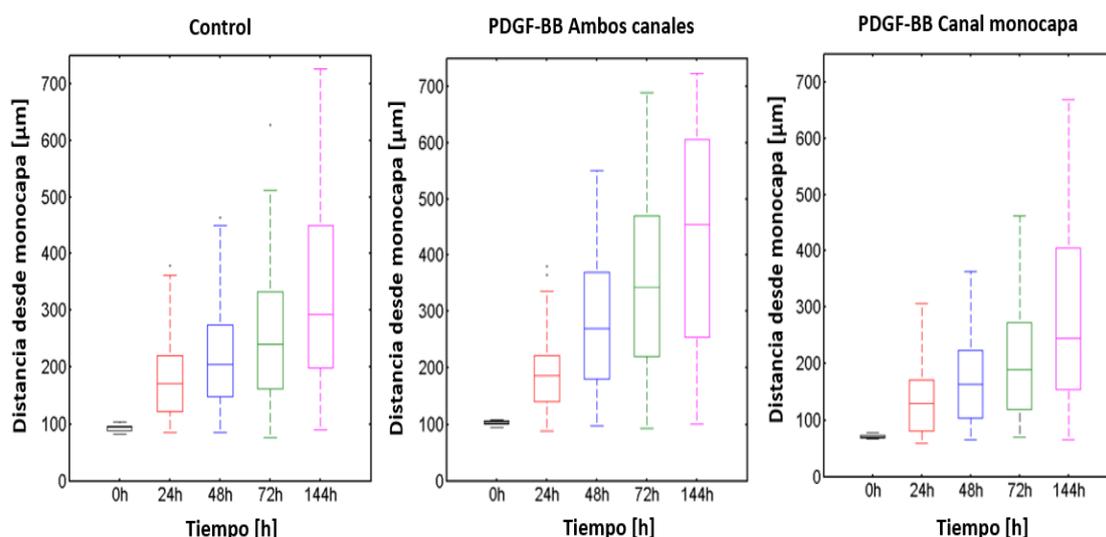


**Figura 3.4. Migración de los fibroblastos de la monocapa con pretratamiento de PDGF-BB, en ambos canales y en el canal de siembra de la monocapa, en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno**

Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentra confinado el hidrogel de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en el hidrogel. Las imágenes se tomaron a las 24, 48 y 144 h. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

Las Figura 3.5 y la Figura 3.6 muestran la distancia recorrida por los fibroblastos en los hidrogeles pretratados con PDGF-BB, en ambos canales y en el canal de siembra de la monocapa. La Figura 3.5 muestra la mediana de los valores obtenida de la distancia recorrida por los fibroblastos en función del tiempo. Estos valores, al cabo de 48 h, fueron de 204.8, 268.8 y 163.2  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles control, en los pretratados en ambos canales y en los pretratados en el canal de la monocapa, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron que el efecto en la migración de los fibroblastos de la monocapa, en la condición de pretratamiento con PDGF-BB en ambos canales, aumentó en un 31%, siendo similar a la de los pretratados en el canal opuesto de la Figura 3.2; sin embargo, el efecto producido en el canal de siembra de la monocapa mostró que la distancia recorrida fue incluso menor que en el control (reducción del 20%), lo cual puede ser debido a una concentración óptima del factor químico adherido en la zona de entrada del hidrogel, lo que favorecería la estimulación y proliferación de los fibroblastos en esa zona. La mediana de los valores del recorrido de los fibroblastos, al cabo de 144 h, fue de 292, 454.4 y 244.8  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles control, en los pretratados

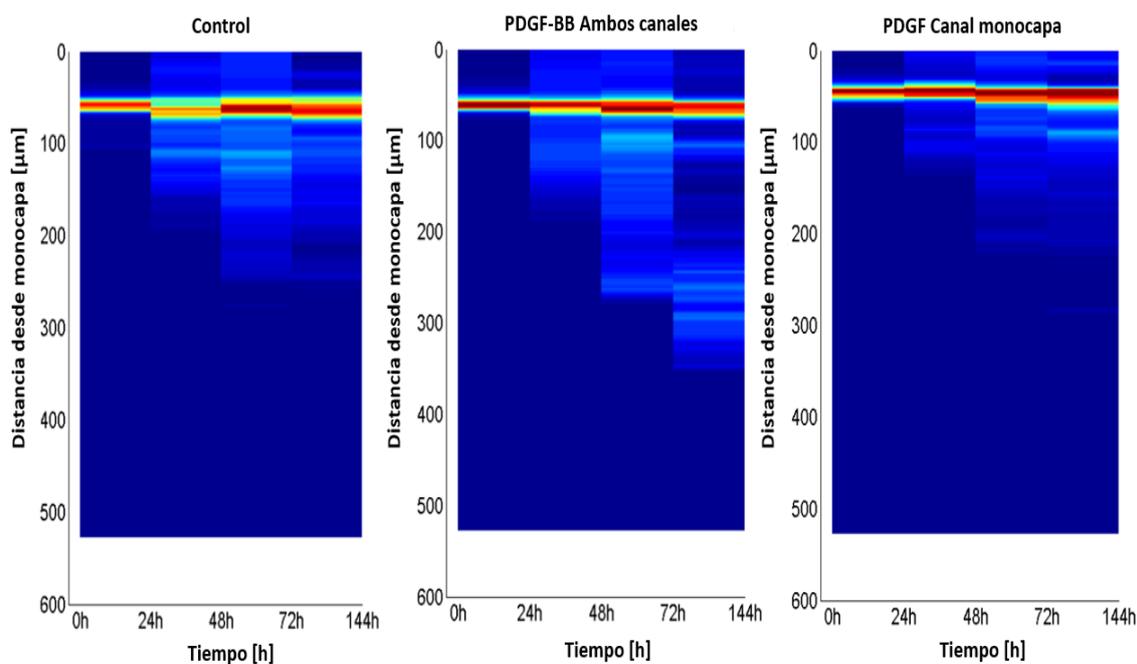
con PDGF-BB en ambos canales (monocapa y opuesto) y en los pretratados en el canal de la monocapa, respectivamente. Las distancias recorridas aumentaron un 56% cuando el PDGF-BB se aplicó en ambos canales, incrementando en función del tiempo, y en el caso del pretratado en el canal de la monocapa se redujeron un 16% comparadas con el control. Los resultados obtenidos muestran de nuevo que parece existir una unión del factor químico al colágeno, el cual al ser aplicado en ambos canales a la vez resulta en una mayor estimulación de la migración de los fibroblastos de la monocapa.



**Figura 3.5. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con pretratamiento de PDGF-BB añadido en ambos canales y en el canal de siembra de la monocapa**

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos en los hidrogeles, al cabo de 24, 48, 72 y 144 h, con pretratamiento de factor químico durante 24 h, en control (izquierda) en ambos canales (centro) y en el canal de siembra de la monocapa (derecha), el cual ha sido eliminado posteriormente antes de la siembra de la monocapa de fibroblastos. Se realizaron dos experimentos independientes con cinco réplicas técnicas en el control, tres con factor en ambos canales y tres con factor en el canal de siembra de la monocapa.

La Figura 3.6 representa la intensidad de fluorescencia del movimiento de los fibroblastos de la monocapa correspondientes a dos experimentos independientes en las condiciones mencionadas anteriormente. Se puede ver claramente en las imágenes que la estimulación mediante el pretratamiento con PDGF-BB en ambos canales da lugar a una mayor migración de los fibroblastos de la monocapa y en el canal de la monocapa observamos, de nuevo, una primera zona con mayor agrupamiento de los fibroblastos donde se ha aplicado el factor químico.



**Figura 3.6. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en ambos canales y en el canal de siembra de la monocapa**

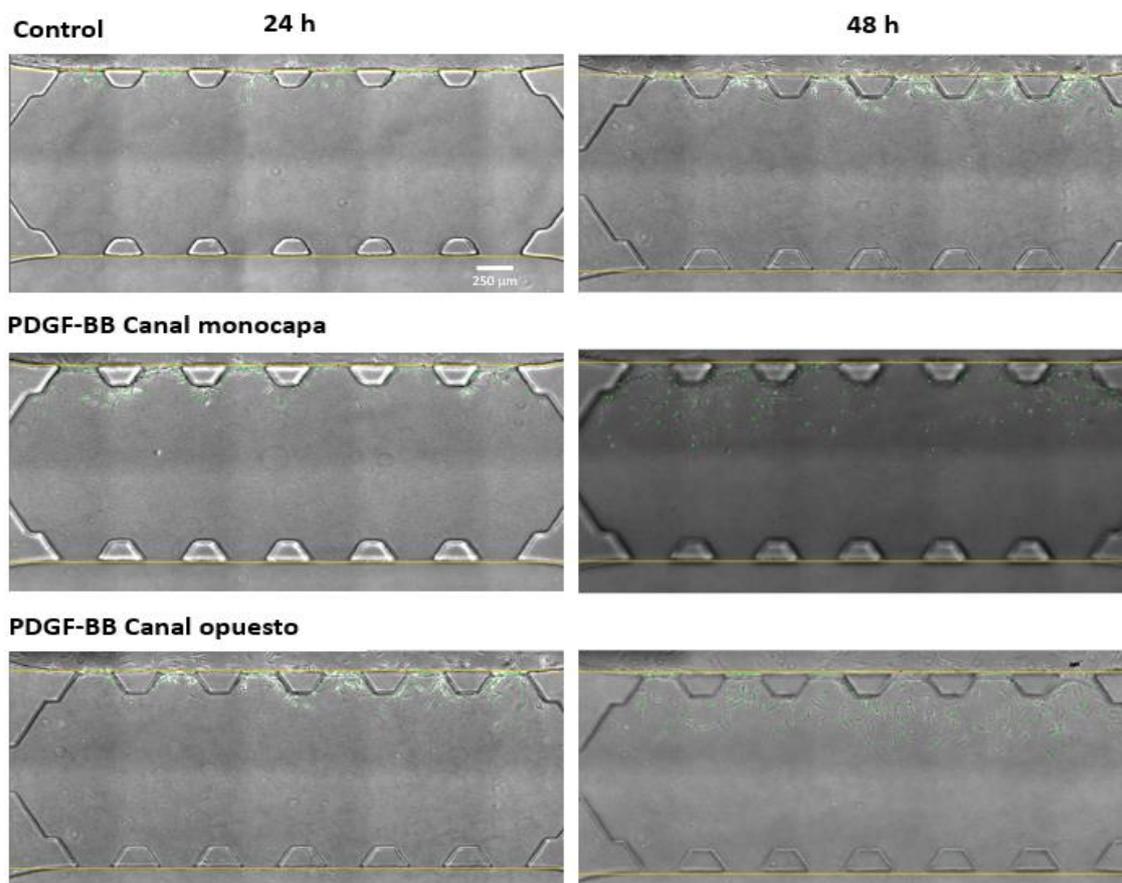
Intensidad de fluorescencia de los fibroblastos a lo largo de los hidrogeles de colágeno en el control (izquierda), en los pretratados con PDGF-BB en ambos canales (centro) y en el canal de siembra de la monocapa (derecha), en los intervalos de 0-24, 24-48, 48-72 y 72-144 h, partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo. Una mayor fluorescencia indica un mayor número de células.

## ii. Efecto del pretratamiento con PDGF-BB en haptotaxis, en hidrogeles de 2.5 mg/ml, sin eliminación del factor químico no adherido

Las distintas condiciones analizadas en el tercer experimento consistieron en la adición del factor químico en el canal de siembra de la monocapa de fibroblastos y en el canal opuesto de la siembra. La diferencia con respecto al experimento anterior fue que no se eliminó el factor químico de los canales al cabo de 24 h, sino que se procedió a la siembra de la monocapa de fibroblastos. Este proceso suele ocurrir en condiciones fisiológicas, cuando una célula está unida a la matriz de colágeno que contiene factores químicos adheridos a la matriz, y a su vez está atraída por gradientes de moléculas solubles.

La migración de las células de la monocapa en los hidrogeles, en ambas condiciones, en la cámara central de un dispositivo microfluídico se puede ver en la Figura 3.7. Los resultados obtenidos, al cabo de 48 h, mostraron diferencias en la

distribución de los fibroblastos en el hidrogel control con respecto a las condiciones en las que se ha añadido PDGF-BB, entre las cuales no se aprecia una diferencia relevante al cabo de 48 h.

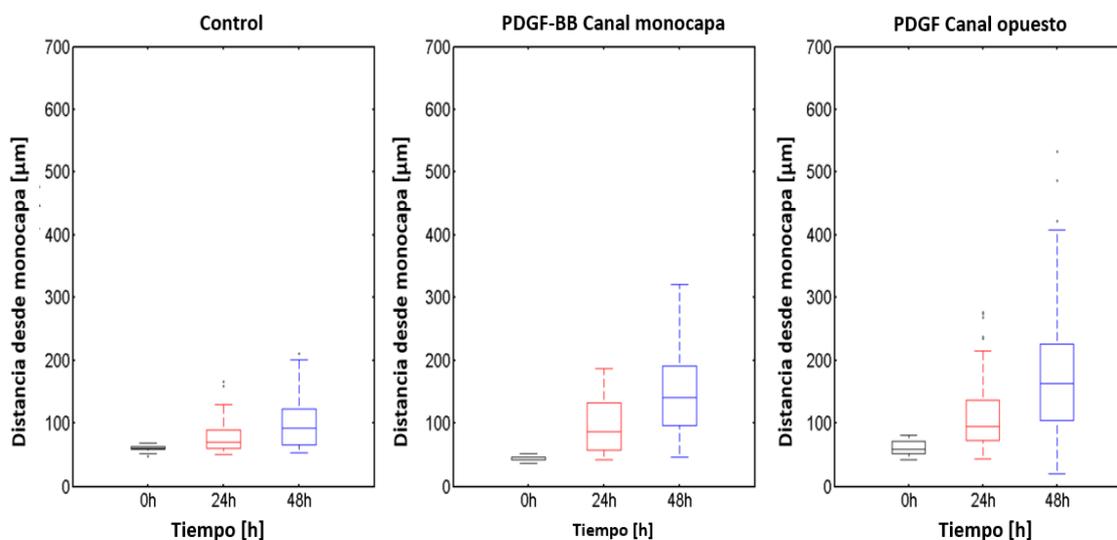


**Figura 3.7. Migración de los fibroblastos de la monocapa con PDGF-BB añadido en el canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto**

Se muestra la migración de los fibroblastos en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno, sin eliminar el factor químico no adherido, a las 24 y 48 h. Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentra confinado el hidrogel de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en el hidrogel. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3.8 muestra la distancia recorrida por los fibroblastos en los hidrogeles tratados con PDGF-BB en el canal de la monocapa y en el canal opuesto. La mediana de los valores obtenida de la distancia recorrida por los fibroblastos al cabo de 48 h fue de 92.8, 140.8 y 163.2  $\mu\text{m}$  en el control, en los tratados en el canal de la monocapa y en el canal opuesto, respectivamente. Estos resultados mostraron que el tratamiento con PDGF-BB, sin eliminación del factor químico no adherido, estimula el avance de las células de la monocapa de una forma más destacada que cuando el factor químico no

adherido se elimina, probablemente por la presencia del PDGF-BB en forma soluble en la matriz de colágeno. El incremento en la migración de los fibroblastos fue del 52% cuando el tratamiento con PDGF-BB se aplicó en la monocapa y del 76% cuando se aplicó en el canal opuesto. Además, estos resultados confirman que la aplicación del factor químico en el canal opuesto a la siembra de la monocapa produce una estimulación más relevante de la migración de los fibroblastos.



**Figura 3.8. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal de la monocapa y en el canal opuesto**

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos de la monocapa en los hidrogeles, al cabo de 24 y 48 h, control (izquierda), con tratamiento de PDGF-BB durante 24 h, aplicado en el canal de la siembra de la monocapa (centro) y en el canal opuesto (derecha), sin eliminación del factor. Se llevó a cabo un experimento con dos réplicas técnicas en el control, dos con factor en el canal de siembra de la monocapa y tres con factor en el canal opuesto.

En la Figura 3.9 se representa la intensidad de la fluorescencia durante el movimiento de las células de la monocapa donde se observa que la distancia recorrida, al cabo de 24 y 48 h, en los hidrogeles tratados con el factor químico en el canal opuesto es mayor que en las otras condiciones, tal y como se ha mencionado anteriormente.

Los resultados de haptotaxis obtenidos con el tratamiento de PDGF-BB, con y sin eliminación del factor químico no adherido, sugieren que en ambos casos existe unión del factor a la matriz de colágeno, siendo más eficiente la estimulación de la migración de los fibroblastos cuando el factor no adherido no se elimina.

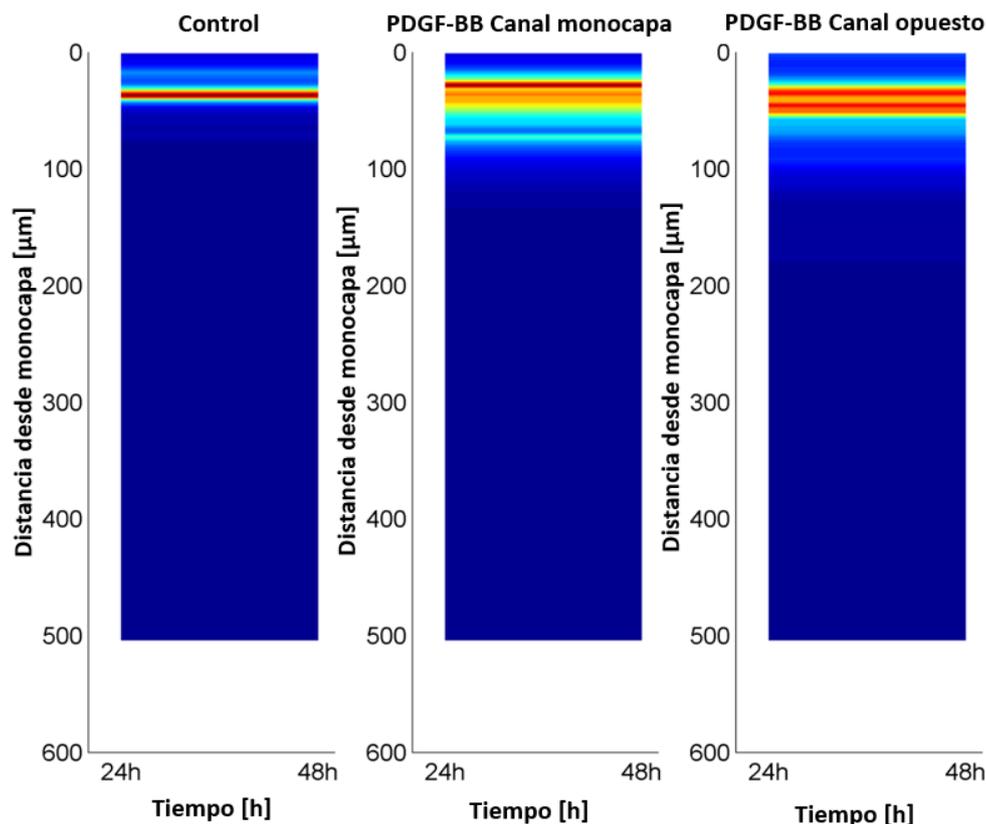


Figura 3.9. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto

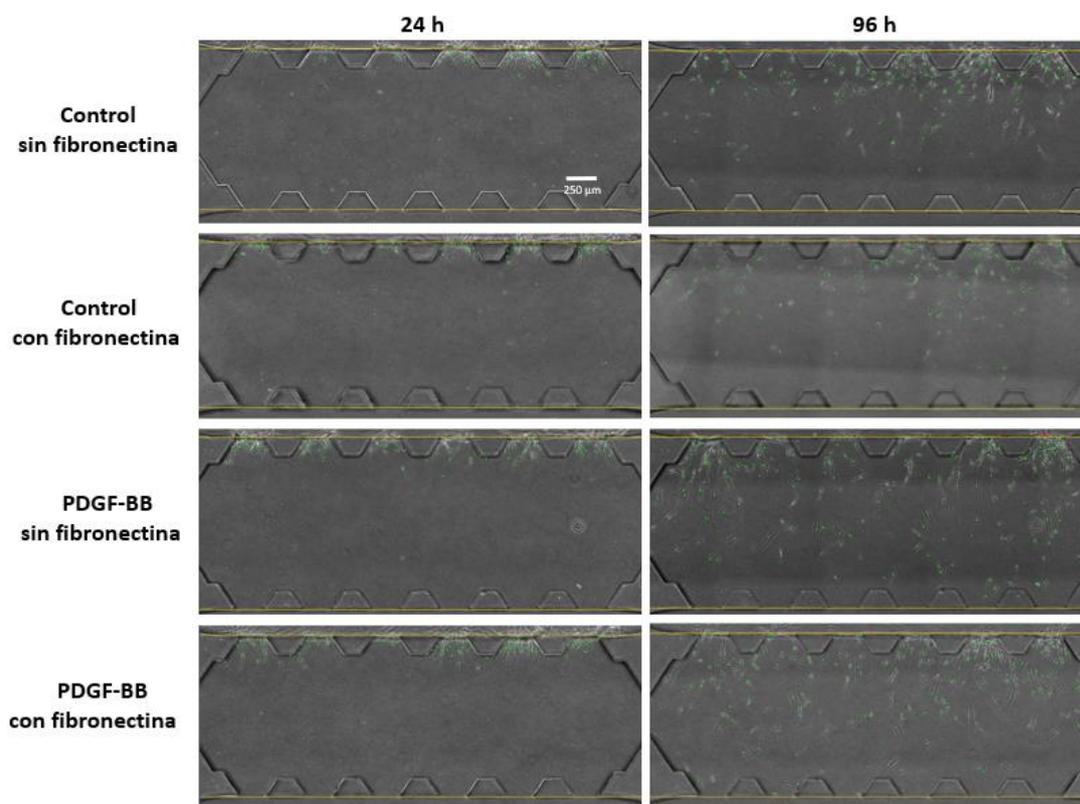
La intensidad de fluorescencia representa la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles, en el intervalo de 24-48 h, partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo.

### iii. Influencia del pretratamiento con fibronectina en haptotaxis en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva insoluble que está presente en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos. Esta proteína facilita la unión de otras proteínas de la matriz extracelular, influyendo en el comportamiento celular y en diversos procesos fisiológicos, entre ellos la migración celular [246]. La fibronectina tiene un dominio con una masa molecular entre 30 y 42 KDa con afinidad al colágeno tipo I. Se ha demostrado que a través de este dominio la fibronectina regula la unión de fibroblastos a colágeno en cultivos. La unión de colágeno y fibronectina, puede ser de importancia fisiológica en procesos de cicatrización de heridas, embriogénesis, reparación de tejidos y quimiotaxis, entre otros [247]–[250].

El análisis del efecto de la fibronectina en el avance y distribución de la monocapa de fibroblastos se llevó a cabo añadiendo fibronectina en el canal de siembra de la monocapa, a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  dejándola difundir en los hidrogeles de colágeno durante 24 h. Al cabo de este tiempo se procedió a eliminar la fibronectina no adherida y se añadieron 5 ng/ml de PDGF-BB durante 24 h, en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. El PDGF-BB no adherido se eliminó con dos lavados y se procedió a sembrar la monocapa.

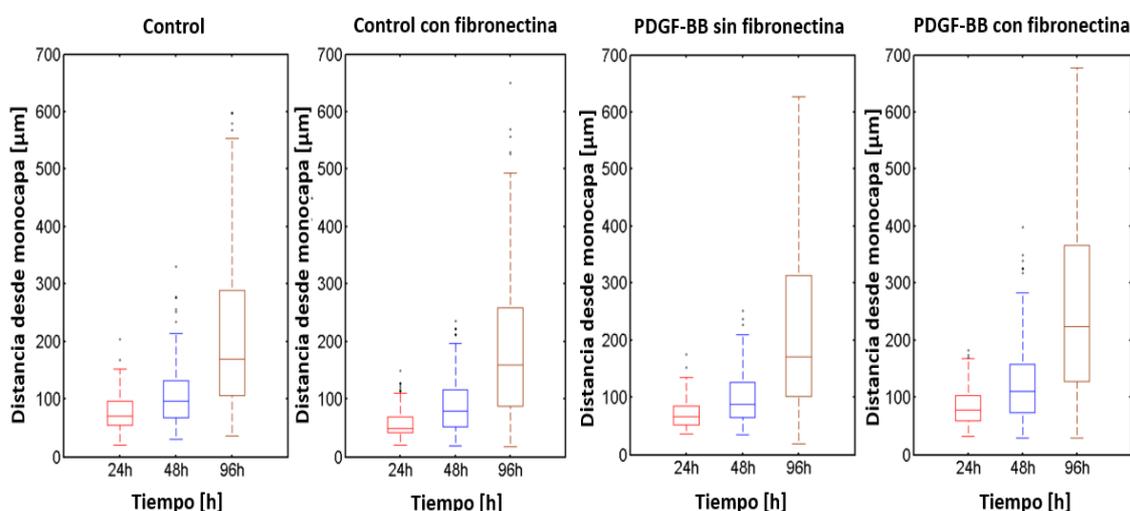
La Figura 3.10 muestra la distribución de los fibroblastos de la monocapa en la cámara central de un dispositivo microfluídico en las siguientes condiciones: hidrogel control sin y con fibronectina e hidrogel con pretratamiento de PDGF-BB sin y con fibronectina. Los resultados obtenidos, al cabo de 96 h, muestran que el pretratamiento con fibronectina no tiene un efecto relevante en el movimiento y distribución de los fibroblastos de la monocapa, tal y como se puede ver en la Figura 3.10.



**Figura 3.10. Migración de los fibroblastos de la monocapa, sin y con pretratamiento de fibronectina, y sin y con pretratamiento con PDGF-BB añadido en el canal opuesto**

Se muestran imágenes de la migración de los fibroblastos en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno, eliminando el factor químico no adherido, a las 24 y 96 h. Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentra confinado el hidrogel de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en el hidrogel. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3.11 muestra la distancia recorrida por los fibroblastos de la monocapa en los hidrogeles sin y con pretratamiento con fibronectina, y sin y con pretratamiento con PDGF-BB. La mediana de los valores obtenida de la distancia recorrida por los fibroblastos, al cabo de 48 h, fue de 96.6, 80.5, 88.55 y 109.5  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles control, en los pretratados con fibronectina, en los pretratados con PDGF sin fibronectina y en los pretratados con PDGF y fibronectina, respectivamente. Los valores al cabo de 96 h fueron de 169.1, 159.4, 170.7 y 223.8  $\mu\text{m}$ , respectivamente. La distancia recorrida no varió con el tratamiento con fibronectina, solamente aumentó en los hidrogeles pretratados con el factor químico con fibronectina en el canal opuesto en un 31%.

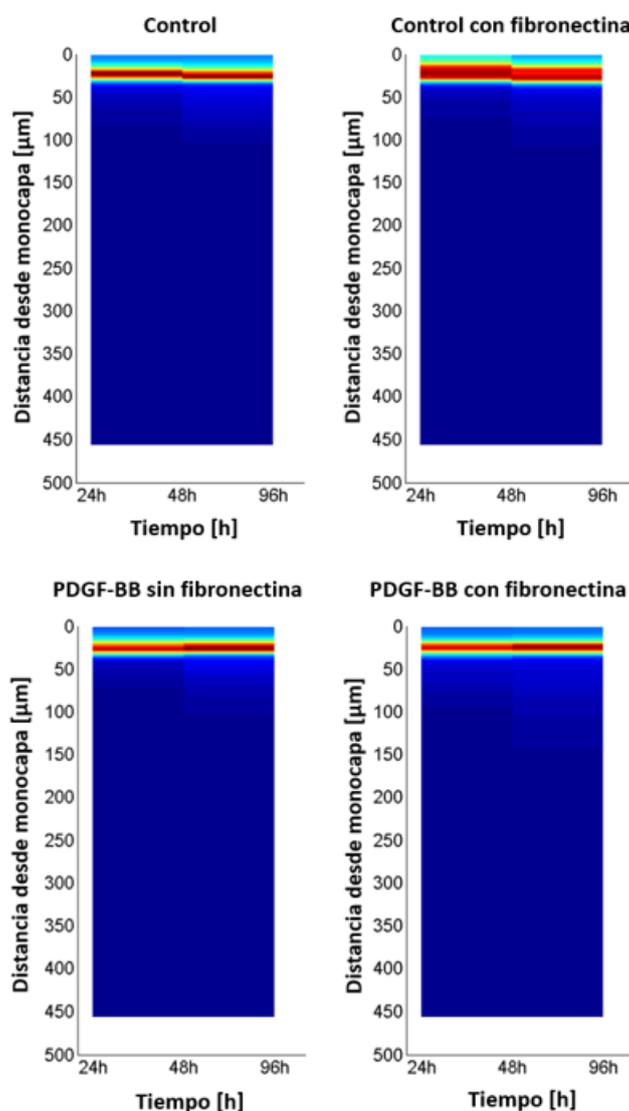


**Figura 3.11. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, sin y con pretratamiento de fibronectina, y sin y con pretratamiento con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos en los hidrogeles, al cabo de 24, 48 y 96 h, sin y con pretratamiento de fibronectina (izquierda), y sin y con pretratamiento con PDGF-BB durante 24 h (derecha), aplicado en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. Se llevó a cabo un experimento con dos réplicas técnicas en el control sin fibronectina, tres en el control con fibronectina, dos con factor sin fibronectina y cuatro con fibronectina y factor.

Los resultados obtenidos, en función del tiempo analizado, muestran que el pretratamiento con fibronectina no presenta un efecto estimulador en la migración de los fibroblastos de la monocapa, no obstante, habría que replicar el experimento para poder confirmarlo.

La Figura 3.12 representa la intensidad de la fluorescencia del movimiento de los fibroblastos de la monocapa, al cabo de 24, 48 y 96 h, en las distintas condiciones de pretratamiento con fibronectina y PDGF-BB.



**Figura 3.12. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con y sin pretratamiento con fibronectina, y sin y con pretratamiento con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

La intensidad de fluorescencia representa la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles, (intervalos de 24-48 y 48-96 h). En la parte superior de la figura se muestra sin y con pretratamiento de fibronectina y en la parte inferior sin y con pretratamiento con PDGF-BB, partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo.

Para intentar explicar los resultados de haptotaxis se procedió a unir el PDGF-BB al marcador Alexa Fluor 647, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1 de material y métodos, para así poder visualizar con fluorescencia la unión del PDGF-BB

a la matriz de colágeno. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes, no obstante, se muestran en el Apéndice I.

### **3.1.1.2. Efecto de un gradiente quimiotáctico con PDGF-BB para migración celular dirigida de la monocapa de fibroblastos NHDF-GFP en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml**

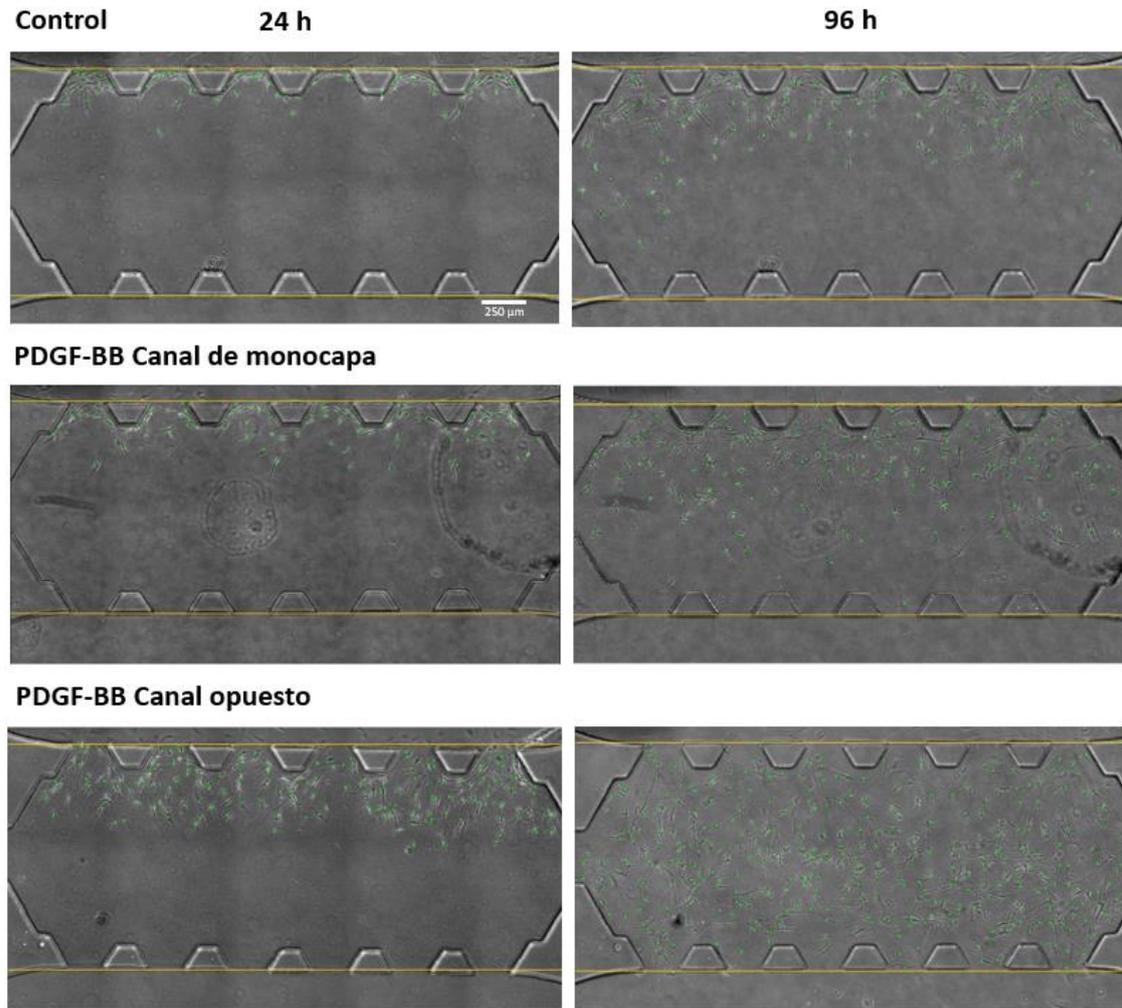
La quimiotaxis es el proceso por el cual las células detectan un gradiente químico y responden migrando de forma direccional al gradiente. Este proceso es crucial en la curación de heridas.

El objetivo de este ensayo ha sido determinar si el gradiente del factor químico PDGF-BB estimulaba la migración de la monocapa de fibroblastos. El PDGF-BB es un importante regulador de la respuesta migratoria durante el desarrollo y en la curación de heridas [213], [251].

Se procedió a la preparación de hidrogeles de colágeno a 2.5 mg/ml y el PDGF-BB se añadió una vez sembrada la monocapa a una concentración de 5 ng/ml. El experimento se llevó a cabo en distintas condiciones añadiendo el factor químico en el canal de siembra de la monocapa, en el canal opuesto y sin añadir factor.

La Figura 3.13 muestra la distribución de los fibroblastos de la monocapa, al cabo de 24 y 96 h, en la cámara central de un dispositivo microfluídico. Se puede observar que los fibroblastos de la monocapa, en presencia del gradiente de PDGF-BB creado al añadir el factor químico en el canal opuesto a la siembra, se encuentran distribuidos homogéneamente a lo largo de todo el hidrogel al cabo de 96 h. Esta estimulación con el gradiente del factor químico ya se empieza a ver al cabo de 24 h, siendo mucho menos evidente cuando el factor se aplica en el canal de la monocapa.

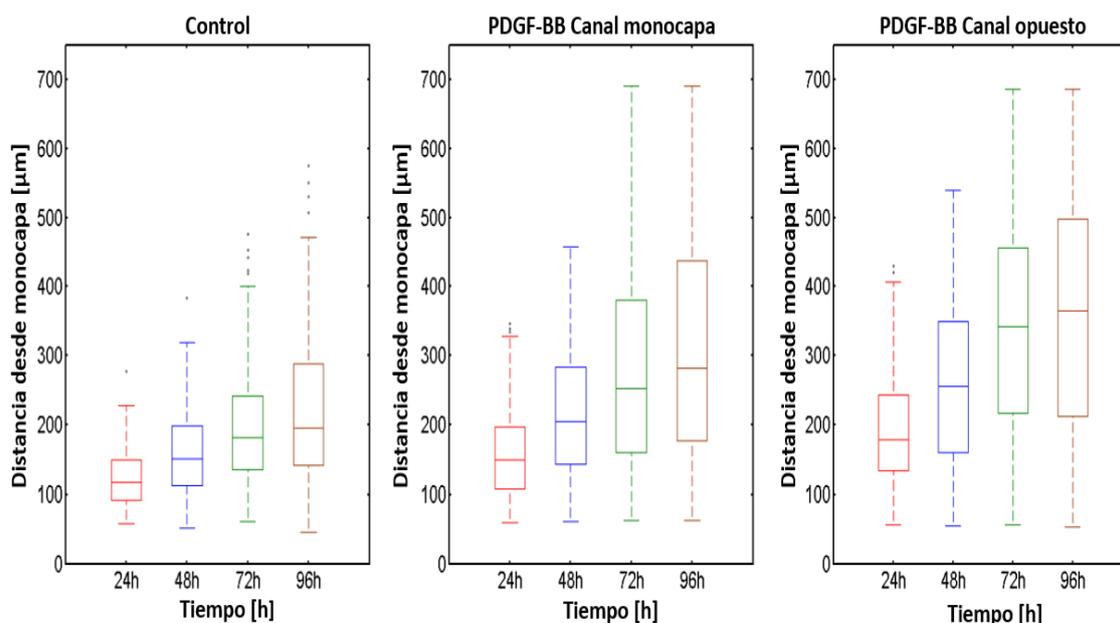
La Figura 3.14 muestra la distancia recorrida por los fibroblastos en los hidrogeles de colágeno tratados con PDGF-BB en el canal de la monocapa y en el canal opuesto. La mediana de los valores obtenida de la distancia recorrida por los fibroblastos al cabo de 48 h fue de 150.4, 204.8 y 256  $\mu\text{m}$  en el control, en los tratados en el canal de la monocapa y en el canal opuesto; es decir, la distancia recorrida se incrementó en un 36% y en un 70%, respectivamente, respecto al control. Al cabo de 96 h fue de 195.2, 281.6 y 364.8  $\mu\text{m}$ , lo cual representó un aumento del 44% y del 87% en la distancia recorrida por los fibroblastos en las condiciones mencionadas.



**Figura 3.13. Migración de los fibroblastos de la monocapa, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal de siembra de monocapa y en el canal opuesto**

Se muestran imágenes de la migración de las células de la monocapa de fibroblastos en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno a las 24 y 96 h. Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentra confinado el hidrogel de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en el hidrogel. La barra de escala representa 250 µm.

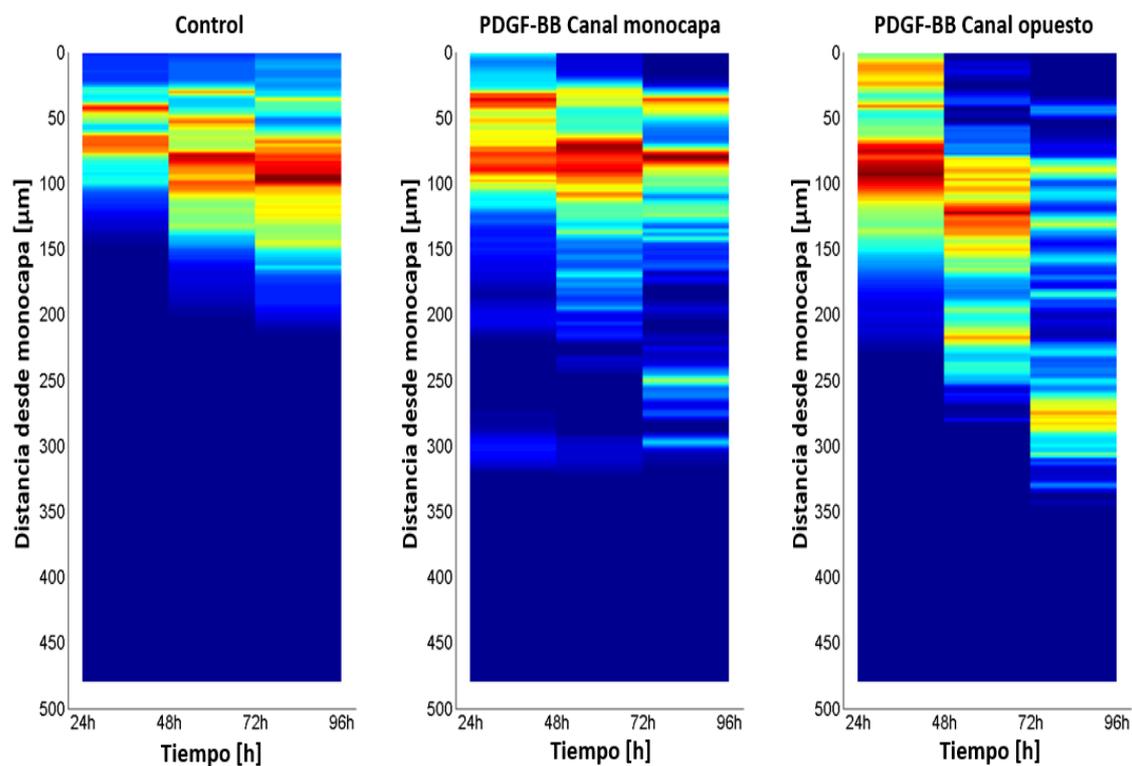
Los resultados obtenidos mostraron que la migración de los fibroblastos de la monocapa se ve claramente estimulada por el gradiente del factor químico PDGF-BB en el canal de siembra de la monocapa, y en mayor medida cuando el gradiente del PDGF-BB es aplicado en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.



**Figura 3.14. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, sin y con tratamiento de PDGF-BB en canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto**

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos en los hidrogeles al cabo de 24, 48, 72 y 96 h en control (izquierda), con tratamiento de PDGF-BB en el canal de la siembra de la monocapa (centro) y en el canal opuesto (derecha). Se realizaron cuatro experimentos independientes con ocho réplicas técnicas en el control, siete en el canal opuesto y seis en el canal de siembra de la monocapa.

En la Figura 3.15 se representa la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la dirección del movimiento de los fibroblastos de la monocapa de cuatro experimentos independientes, por lo que los rojos oscuros indicarían mayor cantidad de fibroblastos y azules oscuros, ausencia. Se puede ver claramente a partir de las 24 h, cuando el PDGF-BB es añadido en el canal opuesto, como la intensidad de fluorescencia va aumentando en dirección al canal de adición del factor químico. A las 96 h, hay un mayor número de fibroblastos en el canal opuesto a la siembra de la monocapa, lo cual indica claramente la estimulación química que ejerce el gradiente de PDGF-BB sobre los fibroblastos.

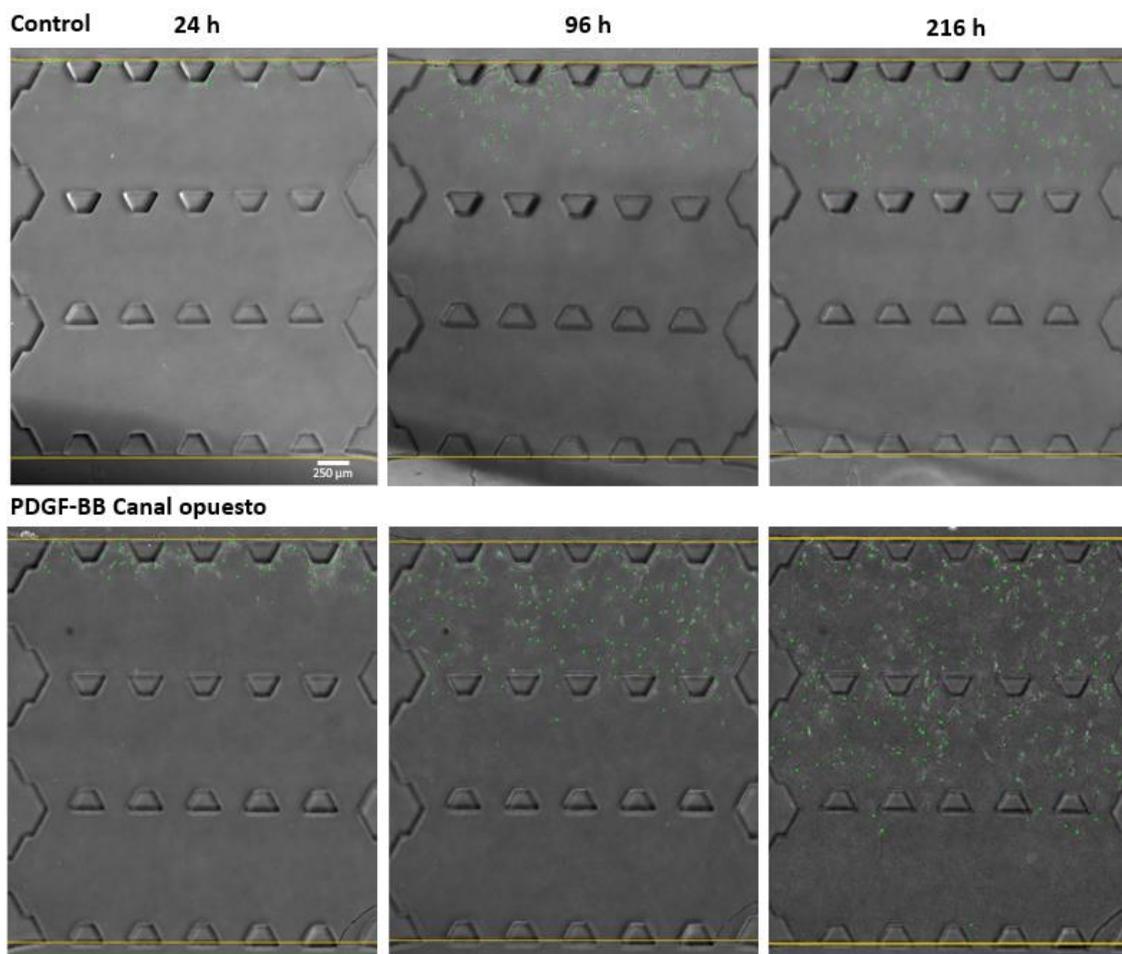


**Figura 3.15. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal de siembra de la monocapa y en el canal opuesto**

La intensidad de fluorescencia representa a grandes rasgos la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles de colágeno, en intervalos de 24-48, 48-72 y 72-96 h, partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo; es decir, a mayor fluorescencia, mayor número de células.

Para ver la capacidad de estimulación de la migración de la monocapa por el gradiente del factor químico PDGF-BB durante más tiempo, se llevó a cabo el experimento añadiendo PDGF-BB en el canal opuesto a la monocapa en hidrogeles de 2.5 mg/ml, utilizando dispositivos microfluídicos de tres cámaras [230], lo que permitió analizar no solamente la distancia recorrida durante más tiempo, sino también el efecto del gradiente químico a lo largo de los tres hidrogeles.

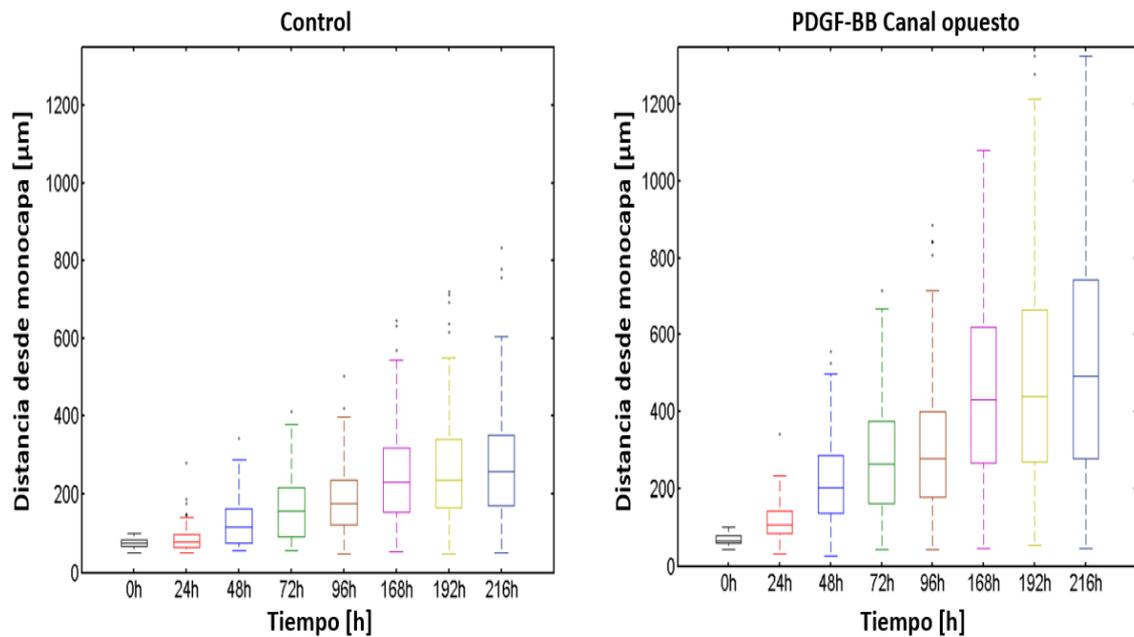
La Figura 3.16 muestra claramente el aumento de la migración de los fibroblastos por efecto del gradiente de PDGF-BB en un dispositivo microfluídico de tres cámaras. Al cabo de 216 h, los fibroblastos de la monocapa han alcanzado el doble de distancia que los fibroblastos sin estimulación química.



**Figura 3.16. Migración de los fibroblastos de la monocapa, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa en dispositivos de tres cámaras**

Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentra confinados los hidrogeles de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en los hidrogeles. Las imágenes se tomaron a las 24, 96 y 216 h. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3.17 muestra la distancia recorrida por las células en los hidrogeles tratados con PDGF-BB en el canal opuesto. La mediana de los valores obtenida de la distancia recorrida por los fibroblastos, al cabo de 48 h, fue de 117.5 y 202.9  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles control y en los tratados en el canal opuesto, respectivamente, lo que representa un aumento del recorrido del 73%. Al cabo de 216 h fue de 257.6 y 491.1  $\mu\text{m}$ , es decir, un aumento del 91%, demostrando una vez más que la distancia recorrida por los fibroblastos en presencia de PDGF-BB aumenta, incluso hasta duplicarse, en función del tiempo.



**Figura 3.17. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto en dispositivos de tres cámaras**

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos en los hidrogeles al cabo de 24, 48, 72, 96, 168, 192 y 216 h en los hidrogeles control y en los tratados con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. Se llevó a cabo un experimento con cuatro réplicas técnicas en el control y siete en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.

En la Figura 3.18 se representa la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la dirección del movimiento de los fibroblastos de la monocapa en los hidrogeles de colágeno. Las imágenes muestran que en presencia del gradiente de PDGF-BB se pueden ver tanto el efecto de la estimulación de la migración de los fibroblastos desde las 24 h como su distribución a lo largo de los tres hidrogeles en función del tiempo.

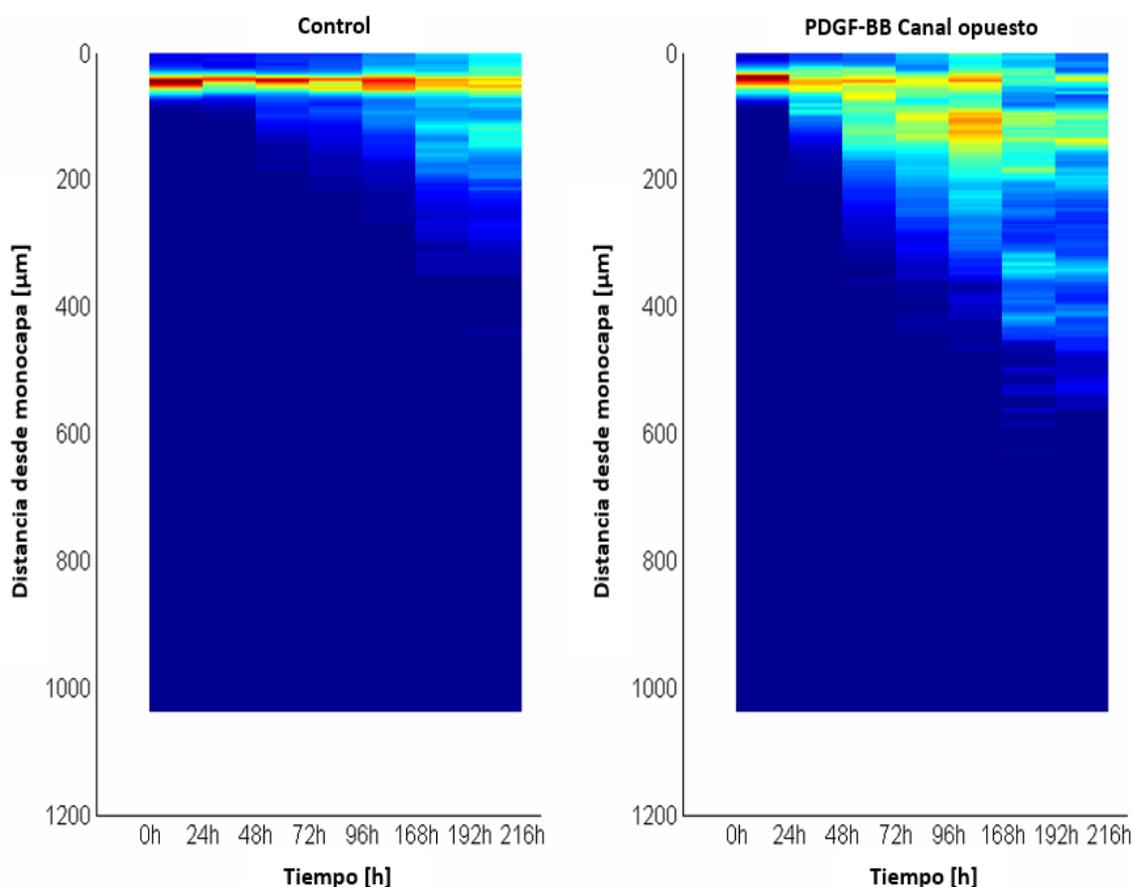


Figura 3.18. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa en dispositivos de tres cámaras

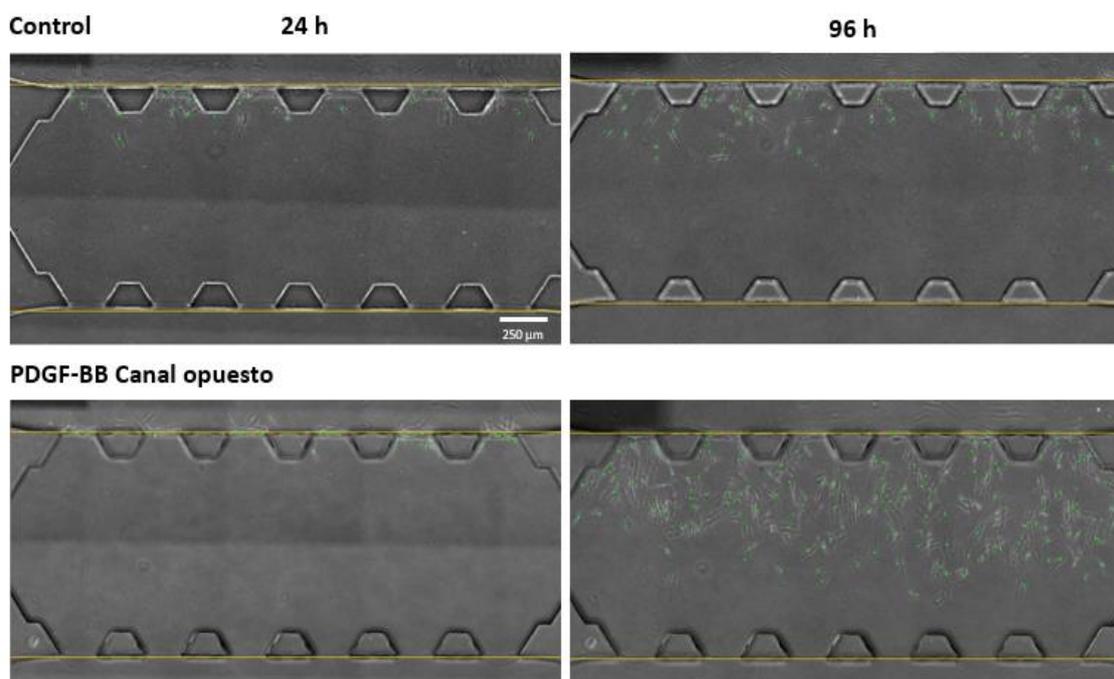
La intensidad de fluorescencia representa la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles de colágeno, (intervalos de 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-168, 168-192 y 192-216 h), partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo.

**i. Efecto del entrecruzante TG2 en la motilidad celular de la monocapa de fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, aplicando un gradiente quimiotáctico con PDGF-BB**

El objetivo de este ensayo fue analizar si la modificación de la estructura de la matriz mediada por el entrecruzante TG2 afectaba a la migración de la monocapa de fibroblastos, estimulada a su vez por el gradiente de factor químico PDGF-BB.

El experimento se llevó a cabo en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml con una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$  de TG2. El PDGF-BB se añadió una vez sembrada la monocapa a una concentración de 5 ng/ml, al igual que en los experimentos anteriores.

La Figura 3.19 muestra la distribución de los fibroblastos de la monocapa, al cabo de 24 y 96 h, en hidrogeles entrecruzados en la cámara central del dispositivo microfluídico. Se puede observar de nuevo que las células de la monocapa, en presencia del gradiente de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra, han migrado más distancia, sin embargo, si se compara con el hidrogel sin entrecruzamiento la distancia recorrida, al cabo de 96 h, tanto en el hidrogel control como en el tratado con PDGF-BB fue proporcionalmente menor (Figura 3.13).



**Figura 3.19. Migración de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles entrecruzados con TG2, con tratamiento de PDGF-BB en canal opuesto a la siembra de la monocapa**

Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentran confinados los hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en el hidrogel. Las imágenes se tomaron a las 24 y 96 h. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3.20 muestra la distancia recorrida por los fibroblastos en los hidrogeles entrecruzados con TG2. La mediana de los valores obtenida de la distancia recorrida por los fibroblastos, al cabo de 48 h, fue de 139.2 y 201.6  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles control y en los estimulados con el gradiente de PDGF-BB en el canal opuesto, respectivamente. La migración de los fibroblastos estimulados en estos hidrogeles entrecruzados representa un aumento del 45%. Al cabo de 96 h, la mediana de los valores obtenidos fue de 184 y 296  $\mu\text{m}$ , frente a 195.2 y 364.8  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles sin entrecruzamiento; es decir, la migración sin TG2 en presencia del gradiente de PDGF-BB es aproximadamente un 23%

mayor que en los hidrogeles entrecruzados. Este hecho indica que los fibroblastos en presencia de TG2 se mueven más lentamente, probablemente debido a la rigidez de la matriz entrecruzada, y este efecto es más notorio sobre todo en el momento en que la monocapa de fibroblastos intenta migrar en la matriz de colágeno.

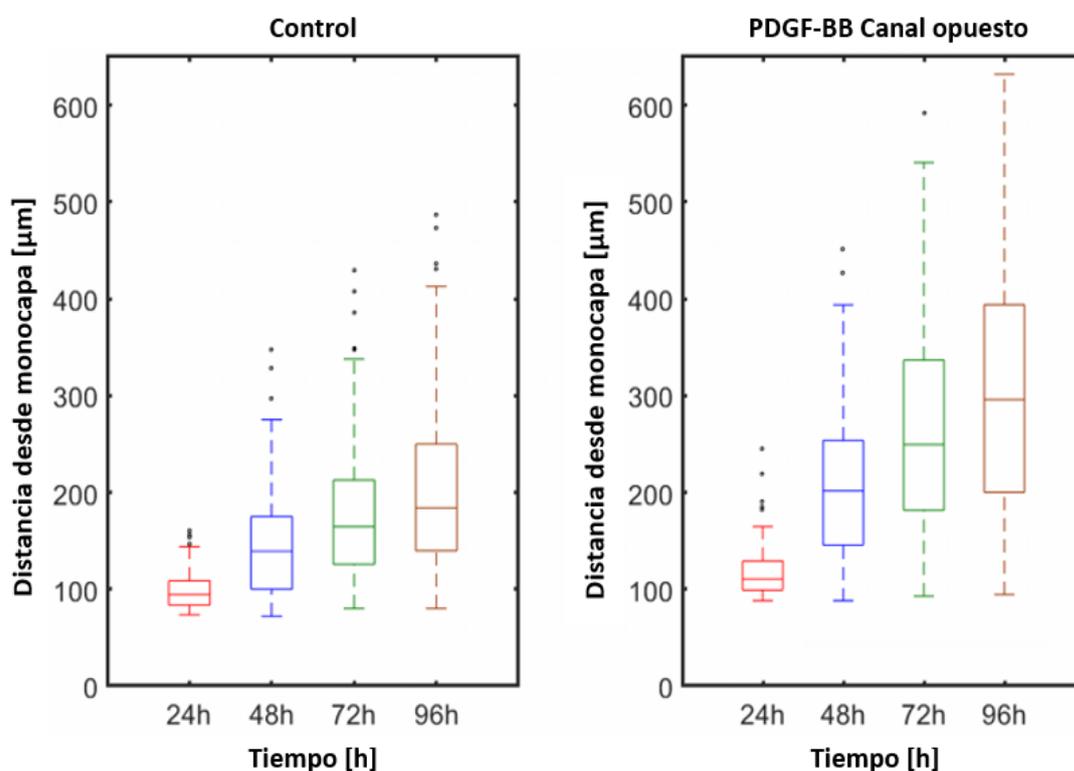
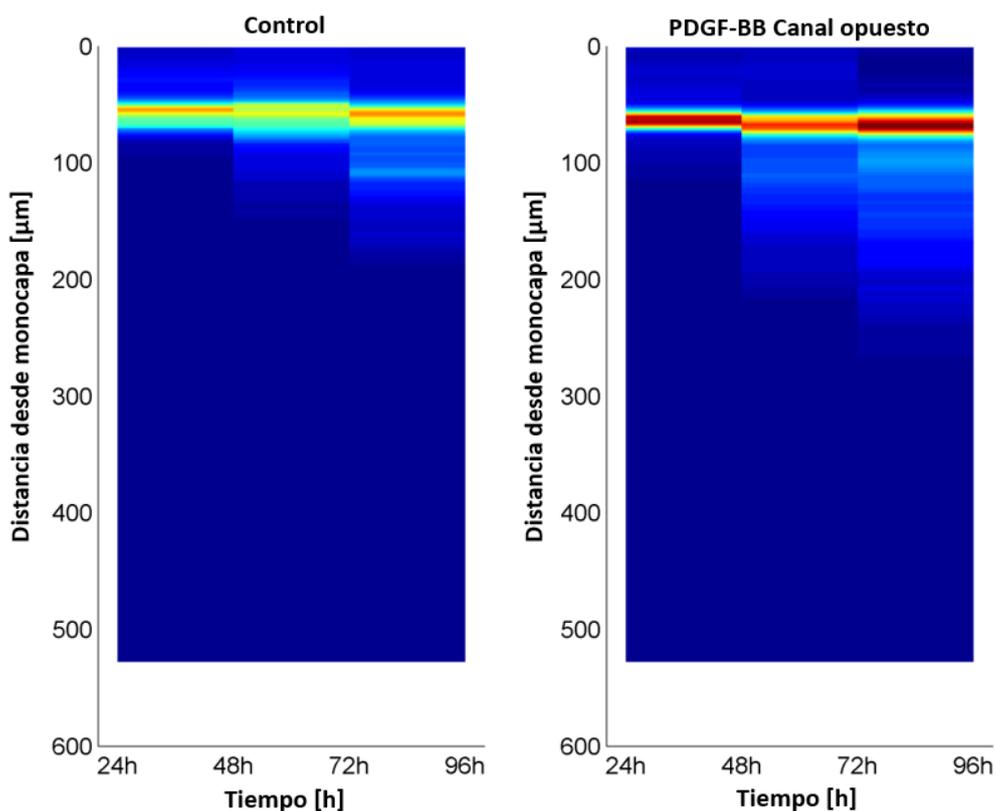


Figura 3.20. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml entrecruzados con TG2, con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos, al cabo de 24, 48, 72 y 96 h en hidrogeles entrecruzados con TG2 en los controles y en los tratados con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. Se llevó a cabo un experimento con tres réplicas técnicas en el control y tres en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.

En la Figura 3.21 se representa la intensidad de la fluorescencia en los hidrogeles a lo largo de la dirección del movimiento de los fibroblastos de la monocapa, correspondiendo el color más intenso a una mayor cantidad de células.



**Figura 3.21. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml entrecruzados con TG2, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

La intensidad de fluorescencia representa la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles de colágeno en el control y en los entrecruzados con TG2 en intervalos de 24-48, 48-72 y 72-96 h, partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo; es decir, a mayor fluorescencia, mayor número de células.

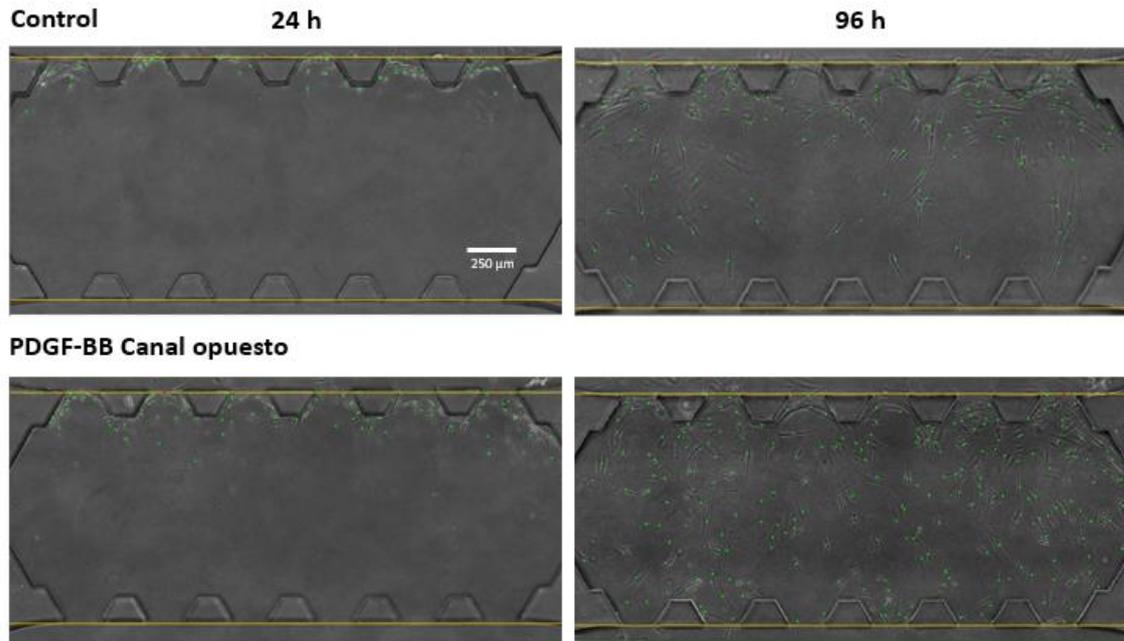
## ii. Análisis del movimiento de la monocapa de fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml, aplicando un gradiente quimiotáctico de PDGF-BB

El objetivo de este ensayo fue determinar si distintas concentraciones de colágeno afectan a la migración de la monocapa en presencia del gradiente del factor químico PDGF-BB.

Se procedió a la preparación de hidrogeles de 4 mg/ml de colágeno y el PDGF-BB se añadió una vez sembrada la monocapa a una concentración de 5 ng/ml.

La Figura 3.22 muestra la distribución de los fibroblastos en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml, al cabo de 24 y 96 h, en la cámara central del dispositivo microfluídico. Se puede observar que los fibroblastos de la monocapa, en presencia del gradiente de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra, se han estimulado y por lo tanto han migrado más distancia, siendo ésta ligeramente menor a la alcanzada en los

hidrogeles de menor concentración (2.5 mg/ml). La diferencia que se observa entre ambas concentraciones de colágeno es que la monocapa de fibroblastos sembrada en la concentración de 4 mg/ml tarda más tiempo en entrar en los hidrogeles de colágeno, probablemente debido a la mayor rigidez del mismo, al igual que ocurre con los hidrogeles de 2.5 mg/ml entrecruzados con TG2.

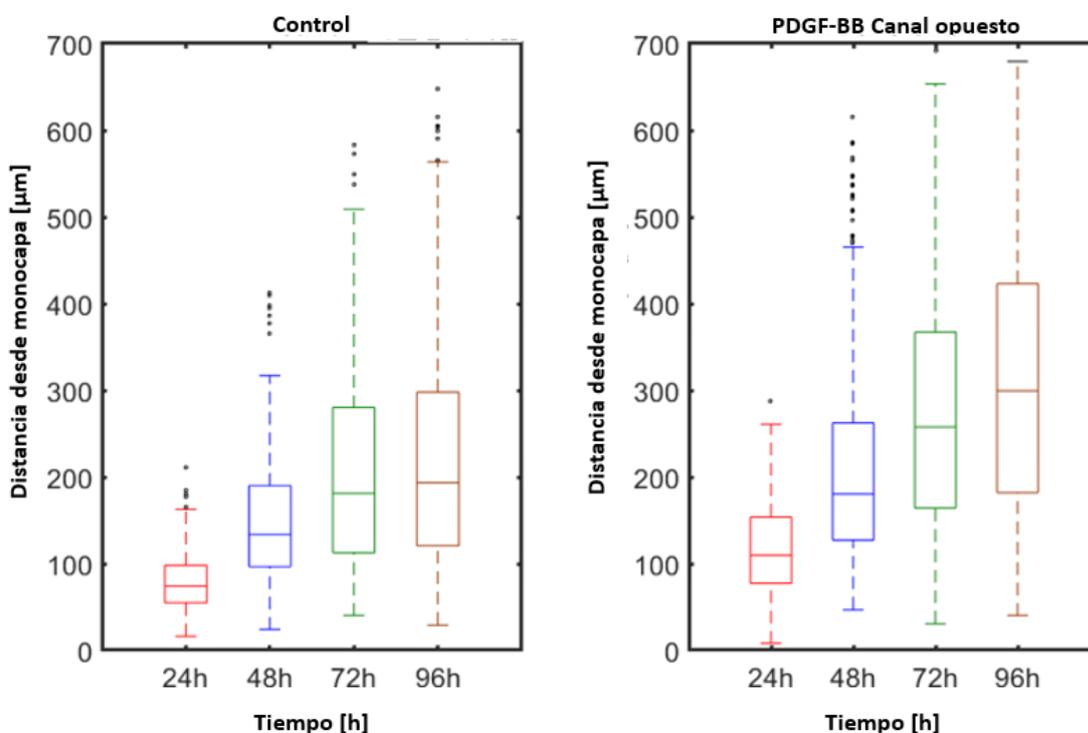


**Figura 3.22. Migración de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de 4 mg/ml, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentra confinado el hidrogel de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en el hidrogel. Las imágenes se tomaron a las 24 y 96 h. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3.23 muestra la distancia recorrida por los fibroblastos en los hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml estimulados con gradiente de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. La mediana de los valores obtenidos de la distancia recorrida por los fibroblastos, al cabo de 48 h, fue de 133.6 y 180.3  $\mu\text{m}$  en los hidrogeles control y en los tratados con factor químico en el canal opuesto a la siembra, respectivamente, lo que representa un aumento de la distancia recorrida de un 35%. Al cabo de 96 h, la mediana de los valores fue de 193.2 y 299.5  $\mu\text{m}$ , es decir, un aumento del 55%. Estos valores comparados con 195.2 y 364.8  $\mu\text{m}$ , que representaban un aumento del 87% de los hidrogeles de 2.5 mg/ml, indican que la migración de los fibroblastos estimulados con PDGF-BB se redujo un 32% en el caso de los hidrogeles de 4 mg/ml. Estos resultados

sugieren que la difusión del PDGF-BB es más rápida en los hidrogeles de menor concentración (mayor tamaño de poro), y por eso la distancia alcanzada es mayor en el mismo tiempo de migración en los hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml.

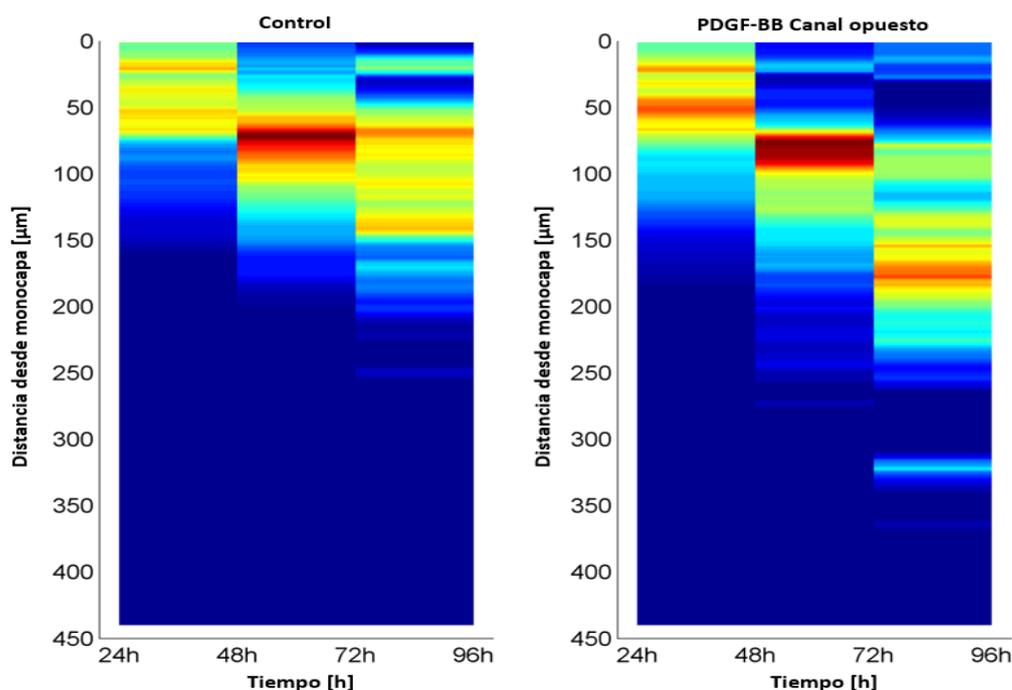


**Figura 3.23. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml, con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

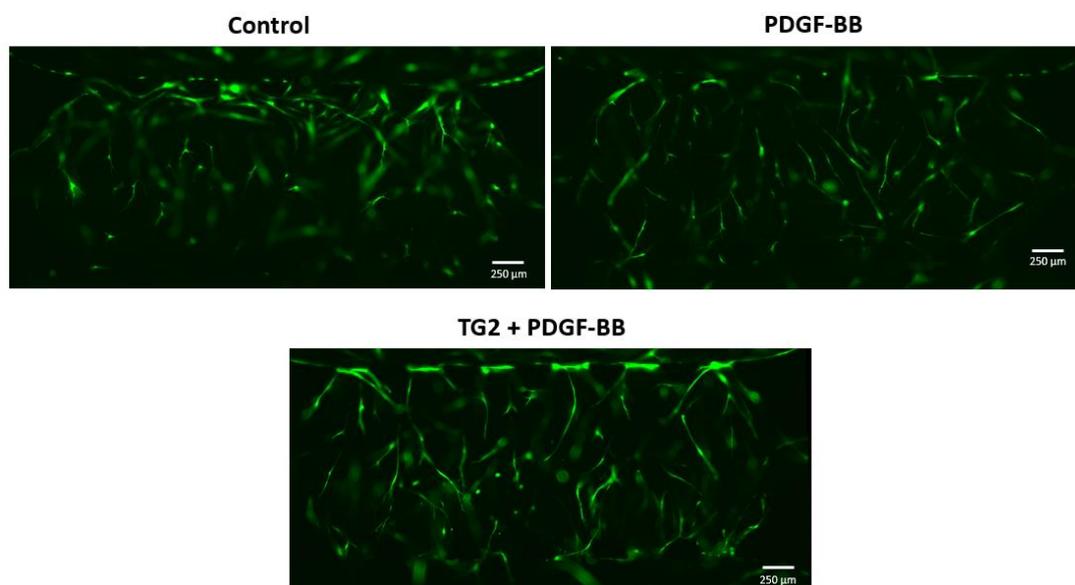
Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos, al cabo de 24, 48, 72 y 96 h en hidrogeles de 4 mg/ml, en los controles y en los tratados con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. Se realizaron dos experimentos independientes con nueve réplicas técnicas en el control y diez en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.

En la Figura 3.24 se representa la intensidad de la fluorescencia de dos experimentos independientes a lo largo de la dirección del movimiento de los fibroblastos de la monocapa en los hidrogeles de 4 mg/ml, correspondiendo el color más intenso a una mayor cantidad de células.

Los resultados obtenidos de la migración de la monocapa de fibroblastos en los procesos de quimiotaxis y haptotaxis muestran una migración de estas células de una forma individual en los hidrogeles de colágeno. El tratamiento con el factor de crecimiento PDGF-BB influye en que la mayoría de los fibroblastos presentan una morfología más alargada y dirigida a favor del gradiente químico, al igual que en los hidrogeles entrecruzados con TG2, tal y como se puede apreciar en la Figura 3.25.



**Figura 3.24.** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa, en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. La intensidad de fluorescencia representa la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles de 4 mg/ml de colágeno, (intervalos de 24-48, 48-72 y 72-96 h), partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo.



**Figura 3.25.** Morfología de los fibroblastos en hidrogeles de 2.5 mg/ml con gradiente de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa y con TG2 y gradiente químico. Los fibroblastos en presencia del gradiente de factor químico y con TG2 presentan una morfología más alargada y dirigida que los fibroblastos control. Las imágenes se tomaron con el microscopio Nikon D-Eclipse con el objetivo Plan Fluor 10X. La barra de escala representa 250 μm.

Por otra parte, la presencia de PDGF-BB, además de estimular la migración de los fibroblastos, también incrementa su proliferación, lo cual favorece las interconexiones

entre los fibroblastos, aunque éstas sean de forma transitoria. Los resultados indican claramente que la adición del factor químico en el canal opuesto a la siembra de la monocapa es el que produce mayor proliferación de los fibroblastos, siendo esta más significativa en la condición de quimiotaxis. Por otro lado, también se puede observar cómo el efecto en la proliferación del entrecruzante TG2 en los hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml es similar al de 4 mg/ml sin entrecruzante, lo cual puede ser debido a la reorganización de las fibras producida por TG2. Este incremento de la proliferación se puede observar en la Tabla 3.1, donde se muestran los resultados del conteo promedio aproximado de las réplicas de un experimento, en las distintas condiciones analizadas.

**Tabla 3.1. Valores promedio del número de fibroblastos**

Resultados de los valores promedio de la cantidad de fibroblastos de las réplicas de un mismo experimento, en las distintas condiciones analizadas a un tiempo determinado. El verde más oscuro corresponde a mayor cantidad de fibroblastos y el verde más claro a menor cantidad de fibroblastos, respecto al control.

VALORES PROMEDIO DEL NÚMERO DE FIBROBLASTOS EN LAS DISTINTAS CONDICIONES				
CONDICIONES		N. ° DE CÉLULAS	TIEMPO (h)	PROLIFERACIÓN (%)
Haptotaxis eliminando PDGF-BB	Control	156	72	NA
	Factor canal monocapa	125	72	-20
	Factor canal opuesto	216	72	38
	Factor en ambos canales	275	72	76
Haptotaxis sin eliminar PDGF-BB	Control	88	48	NA
	Factor canal monocapa	90	48	2
	Factor canal opuesto	117	48	33
Quimiotaxis 2.5 mg/ml de colágeno	Control	152	96	NA
	Factor canal monocapa	218	96	43
	Factor canal opuesto	314	96	107
Quimiotaxis 2.5 mg/ml de colágeno + TG2	Control	89	96	NA
	Factor canal opuesto	140	96	57
Quimiotaxis 2.5 mg/ml de colágeno tres canales	Control	56	96	NA
	Factor canal opuesto	107	96	91
Quimiotaxis 4 mg/ml de colágeno	Control	139	96	NA
	Factor canal opuesto	216	96	55
Durotaxis 2.5-2-1.5 mg/ml de colágeno	Control	138	72	NA
	Factor canal opuesto	209	72	51

N.A. (no aplicable, control)

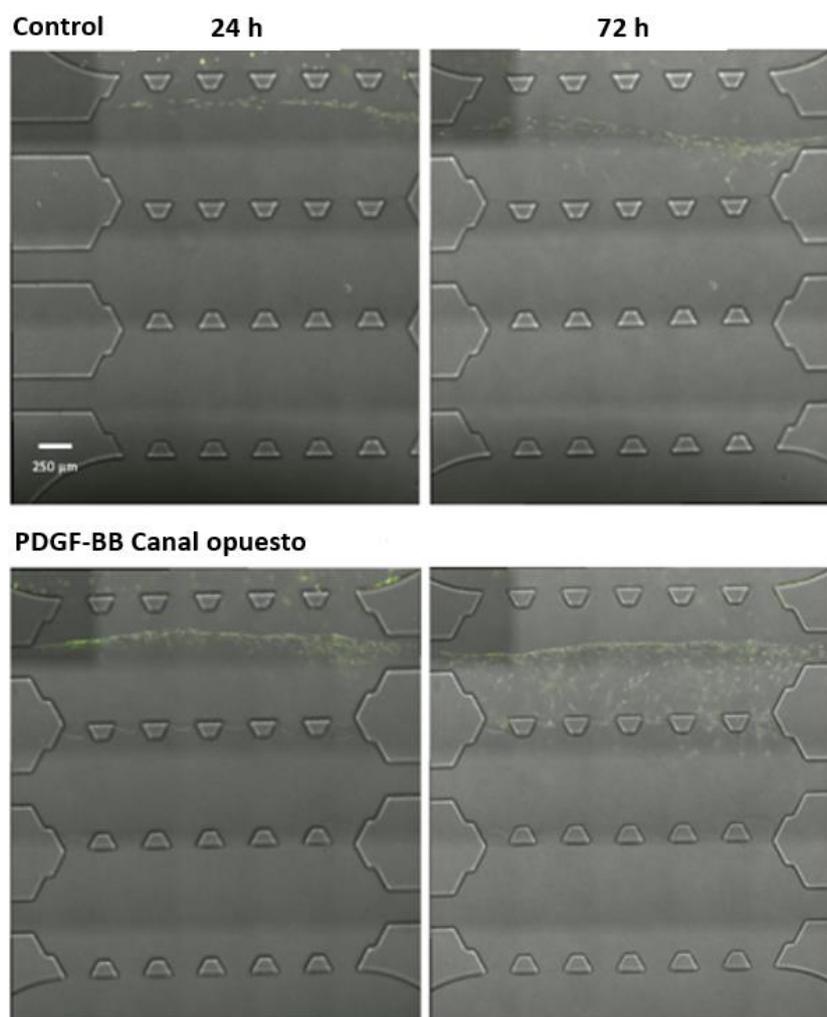
### **3.1.1.3. Efecto de la durotaxis colectiva de la monocapa de fibroblastos en hidrogeles de colágeno con gradiente creciente y decreciente estimulados adicionalmente con gradiente de PDGF-BB**

La rigidez del sustrato [252] y las condiciones químicas [31], entre otros factores determinan la migración individual y colectiva. Sunyer y col. [82] demostraron que las células tienden a regular su migración direccional en 2D siguiendo el gradiente de rigidez cuando se mueven colectivamente. Moreno-Arotzena y col. [241] demostraron que los fibroblastos humanos son capaces de aumentar la velocidad celular y orientar su migración 3D cuando están sometidos a gradientes químicos, si la rigidez de la matriz lo permite [230].

Los ensayos de durotaxis se llevaron a cabo con el dispositivo de tres cámaras mencionado anteriormente. El hecho de tener varias cámaras permite sembrar distintas concentraciones de hidrogel, lo cual facilitó llevar a cabo el estudio de la migración de la monocapa de fibroblastos a diferentes concentraciones de colágeno. La rigidez de estos hidrogeles depende de esta concentración de colágeno y esta rigidez regula la direccionalidad del movimiento celular.

La densidad celular utilizada, al igual que en los experimentos anteriores, fue de  $2.5 \times 10^5$  células/ml y los hidrogeles se prepararon siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1 de material y métodos. El gradiente de PDGF-BB se utilizó a una concentración de 5 ng/ml y se aplicó en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.

En primer lugar, se utilizó un gradiente creciente de 1.5-2-2.5 mg/ml de concentración de colágeno sembrando la monocapa de fibroblastos en el colágeno de menor concentración. En este gradiente de colágeno, la monocapa de fibroblastos ejerció tanta fuerza en los hidrogeles de 1.5 mg/ml que terminó por desprenderlos de los postes de la cámara del dispositivo microfluídico. Este desprendimiento de los hidrogeles, probablemente debido a la poca rigidez que presentan, tuvo lugar incluso sin estimulación con PDGF-BB, por lo que no se ha podido analizar la migración de los fibroblastos de la monocapa con este gradiente. La Figura 3.26 muestra los hidrogeles de colágeno de 1.5 mg/ml desprendidos de los postes de la cámara donde se confinaban los hidrogeles.

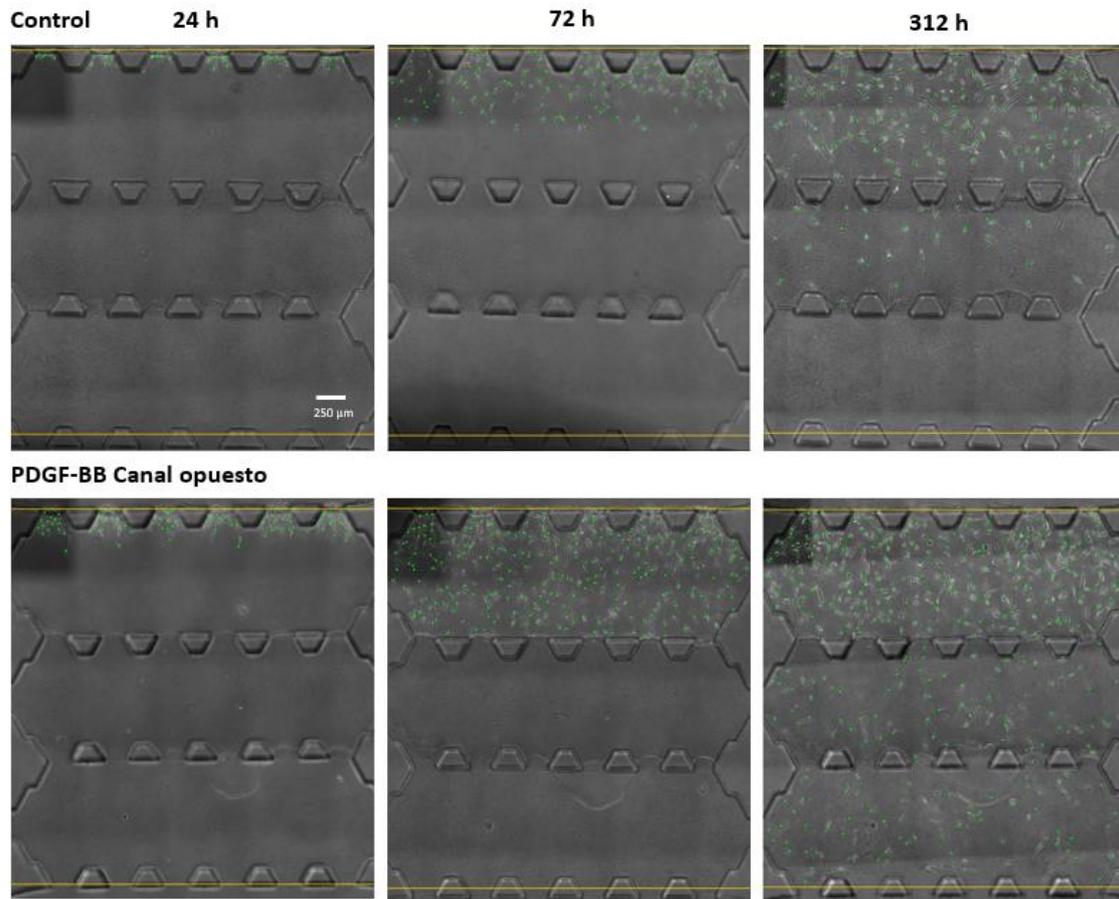


**Figura 3.26. Migración de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de gradiente creciente de 1.5-2-2.5 mg/ml de colágeno sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto**

El desprendimiento de los hidrogeles de los postes se observa en las imágenes tomadas a las 24 y 72 h. Se realizaron dos experimentos independientes con seis réplicas técnicas en el control y siete en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. La barra de escala representa 250  $\mu\text{m}$ .

En segundo lugar, se utilizó un gradiente decreciente de 2.5-2-1.5 mg/ml sembrando la monocapa de fibroblastos en el colágeno de mayor concentración. La distribución de los fibroblastos de la monocapa en los hidrogeles se muestra en la Figura 3.27. Se puede observar, al cabo de 72 h, que la distancia recorrida por los fibroblastos de la monocapa estimulada con el gradiente de PDGF-BB es significativamente mayor que en la no estimulada. Este efecto, incluso más significativo, se puede observar al cabo de 312 h, cuando parte de los fibroblastos estimulados con factor han alcanzado los tres hidrogeles. La distribución de los fibroblastos en los hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml y en los de 1.5 mg/ml es muy similar; parece ser que la diferencia de rigidez entre ambas

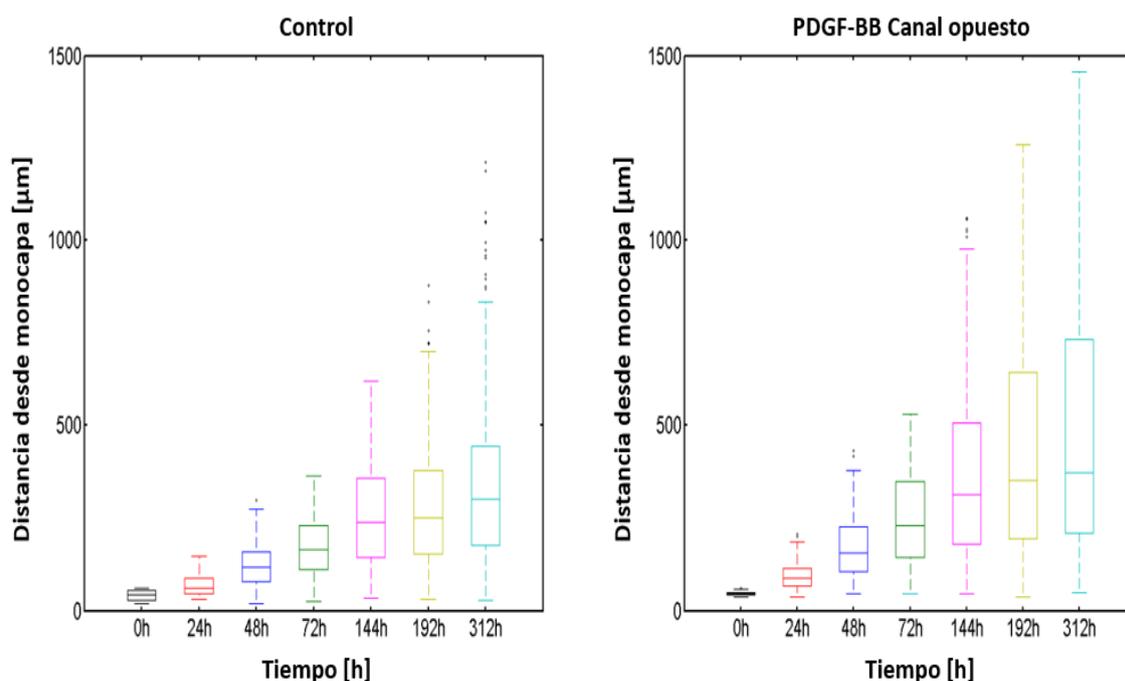
no es relevante para los mismos; sin embargo, es notorio destacar que la gran mayoría de los fibroblastos se mantienen en el hidrogel de mayor concentración de colágeno (2.5 mg/ml).



**Figura 3.27. Migración de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de gradiente creciente de 2.5-2.15 mg/ml de colágeno, sin y con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

Las líneas amarillas representan las zonas límites donde se encuentran confinados los hidrogeles de colágeno y los puntos verdes representan los fibroblastos que han avanzado en los hidrogeles. Las imágenes se tomaron a las 24, 72 y 312 h. La barra de escala representa 250 μm.

La Figura 3.28 muestra la distancia recorrida por los fibroblastos en los hidrogeles de 2.5-2.15 mg/ml de colágeno sin y con estimulación química en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. La mediana de los valores obtenida de la distancia recorrida en los hidrogeles por los fibroblastos, al cabo de 48 h, fue de 116.8 y 156.8 μm, en los controles y en los estimulados con PDGF-BB en el canal opuesto, respectivamente, lo que representa un aumento de la migración de un 34%. Al cabo de 312 h, fue de 300.8 y 372 μm, el aumento fue solamente de un 24%, comparado con el 91%, a las 216 h, en los hidrogeles de 2.5 mg/ml de tres canales.



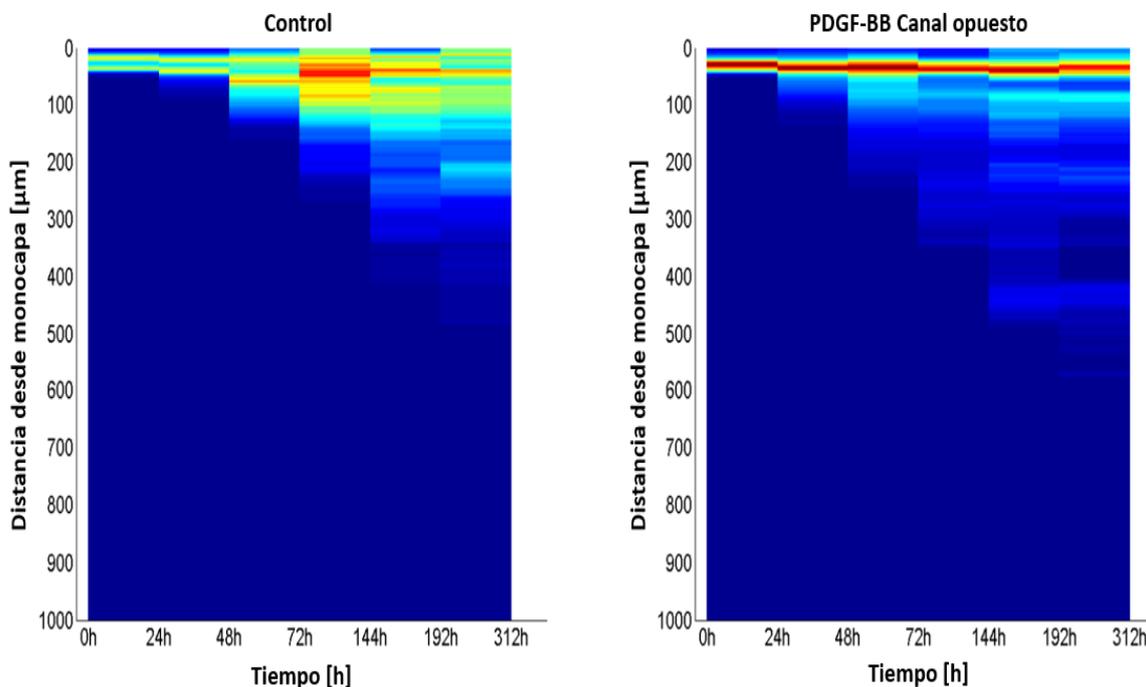
**Figura 3.28. Cuantificación de la distancia recorrida por los fibroblastos, en hidrogeles de gradiente creciente de colágeno de 2.5-2-1.5 mg/ml, con tratamiento de PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa**

Distancia recorrida perpendicularmente a la monocapa por los fibroblastos, al cabo de 24, 48, 72, 144, 192 y 312 h en hidrogeles de 2.5-2-1.5 mg/ml de colágeno, en los controles y los tratados con PDGF-BB en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. Se realizaron dos experimentos independientes con cinco réplicas técnicas en el control y seis en el canal opuesto a la siembra de la monocapa.

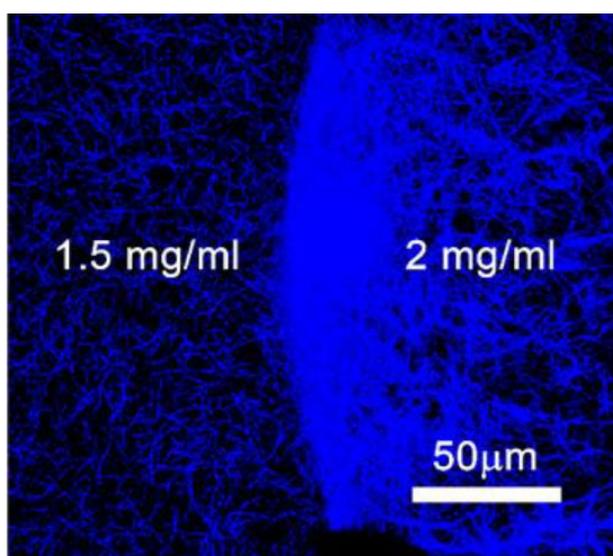
En la Figura 3.29 se representa la intensidad de la fluorescencia de dos experimentos independientes a lo largo de la dirección del movimiento de los fibroblastos de la monocapa en los hidrogeles de 2.5-2-1.5 mg/ml, correspondiendo el color más intenso a una mayor cantidad de células.

Los resultados obtenidos de durotaxis, usando el gradiente de colágeno de 2.5-2-1.5 mg/ml, indicaron que los fibroblastos se mantienen mayoritariamente en el hidrogel de colágeno de 2.5 mg/ml. Este hecho puede ser debido, a la presencia de la interfaz creada después de la polimerización consecutiva de cada hidrogel, la cual debido al aumento de espesor de las fibras de colágeno (Figura 3.30) parece impedir la migración de los fibroblastos a los hidrogeles de menor concentración. El efecto de esta interfaz parece que domina sobre el efecto del gradiente de PDGF-BB. Dicho efecto no se observa en los hidrogeles de 2.5 mg/ml en el dispositivo de tres canales, dónde los fibroblastos se encuentran distribuidos de una forma más homogénea a lo largo del

hidrogel, probablemente debido a que solamente se ha llevado a cabo una polimerización y, por lo tanto, no existe interfaz (Figura 3.16).



**Figura 3.29.** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos de la monocapa en hidrogeles de colágeno de 2.5-2-1.5 mg/ml, con PDGF-BB añadido en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. La intensidad de fluorescencia representa la cantidad de fibroblastos que hay distribuidos a lo largo de los hidrogeles de colágeno de 2.5-2-1.5 mg/ml, (intervalos de 0-24, 24-48, 48-72, 72-144, 144-192 y 192-312 h), partiendo de la monocapa hasta el extremo opuesto del dispositivo; es decir, a mayor fluorescencia, mayor número de células.



**Figura 3.30.** Interfaz generada entre dos hidrogeles de diferentes concentraciones de colágeno

Se muestra la interfaz de fibras de colágeno en 3D de hidrogeles de 1.5 y 2 mg/ml obtenidas por microscopía confocal de reflexión entre dos postes del dispositivo de microfluídica. La imagen se tomó con el microscopio Nikon D-Eclipse con el objetivo Plan Apo VC 60XH. *Imagen tomada de [230].* La barra de escala representa 50 µm.

A continuación, se muestran la Tabla 3.2, la Tabla 3.3 y la Tabla 3.4 con un resumen de las condiciones analizadas en los distintos experimentos, las cuales muestran la mediana de los valores de la distancia recorrida por los fibroblastos de la monocapa. La Tabla 3.2 muestra el análisis de haptotaxis, la Tabla 3.3 el de quimiotaxis y la Tabla 3.4 el de durotaxis.

**Tabla 3.2. Resultados del análisis de haptotaxis de los fibroblastos de la monocapa**

Los resultados representan la mediana de los valores de la distancia recorrida por los fibroblastos en las distintas condiciones analizadas, en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno. Las tonalidades de naranja representan la distancia recorrida hasta 200  $\mu\text{m}$ , siendo el naranja más oscuro la menor distancia recorrida por los fibroblastos (49.91  $\mu\text{m}$  en la condición de tratamiento con fibronectina y eliminación de factor químico a las 24 h). Las tonalidades de verde representan la distancia recorrida desde 200  $\mu\text{m}$  con el verde más claro hasta 454.4  $\mu\text{m}$  con el verde más oscuro (condición de mayor distancia recorrida con eliminación de factor aplicado en ambos canales a las 144 h).

HAPTOTAXIS							
Hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml	MEDIANA DE LOS VALORES DE LA DISTANCIA RECORRIDA POR LOS FIBROBLASTOS DE LA MONOCAPA ( $\mu\text{m}$ )						
	PDGF-BB	24 h	48 h	72 h	96 h	144h	216 h
Con eliminación de factor	Control	105.6	124.8	ND	ND	ND	228.8
	Canal opuesto	131.2	164	ND	ND	ND	292
	Control	171.2	204.8	240	ND	292	
	Canal monocapa	129.6	163.2	188.8	ND	244.8	
	Ambos canales	185.6	268.8	344	ND	454.4	
Sin eliminación de factor	Control	70.4	92.8	ND	ND		
	Canal monocapa	88	140.8	ND	ND		
	Canal opuesto	96	163.2	ND	ND		
Fibronectina + eliminación de factor	Control sin fibronectina	70.84	96.6	ND	169.1		
	Control con fibronectina	49.91	80.5	ND	159.4		
	Fibronectina sin PDGF-BB	67.62	88.55	ND	170.7		
	Fibronectina con PDGF-BB	78.89	109.5	ND	223.8		

N.D. (no determinado)

**Tabla 3.3. Resultados del análisis de quimiotaxis de los fibroblastos de la monocapa**

Los resultados muestran la mediana de los valores de la distancia recorrida por los fibroblastos en las distintas condiciones analizadas, en hidrogeles de 2.5 mg/ml de una y tres cámaras centrales, con el entrecruzante TG2, y de 4 mg/ml de colágeno. El naranja más oscuro representa la menor distancia recorrida por los fibroblastos en el hidrogel de 4 mg/ml (74.06  $\mu\text{m}$  en la condición control a las 24 h) y el verde más oscuro la mayor distancia recorrida en el hidrogel de 2.5 mg/ml (491.1  $\mu\text{m}$  a las 216 h en el dispositivo de tres cámaras, aplicando factor en el canal opuesto).

QUIMIOTAXIS						
Hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml	MEDIANA DE LOS VALORES DE LA DISTANCIA RECORRIDA POR LOS FIBROBLASTOS DE LA MONOCAPA ( $\mu\text{m}$ )					
	PDGF-BB	24 h	48 h	72 h	96 h	216 h
Una cámara	Control	116.8	150.4	180.8	195.2	ND
	Canal monocapa	148.8	204.8	252.8	281.6	ND
	Canal opuesto	177.6	256	341.6	364.8	ND
Tres cámaras	Control	77.28	117.5	159.4	178.7	257.6
	Canal opuesto	108.7	229	262.4	276.8	491.1
TG2	Control	94.4	139.2	164.8	184	
	Canal opuesto	110.4	201.6	249.6	296	
Hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml	Control	74.06	133.6	181.1	193.2	
	Canal opuesto	109.5	180.3	257.6	299.5	

N.D. (no determinado)

**Tabla 3.4. Resultados del análisis de durtaxis de los fibroblastos de la monocapa**

Mediana de los valores de la distancia recorrida por los fibroblastos en condiciones control y con factor químico añadido en el canal opuesto, en hidrogeles de 2.5-2-1.5 mg/ml de colágeno. La menor distancia recorrida corresponde a la condición control a las 24 h (60.8  $\mu\text{m}$ , en naranja oscuro) y la mayor distancia recorrida cuando se aplica el factor químico en el canal opuesto (372  $\mu\text{m}$ , en verde oscuro).

DUROTAXIS							
Hidrogeles de colágeno de 2.5-2-1.5 mg /ml	MEDIANA DE LOS VALORES DE LA DISTANCIA RECORRIDA POR LOS FIBROBLASTOS DE LA MONOCAPA ( $\mu\text{m}$ )						
	PDGF-BB	24 h	48 h	72 h	144 h	192 h	312 h
Tres cámaras	Control	60.8	116.8	166.4	236.8	248.8	300.8
	Canal opuesto	88	156.8	228.8	312	350.4	372

#### **3.1.1.4. Discusión y conclusiones**

Este trabajo se ha llevado a cabo para evaluar los efectos de la matriz en la migración de la monocapa de fibroblastos en presencia del factor de crecimiento derivado de plaquetas humano, en procesos de haptotaxis, quimiotaxis y durotaxis.

La presencia del factor químico PDGF-BB hace que las células utilicen fuerzas de tracción en las fibras de colágeno para establecer una polaridad frontal-posterior y como consecuencia de ésta se produce una translocación del cuerpo celular. Las fuerzas de protrusión y retracción se transmiten de manera coordinada al cuerpo celular para apoyar el movimiento hacia adelante.

La expansión de la monocapa de fibroblastos resultó en la migración de estas células de una forma individual y las interconexiones que se producen entre ellas son generalmente transitorias. Este hecho de que los fibroblastos no formen adhesiones persistentes célula-célula durante la migración de la monocapa presenta un contexto diferente al de la migración colectiva donde las células logran la coordinación mediante la formación y el mantenimiento de contactos célula-célula durante la cicatrización de heridas *in vivo* [82], [253], [254].

Los experimentos de haptotaxis en este trabajo demostraron que la matriz de colágeno actúa no solamente determinando el tamaño de poro y la conectividad, sino también como reservorio del factor químico, al proporcionar sitios de unión a las biomoléculas [218], [255]. En concreto, como se ha descrito en la literatura, el PDGF-BB presenta una gran afinidad para unirse al colágeno tipo I [219] que es el que se utiliza para llevar a cabo los experimentos de este trabajo. En los procesos de haptotaxis se puede confirmar que parte del PDGF-BB permaneció inmovilizado en la matriz, lo cual estimuló la migración y la división de los fibroblastos de la monocapa, aumentando la distancia recorrida por los mismos. La adhesión del PDGF-BB parece no producirse de una forma completamente homogénea a lo largo de todo el hidrogel, presentando una concentración más idónea para la migración de los fibroblastos en la zona más cercana a la siembra de la monocapa, donde se ha aplicado el factor químico [208]. Este resultado se puede observar en la distribución y en la migración de los fibroblastos, en función del tiempo, en las distintas condiciones analizadas, tanto con eliminación como sin eliminación de PDGF-BB. También es importante destacar que el pretratamiento con

PDGF-BB en las condiciones de haptotaxis analizadas (cuando el factor químico se añade en el canal opuesto a la siembra de la monocapa de fibroblastos) estimula la proliferación entre un 33 y un 38%. Cuando el PDGF-BB se incorpora en ambos canales, esta proliferación se ve incrementada en un 76%, respecto a los hidrogeles no tratados (véase Tabla 3.1).

Los resultados obtenidos del pretratamiento de los hidrogeles de colágeno con fibronectina y PDGF-BB, en condiciones de haptotaxis, no muestran una diferencia relevante en la migración de los fibroblastos de la monocapa respecto a los que no han tenido dicho pretratamiento.

La difusión de factores químicos, mediante quimiotaxis, a través de los poros de la matriz forma gradientes en el hidrogel que pueden ser heterogéneos [256] pudiendo quedar parte del factor químico unido a la matriz o en forma soluble. Moreno-Arotzena y col. [141] desarrollaron una herramienta de cálculo computacional, que se validó experimentalmente mediante ensayos de inmunoadsorción enzimáticos (ELISA), para evaluar el transporte y distribución del PDGF-BB soluble en hidrogeles 3D, concluyendo que durante el tiempo de difusión algunas biomoléculas pueden degradarse, difundir a través de los poros del hidrogel o unirse a las proteínas de la matriz. Este hecho puede hacer que el factor químico tenga un papel distinto en la regulación de la migración. Los resultados obtenidos de la estimulación de los fibroblastos de la monocapa, mediante aplicación de un gradiente quimiotáctico con PDGF-BB, confirman una migración notablemente superior respecto al proceso de haptotaxis, tanto a nivel de la distribución homogénea de los fibroblastos como en la velocidad de la migración de los mismos, sobre todo cuando el factor químico se aplica en el canal opuesto a la siembra de la monocapa. La proliferación de los fibroblastos en estas condiciones de quimiotaxis es mucho más relevante que en el proceso de haptotaxis, ya que estimula una mayor proliferación, entre un 91 y un 107% (véase Tabla 3.1).

La migración de las células en 3D depende del equilibrio mecánico entre la deformabilidad de la célula y las restricciones de la matriz [257] dependiendo ambas del nivel de entrecruzamiento y la arquitectura de la matriz [258]. La adición del entrecruzante TG2 a la matriz de colágeno, además de mejorar la resistencia de los biopolímeros a la digestión proteolítica, como se ha mencionado anteriormente, también produce una alteración en la disposición fibrilar de la matriz, a nivel de

porosidad, tamaño de poro y diámetro de la fibra que afecta a la migración celular [223], [259]. La porosidad y el tamaño de poro de los hidrogeles de colágeno son particularmente importantes, ya que son indicativos de la densidad de ligando presentada en la superficie de la matriz para la adhesión célula-matriz [141]. Miron-Mendoza y col. han reportado que la densidad del ligando, en lugar de la rigidez del sustrato, puede determinar la morfología de los fibroblastos [260]. Los resultados obtenidos con el tratamiento de los hidrogeles de 2.5 mg/ml con 25  $\mu$ g/ml de TG2 mostraron que los fibroblastos de la monocapa se mueven de una forma más direccional y presentan menos ramificaciones. Es notorio destacar que la distancia recorrida por los fibroblastos no refleja cambios en cuanto a la migración en la condición control, sin embargo, se redujo un 23% en los estimulados con PDGF-BB comparada con los hidrogeles sin entrecruzar. Esto lleva a concluir que la distribución y la migración celular de los fibroblastos de la monocapa no parece demasiado dependiente de la rigidez de la matriz producida por el efecto del entrecruzante TG2 en los hidrogeles de 2.5 mg/ml.

Los resultados obtenidos cuando se varía la concentración de colágeno de 2.5 a 4 mg/ml tampoco presentan cambios en cuanto a la migración en la condición control. No obstante, sí presentan cambios cuando se estimulan con factor químico, siendo un 32% menor en los hidrogeles de 4 mg/ml. Esta reducción se puede deber a la difusión más lenta del PDGF-BB como consecuencia del tamaño de poro en los hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml (1.5  $\mu$ m) que es casi la mitad de los de 2 mg/ml (2.84  $\mu$ m) [260]. La proliferación de los fibroblastos también se vio afectada, reduciéndose aproximadamente un 50% respecto a los hidrogeles de 2.5 mg/ml cuando se estimula con factor químico (véase Tabla 3.1).

Durante la migración de los fibroblastos, se sabe que las señales mecánicas de la matriz extracelular juegan un papel importante regulando el comportamiento celular [261], [262]. Se han llevado a cabo numerosos estudios de regulación de la migración individual de fibroblastos estudiando la microestructura y las propiedades mecánicas de la matriz extracelular [263]–[266]. Se ha demostrado que en ausencia de células vecinas los fibroblastos migran preferentemente de regiones de baja rigidez a regiones de alta rigidez, tanto en sustratos poliméricos como en matrices de colágeno con distintos gradientes de rigidez, a través del proceso de durotaxis [254], [263], [264]. Las células detectan la rigidez del sustrato ejerciendo fuerzas sobre él, y posteriormente, alterando

los flujos de actina y modificando su citoesqueleto para detectar las deformaciones de la matriz [78], [264].

Los experimentos de durotaxis llevados a cabo en este trabajo, en hidrogeles de 1.5-2-2.5 mg/ml de colágeno, muestran que la monocapa de fibroblastos sembrada en contacto con hidrogeles de baja concentración (1.5 mg/ml) genera colectivamente una fuerza mecánica lo suficientemente grande para deformar la matriz de colágeno durante la migración, que termina por desprender el hidrogel de colágeno, no pudiendo obtenerse resultados de dicho gradiente. Sin embargo, la monocapa de fibroblastos sembrada en los hidrogeles de 2.5-2-1.5 mg/ml de colágeno permite la migración de los fibroblastos desde el hidrogel de 2.5 mg/ml hacia los hidrogeles de menor concentración, pareciendo estar dicha migración limitada por la interfaz generada en la polimerización de los hidrogeles.

### **3.2. La degradación de la matriz extracelular regula la migración de los osteoblastos**

La migración celular desempeña una función crítica y crucial en muchos procesos regenerativos, incluida la reparación ósea, la cual depende en gran medida de la capacidad de las células para moverse en un microambiente 3D, donde una gran cascada de señales se activa. Para mejorar la comprensión de este complejo proceso y avanzar en el conocimiento del papel que desempeña cada señal específica, es fundamental analizar el impacto de cada factor de forma independiente. El cultivo celular basado en microfluídica es una tecnología apropiada para lograr este objetivo, porque permite recrear microambientes 3D teniendo en cuenta las propiedades de la matriz extracelular, las células y los gradientes químicos en escenarios independientes o combinados. Para ello, en este trabajo se han utilizado hidrogeles de colágeno, con y sin entrecruzamiento, con diferentes gradientes químicos de PDGF-BB para comprender su papel regulador, y finalmente se han inhibido las metaloproteasas para modificar la degradación de la matriz.

#### **3.2.1. Análisis de la microestructura y la respuesta mecánica de los hidrogeles de colágeno.**

La información estructural sobre las fibras de colágeno se determinó mediante técnicas de microscopía electrónica, en hidrogeles de colágeno a concentraciones de 4 mg/ml en los experimentos de migración de osteoblastos HOB. También se modificó la microestructura mediante la reticulación de estos hidrogeles de colágeno con 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de transglutaminasa. Se observó una polimerización del hidrogel diferente y una reorganización de la alineación de las fibras, con lo que se obtuvieron hidrogeles de colágeno con mayor resistencia a la deformación (Tabla 3.5).

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles utilizados para el cultivo celular se estudiaron dentro de su región elástica lineal, donde la tensión es linealmente proporcional a la deformación e independiente del tiempo. Los análisis reológicos mostraron una mayor rigidez en hidrogeles con mayor concentración de colágeno, cuando se aplicaron pequeñas deformaciones ( $\gamma < 10\%$ ). No se observan diferencias

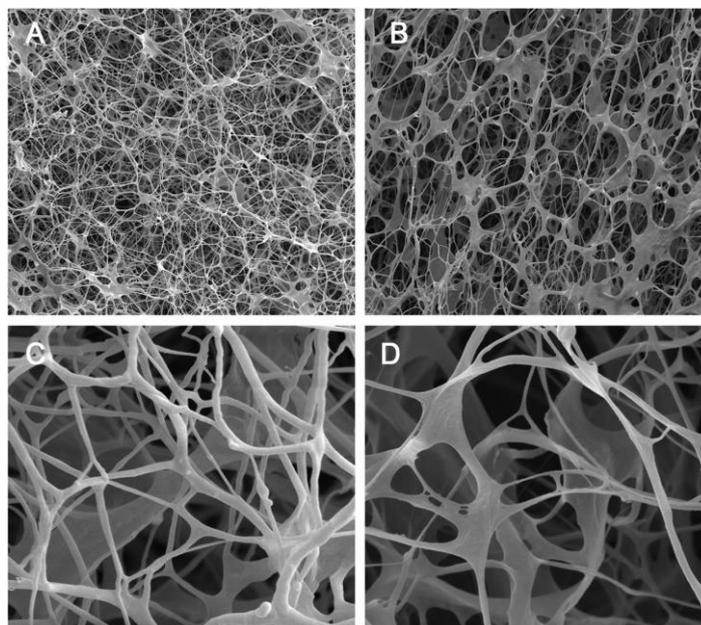
significativas en la rigidez de los hidrogeles de 4 mg/ml cuando se agrega la enzima de entrecruzamiento TG2.

**Tabla 3.5. Propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno utilizados para los experimentos *in vitro***

Las propiedades mecánicas analizadas según la composición del gel fueron el módulo de almacenamiento  $G'$ , el esfuerzo cortante máximo, la máxima  $G'$  y la tensión a la máxima  $G'$ . Se analizaron tres muestras para los casos sin TG2 y 25  $\mu\text{g/ml}$  de TG2 y una muestra para el hidrogel de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

COMPOSICIÓN DEL HIDROGEL	MÓDULO DE ALMACENAMIENTO $G'$ (PA)	ESFUERZO CORTANTE MÁXIMO (PA)	MÁXIMA $G'$ (PA)	TENSIÓN A LA MÁXIMA $G'$ (PA)
4 mg/ml	121.03 $\pm$ 9.94	0.403	191.2	0.403
4 mg/ml + 25 $\mu\text{g/ml}$ TG2	127.90 $\pm$ 14.43	0.449	285.5	0.384
4 mg/ml + 50 $\mu\text{g/ml}$ TG2	207	0.430	863.2	0.362

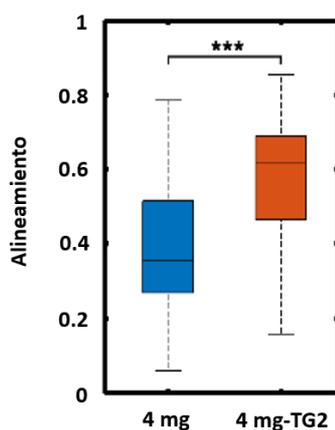
La Figura 3.31 muestra la arquitectura de hidrogeles de 4 mg/ml a diferentes aumentos (6,000 $\times$  y 50,000 $\times$  para panel superior e inferior, respectivamente). La adición de TG2 no indujo fuertes alteraciones en la arquitectura, pero parece aumentar el número de membranas delgadas entre las fibras de colágeno y, en general, forma una arquitectura más alineada (Figura 3.31B).



**Figura 3.31. Imágenes de SEM de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml y con y sin TG2**

Imágenes de SEM de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml (A, C) y 4 mg/ml con TG2 (B, D) adquiridos a 6,000 $\times$  – 50,000 $\times$  aumentos (paneles izquierda y paneles derecha, respectivamente) que muestran las características morfológicas de las fibras del hidrogel.

Para confirmar esto, se analizó la alineación de las redes de diferentes hidrogeles, tal y como se explica en el apartado 2.7 de material y métodos, obteniendo el índice de alineación alfa, que varía de 0 (estructura completamente isotrópica) a 1 (estructura completamente alineada). La Figura 3.32 muestra que las redes de los hidrogeles sin TG2 están significativamente menos alineadas (mediana de alfa aproximadamente 0.354, en comparación con 0.62).



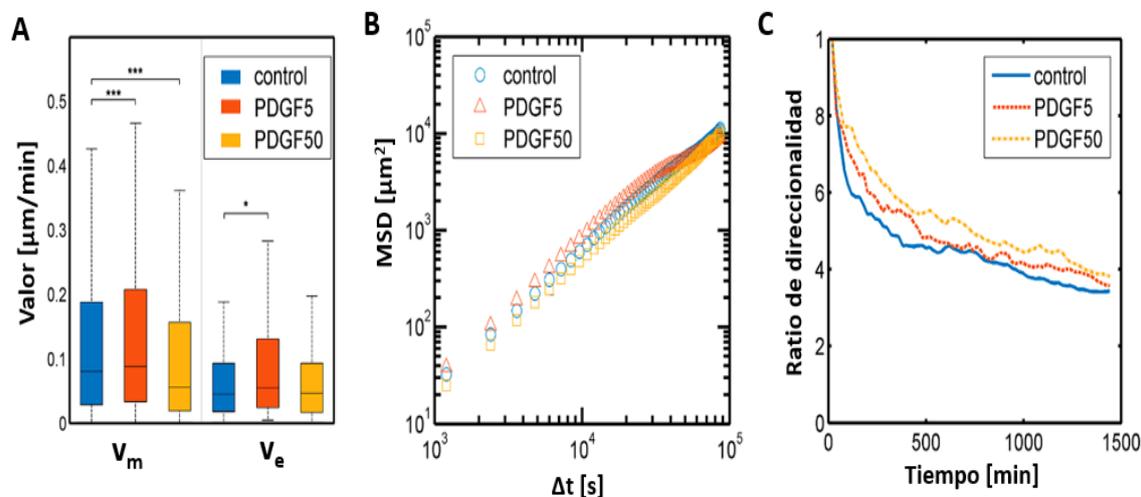
**Figura 3.32. Índice de alineación de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml con y sin TG2**

Cuando este índice es 0 representa redes totalmente isotrópicas y cuando es 1, totalmente alineadas. Las redes de los hidrogeles con TG2 están significativamente más alineadas que las que no lo tenían. Se realizaron tres réplicas de hidrogeles para cada condición, tomando hasta 28 imágenes de diferentes puntos por réplica a diferentes aumentos. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 3.2.2. Efecto del factor químico PDGF-BB en la migración de células HOB

El análisis del efecto de la isoforma PDGF-BB en la migración de los osteoblastos se llevó a cabo en dos concentraciones diferentes: 5 y 50 ng/ml. Estos resultados muestran que no hay ninguna alteración significativa de la orientación celular en la dirección del gradiente; sin embargo, se encontró un efecto de estimulación de la velocidad de migración a la dosis más baja (5 ng/ml) que aumentó la velocidad media y efectiva. Por otro lado, la concentración más alta (50 ng/ml), probablemente por un efecto inhibitorio debido a la saturación de receptores, no dio como resultado una migración mucho más rápida ni direccional de los osteoblastos, sino que presentó valores muy similares e incluso más bajos que el control (Figura 3.33A). La mediana del coeficiente de difusión estimado (D) corroboró esta tendencia, obteniendo valores de  $1.199 \mu\text{m}^2/\text{min}$  en condiciones control y  $1.605 \mu\text{m}^2/\text{min}$  y  $0.913 \mu\text{m}^2/\text{min}$  para concentraciones de 5 y 50 ng/ml de PDGF-BB, respectivamente (Figura 3.33B). Sin

embargo, la direccionalidad aumenta ligeramente a dosis más altas de PDGF-BB durante todo el experimento (Figura 3.33C).



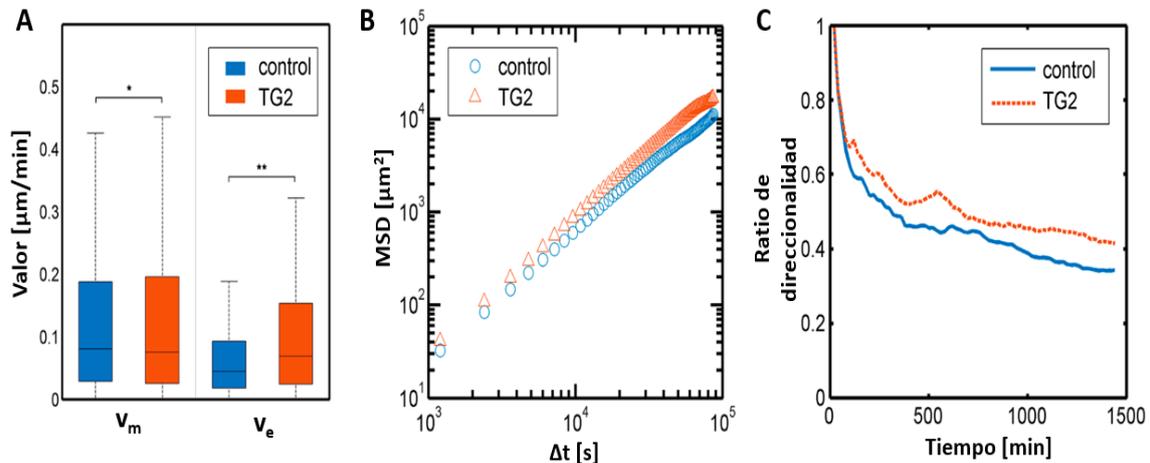
**Figura 3.33.** Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con PDGF-BB

(A) Velocidades medias y efectivas de las células HOB, (B) desplazamiento de mínimos cuadrados (MSD) de las trayectorias seguidas y (C) ratio de direccionalidad de 4 mg/ml de colágeno con 0 (control, azul), 5 (naranja) y 50 (amarillo) ng/ml de PDGF-BB. La concentración de 5 ng/ml se utilizó en cuatro experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno, y la concentración de 50 ng/ml se usó en dos experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 3.2.3. Efecto de los hidrogeles de colágeno entrecruzados con TG2 en la migración de células HOB

Los hidrogeles de colágeno se trataron con TG2 para estudiar el efecto del entrecruzamiento de la matriz en la migración celular. Se observaron diferencias pequeñas pero significativas, especialmente con respecto a velocidades y direccionalidad, cuando la red de colágeno estaba entrecruzada con TG2. De hecho, la adición de TG2 no afectó apreciablemente a las velocidades de las células, pero mejoró la difusividad y la direccionalidad, probablemente debido a la mayor alineación de fibras encontradas en estas redes (Figura 3.32). Los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la migración de osteoblastos HOB con respecto a las velocidades medias y efectivas en los hidrogeles de colágeno con TG2 en comparación con el control, aunque estas variaciones no fueron relevantes, siendo la mediana de la velocidad media ( $v_m$ ) de 0.080  $\mu\text{m}/\text{min}$  en las células control y 0.075  $\mu\text{m}/\text{min}$  en hidrogeles tratados con TG2. En el caso de la velocidad efectiva ( $v_e$ , que tiene en cuenta solo el primer y último punto de la trayectoria), se obtuvo un valor mediano

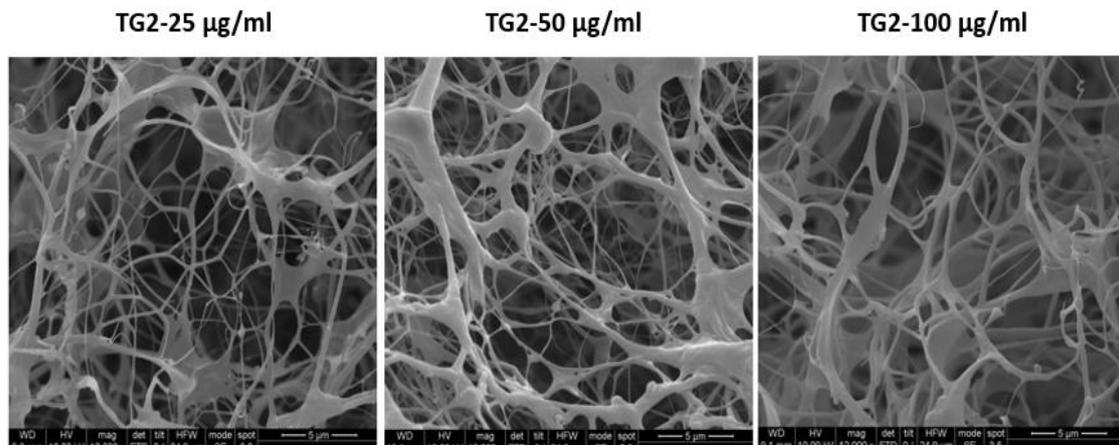
de  $0.044 \mu\text{m}/\text{min}$  frente a  $0.068 \mu\text{m}/\text{min}$  en hidrogeles tratados con TG2 (Figura 3.34A). El coeficiente de difusión aumentó al añadir TG2, obteniendo un valor mediano de  $1.747 \mu\text{m}^2/\text{min}$  en comparación con  $1.199 \mu\text{m}^2/\text{min}$  de controles (Figura 3.34B), así como la ratio de direccionalidad durante todo el período registrado (Figura 3.34C).



**Figura 3.34.** Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  de TG2

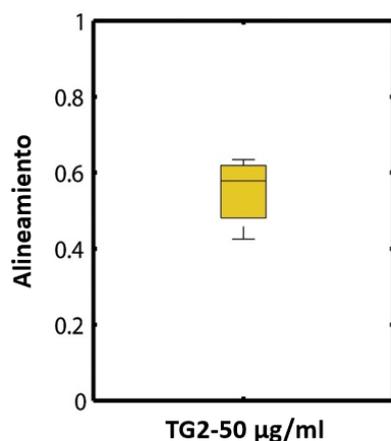
(A) Velocidades medias y efectivas de las células HOB, (B) desplazamiento de mínimos cuadrados (MSD) de las trayectorias seguidas y (C) ratio de direccionalidad en  $4 \text{ mg}/\text{ml}$  de colágeno con (curva naranja) y sin (curva azul) TG2. Se realizaron cuatro experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

Para confirmar lo expuesto anteriormente, se aumentó la concentración de TG2 a  $50$  y  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  encontrando que no cambió significativamente ni la alineación (Figura 3.35 y Figura 3.36) ni la velocidad y direccionalidad de las células HOB en comparación con las obtenidas para  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  (Figura 3.37).



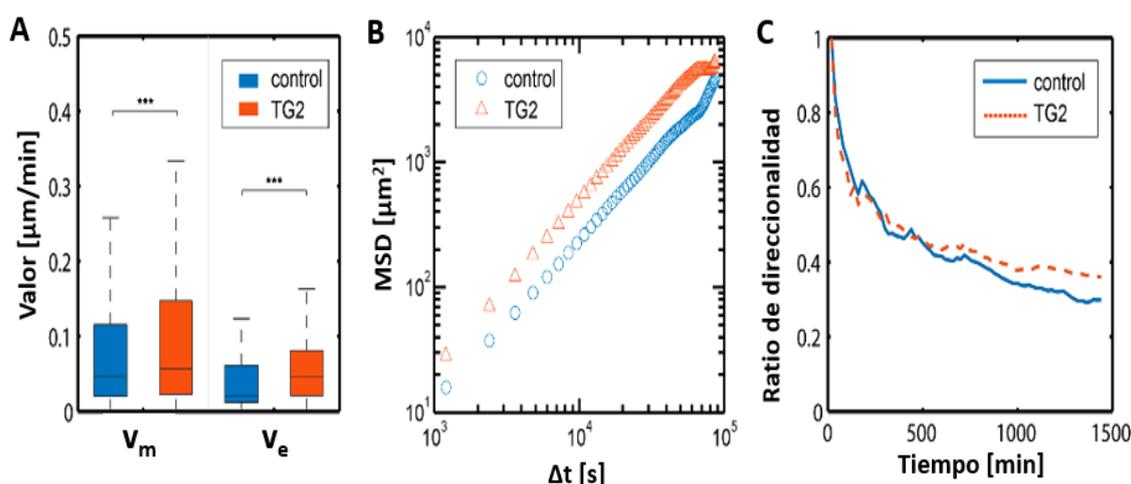
**Figura 3.35.** Imágenes de SEM de fibras de hidrogeles de colágeno de  $4 \text{ mg}/\text{ml}$  con TG2

Imágenes tomadas a una magnificación de  $12.000\times$  donde se muestran las características morfológicas de las fibras de los hidrogeles a distintas concentraciones de TG2. La barra de escala representa  $5 \mu\text{m}$ .



**Figura 3.36. Índice de alineación de hidrogeles de colágeno de 4mg/ml con 50 µg/ml de TG2**

El alineamiento 0 representa redes totalmente isotrópicas y 1, totalmente alineadas. Las redes de los hidrogeles con 50 µg/ml de TG2 tienen un alineamiento alrededor de 0.6, al igual que los hidrogeles de 25 µg/ml (Figura 3.32). Se realizaron dos réplicas, tomando hasta 28 imágenes de diferentes puntos por réplica a diferentes aumentos.

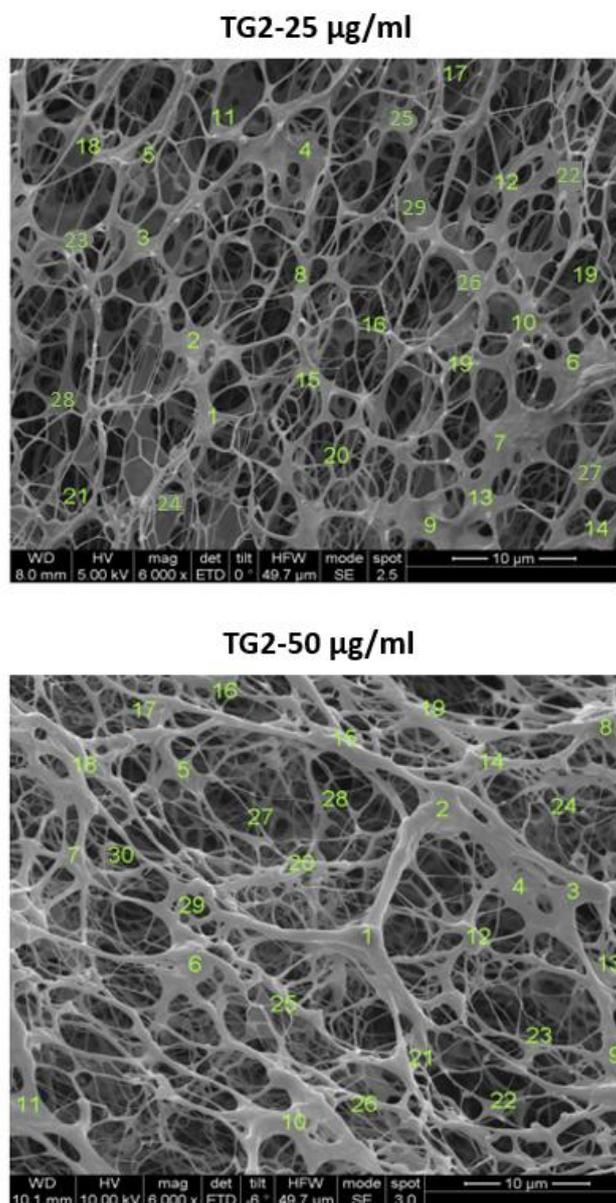


**Figura 3.37. Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con 50 µg/ml de TG2**

(A) Velocidades medias y efectivas de las células HOB, (B) desplazamiento de mínimos cuadrados (MSD) de trayectorias seguidas y la ratio de direccionalidad (C) de 4 mg/ml de colágeno con 50 µg/ml de TG2 (curva naranja) y sin TG2 (curva azul). Se realizaron dos experimentos independientes con cuatro réplicas técnicas cada uno. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

Para tratar de entender si las diferencias encontradas se debían a cambios en la alineación global, o algo más complejo como las estructuras membranosas que aparecen durante la polimerización con la adición de TG2, se intentó cuantificar de alguna forma dichas membranas. Debido a su forma irregular y tridimensional, no es posible hacer mediciones exactas, por lo que se tomaron dos aproximaciones. Una primera que consistió en el conteo manual de las membranas en las dos

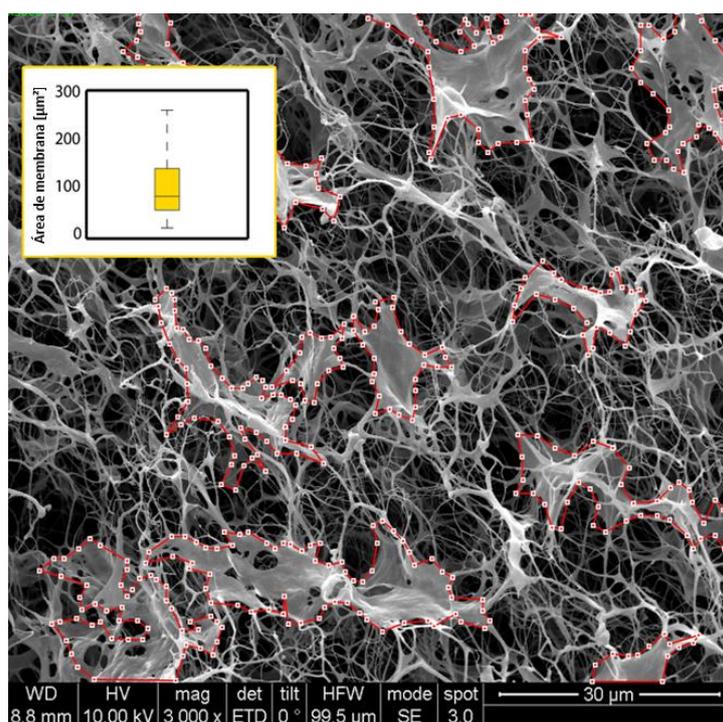
concentraciones de TG2 (25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) obteniendo aproximadamente el mismo número en ambos casos (29 y 30 membranas, respectivamente), tal y como se muestra en la Figura 3.38.



**Figura 3.38.** Cuantificación de las membranas en hidrogel de colágeno de 4 mg/ml con 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de TG2. Imágenes de SEM tomadas a una magnificación de 6.000x donde se muestran las membranas entre las fibras de los hidrogel con TG2. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

Como segunda aproximación, se midieron de forma semicuantitativa las superficies ocupadas por dichas membranas. Para poder medirlas adecuadamente tanto en cantidad como en extensión, sería necesaria la obtención de un z-stack segmentado para representarlo y analizarlo en 3D. Sin embargo, las imágenes tomadas por SEM corresponden a un solo plano focal y, por lo tanto, son bidimensionales, por lo que las

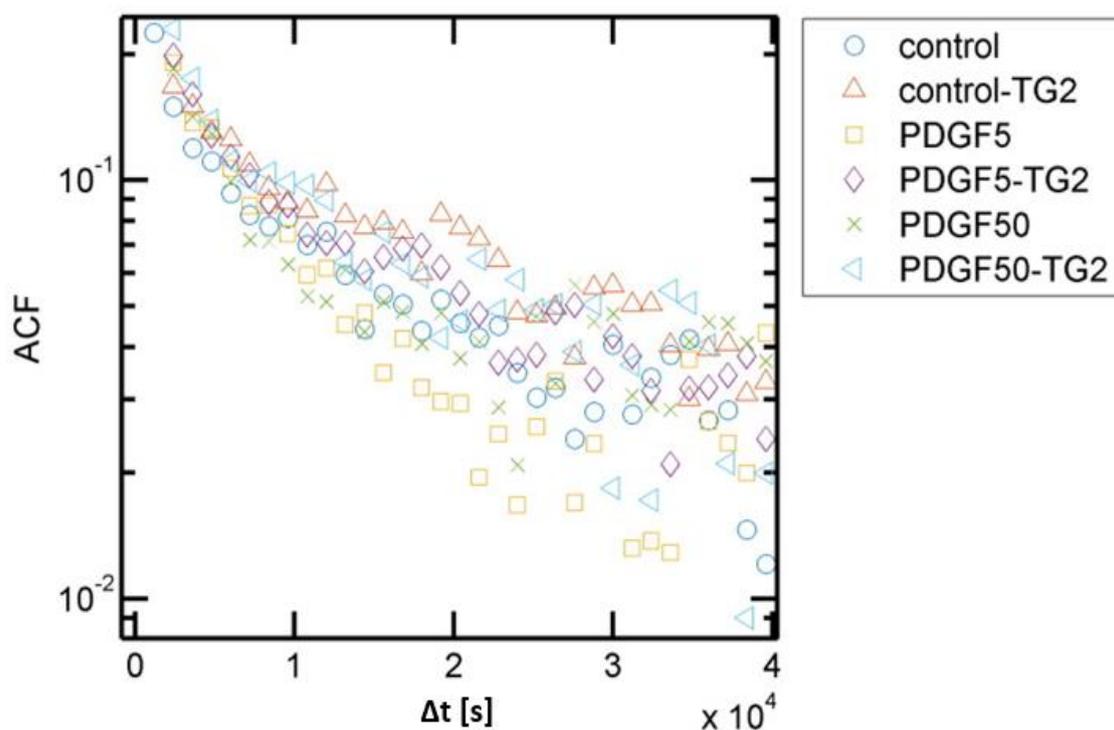
medidas de las áreas se realizaron en dicho plano. Igual que en el caso anterior, también se encontró que el número y el tamaño de las membranas son similares en ambas concentraciones de TG2 (25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ), estando ausentes en el control. La mediana del área de las membranas fue de 80  $\mu\text{m}^2$ . A continuación, se muestra un ejemplo de este análisis (Figura 3.39). Si este efecto de formación de membranas se produce en microentornos fisiológicos es una cuestión importante, pero por el momento se desconoce la respuesta.



**Figura 3.39. Medición de las membranas de hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml + TG2**

Imagen de SEM tomada a una magnificación de 3.000x donde se muestra la medición del área de las membranas entre las fibras de los hidrogeles. La barra de escala representa 30  $\mu\text{m}$ .

Los resultados obtenidos de los experimentos con adición a los hidrogeles del agente entrecruzante TG2 permiten concluir que se favoreció la migración dirigida, probablemente debido a una alineación de la matriz más alta como lo sugiere el estudio microestructural (Figura 3.32). También se observó una mayor autocorrelación de las velocidades celulares con TG2 que indica que los movimientos celulares son más persistentes (Figura 3.40).

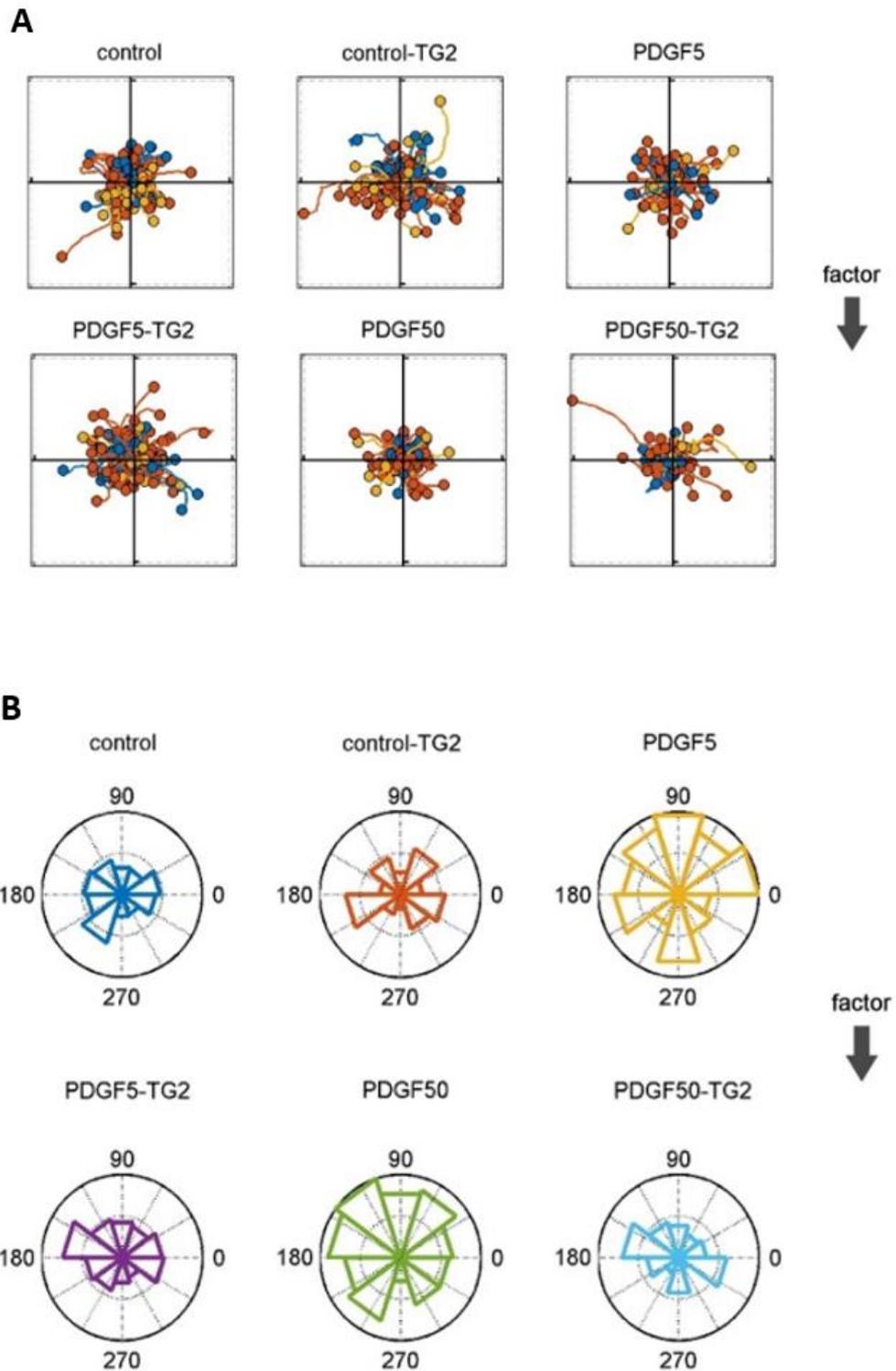


**Figura 3.40. Correlación de velocidades**

Función de autocorrelación de las velocidades de la célula (ACF). Un valor más alto indica que los movimientos de las células son más persistentes. ACF acercándose a 0 indica que las células presentan patrones de movimiento aleatorio.

### 3.2.4. Análisis de la dirección del movimiento de la migración de HOB en 3D

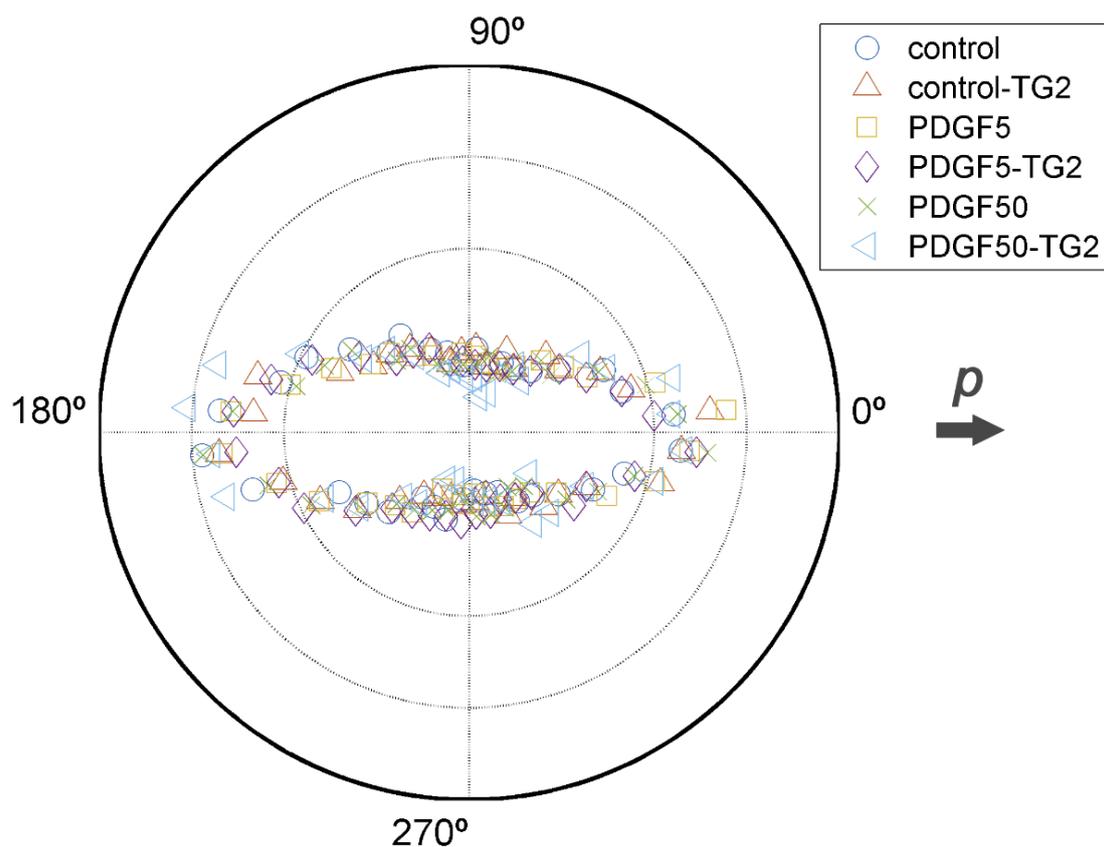
Las trayectorias celulares de múltiples ensayos, en relación con su origen, se analizaron juntas para dilucidar si existían patrones direccionales dependiendo de las condiciones. Como se muestra en la Figura 3.41A y B, respectivamente, tanto en las trayectorias reales como en los histogramas polares, no se encontró ningún patrón visible, a pesar de que algunos de los casos presentaban un gradiente de factor en una dirección específica o una mayor alineación de las fibras. Esto sugirió que las condiciones químicas o microestructurales pueden mejorar la motilidad en 3D, aunque todavía es difícil para las células seguir un camino recto, es decir, hacia el factor químico.



**Figura 3.41. Trayectorias de las células cuyo punto de partida fue centrado en el origen de las coordenadas**

(A) Trayectorias de las células individuales e (B) histogramas polares. Los colores en las trayectorias solo se utilizan con fines de visualización. Los histogramas muestran la distribución angular de las trayectorias teniendo en cuenta solo el primer y último punto de cada trayectoria. La dirección del gradiente de factor está indicada por una flecha negra.

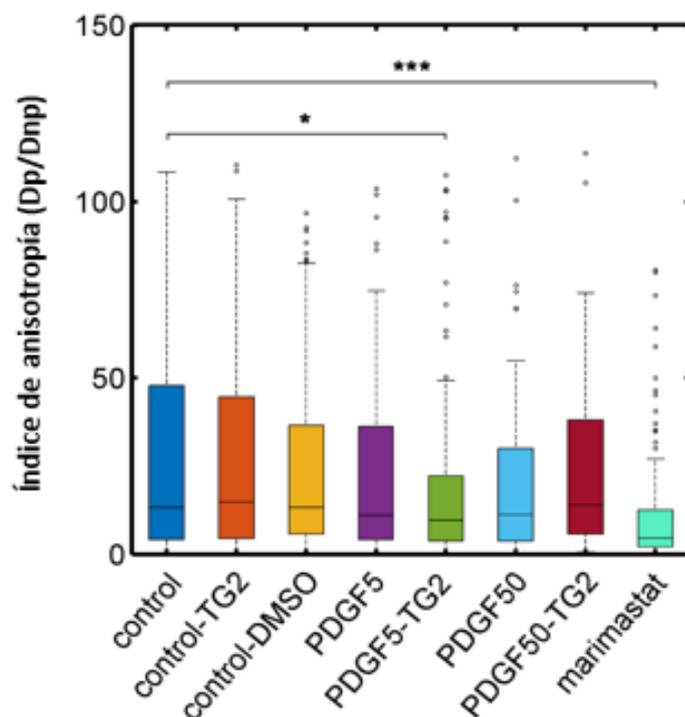
Sin embargo, un análisis más profundo de las trayectorias celulares al descomponer los movimientos en una dirección principal y otra secundaria [234] reveló que la migración celular en 3D es intrínsecamente anisotrópica independientemente de las condiciones mecanoquímicas (Figura 3.42). Es decir, aunque las células en conjunto se muevan de forma aleatoria y sin patrón aparente, cada una individualmente tiende a seguir una dirección particular de forma persistente.



**Figura 3.42. Polarización de la velocidad**

Perfil de polarización de la velocidad: promedio de la velocidad de la célula, realineada a lo largo de la dirección de migración principal ( $p$ ) y analizada en diferentes orientaciones. Si la velocidad es isotrópica (camino aleatorio), el promedio de la velocidad de la célula es igualmente probable en todas las direcciones. Los resultados muestran que el promedio de la velocidad a lo largo de la dirección de migración primaria fue sustancialmente mayor que en otras direcciones para todos los casos estudiados, revelando un comportamiento intrínsecamente anisotrópico.

De hecho, el índice anisotrópico se calculó indirectamente a través de los coeficientes de difusión tanto en la dirección primaria como en la secundaria de migración, y los resultados mostraron valores altos para todos los casos estudiados (Figura 3.43).



**Figura 3.43. Índice de anisotropía**

El índice de anisotropía se obtiene con la ratio entre  $D_p$  y  $D_{np}$ , siendo  $D_p$  el eje en dirección principal de migración celular y  $D_{np}$  el eje en dirección secundaria. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ .

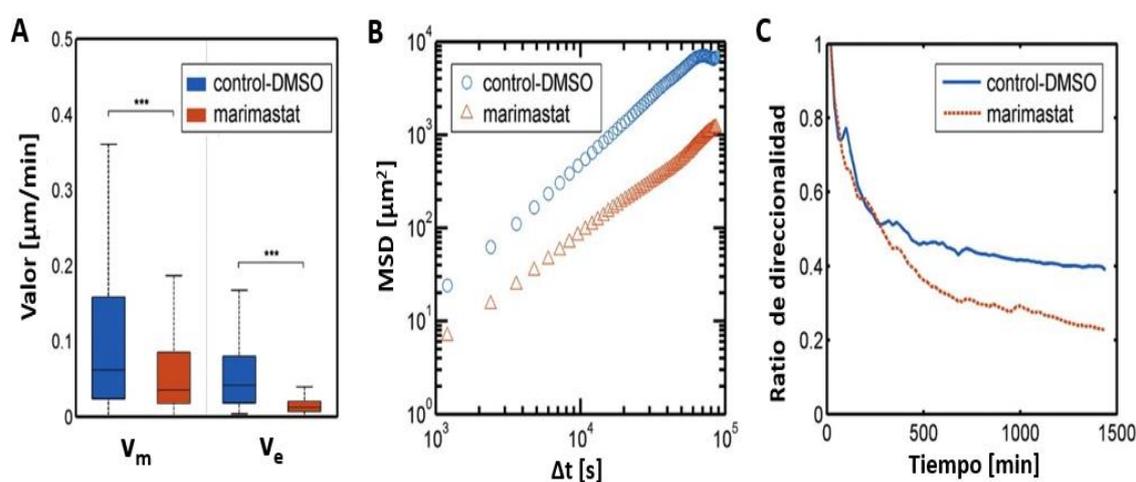
### 3.2.5. Efecto de la capacidad de degradación de la línea celular HOB en la migración

Los cambios locales en las propiedades de la matriz debido a la degradación también alteran el proceso de migración [267]. Las células degradan la matriz circundante para abrir nuevos caminos para moverse. Lógicamente, como resultado de esta degradación, se reduce la rigidez de la matriz y aumenta el tamaño de los poros. El mecanismo que utilizan las células para degradar la matriz extracelular se basa principalmente en la secreción de enzimas metaloproteasas de matriz (MMP) con la capacidad de degradar proteínas de la MEC [267], que han demostrado ser clave en patologías como la invasión de células cancerosas [268].

Para migrar en 3D, las células pueden usar estrategias proteolíticas (mesenquimales) o no proteolíticas (ameboides) [269]. En la migración proteolítica, las células se adhieren a la matriz y secretan metaloproteasas activas (MMPs), que descomponen la MEC y crean agujeros macroscópicos que permiten su movimiento. Sin embargo, en la migración no proteolítica, las células deforman la MEC o pasan a través

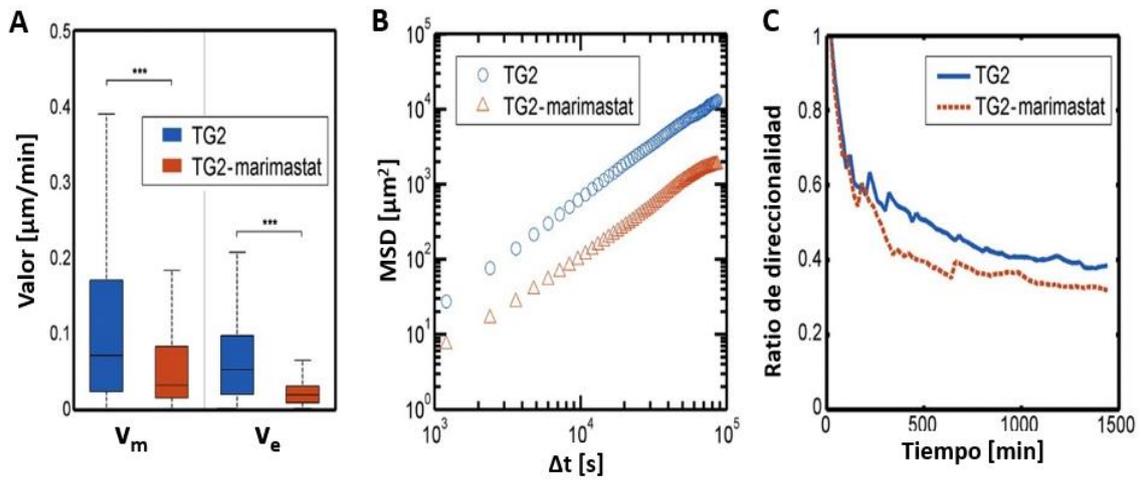
de ella, sin degradación. Hasta la fecha, no está claro si la migración de osteoblastos en matrices basadas en colágeno presenta una estrategia proteolítica o no proteolítica.

Para analizar la importancia de la degradabilidad de la matriz, se trataron células HOB con el inhibidor de metaloproteasas (MMP) marimastat (10  $\mu\text{M}$ ), que bloquea la actividad de degradación de la matriz extracelular [270]. Se encontró un efecto muy significativo en la migración de HOB, reduciendo dramáticamente los valores medios de las velocidades media y efectiva (Figura 3.44A). De hecho, en algunos casos las células no se movieron en absoluto. En consecuencia, el coeficiente de difusión se redujo drásticamente (la mediana de los valores descendió de 0.927  $\mu\text{m}^2/\text{min}$  a 0.145  $\mu\text{m}^2/\text{min}$ ), así como la ratio de direccionalidad en el período registrado (Figura 3.44B y C).



**Figura 3.44. Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con marimastat** (A) Velocidades medias y efectivas de las células HOB, (B) desplazamiento de mínimos cuadrados (MSD) de las trayectorias seguidas y (C) la ratio de direccionalidad para hidrogeles de colágeno con (naranja) y sin (azul) marimastat. Los experimentos se repitieron dos veces con tres réplicas cada uno. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

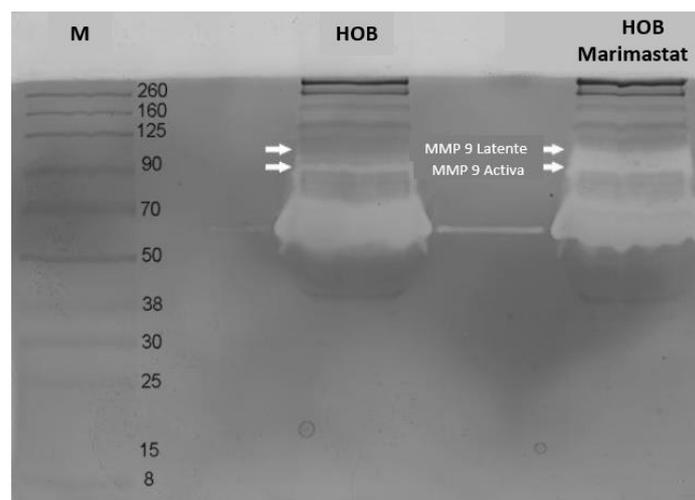
Para confirmar esto, también se probó el inhibidor de MMP con hidrogeles entrecruzados con TG2. Al igual que en los casos sin entrecruzamiento, la adición de marimastat tuvo efectos muy significativos en la velocidad de los osteoblastos (tanto instantánea como efectiva, (Figura 3.45A), así como en el coeficiente de difusión (mediana de los valores de 1.255  $\mu\text{m}^2/\text{min}$  en comparación con 0.191  $\mu\text{m}^2/\text{min}$ , (Figura 3.45B) y la ratio de direccionalidad (Figura 3.45C). Por lo tanto, a partir de estos resultados, se observó que TG2 indica que el hidrogel es más resistente a la proteólisis [271], [272] aunque las células todavía pueden degradar selectivamente la matriz extracelular para definir su movimiento.



**Figura 3.45.** Cuantificación del desplazamiento, trayectorias y direccionalidad de las células HOB con marimastat y TG2

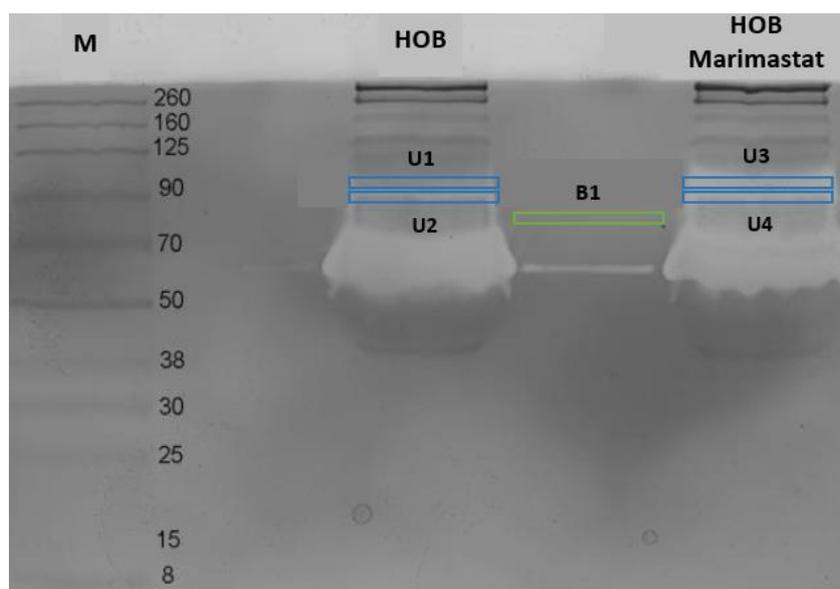
(A) Velocidades medias y efectivas de las células HOB, (B) desplazamiento de mínimos cuadrados (MSD) de las trayectorias seguidas y ratio de direccionalidad (C) para los hidrogeles de colágeno con TG2 y con (naranja) y sin (azul) marimastat. El experimento se realizó una vez con tres réplicas. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

Por otro lado, se llevó a cabo la técnica de zimografía cuantitativa en gel, tal y como se explica en el apartado 2.12 de material y métodos, la cual mostró que en presencia del inhibidor marimastat, la metaloproteasa MMP-9 se acumulaba claramente en su forma inactiva latente (Figura 3.46), un resultado coherente con la inhibición de la migración celular, sugiriendo que la degradación de la MEC regula fuertemente la migración de los osteoblastos.



**Figura 3.46.** Zimografía de gelatina del medio de cultivo de células HOB control y de HOB tratadas con marimastat. El marcador que se utilizó fue Chamaleon Duo (LI-COR). Las muestras se cuantificaron, se diluyeron con tampón de muestra no desnaturizante y se sometieron a SDS-PAGE al 10% que contenía 1 mg/ml de gelatina. La reacción gelatinolítica se indujo durante la noche (16-18 h). La MMP-9 latente se detecta en el medio de cultivo de hidrogeles tratados con HOB + marimastat y no en el HOB control.

Se procedió a cuantificar la cantidad relativa de MMP-9 inactiva latente mediante densitometría de bandas (Figura 3.47U1 y U3) en comparación con la MMP-9 activa (Figura 3.47U2 y U4), usando la región B1 para sustraer el valor del fondo (Figura 3.47). Los resultados que se muestran en la Tabla 3.6 indican que la MMP-9 inactiva latente aumentó quince veces en las células HOB tratadas con marimastat en comparación con las células no tratadas, mientras que la MMP-9 activa aumentó solamente dos veces en las células tratadas frente a las no tratadas.



**Figura 3.47. Actividad gelatinolítica de la MMP-9 en HOB tratadas y sin tratar con marimastat**

Separación por zimografía en gel de las metaloproteasas de matriz (MMPs) en gel de poliacrilamida al 8%. Las bandas blancas representan la actividad gelatinolítica de la MMP-9 inactiva latente (U1 y U3) y activa (U2 y U4).

**Tabla 3.6. Cuantificación de la MMP-9 en HOB con y sin marimastat**

Se muestran los valores de absorbancia sin ajustar y ajustados con el valor de las bandas correspondientes a MMP-9 en estado latente (U1 y U3) y activada (U2 y U4) en la muestra control y en la inhibida con marimastat.

ÍNDICE	NOMBRE	VOLUMEN OD*MM <sup>2</sup>	VOLUMEN AJUSTADO OD*MM <sup>2</sup>	VOLUMEN AJUSTADO	ÁREA MM <sup>2</sup>
1	U1	2.98	0.094	2.34	9.24
2	U2	3.63	0.74	18.47	9.24
3	U3	4.26	1.37	34.16	9.24
4	U4	4.70	1.81	45.04	9.24
5	B1	2.88	0.00	N/A	9.24

La Tabla 3.7 y la Tabla 3.8 resumen los valores medios de las velocidades medias y efectivas, la ratio de direccionalidad y los parámetros de movilidad (coeficiente de difusión, tiempo de persistencia y velocidad de persistencia extraídos de los modelos PRW y APRW ajustados). Los valores obtenidos utilizando ambos modelos fueron similares (Tabla 3.8 y Figura 3.43, Figura 3.48 y Figura 3.49), este hallazgo podría cambiar totalmente el enfoque en futuros estudios a la hora de analizar patrones o fenómenos clave en procesos relevantes como metástasis de cáncer que involucran degradación de la matriz, protuberancias dendríticas, diferentes fenotipos migratorios o, en resumen, migración 3D a través de una red compleja fibrada.

**Tabla 3.7. Velocidades, direccionalidad y difusividad**

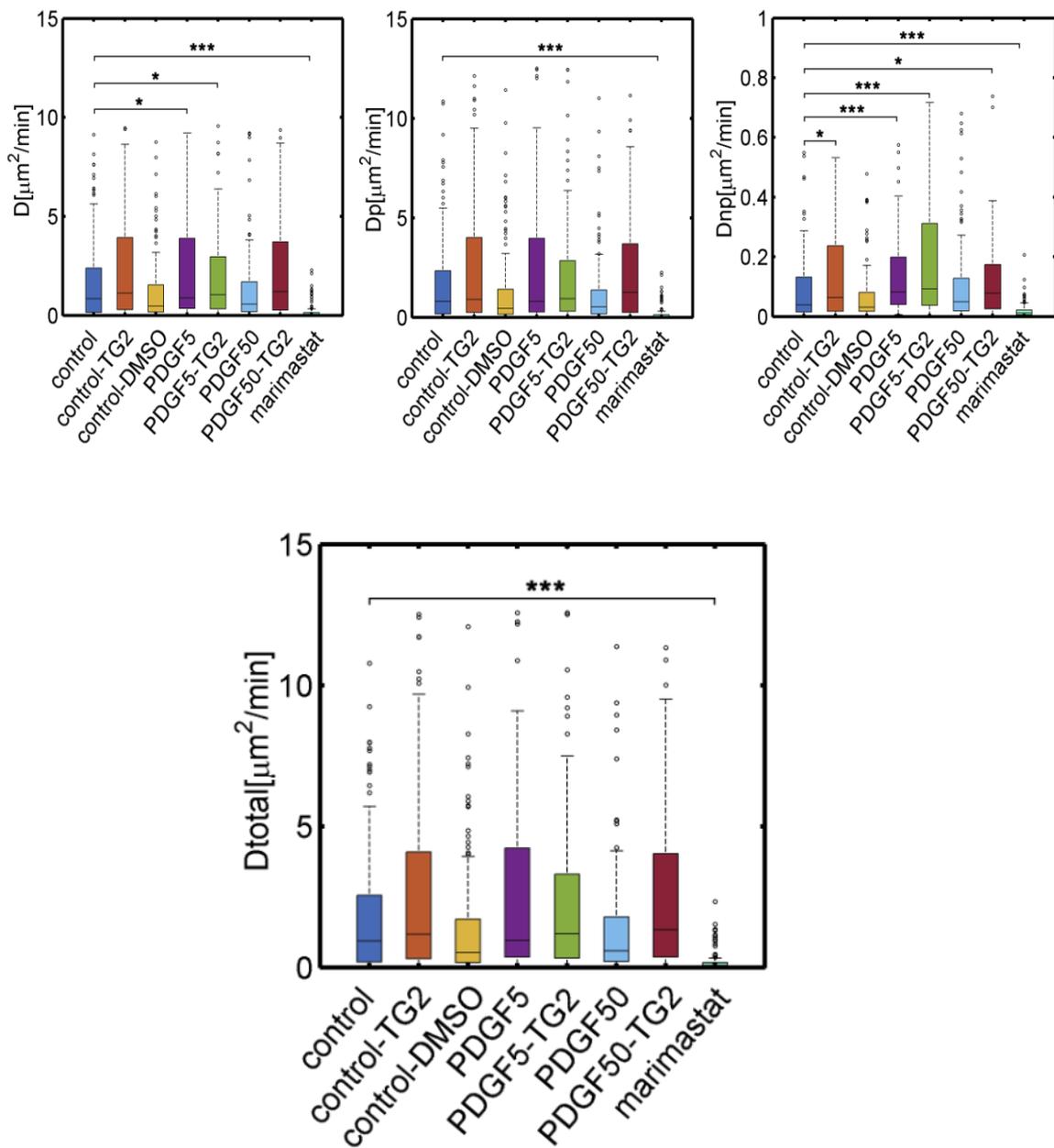
Valores medios de las velocidades media y efectiva ( $V_{media}$ ,  $V_{efectiva}$ ), ratio de direccionalidad (dR) y coeficiente de difusividad (D).

CONDICIÓN DE HOB	$V_{media}$ ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	$V_{efectiva}$ ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	dR	D ( $\mu\text{m}^2/\text{min}$ )
Control	0.080	0.044	0.343	1.199
Control + TG2	0.075	0.068	0.415	1.747
Control + DMSO	0.061	0.041	0.390	0.927
PDGF 5	0.087	0.055	0.357	1.605
PDGF 5 + TG2	0.070	0.068	0.428	1.623
PDGF 50	0.055	0.046	0.381	0.913
PDGF 50 + TG2	0.078	0.075	0.472	2.293
Marimastat	0.035	0.012	0.227	0.145
Marimastat + TG2	0.032	0.019	0.320	0.191

**Tabla 3.8. Tiempo de persistencia, velocidad de persistencia y coeficiente de difusión**

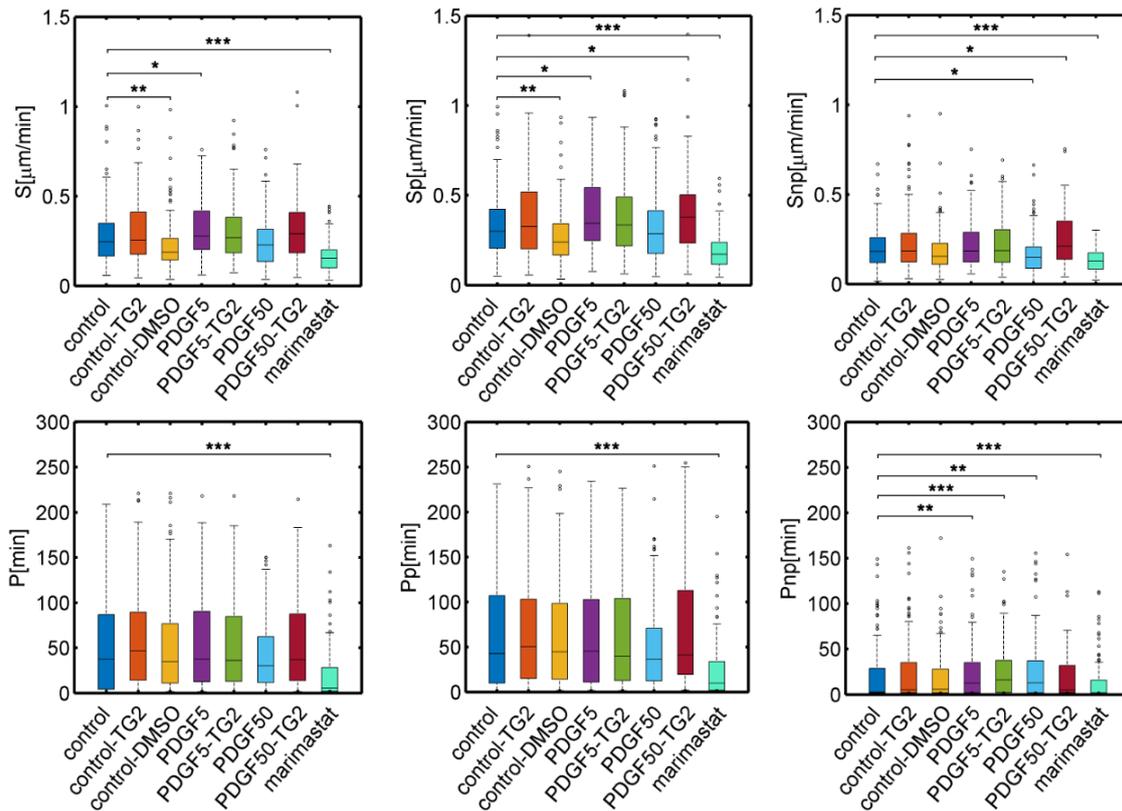
Valores medios del tiempo de persistencia (P), velocidad de persistencia (S) y coeficiente de difusión (D) ajustados con los modelos PRW y APRW. El ajuste APRW produce dos valores para cada parámetro, uno para el eje principal de migración celular (subíndice p) y otro para el eje secundario (subíndice np). El índice anisotrópico se obtiene como la ratio entre  $D_p$  y  $D_{np}$ .

	TIEMPO DE PERSISTENCIA (min)			VELOCIDAD DE PERSISTENCIA ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )			DIFUSIVIDAD ( $\mu\text{m}^2/\text{min}$ )				ÍNDICE DE ANISOTROPÍA
	PRW	APRW		PRW	APRW		PRW	APRW			APRW
CONDICIÓN HOB	P	$P_p$	$P_{np}$	S	$S_p$	$S_{np}$	D	$D_p$	$D_{np}$	$D_{total}$	$(D_p/D_{np})$
Control	37.16	42.56	2.41	0.24	0.29	0.18	0.84	0.78	0.03	0.93	13.21
Control + TG2	46.79	50.21	5.40	0.25	0.32	0.18	1.11	0.88	0.06	1.17	14.79
Control + DMSO	34.67	44.40	5.58	0.18	0.23	0.15	0.46	0.44	0.03	0.51	13.21
PDGF 5	37.36	45.27	12.38	0.27	0.34	0.18	0.87	0.79	0.08	0.95	11.08
PDGF 5 + TG2	36.23	39.31	16.24	0.26	0.33	0.18	1.04	0.94	0.09	1.11	9.55
PDGF 50	30.03	36.15	12.80	0.22	0.28	0.14	0.55	0.52	0.04	0.58	11.20
PDGF 50 + TG2	36.77	41.05	4.86	0.28	0.37	0.21	1.20	1.24	0.07	1.32	13.82
Marimastat	5.55	9.85	1.85	0.15	0.17	0.12	0.06	0.05	0.01	0.06	4.60
Marimastat + TG2	24.08	30.10	3.05	0.11	0.13	0.09	0.10	0.08	0.01	0.11	7.29



**Figura 3.48. Coeficiente de difusión**

Coeficiente de difusión obtenido al ajustar un modelo PRW (D) y un modelo APRW ( $D_p$  y  $D_{np}$ ).  $D_{total}$  es la suma de  $D_p$  y  $D_{np}$  y tiene el mismo significado de D en el modelo PRW. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .



**Figura 3.49. Velocidades de persistencia**

Primera fila: velocidades de persistencia obtenidas ajustando un modelo PRW (S) y un modelo APRW ( $S_p$  y  $S_{np}$ ). Segunda fila: tiempos de persistencia obtenidos ajustando un modelo PRW (P) y un modelo APRW ( $P_p$  y  $P_{np}$ ). \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 3.2.6. Discusión y conclusiones

En este trabajo, se cuantifica, por primera vez, la migración de los osteoblastos en 3D. Para recrear fisiológicamente la migración 3D de osteoblastos, el uso de hidrogel biomiméticos es fundamental. El cultivo de osteoblastos usando hidrogel de colágeno tipo I, principal componente de la matriz ósea, fue descrito por primera vez por Elsdale y Bard [273]. Los osteoblastos en estas condiciones de cultivo mantienen su función, su estructura 3D y la interacción célula-célula [274]. De hecho, descubrieron que los osteoblastos migraban hacia el hidrogel, extendiendo las protuberancias dendríticas hacia las células vecinas, y sintetizaron fibras de colágeno, mineralizando a su alrededor.

La mayoría de los experimentos *in vitro* de migración de osteoblastos se desarrollan con células de diferente origen animal, por ejemplo, osteoblastos

neonatales de rata [275] o líneas celulares osteoblásticas murinas [274], [276]. Sin embargo, no hay muchos trabajos *in vitro* de migración 3D con osteoblastos humanos. De hecho, según los datos obtenidos en la literatura, el trabajo más relevante corresponde al de Robin y col. [277] que estudió la migración 3D inducida por apatita. En este sentido, las células podrían reaccionar a otras señales como los factores químicos o la rigidez, por ejemplo, variando el número de protuberancias o ajustando la fuerza de las adhesiones, pero dependerían en última instancia de la microestructura y la geometría que tienen alrededor.

La respuesta migratoria de la población de osteoblastos a los quimioatrayentes se ha estudiado normalmente en determinados sustratos o superficies no porosas (por ejemplo, metales usados para aplicaciones ortopédicas y dentales) [275] o usando ensayos en la cámara de Boyden [278]. Sin embargo, ninguno de estos ensayos permite caracterizar de forma fidedigna la quimiotaxis celular en entornos 3D.

El presente estudio adapta los ensayos de migración de células tumorales bajo un gradiente químico [62], [279] para examinar la migración 3D de los osteoblastos. Diferentes tipos de factores de crecimiento han sido estudiados en la literatura para evaluar las propiedades quimiotácticas de los osteoblastos: TGF- $\beta$  es un quimioatrayente utilizado para estimular las células de osteosarcoma de rata [280] y osteoblastos humanos [281]; OP-1 es química y estructuralmente similar a la proteína morfogenética ósea-2, un quimioatrayente para los osteoblastos humanos [281]; factores de crecimiento tipo insulina (IGF-1 e IGF-2) también estimulan la migración dirigida de osteoblastos [281]. Robin y col. [277] demostraron que la presencia de apatita ósea promueve la migración de osteoblastos, posiblemente a través de la liberación de iones y/o mediada por la rugosidad de la apatita o la alteración de las propiedades mecánicas. El PDGF-BB es uno de los factores quimiotácticos más potentes para los osteoblastos primarios y las líneas celulares osteoblásticas en la migración de células 2D [281]–[284]. De hecho, el PDGF se ha utilizado como tratamiento para mejorar la curación de fracturas óseas en etapas preclínicas y clínicas [278], [285].

Los experimentos se llevaron a cabo con el factor químico PDGF-BB y la respuesta que se obtuvo con respecto al efecto del gradiente químico, fue que el PDGF-BB presenta un bajo potencial quimioatrayente para los osteoblastos en comparación, por ejemplo, con su efecto sobre los fibroblastos [208]. De hecho, incluso altas

concentraciones de PDGF-BB no dieron como resultado una migración mucho más rápida ni direccional de los osteoblastos en comparación con las condiciones control, aunque esto también puede ser debido a que cuando la concentración de quimioatrayente que rodea la célula alcanza un punto de saturación, las células comienzan a perder la capacidad de detectar las señales químicas [79]. Los resultados obtenidos podrían indicar que el PDGF-BB es más relevante en los procesos de curación de heridas que en los de curación ósea, aunque se debe tener en cuenta que los entornos fisiológicos están sujetos a muchos otros factores que no se han incluido en este modelo experimental.

Además, se ha observado que la modificación de la arquitectura de la matriz, por ejemplo, entrecruzando las fibras, induce un comportamiento celular diferente, mejorando la unión celular de los osteoblastos humanos (HOB) [271], [286]. Mullen y col. [287] investigaron el efecto del entrecruzamiento de colágeno (con glutaraldehído) junto con el grosor del sustrato en el comportamiento celular osteogénico en 2D, encontrando que las células MC3T3 que se cultivan en un sustrato fibroso blando alcanzan la misma área diseminada que las cultivadas en un módulo mayor, pero con sustrato no fibroso.

También se ha comprobado que la orientación de la fibra de la matriz extracelular guía la motilidad celular [270], independientemente de las diferentes variaciones de tamaño de poro y densidad de la matriz. De hecho, varios trabajos experimentales determinaron recientemente que las células lideran su migración en respuesta a señales físicas coordinadas de la MEC, siendo la alineación de las fibras de la matriz 3D uno de los factores más relevantes [270], [288], [289]. Sin embargo, otros factores como la porosidad y la rigidez de la red deberían explorarse más a fondo para dilucidar los roles específicos en la capacidad de migración celular.

Es importante destacar que el núcleo tiene un papel importante durante la migración, tanto el cuerpo celular como el núcleo deben deformarse para permitir el paso de la célula a través de los espacios confinados en 3D, y la deformabilidad del núcleo relativamente rígido puede constituir un paso limitante. El movimiento del núcleo debe coordinarse con la dinámica citoesquelética en los bordes anterior y posterior, que a su vez influyen en la dinámica citoplasmática que afecta a la eficiencia de la migración. Este hecho implica que las alteraciones en la estructura nuclear pueden

facilitar las reorganizaciones celulares que son necesarias para una migración eficiente. [290].

En los experimentos llevados a cabo, al comparar el efecto del entrecruzamiento del colágeno, se observan pequeñas diferencias significativas, especialmente con respecto a velocidades y direccionalidad, cuando la red de colágeno se entrecruza con TG2. Wu y col. [291] sugieren que la migración en 3D no sigue un recorrido puramente aleatorio (PRW) como ocurre en cultivos 2D, y, por lo tanto, que los modelos de camino aleatorio persistente y anisotrópico (APRW) deben utilizarse cuando se trata de este tipo de estudios. Como ya se ha comentado anteriormente, aunque el movimiento general de todas las células en conjunto parece aleatorio, cada célula específica se mueve preferiblemente en una cierta dirección, probablemente guiada por la microestructura tridimensional que la rodea. Por lo tanto, los cambios importantes en esta microestructura serían críticos para determinar la migración. Principalmente, este efecto aparece porque la migración celular en matrices 3D requiere mecanismos de generación de fuerza, adhesión de la matriz celular y vías de señalización que son distintas de las requeridas para la migración 2D [234] como la contractilidad de la actomiosina o las adhesiones focales. Esta contractilidad celular induce tensiones significativas en la matriz de colágeno, la cual se deforma reorientando las fibras y alineándolas a lo largo de la dirección de estiramiento [292]. Las mayores deformaciones de la matriz de colágeno se encuentran localizadas en las proteínas de las adhesiones focales (vinculina y actina), las cuales desempeñan un papel crítico en las células dentro de la MEC como punto de adhesión, tracción y migración [293].

Además, la migración de células en 3D se encuentra estrechamente asociada con la expresión de metaloproteasas (MMPs), y por ello se estudió la influencia de marimastat, un inhibidor de las metaloproteasas de amplio espectro, que conduce a cambios drásticos en la motilidad celular, disminuyendo significativamente las velocidades, la difusividad y la direccionalidad. Este efecto presente en ambos tipos de hidrogeles (con y sin TG2), sugieren que la degradación de la matriz juega el papel más importante entre todos los factores estudiados. Esto concuerda con los hallazgos de Ehrbar y col. [276], que utilizaron matrices basadas en polietilenglicol con diferentes concentraciones y concluyeron que un modo de migración no proteolítica domina a concentraciones relativamente bajas y la migración proteolítica a concentraciones más

altas. En su trabajo, los autores observaron velocidades de migración de 0.6  $\mu\text{m}/\text{min}$  (en matrices no degradables) y 0.9  $\mu\text{m}/\text{min}$  (en matrices degradables) a concentraciones de hidrogel más bajas, debido a las porosidades más grandes de estos hidrogeles. Sin embargo, a concentraciones más altas (2.5%) obtuvieron velocidades de migración del mismo orden que en los experimentos llevados a cabo en este trabajo (alrededor de 0.1  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), sugiriendo de nuevo que el modo de migración de osteoblastos se define predominantemente por proteólisis, en condiciones fisiológicas en 3D, en los hidrogeles de colágeno.

Finalmente, es importante remarcar que los hidrogeles utilizados en este trabajo presentan una baja concentración de colágeno (4 mg/ml), porque se enfocan en recrear el tejido de granulación, que se define como un tejido blando no mineralizado, que aparece durante el proceso de curación del hueso [294] y donde el proceso migratorio se produce rápidamente debido a la necesidad de recuperar la estabilidad mecánica de la brecha de fractura lo antes posible. De hecho, unas pocas horas después de la fractura, las células sanguíneas extravasculares forman un coágulo de sangre, conocido como hematoma. Después de varios días, cuando este hematoma y la posterior reacción inflamatoria aguda se eliminan, se reemplazan por tejido de granulación con una neovascularización en desarrollo embebida en una matriz de colágeno extracelular no organizada [295]. Este tejido de granulación proporciona soporte mecánico a los osteoblastos y a las células mesenquimales proliferativas para permitir su migración, reduciendo la tensión en el sitio de la fractura y favoreciendo la fase reparadora [296]. Ciertamente, los patrones migratorios podrían verse fuertemente alterados mediante el uso de matrices más rígidas con una mayor concentración de colágeno (por ejemplo, 40 mg/ml) o mediante la inclusión de apatita ósea en la matriz [277]. Los hidrogeles que se usan en este trabajo, sin embargo, con una concentración mucho menor de colágeno, exhiben grandes espacios interfibrilares que pueden degradarse fácilmente por las proteasas y, por lo tanto, facilitan la motilidad celular. En cualquier caso, las propiedades mecánicas medidas en matrices de colágeno densas puras (15 kPa) son cercanas a las reportadas para el tejido osteoide (aproximadamente 25 kPa) [297] y, por lo tanto, permiten recrear la invasión del osteoblasto al osteoide, que es más habitual en los fenómenos de remodelación ósea [274], [277].

Para concluir, este método para recrear el microambiente de curación ósea, junto con nuestro trabajo de procesamiento y cuantificación de imágenes, presenta una herramienta prometedora para analizar el efecto de diferentes condiciones biofísicas y bioquímicas en la migración de células osteoblásticas *in vitro*. La microfluídica permite salvar la brecha existente entre los cultivos 2D y los modelos animales al recrear algunas de las características complejas del microentorno *in vivo* [205]. Comprender cómo las condiciones ambientales pueden regular la migración direccional de los osteoblastos es de gran importancia para las terapias óseas en el tratamiento de la osteoporosis o en el desarrollo de nuevas estrategias de ingeniería de tejidos óseos. Dado que estos chips microfluídicos constituyen una herramienta flexible que ofrece ventajas más allá de las ofrecidas por los sistemas de cultivo existentes en ingeniería de tejidos, estos sistemas microfisiológicos podrían crearse utilizando una combinación de diferentes materiales, factores solubles o cocultivos celulares específicos, permitiendo así las pruebas *in vitro* de diferentes estrategias en ingeniería de tejidos.

### **3.3. La degradación de la matriz regula la dinámica de las protrusiones de los osteoblastos y su migración individual**

Las células en entornos 3D detectan su entorno y su cultivo 3D permite recrear condiciones más realistas que los cultivos celulares en 2D, al proporcionar diferentes estímulos físicos y químicos a las células. Por ejemplo, se ha demostrado que el citoesqueleto celular adquiere una morfología diferente dependiendo de la disponibilidad de adhesión que proporciona la matriz [298], [299]. Las células, en este microentorno desarrollan diferentes estructuras adherentes [300], [301]. Los cultivos celulares tradicionales en 2D han estudiado ampliamente cómo las células emiten filopodios y lamelipodios y su papel principal en procesos celulares como la adaptación mecánica y la migración [130], [302]. Sin embargo, las células *in vivo* generalmente están integradas en matrices tridimensionales que les permiten moverse libremente en todas las direcciones y desarrollar adherencias más complejas en comparación con las observadas en cultivos de células 2D [303]–[305]. Los mecanismos que regulan la creación y evolución de estas estructuras en entornos 2D y 3D han sido objeto de una extensa investigación [270], [306]. Aung y col. [307] encontraron que las células en 3D cambian de un modo de invasión no dependiente de proteasas a un modo dependiente de proteasas cuando la tensión ejercida por las células al comprimirse está por encima de un umbral específico. Por consiguiente, las células cambian las vesículas por estructuras similares a los invadopodios. Estas estructuras se utilizan para clasificar la migración como ameboide o mesenquimal. Las protrusiones son unas de las estructuras que utilizan las células para detectar su entorno adyacente de forma exploratoria, así como para comunicarse con otras células. Estas estructuras se ven afectadas por las condiciones mecánicas y químicas del microentorno, lo que condiciona la migración celular. En particular, los osteoblastos embebidos dentro de una matriz 3D, tienden a originar un gran número de protrusiones en comparación con otro tipo de células.

En este trabajo se ha estudiado el papel que desempeñan las propiedades mecanoquímicas de la matriz extracelular en la dinámica de estas protrusiones, específicamente sobre cómo regulan el tamaño y la cantidad de protrusiones que emiten en distintas concentraciones de colágeno. Además, se ha determinado cómo la dinámica de las protrusiones puede dirigir el movimiento 3D de los osteoblastos. Se

investigó cómo la combinación de la modificación de la arquitectura de la matriz y la degradación de la matriz regula la migración de las células individuales, al alterar la red de la matriz extracelular, a través de la reticulación con la enzima TG2 y al inhibir la degradación de la matriz extracelular que induce el inhibidor de metaloproteasas (marimastat). También, se analizó la dinámica de las protrusiones de las células tratadas con el inhibidor de la polimerización de actina (CK-636) y con el inhibidor de la actividad ATPasa de la miosina II (blebistatina). Por otro lado, se analizó el efecto del tratamiento con fibronectina que une eficientemente el colágeno con integrinas, dando lugar a la regulación y migración celular, ensamblaje de la matriz y a la organización del citoesqueleto [308], [309]. Finalmente, para explorar cómo estos factores podrían modificar el proceso de migración basado en protrusiones 3D, la Dra. Clara Valero (investigadora del grupo M2BE), desarrolló un nuevo modelo computacional que combina señales mecánicas y químicas simulando así las condiciones experimentales estudiadas en este trabajo [310].

Para llevar a cabo el análisis de las protrusiones emitidas por los osteoblastos se ha desarrollado un software semiautomático para cuantificar con precisión el número, el tamaño y la evolución de las protrusiones de los osteoblastos HOB.

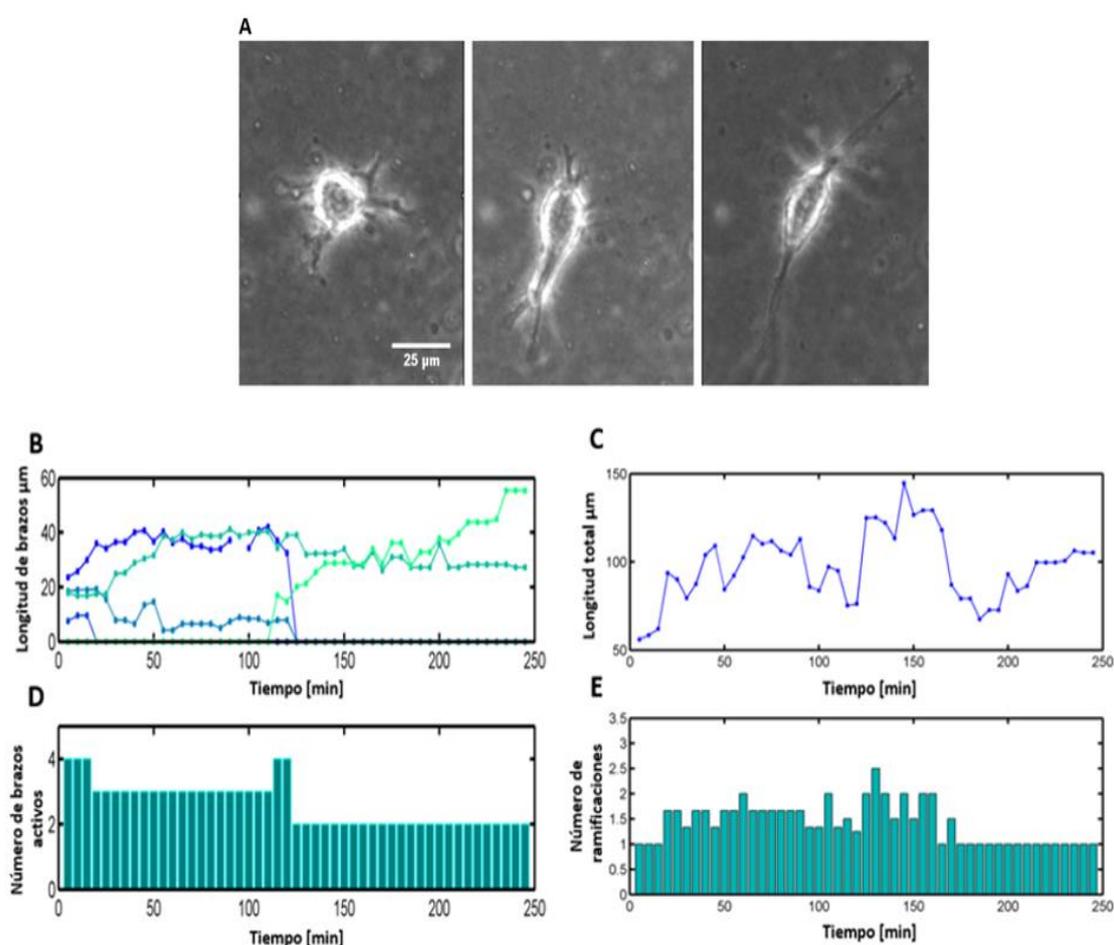
Los parámetros analizados para cada célula fueron: la longitud total (suma) de los brazos y sus ramificaciones, la longitud máxima alcanzada por cada brazo, el número de brazos activos y el número de ramificaciones. Se capturaron 49 imágenes cada 5  $\mu\text{m}$  a intervalos de 5 min durante 4 h, comenzando inmediatamente después de la polimerización de la matriz de colágeno, obteniendo así un stack 3D a lo largo del tiempo. La explicación de la adquisición de las imágenes, así como de la obtención de los distintos parámetros mencionados se detalla en el apartado 2.13 de material y métodos.

El análisis de las distintas condiciones analizadas en este trabajo se llevó a cabo primero, describiendo un ejemplo de cada condición, y posteriormente se compararon entre sí.

En la primera parte de este trabajo, se estudiaron cuatro escenarios diferentes a partir de un hidrogel de colágeno de 4 mg/ml (control), entrecruzado con 25  $\mu\text{g/ml}$  de TG2, y con la introducción del inhibidor marimastat a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  (con y sin TG2).

### 3.3.1. Análisis de la dinámica de protrusiones en hidrogeles de 4 mg/ml de colágeno

El primer análisis llevado a cabo de un osteoblasto HOB en un hidrogel de 4 mg/ml con los parámetros mencionados anteriormente se muestra en la Figura 3.50. La Figura 3.50A muestra las imágenes del osteoblasto al inicio, en un estado intermedio y al final del seguimiento de las protrusiones. La mediana de los valores de la longitud de los brazos fue de  $28.94 \mu\text{m}$  (Figura 3.50B) y la longitud total máxima alcanzada,  $144.75 \mu\text{m}$  (Figura 3.50C). El número de brazos activos osciló entre 2 y 4 a lo largo de las 4 h de seguimiento de la célula (Figura 3.50D) y el número de ramificaciones por brazo estuvo entre 1 y 2.5 (Figura 3.50E).



**Figura 3.50. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno**

Protrusiones observadas en un osteoblasto durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial (izquierda), intermedio (central) y final (derecha) del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa  $25 \mu\text{m}$ ), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

### 3.3.2. Efecto del entrecruzante TG2 en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml

La adición del entrecruzante TG2 no favoreció un mayor número de protrusiones en el osteoblasto ni más ramificaciones, tal y como se puede ver en la Figura 3.51. La Figura 3.51A muestra la célula, a distintos tiempos. La longitud de los brazos es variable a lo largo del tiempo, siendo la mediana de los valores, 31.04  $\mu\text{m}$ , similar al control, (Figura 3.51B) y la longitud total máxima alcanzada fue de 183.2  $\mu\text{m}$  al cabo de 2 h desde la siembra, ligeramente mayor que el control, probablemente por la direccionalidad de las fibras (Figura 3.51C). El número de brazos activos osciló entre 2 y 5, a lo largo de las 4 h de seguimiento (Figura 3.51D) y el número de ramificaciones por brazo osciló entre 1 y 3 (Figura 3.51E).

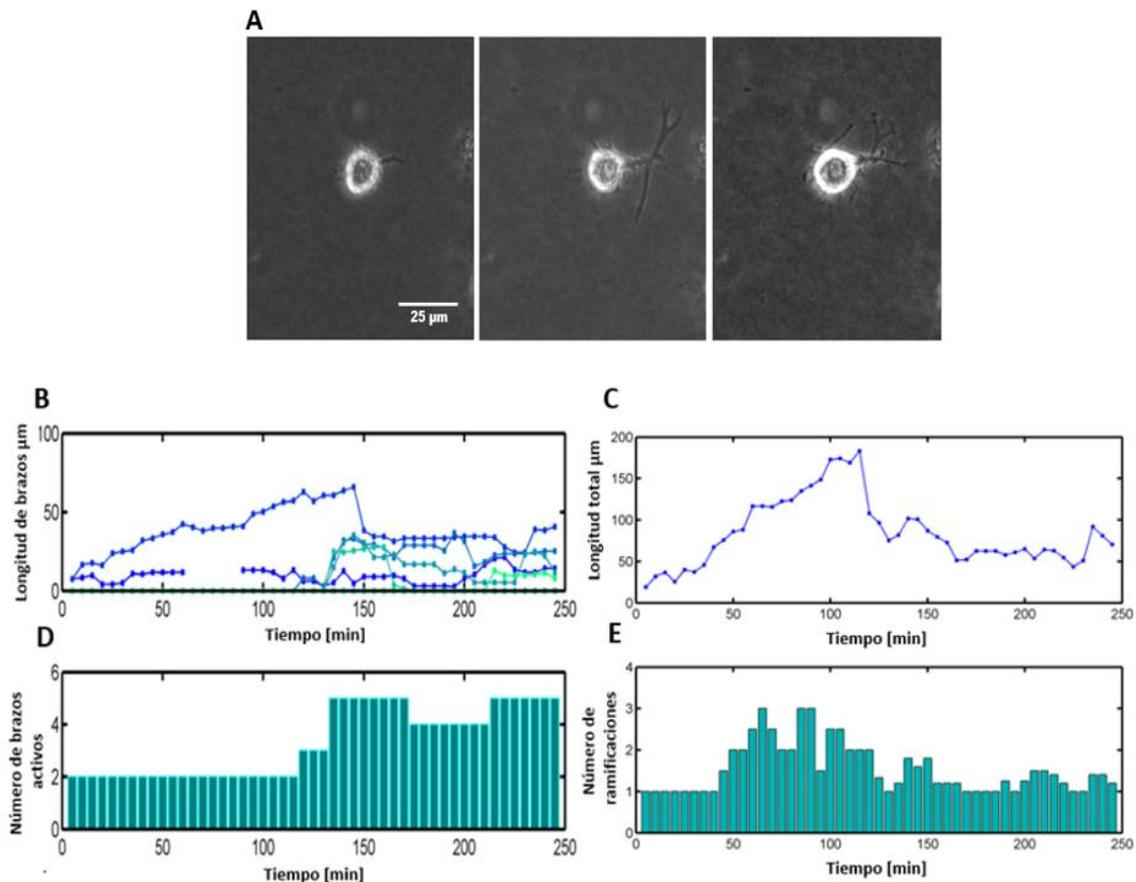


Figura 3.51. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno entrecruzado con TG2

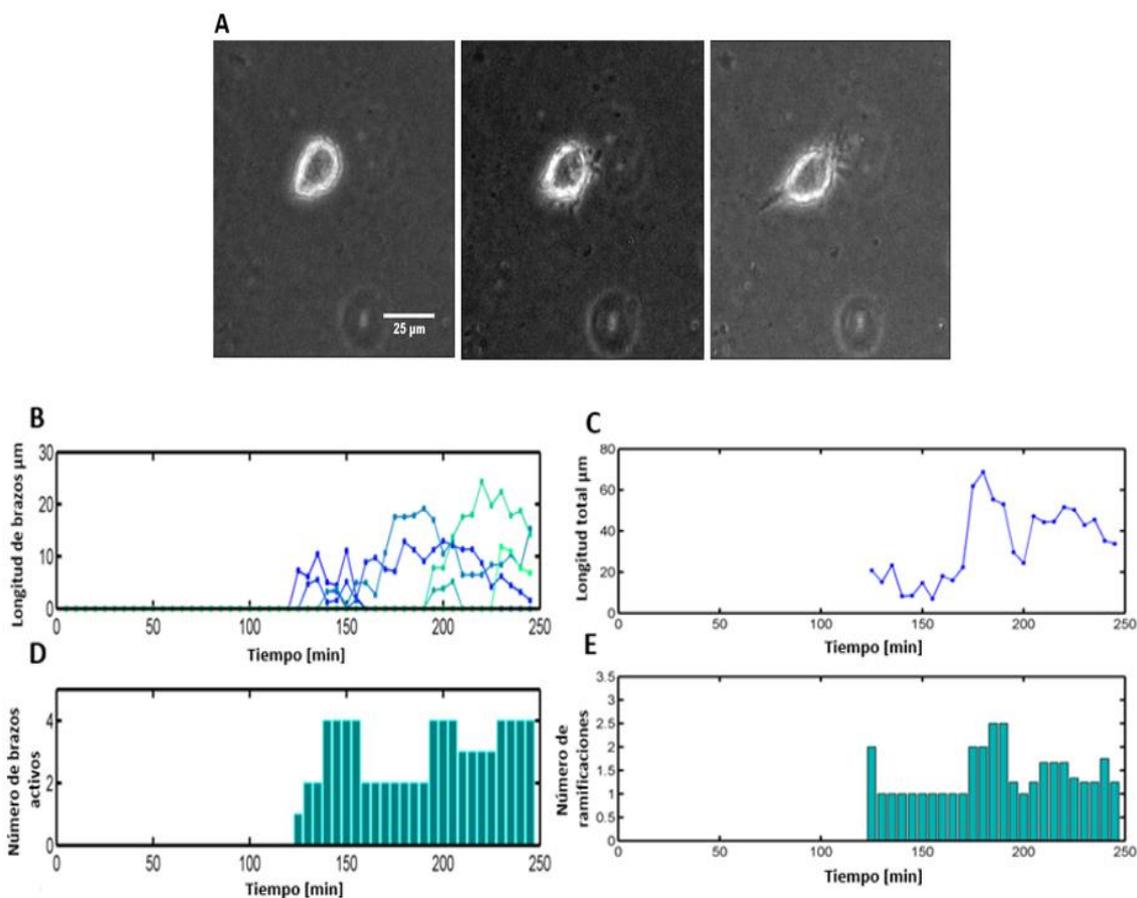
Se muestran imágenes de las protrusiones de la célula durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ ), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

### **3.3.3. Efecto del inhibidor marimastat en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml**

Las características de las protrusiones individuales emitidas por las células cuando la degradación está inhibida no se habían investigado previamente, según nuestro conocimiento, por lo que añadimos el inhibidor de las metaloproteasas de matriz, marimastat.

Das y col. [311] encontraron que la degradación de la matriz aumentó con la densidad de la MEC, asociada con una mayor actividad de ciertas metaloproteasas, promoviendo estructuras de invadopodios más dinámicas. La secreción de MMPs puede ser bloqueada naturalmente por inhibidores tisulares de metaloproteasas (ITMP) o por inhibidores de las metaloproteasas de matriz de amplio espectro artificial (MMPi) como marimastat [312].

Para estudiar el efecto del bloqueo de la degradación de la matriz se llevó a cabo su inhibición mediante la adición de marimastat a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Se observó un cambio en el tiempo de aparición de los brazos de la célula y en su capacidad invasiva respecto a la célula control (Figura 3.52). La Figura 3.52A muestra las imágenes del osteoblasto, a distintos tiempos, inhibido por marimastat. La mediana de los valores de la longitud de los brazos fue de 7.82  $\mu\text{m}$ , notablemente más bajo que el control (28.94  $\mu\text{m}$ ), y además empezaron a formarse a las 2 h desde la siembra (Figura 3.52B). La longitud total máxima llegó a ser de 68.68  $\mu\text{m}$  a las 3 h del recorrido (Figura 3.52C). El número de brazos activos osciló entre 2 y 4 (Figura 3.52D) y el número de ramificaciones por brazo estuvo entre 1 y 2.5 (Figura 3.52E).

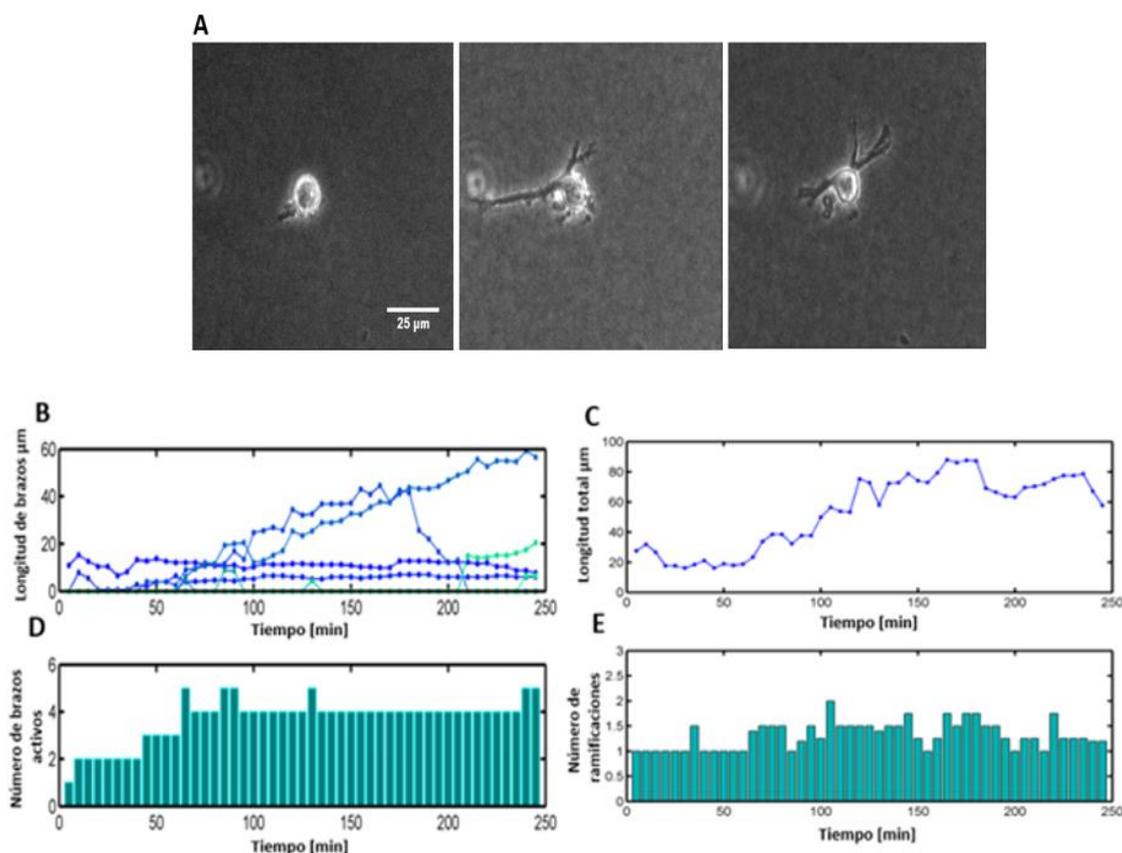


**Figura 3.52. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con marimastat**

Se muestran las protrusiones observadas de la célula durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25 µm), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

### 3.3.4. Efecto combinado del entrecruzante TG2 y la inhibición de la degradación en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml

La combinación del agente entrecruzante TG2 y el inhibidor de las metaloproteasas facilitó la aparición de brazos desde el principio, pero los resultados se vieron afectados por la presencia del inhibidor marimastat (Figura 3.53). La Figura 3.53A muestra las imágenes del osteoblasto al inicio, tiempo intermedio y final del experimento. La mediana de los valores de la longitud de los brazos fue de 12.71 µm (Figura 3.53B) y la longitud total alcanzó un máximo de 87.84 µm a las 3 h desde la siembra (Figura 3.53C). El número de brazos activos osciló entre 2 y 5 (Figura 3.53D) y el número de ramificaciones por brazo estuvo entre 1 y 2 (Figura 3.53E), similar a las condiciones anteriores.



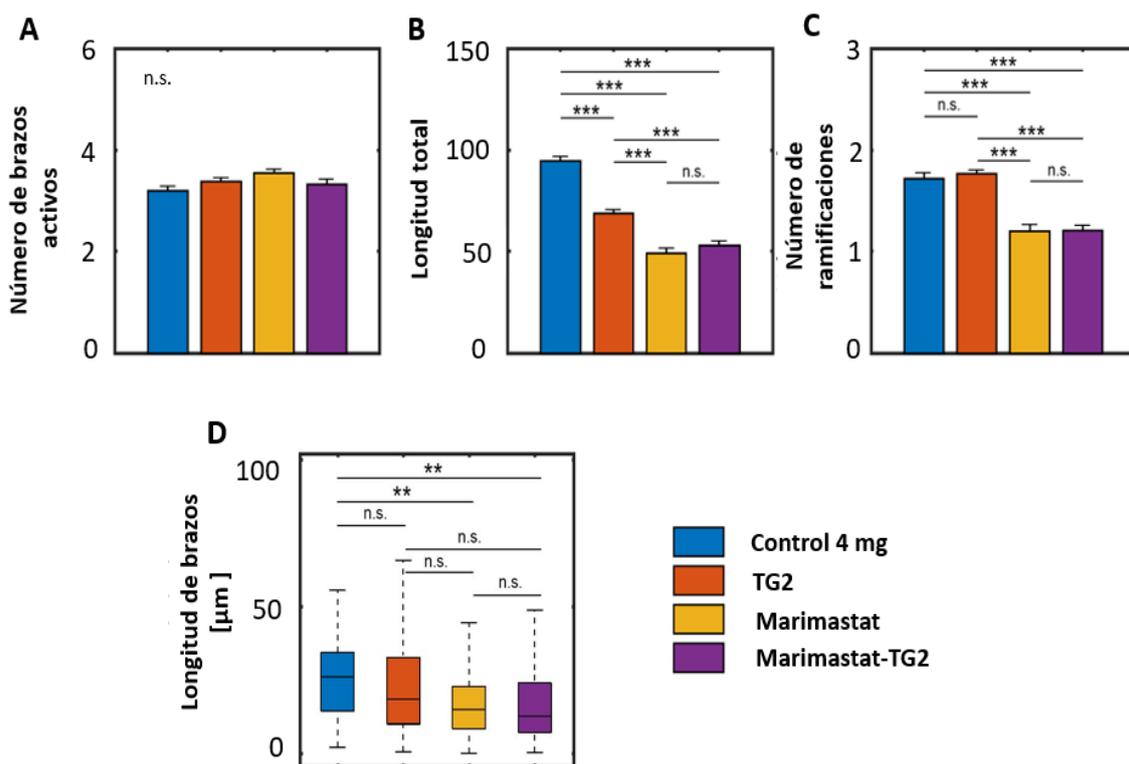
**Figura 3.53.** Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con TG2 y marimastat

Protrusiones observadas de la célula durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ ), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

### 3.3.5. Análisis del entrecruzante TG2 y del inhibidor marimastat en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml

El análisis de las distintas condiciones analizadas anteriormente con cinco células se puede ver en la Figura 3.54. El número de brazos activos osciló entre 2 y 5 para cada una de las condiciones analizadas, no encontrándose diferencias significativas entre distintas condiciones (Figura 3.54A). Sin embargo, la mediana de los valores de la longitud total de los brazos (incluidas las ramificaciones secundarias) de las células cultivadas en matrices tratadas con TG2 y marimastat (49.08  $\mu\text{m}$ ) fue significativamente más baja que el control (90.04  $\mu\text{m}$ ), seguida del caso con TG2 (58.95  $\mu\text{m}$ ) (Figura 3.54B), lo que coincidió con el hecho de que las protrusiones en estos casos tienden a presentar más ramificaciones en comparación con los casos que incluyen marimastat, cuya mediana de los valores de longitud total fue de 45.42 y 49.08  $\mu\text{m}$ , sin y con TG2,

respectivamente (Figura 3.54C). Por otro lado, la longitud real del brazo (entendida como el recorrido máximo desde el perímetro del cuerpo celular hasta las puntas de la protrusión) se vio ligeramente afectada por la adición de TG2 (mediana de 26.25  $\mu\text{m}$  en control frente a 19.02  $\mu\text{m}$  con TG2), aunque el efecto más significativo se observó al agregar marimastat respecto al control (15.26 y 12.96  $\mu\text{m}$ , sin y con TG2, respectivamente) (Figura 3.54D).



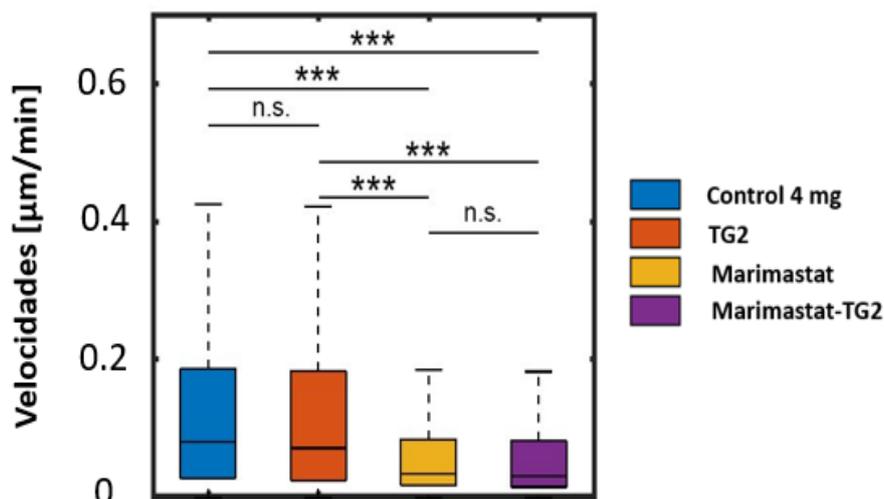
**Figura 3.54. Cuantificación de las protrusiones en 4 mg, con TG2, marimastat y TG2 con marimastat**

Protrusiones observadas en las células seleccionadas durante 4 h en las condiciones mencionadas. (A) Número de brazos activos, (B) longitud total, (C) número de ramificaciones por brazo y (D) longitud de brazos. La Figura 2.8 muestra una aclaración de la medición y la Tabla 2.3 presenta información adicional de todos los experimentos en los apartados 2.14 y 2.3.2 en material y métodos, respectivamente. ANOVA seguido de pruebas post-hoc de Tukey-Kramer se utilizaron para determinar la significación estadística. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$  y n.s. (no significativo). Las barras de error en (A), (B), (C) representan el error estándar. Se realizaron entre dos y cuatro experimentos independientes, de los cuales se analizaron cinco células en cada condición (49 imágenes por célula) durante 4 h.

### 3.3.6. Efecto del entrecruzante TG2 y de la inhibición de protrusiones en la velocidad de migración de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml

La velocidad de migración de las células, en las condiciones analizadas anteriormente, no se vio afectada por la única adición de TG2 (la mediana de los valores

fue de 0.08  $\mu\text{m}/\text{min}$  en control frente a 0.07  $\mu\text{m}/\text{min}$  con TG2), pero disminuyó significativamente en presencia de marimastat (la mediana de los valores fue de 0.035 y 0.032  $\mu\text{m}/\text{min}$  para marimastat con/sin TG2, respectivamente) (Figura 3.55).



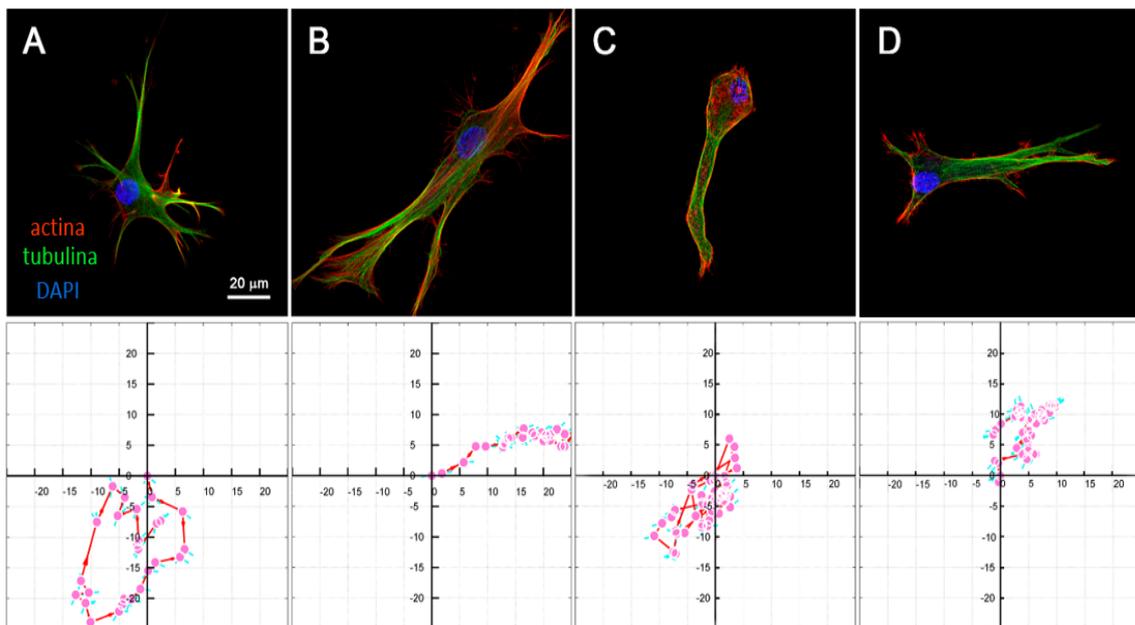
**Figura 3.55. Cuantificación de la velocidad de los osteoblastos**

Velocidad media de las células analizadas en diferentes condiciones. ANOVA seguido de pruebas post-hoc de Tukey-Kramer se utilizaron para determinar la significación estadística. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

### 3.3.7. Análisis de la organización del citoesqueleto, forma y trayectorias de las protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml

En la Figura 3.56, se puede visualizar la organización del citoesqueleto de las protrusiones de osteoblastos en las condiciones anteriormente analizadas, distinguiendo claramente entre microtúbulos de tubulina (verde) y filamentos de actina (rojo). En esta figura, también se pueden ver las diferencias encontradas en los hidrogeles de colágeno, donde hubo aproximadamente la misma cantidad de protrusiones en hidrogeles sin entrecruzar que entrecruzados con TG2, con la diferencia de que algunas eran más finas y otras eran más largas, probablemente debido a la alineación de las fibras. El tratamiento con marimastat bloqueó la capacidad de degradación de los osteoblastos y los llevó a emitir protrusiones más pequeñas, aunque en este caso particular, mostrado en la Figura 3.56C, existe una gran protrusión principal. Cuando se añade TG2 con marimastat, las células aumentaron el número de ramificaciones, pero son más pequeñas y finas debido al entrecruzamiento de la matriz y la inhibición de la degradación. En el panel inferior de la Figura 3.56 se representan las

trayectorias relativas al desplazamiento de la célula en las mismas condiciones mencionadas anteriormente (en rojo), así como la posición de las protrusiones en cada momento (en cian). Se puede apreciar que la trayectoria del osteoblasto en hidrogeles entrecruzados con TG2 fue más dirigida que en el control y el osteoblasto en presencia de marimastat sin y con TG2 recorrió una distancia menor y menos dirigida. Las distancias efectivas alcanzadas en el control, con TG2, con marimastat y con marimastat + TG2 fueron de 2.3, 25.46, 1.91 y 7.2  $\mu\text{m}$  horizontalmente y 7.3, 6.99, 3.08 y 1.7  $\mu\text{m}$  verticalmente, respectivamente.



**Figura 3.56. Tinción del núcleo, actina y tubulina en osteoblastos en distintas condiciones**

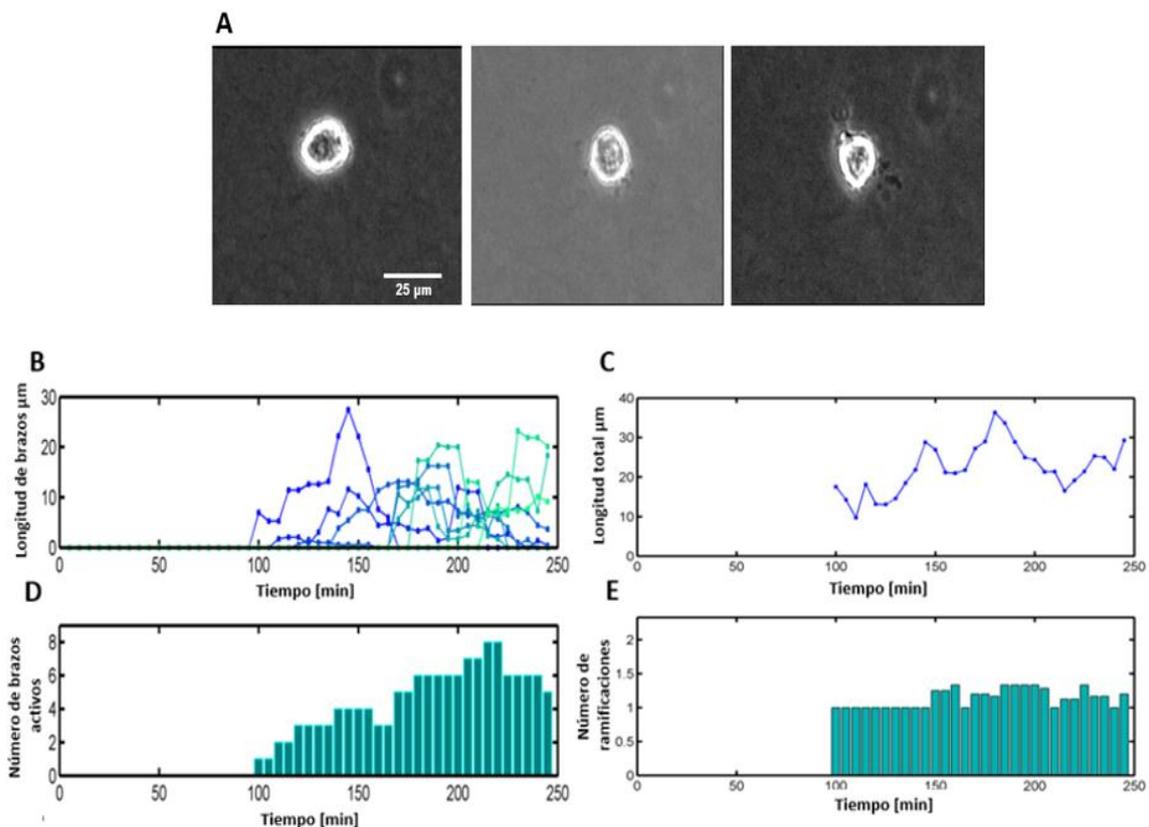
El panel superior superior de la figura muestra la tinción del núcleo con DAPI (ADN nuclear) (azul), actina (rojo) y tubulina (verde) en las células HOB control y sus trayectorias relativas de desplazamiento celular (A), células tratadas con TG2 (B), células tratadas con marimastat (C) y células tratadas con marimastat + TG2 (D) embebidas en una matriz de colágeno 3D. La barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ . El panel inferior de la figura muestra ejemplos de trayectorias de migración de cada condición (líneas rojas) donde los círculos rosados representan el centroide celular y las líneas azules son las ramas activas en cada paso temporal en sus direcciones correspondientes. Los ejes están en micrómetros. Nota: la longitud de los brazos celulares no está representada a escala.

En la segunda parte de este trabajo, se analizó la dinámica de protrusiones de los osteoblastos HOB en hidrogeles de 4 mg/ml de colágeno tratados con inhibidores de actina y miosina II, así como el efecto del tratamiento de los hidrogeles de colágeno con fibronectina para favorecer la estimulación de la formación de protrusiones.

### 3.3.8. Efecto de la inhibición del complejo Arp2/3 en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml

La inhibición del complejo Arp2/3, implicado en el control de la disposición de la actina en el frente celular y que induce la formación de las protrusiones en la dirección de la migración, se llevó a cabo con CK-636 a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

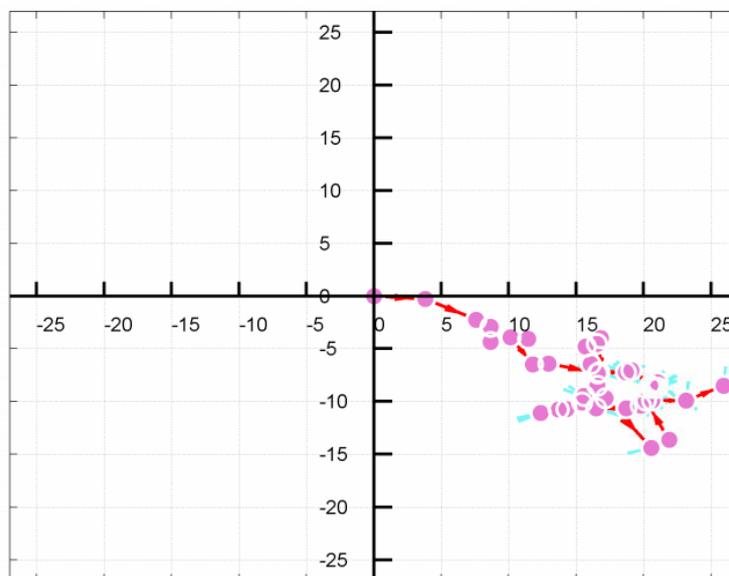
La Figura 3.57A muestra la formación de brazos de un osteoblasto en un hidrogel de 4 mg/ml de colágeno en presencia del inhibidor CK-636 a distintos tiempos. La formación y longitud de los brazos fue similar a la condición cuando se añadió el inhibidor marimastat, no empiezan a formarse hasta 1.5 h desde la siembra. La mediana de los valores de la longitud de los brazos fue de 7.22  $\mu\text{m}$  (Figura 3.57B) y la longitud total máxima que llegó a alcanzar fue de 36.35  $\mu\text{m}$  al cabo de 2.5 h desde la siembra (Figura 3.57C). El número de brazos activos osciló entre 2 y 8 (Figura 3.57D) y el número de ramificaciones de cada brazo alcanzó un máximo de 1.33 (Figura 3.57E).



**Figura 3.57. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con CK-636**

Protrusiones observadas en un osteoblasto durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ ), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

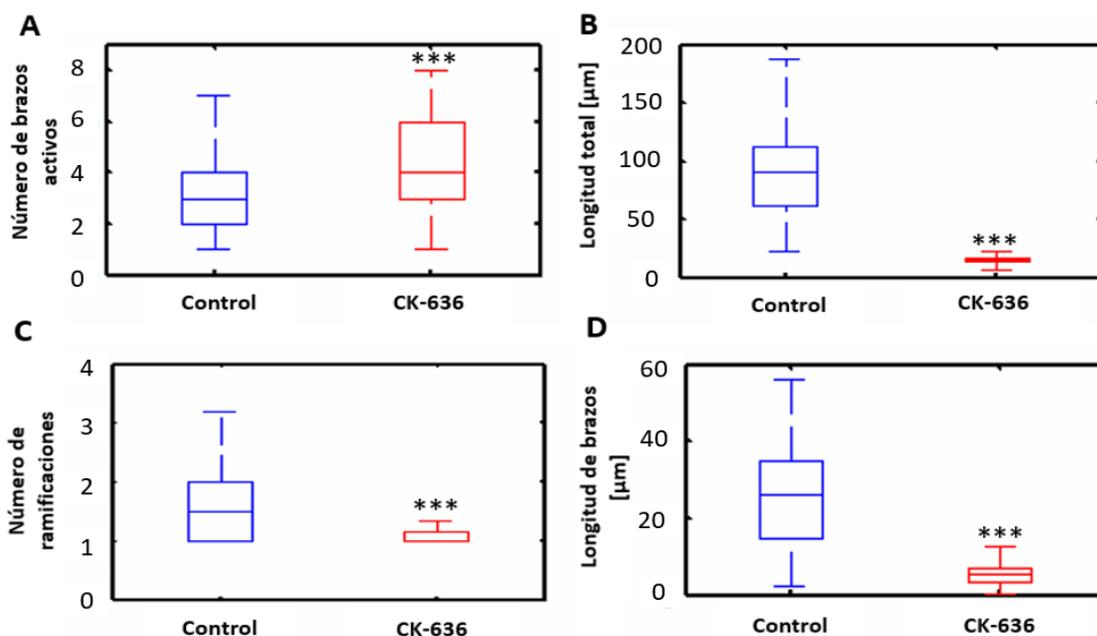
La Figura 3.58 representa un diagrama de la trayectoria seguida de un osteoblasto con el inhibidor de actina CK-636 donde se puede ver que la distancia efectiva alcanzada fue de 25.93  $\mu\text{m}$  horizontalmente y 8.50  $\mu\text{m}$  verticalmente.



**Figura 3.58. Trayectoria de migración de un osteoblasto con el inhibidor CK-636**

Diagrama de la trayectoria de migración de un osteoblasto en presencia del inhibidor CK-636 (líneas rojas) donde los círculos rosados representan el centroide de la célula y las líneas azules son las ramas activas en cada paso temporal en sus direcciones correspondientes. Los ejes están en micrómetros. Nota: la longitud de los brazos celulares no está representada a escala.

El análisis de las protrusiones emitidas por cinco células mostró una media de 4 brazos activos, sin encontrar diferencias respecto al control y a las demás condiciones analizadas (Figura 3.59A). Sin embargo, la mediana de los valores de la longitud total con CK-636 fue muy relevante con un valor de 15  $\mu\text{m}$  comparado con 90.04  $\mu\text{m}$  del control (Figura 3.59B), así como la mediana de los valores de la longitud real de los brazos con valores de 5.32  $\mu\text{m}$  (CK-636) y 26.25  $\mu\text{m}$  (control), respectivamente (Figura 3.59D). El número medio de ramificaciones por brazo fue de 1.14 (Figura 3.59C). Estos resultados indican que el complejo Arp2/3 implicado en la disposición de la actina tiene un efecto muy destacado en la formación de las protrusiones de los osteoblastos, ya que actúa claramente de forma inhibitoria.



**Figura 3.59. Cuantificación de las protrusiones con CK-636**

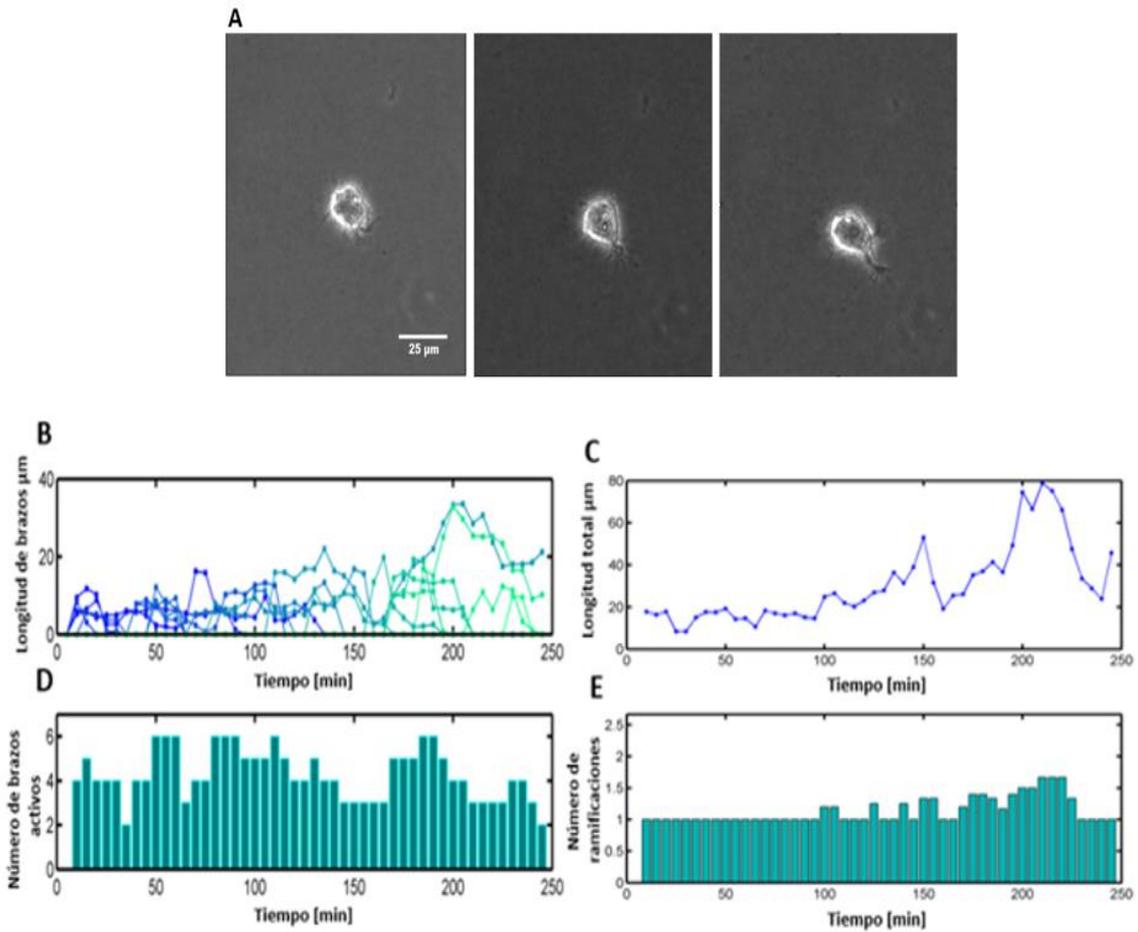
Se muestran las protrusiones emitidas por los osteoblastos durante 4 h. (A) Número de brazos activos, (B) longitud total, (C) número de ramificaciones por brazo y (D) longitud de brazos. Se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis para determinar la significación estadística. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ . Se realizaron dos experimentos independientes, de los cuales se analizaron cinco células durante 4 h (49 imágenes por célula).

### 3.3.9. Efecto de la blebistatina (inhibidor de miosina) en la formación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogel de colágeno de 4 mg/ml

La blebistatina es un potente inhibidor de la actividad ATPasa de la miosina II. Ésta se une al complejo miosina-ADP-Pi con alta afinidad e interfiere en el proceso de liberación del fosfato. Por lo tanto, la blebistatina bloquea la miosina quedando ésta con poca afinidad por la actina.

El efecto de la blebistatina en la formación de protrusiones de los osteoblastos se llevó a cabo a una concentración de 30  $\mu\text{M}$ .

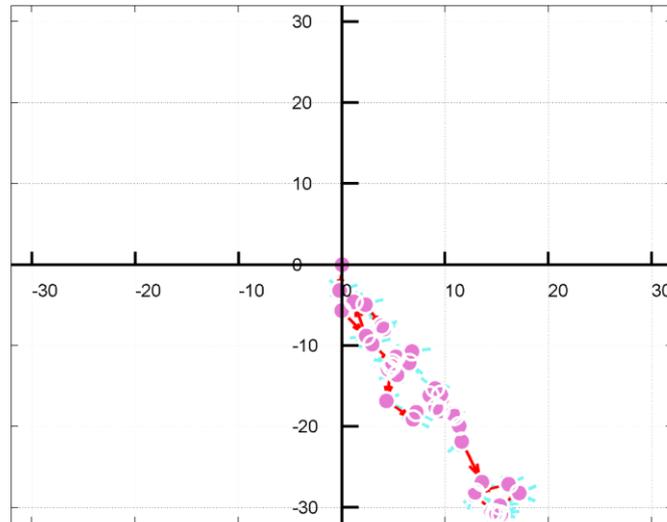
La Figura 3.60A muestra la formación de brazos de un osteoblasto en un hidrogel de 4 mg/ml de colágeno en presencia del inhibidor blebistatina a distintos tiempos. La mediana de los valores de la longitud de los brazos es de 7.64  $\mu\text{m}$  (Figura 3.60B) y la longitud total máxima que llegó a alcanzar es de 78.79  $\mu\text{m}$ , al cabo de 3.5 h desde la siembra (Figura 3.60C). El número de brazos activos osciló entre 2 y 6 (Figura 3.60D) y el número máximo de ramificaciones por brazo fue de 1.66 (Figura 3.60E).



**Figura 3.60. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno con blebistatina**

Se muestran las protrusiones observadas de una célula durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25 µm), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

La Figura 3.61 muestra el diagrama de la trayectoria seguida por el osteoblasto inhibido con blebistatina, donde se puede apreciar una trayectoria notablemente dirigida que alcanza una distancia efectiva de 15.37 µm horizontalmente y 30.89 µm verticalmente.

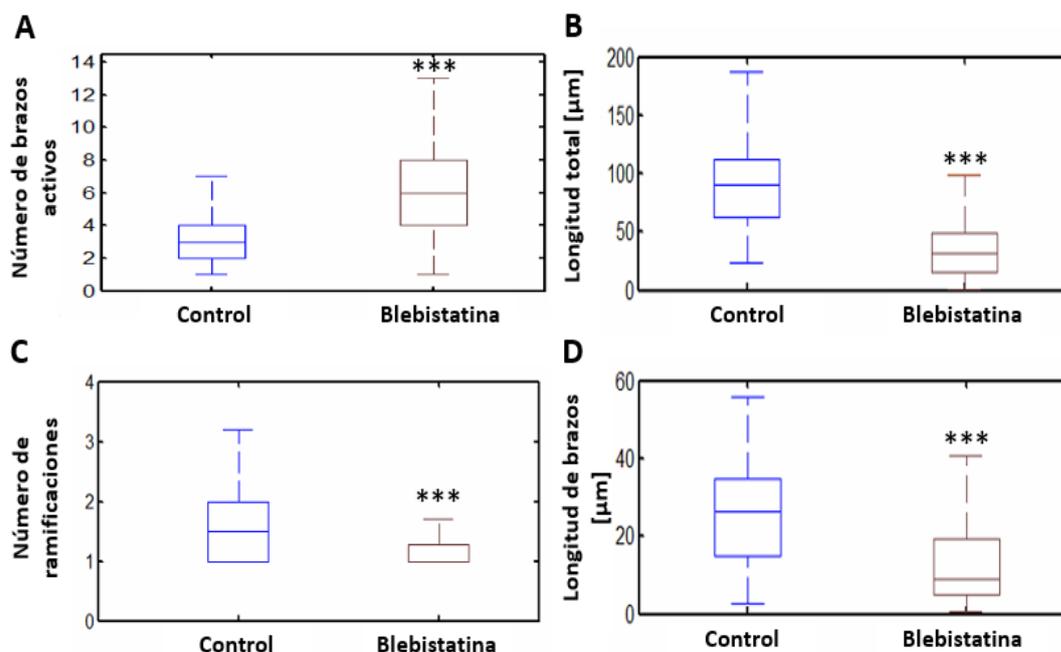


**Figura 3.61. Trayectoria de migración de un osteoblasto con el inhibidor blebistatina**

Diagrama de la trayectoria (líneas rojas) donde los círculos rosados representan el centroide celular y las líneas azules son las ramas activas en cada paso temporal en sus direcciones correspondientes. Los ejes están en micrómetros.

Nota: la longitud de los brazos celulares no está representada a escala.

El análisis de las protrusiones emitidas por cinco osteoblastos muestra en la Figura 3.62 el número de brazos activos, los cuales aumentaron con la adición de blebistatina, aproximadamente entre 4 y 8 comparado con el control que tenía entre 2 y 4 (Figura 3.62A). Sin embargo, la mediana de los valores de la longitud total con blebistatina fue menor que en el control (promedio de  $31.14 \mu\text{m}$  comparado con  $90.04 \mu\text{m}$  del control) (Figura 3.62B), al igual que el número de ramificaciones por brazo que fue en torno a 1.2 (Figura 3.62C). Por otro lado, la longitud real del brazo también disminuyó en presencia de blebistatina comparado con el control ( $9.11$  y  $26.25 \mu\text{m}$ , respectivamente) (Figura 3.62D). Estos resultados sugieren una implicación directa de la contractilidad de la miosina que influye tanto en el número de protrusiones emitidas, inhibiendo el crecimiento de los brazos, como en la generación de ramificaciones.



**Figura 3.62. Cuantificación de las protrusiones con el inhibidor de miosina blebistatina**

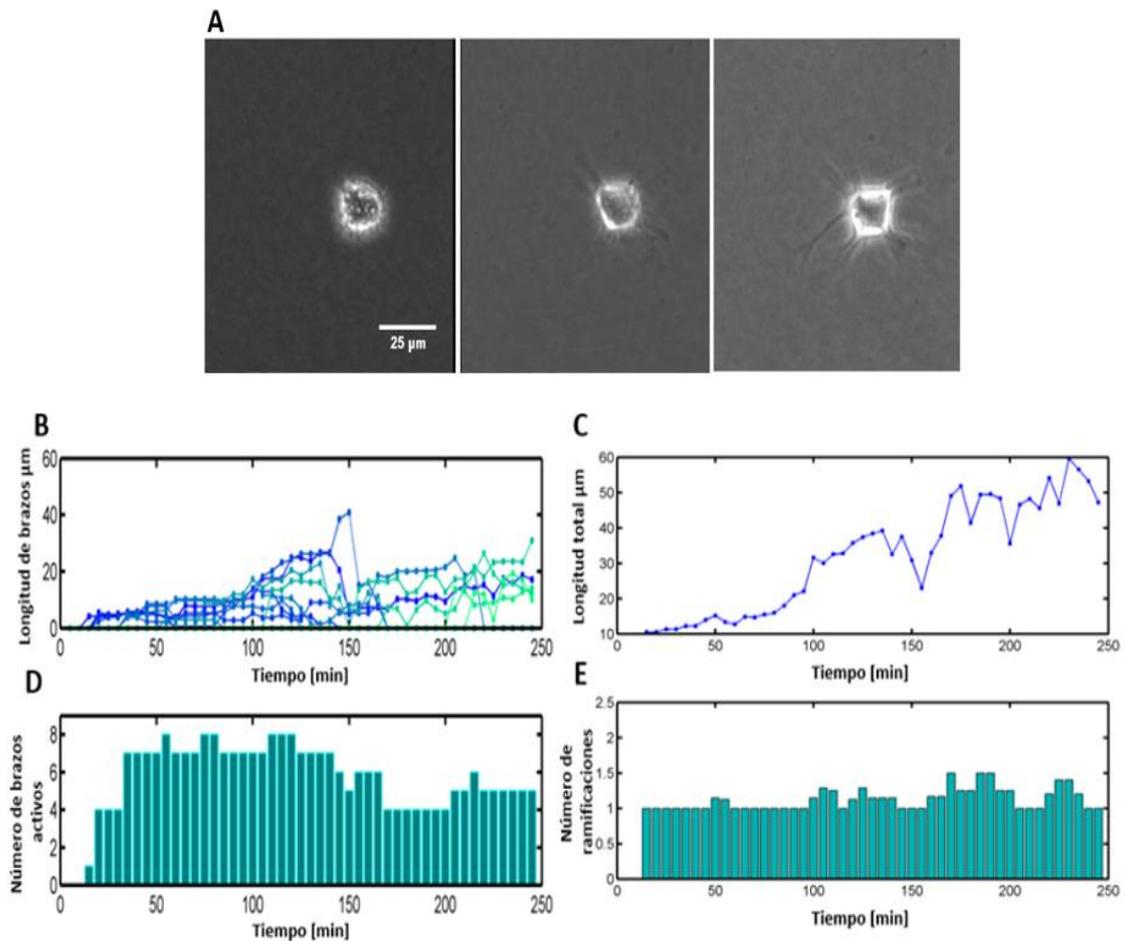
Protrusiones emitidas por los osteoblastos durante 4 h con blebistatina comparadas con el control. (A) Número de brazos activos, (B) longitud total, (C) número de ramificaciones por brazo y (D) longitud de brazos. Se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis para determinar la significación estadística. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ . Se realizaron dos experimentos independientes, de los cuales se analizaron cinco células durante 4 h (49 imágenes por célula).

### 3.3.10. Influencia del tratamiento con fibronectina en la formación de protrusiones de los osteoblastos en hidrogeles de colágeno de 4 mg/ml

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la fibronectina es una proteína adhesiva capaz de unirse al colágeno y de interactuar con las células a través de receptores celulares como las integrinas, por lo que facilita el anclaje a ella de las células y contribuye a la organización de la matriz extracelular, influyendo en el comportamiento celular. Para analizar el efecto de la fibronectina en la formación de protrusiones en los osteoblastos se procedió a añadir 10 µg/ml de fibronectina al hidrogel de colágeno con los osteoblastos.

La Figura 3.63A muestra la formación de brazos de un osteoblasto en un hidrogel de 4 mg/ml de colágeno tratado con fibronectina al inicio, en un estado intermedio y al final del experimento. La mediana de los valores de la longitud de los brazos fue de 8.99 µm (Figura 3.63B) y la longitud total máxima que llegó a alcanzar fue de 59.60 µm al cabo de 4 h desde el momento de la siembra (Figura 3.63C). El número de brazos activos osciló

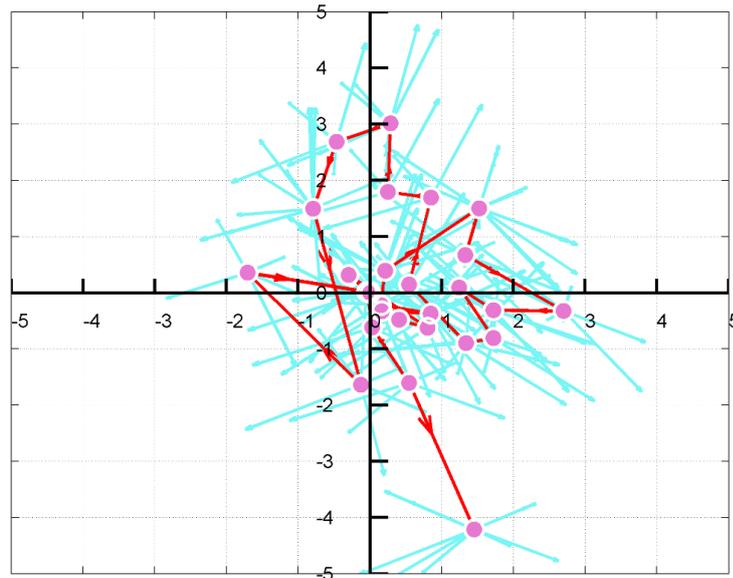
entre 4 y 8 (Figura 3.63D) y el número máximo de ramificaciones de cada brazo fue de 1.5 (Figura 3.63E).



**Figura 3.63. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 4 mg/ml de colágeno tratado con fibronectina**

Protrusiones observadas de la célula durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25 µm), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

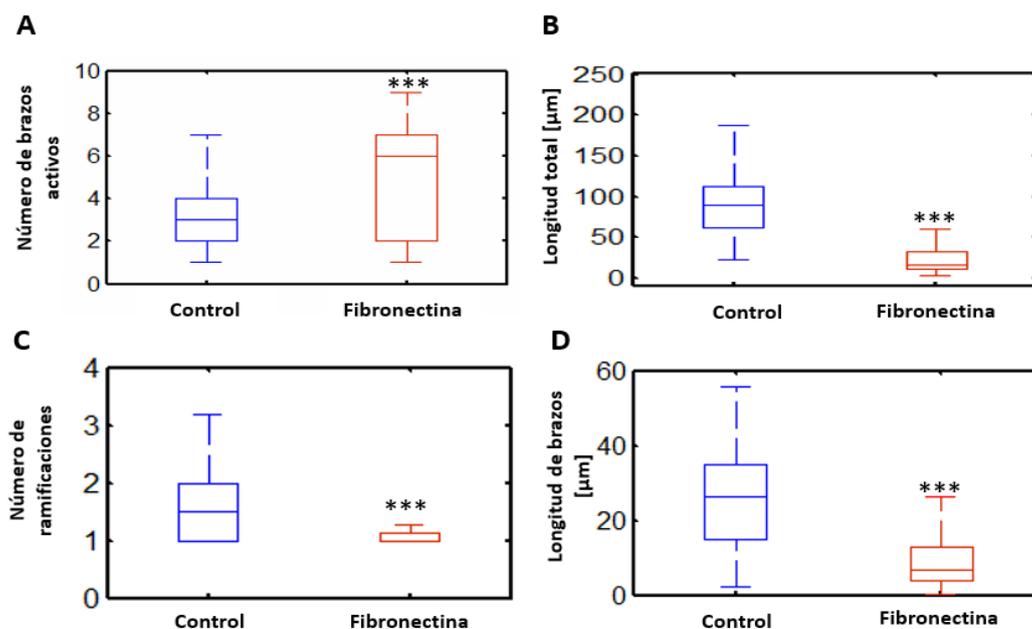
La Figura 3.64 muestra el diagrama de la trayectoria seguida por la célula en un hidrogel tratado con fibronectina. El osteoblasto tuvo un movimiento muy reducido comparado con las demás condiciones analizadas anteriormente, dicho movimiento se realizó en un círculo de aproximadamente 4.20 µm de diámetro, al cabo de las 4 h de siembra. La distancia efectiva alcanzada fue de 1.45 µm horizontalmente y 4.22 µm verticalmente.



**Figura 3.64. Trayectoria de migración de un osteoblasto en un hidrogel de colágeno tratado con fibronectina**

Diagrama de la trayectoria (líneas rojas) donde los círculos rosados representan el centroide celular y las líneas azules son las ramas activas (o brazos celulares) en cada paso temporal en sus direcciones correspondientes. Los ejes están en micrómetros. Nota: la longitud de los brazos celulares no está representada a escala.

La Figura 3.65 muestra como la adición de fibronectina aumentó el número de brazos activos respecto a las demás condiciones analizadas, siendo entre 2 y 8 los brazos activos durante las 4 h desde la siembra, tal y como se puede ver en la Figura 3.65A. Sin embargo, la longitud total fue menor ( $16.75 \mu\text{m}$ ) (Figura 3.65B) que en la mediana de los valores del control ( $90.04 \mu\text{m}$ ) al igual que la longitud de los brazos que fue de  $6.85 \mu\text{m}$  (Figura 3.65D), mientras que la mediana de los valores del control fue de  $26.25 \mu\text{m}$ . El número de ramificaciones por brazo que fue en torno a 1.2 (Figura 3.65C). Esto parece indicar que el tratamiento con fibronectina indujo que el osteoblasto HOB fuera más dinámico, es decir, con mayor cantidad de brazos, aunque estos fueron más pequeños y las cinco células apenas se desplazaron.



**Figura 3.65. Cuantificación de las protrusiones de osteoblastos en 4 mg/ml de colágeno tratados con fibronectina**  
 Protrusiones observadas en las células durante 4 h tratadas con fibronectina comparadas con el control. (A) Número de brazos activos, (B) longitud total, (C) número de ramificaciones por brazo y (D) longitud de brazos. Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis para determinar la significación estadística. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ . Se llevó a cabo un experimento independiente, del cual se analizaron cinco células durante 4 h (49 imágenes).

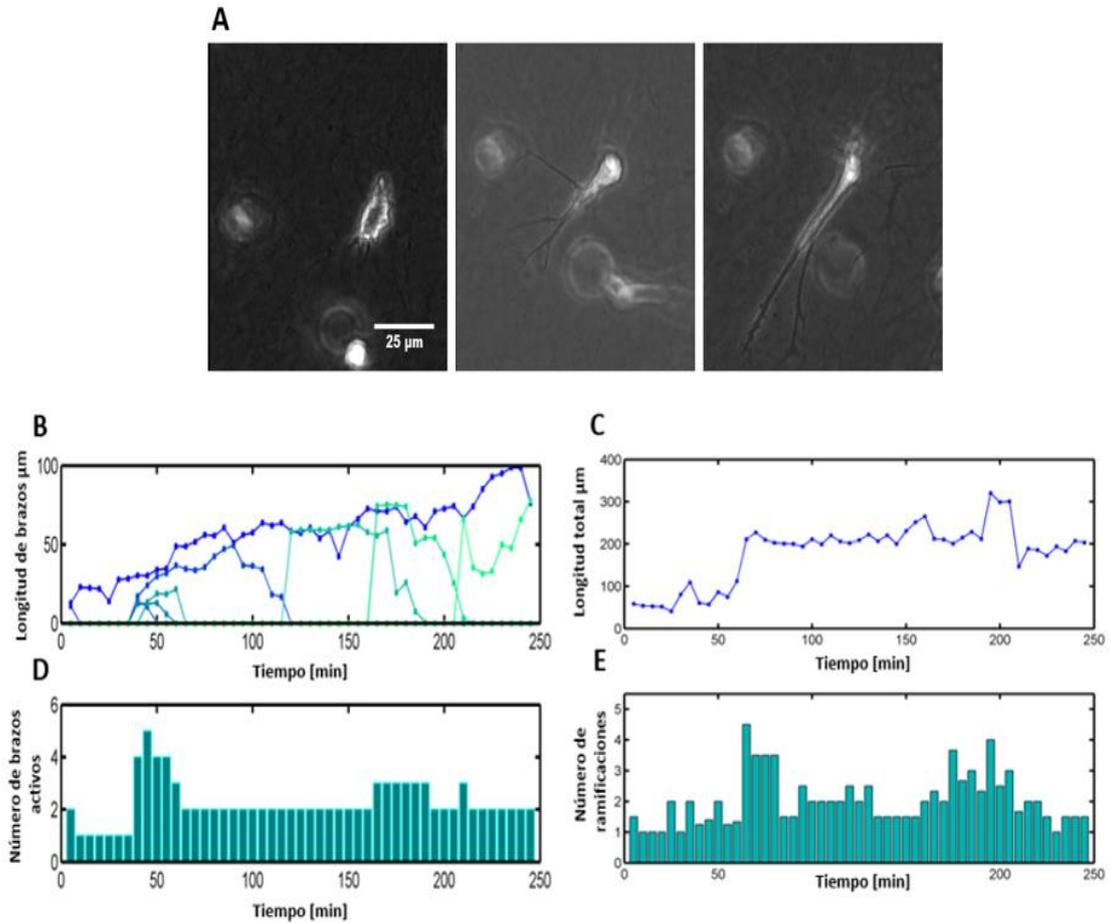
En la tercera parte de este trabajo, se analizó la dinámica de las protrusiones de osteoblastos HOB comparando distintas concentraciones de colágeno con y sin marimastat.

### 3.3.11. Análisis de la dinámica de protrusiones en hidrogeles de 2 mg/ml de colágeno

Para analizar el efecto de las propiedades mecanoquímicas de la matriz extracelular en distintas concentraciones de colágeno, se procedió a analizar la dinámica de las protrusiones en una concentración de 2 mg/ml.

La Figura 3.66A muestra la formación de los brazos de un osteoblasto en un hidrogel de 2 mg/ml de colágeno al inicio, en un estado intermedio y al final del seguimiento. La mediana de los valores de la longitud de los brazos fue de 51.07  $\mu\text{m}$  (Figura 3.66B) y la longitud total llegó a alcanzar las 320.37  $\mu\text{m}$  a las 3 h de siembra, siendo éste el valor notablemente más alto que en todas las condiciones anteriormente analizadas (Figura 3.66C). El número de brazos activos osciló entre 1 y 4.5 (Figura 3.66D)

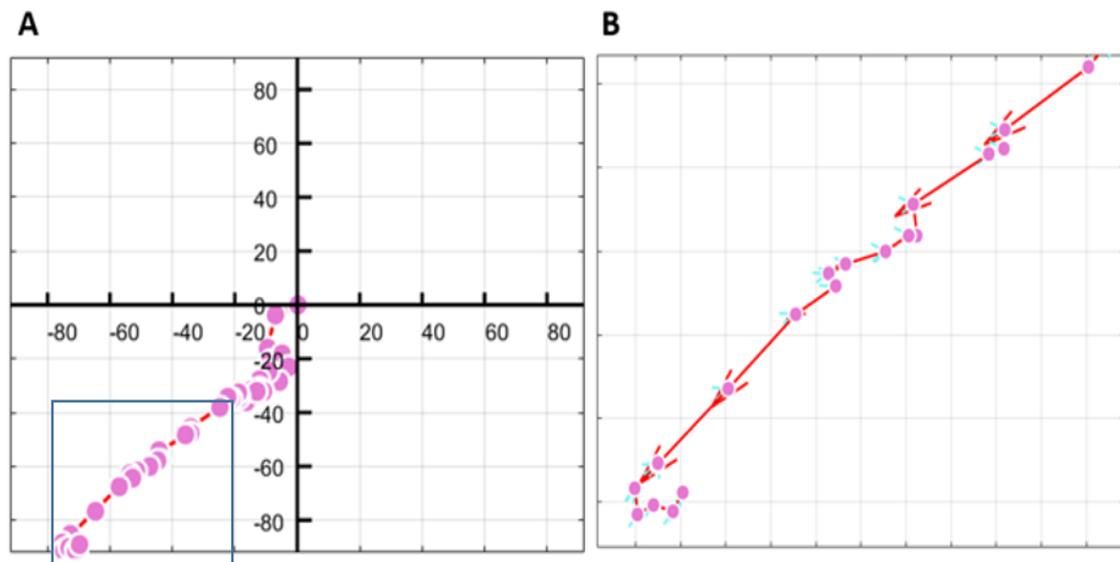
y el número de ramificaciones por brazo varió entre 1 y 5 a lo largo de las 4 h (Figura 3.66E).



**Figura 3.66. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 2 mg/ml de colágeno**

Protrusiones observadas de una célula durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25 µm), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

La Figura 3.67 muestra el diagrama de la trayectoria seguida por un osteoblasto en 2 mg/ml de colágeno, en la cual se puede apreciar una dirección persistente a lo largo del brazo principal de la célula. La distancia efectiva alcanzada fue de 69.81 µm horizontalmente y 88.94 µm verticalmente.

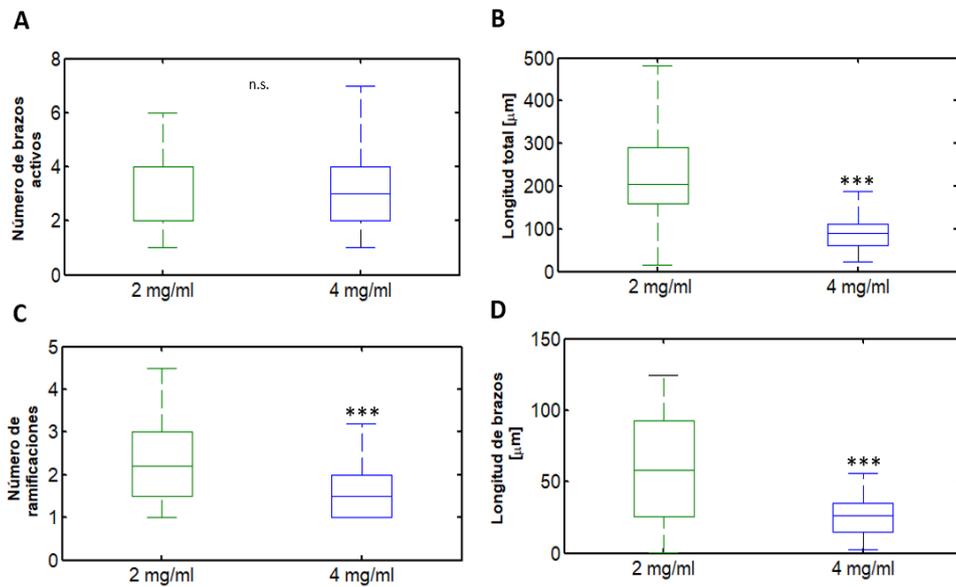


**Figura 3.67. Trayectoria de migración de un osteoblasto en un hidrogel de 2 mg/ml de colágeno**

(A) Diagrama de la trayectoria de migración. (B) Ampliación de un trozo de la trayectoria (líneas rojas) donde los círculos rosados representan el centroide celular y las líneas azules son las ramas activas en cada paso temporal en sus direcciones correspondientes. Los ejes están en micrómetros. Nota: la longitud de los brazos celulares no está representada a escala.

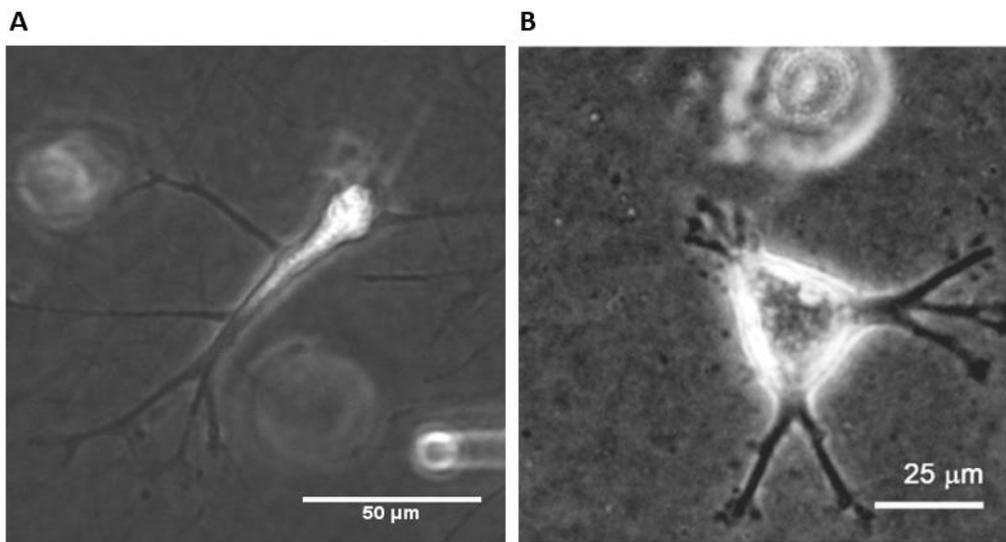
El análisis de las células muestra en la Figura 3.68 que a menor concentración de colágeno (2 mg/ml), el número medio de brazos activos fue de 4 y cuando la concentración de colágeno fue mayor (4 mg/ml) este número se redujo a 3 (Figura 3.68A). La mediana de los valores de la longitud total fue de 205.6  $\mu\text{m}$  y la de la longitud de los brazos principales 58.04  $\mu\text{m}$  (incluidas las ramificaciones secundarias), lo cual fue muy relevante, llegando a alcanzar el doble de longitud que en los hidrogeles de 4 mg/ml (Figura 3.68B–D).

Los resultados obtenidos mostraron que los osteoblastos en hidrogeles con menor densidad de fibras de colágeno suelen moverse de forma más rápida y persistente. El número de protrusiones principales fue menor, ya que se mantuvieron durante más tiempo en una dirección predominante paralela al brazo principal. Además, presentaron ramas secundarias de mayor longitud, por consiguiente, la distancia de invasión desde el punto de origen fue mayor que en los hidrogeles de 4 mg/ml. Los osteoblastos también mantuvieron la orientación de sus protrusiones a lo largo de las 4 h registradas; es decir, la gran mayoría de las protrusiones celulares en los hidrogeles con menor concentración de colágeno permanecieron polarizadas a lo largo del eje original de alargamiento de la célula, tal y como se puede ver en la Figura 3.69.



**Figura 3.68. Cuantificación de las protrusiones en 2 mg/ml de colágeno**

Protrusiones observadas en las células durante 4 h en un hidrogel de 2 mg/ml comparadas con 4 mg/ml de colágeno. (A) Número de brazos activos, (B) longitud total, (C) número de ramificaciones por brazo y (D) longitud de brazos. Se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis para determinar la significación estadística. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$  y n.s. (no significativo). Se realizaron cuatro experimentos independientes, de los cuales se analizaron seis células durante 4 h (49 imágenes por célula).

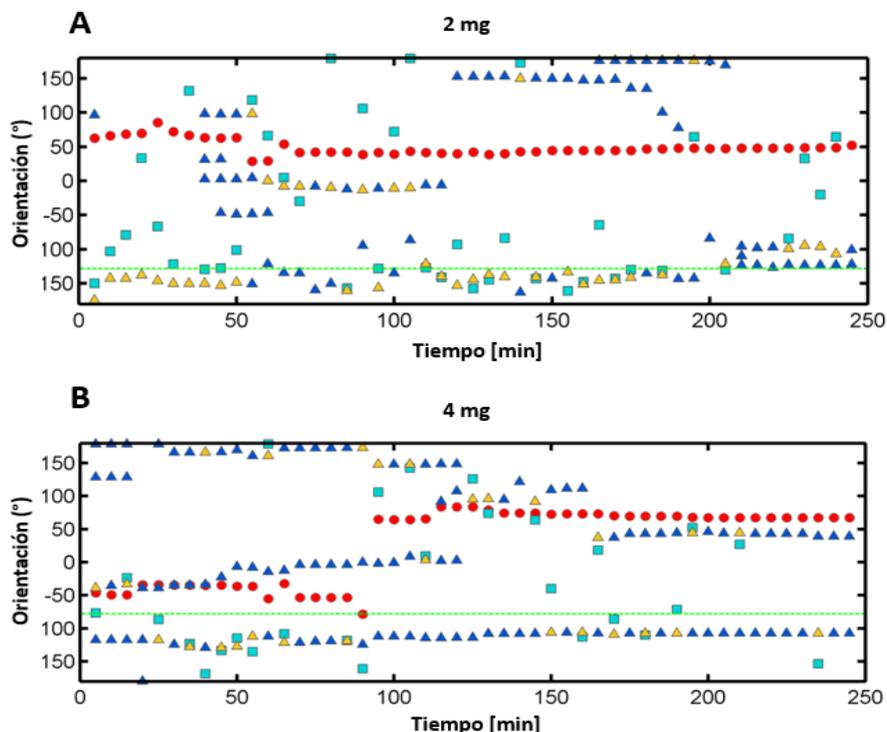


**Figura 3.69. Imagen de protrusiones de un osteoblasto en 2 y 4 mg/ml en un hidrogel de colágeno**

Protrusiones de una célula a las 4 h de siembra. (A) Protrusiones emitidas en un hidrogel de 2 mg/ml con un brazo principal con 5 ramificaciones (la barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ ). (B) Protrusiones emitidas en un hidrogel de 4 mg/ml con 3 brazos principales distribuidos de una forma relativamente uniforme con 2 o 3 ramificaciones cada brazo (la barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ ).

La Figura 3.70 muestra la orientación del cuerpo celular y los brazos de osteoblastos en hidrogel de 2 y 4 mg/ml correspondientes a la Figura 3.69. La orientación del cuerpo celular (círculo rojo) se mantuvo en valores muy estables en el

tiempo, tanto en el hidrogel de 2mg/ml como en el de 4 mg/ml, a pesar de que en el de 4 mg/ml hubo un salto debido a que el núcleo, con forma más circular, cambió su dirección de inercia principal al cambiar la geometría del brazo predominante de la célula que formó una pequeña protuberancia. En ambos casos, se observó que la dirección del movimiento del osteoblasto (cuadrados cian en la Figura 3.70) suele coincidir con el alineamiento de un brazo concreto (la dirección del brazo más alineado al movimiento representado con triángulos amarillos en la Figura 3.70), lo que se ve claramente en el hidrogel de 2 mg/ml, donde hay un brazo predominante durante todo el recorrido (generalmente el que dirige la célula). En el hidrogel de 4 mg/ml se pudieron apreciar 3 brazos principales, los cuales parecen mantener a la célula en equilibrio durante parte de su recorrido, pero siempre terminó predominando un brazo que fue el que finalmente dirigió la célula. Los brazos más próximos a la dirección del movimiento del osteoblasto (triángulos amarillos), en el hidrogel de 2 mg/ml, están la mayoría en la misma orientación, lo que muestra que hay un brazo predominante que dirige el núcleo y esa dirección es la que determinó la dirección del movimiento de la célula.



**Figura 3.70. Orientación y movimiento de un osteoblasto en colágeno a 2 y 4 mg/ml**

Los triángulos azules representan la orientación de los brazos. El círculo rojo representa la orientación del núcleo. Los cuadrados verdes indican la dirección del movimiento del núcleo y el triángulo amarillo, el brazo más próximo a la dirección del movimiento de la célula. Notar que los grados de orientación van de  $-180^\circ$  a  $+180^\circ$ , por lo tanto, al estudiarse únicamente la dirección y no el sentido, hay valores equivalentes (ej.:  $+60^\circ$  es lo mismo que  $-120^\circ$ ).

### 3.3.12. Efecto de la inhibición de las protrusiones de osteoblastos HOB mediada por marimastat en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml

La inhibición de la matriz extracelular mediada por marimastat se vio afectada, aunque no de una forma tan relevante como en los hidrogeles de 4 mg/ml, la mediana de los valores de la longitud de los brazos fue de 29.45 frente a 51.07  $\mu\text{m}$  que alcanzó sin inhibición (Figura 3.71B). La longitud total llegó a las 167.72  $\mu\text{m}$  a las 2 h de la siembra (Figura 3.71C). El número de brazos activos fue considerablemente mayor, osciló entre 4 y 9 en todo su recorrido, lo cual pudo ser debido a la menor rigidez del hidrogel (Figura 3.71D), y el número de ramificaciones por brazo estuvo entre 1 y 2 (Figura 3.71E). La Figura 3.71A muestra el osteoblasto al inicio, en un estado intermedio y al final del seguimiento de las protrusiones.

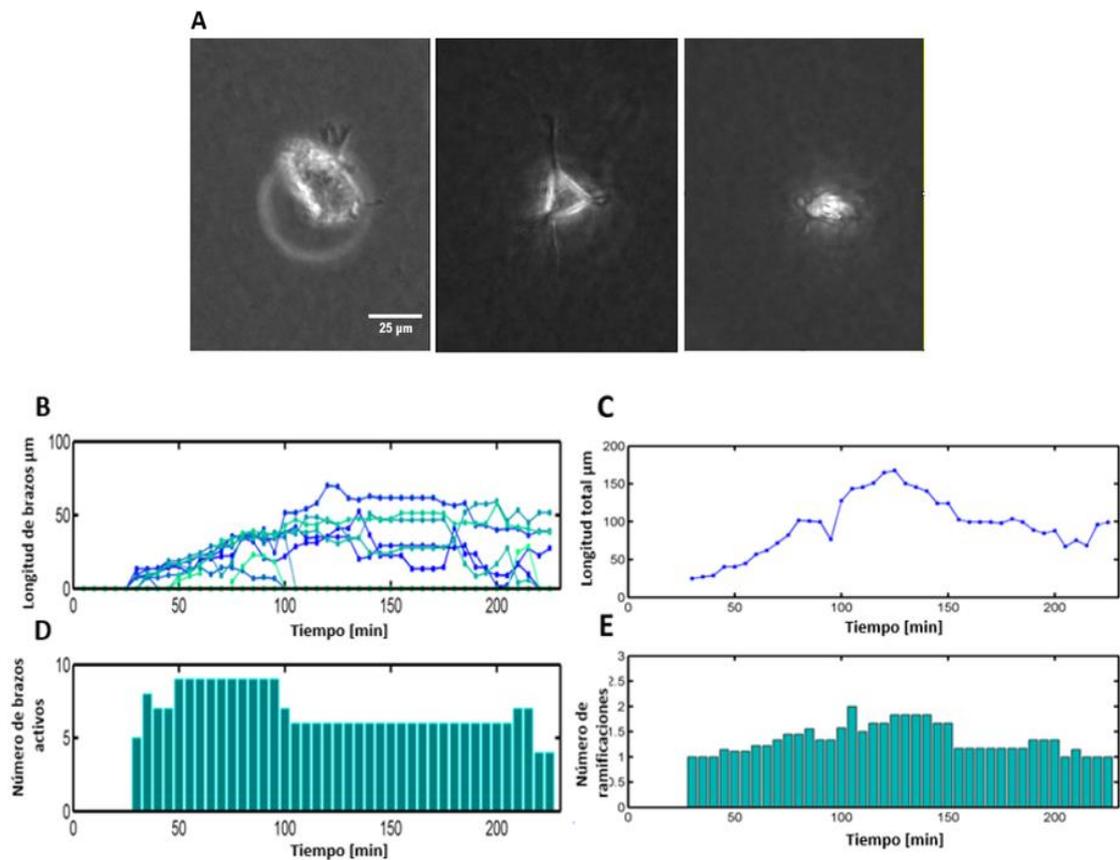
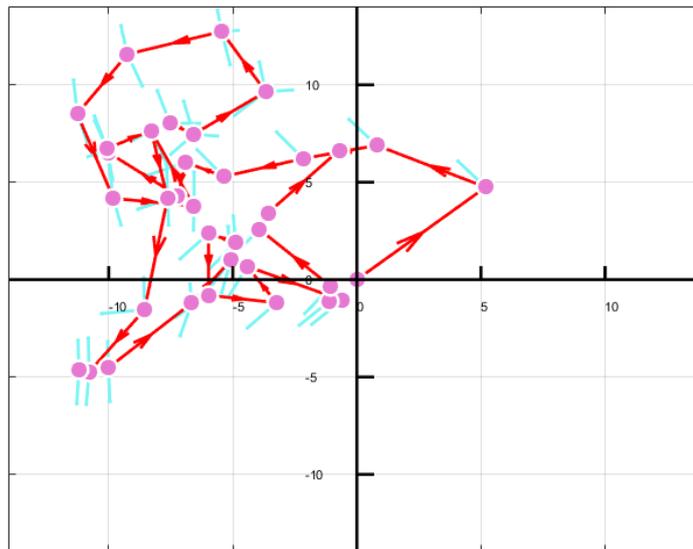


Figura 3.71. Evolución temporal de las protrusiones de un osteoblasto en 2 mg/ml de colágeno con marimastat

Se muestran imágenes de las protrusiones durante 4 h. (A) Imágenes del estado inicial, intermedio y final del desarrollo de las protrusiones del osteoblasto (la barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ ), (B) longitud de brazos, cada color representa un brazo particular, (C) longitud total, (D) número de brazos activos y (E) número de ramificaciones por brazo.

La Figura 3.72 muestra el diagrama de la trayectoria seguida por un osteoblasto en 2 mg/ml de colágeno en presencia de marimastat. Se puede ver que el movimiento del osteoblasto se encuentra inhibido, la distancia máxima alcanzada fue de 17.46  $\mu\text{m}$  frente a las 90.34  $\mu\text{m}$  en el control, llevando a cabo la mayor parte de su movimiento en un círculo en torno a las 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. La distancia efectiva alcanzada fue de 0.7  $\mu\text{m}$  horizontalmente y 6.64  $\mu\text{m}$  verticalmente.

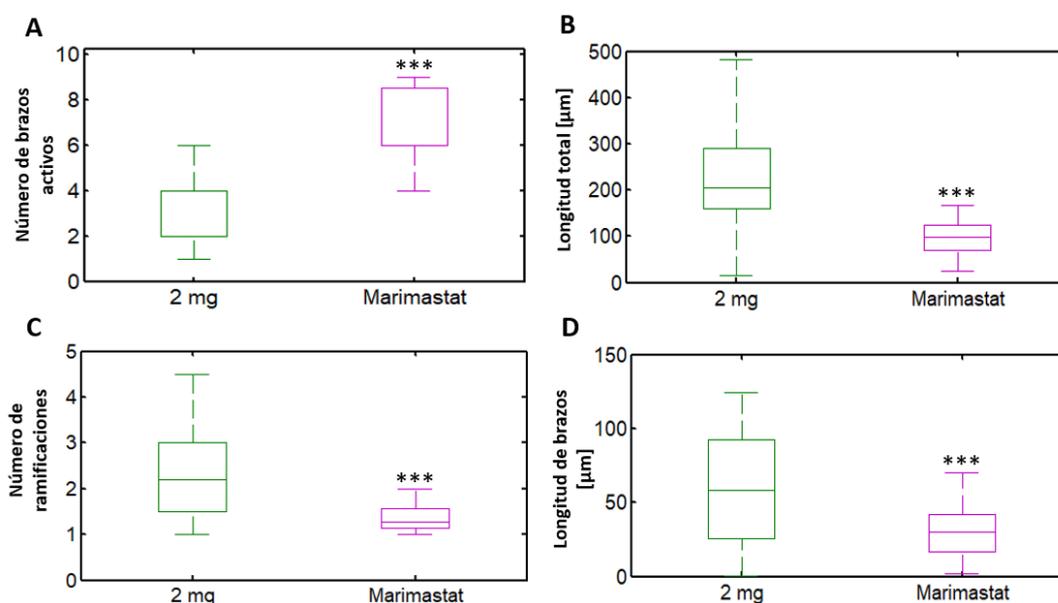
La Figura 3.73 muestra el análisis de cuatro células en el que se puede observar que el número de brazos activos fue mayor que sin el inhibidor marimastat (Figura 3.73A). La mediana de los valores de la longitud total (47.30  $\mu\text{m}$ ) y el de la longitud de los brazos principales (14  $\mu\text{m}$ ) (incluidas las ramificaciones secundarias) fue notablemente menor que en el hidrogel control de 2 mg/ml, lo mismo que sucedió en los hidrogeles de 4 mg/ml (Figura 3.73B–D).



**Figura 3.72. Trayectoria de migración de un osteoblasto en un hidrogel de 2 mg/ml de colágeno con marimastat**

Diagrama de la trayectoria (líneas rojas) donde los círculos rosados representan el centroide celular y las líneas azules son las ramas activas en cada paso temporal en sus direcciones correspondientes. Los ejes están en micrómetros.

Nota: la longitud de los brazos celulares no está representada a escala.



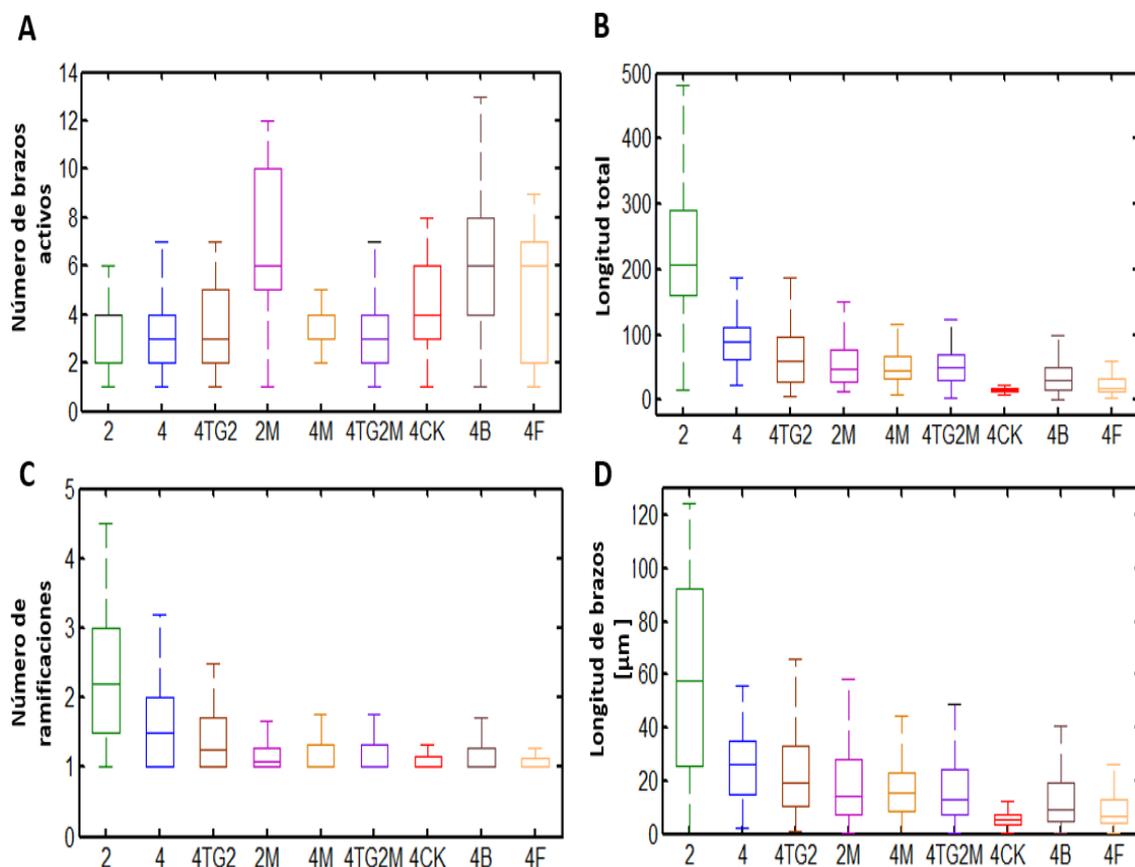
**Figura 3.73. Cuantificación de las protrusiones en 2 mg/ml de colágeno con marimastat**

Protrusiones observadas de las células durante 4 h en un hidrogel de 2 mg/ml de colágeno con marimastat comparadas con el de 4 mg/ml de colágeno. (A) Número de brazos activos, (B) longitud total, (C) número de ramificaciones por brazo y (D) longitud de brazos. Se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis para determinar la significación estadística. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ . Se realizaron dos experimentos independientes, de los cuales se analizaron cuatro células durante 4 h.

### 3.3.13. Protrusiones de osteoblastos HOB: comparativa global de las distintas condiciones analizadas

La Figura 3.74 recoge un resumen de las condiciones anteriormente analizadas y se puede concluir que la concentración del colágeno influyó de manera relevante en la longitud y las ramificaciones de las protrusiones, siendo mayor en los hidrogeles de menor concentración. La adición del entrecruzante TG2 en la matriz apenas tuvo un efecto relevante en el desarrollo de las protrusiones, si se compara con el hidrogel control de 4 mg/ml. Sin embargo, el inhibidor de las metaloproteasas marimastat presentó un efecto claramente significativo en el desarrollo de las protrusiones en prácticamente todos los parámetros analizados, siendo más destacado en hidrogeles de 2 mg/ml que en los de 4 mg/ml. La longitud total y de los brazos estuvo inhibida en ambas concentraciones y en hidrogeles de 2 mg/ml el número de brazos activos aumentó considerablemente. Por otro lado, la acción de los inhibidores de actina y miosina II fueron los que presentaron un mayor efecto inhibitorio, siendo más significativo el inhibidor de actina CK-636 en la longitud total y de los brazos.

Amboinhibidores produjeron un aumento en el número de brazos activos, siendo mayor con el inhibidor de miosina II (blebistatina). Por último, el tratamiento con fibronectina fue el que activó un mayor número de brazos, aunque más pequeños. La longitud total y la de los brazos, incluido el número de ramificaciones, muestra pequeñas variaciones respecto a los experimentos llevados a cabo con los distintos inhibidores.



**Figura 3.74. Cuantificación de las protrusiones en las distintas condiciones analizadas**

Protrusiones observadas en los osteoblastos HOB seleccionados durante 4 h en hidrogel de colágeno de 2 mg, 4 mg, 4 mg + TG2, 2 mg + Marimastat, 4 mg + Marimastat, 4 mg + TG2 + Marimastat, 4 mg + CK-636, 4 mg + Blebistatina y 4 mg + Fibronectina. (A) Longitud de brazos, (B) número de brazos activos, (C) longitud total y (D) número de ramificaciones por brazo.

La Tabla 3.9 y la Tabla 3.10 muestran un resumen de las medidas de los parámetros analizados en los distintos experimentos llevados a cabo. La Tabla 3.9 muestra la mediana de los valores de estos parámetros en los osteoblastos analizados y la Tabla 3.10 los valores de la velocidad de los mismos.

**Tabla 3.9. Resultados del análisis de diferentes experimentos con osteoblastos HOB en distintas condiciones**

Se representa la mediana de los valores, obtenida en distintas condiciones experimentales, de los distintos parámetros analizados durante la generación de protrusiones de osteoblastos HOB en hidrogeles de colágeno de 4 y 2 mg/ml.

MEDIANA DE LOS VALORES DE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS EN DISTINTOS OSTEOBLASTOS					
CONDICIONES	N.º DE CÉLULAS	M <sub>e</sub> LONGITUD DE BRAZOS (µm)	M <sub>e</sub> LONGITUD TOTAL (µm)	M <sub>e</sub> N.º DE BRAZOS ACTIVOS	M <sub>e</sub> N.º DE RAMIFICACIONES POR BRAZO
4 mg	5	26.25	90.04	3	1.5
4 mg TG2	5	19.02	58.95	3	1.25
4 mg Marimastat	5	15.26	45.42	3	1.33
4 mg Marimastat + TG2	5	12.96	49.08	3	1.33
CK-636	5	5.32	15	4	1.14
Blebistatina	5	9.11	31.14	6	1.2
Fibronectina	5	6.85	16.75	6	1.2
2 mg	6	58.04	205.6	2	2.2
2 mg Marimastat	4	14	47.30	6	1.08

**Tabla 3.10. Resultados de la velocidad de osteoblastos HOB**

Se representan los valores medios, los errores estándar y la mediana de los valores correspondiente a la velocidad de las células en las distintas condiciones analizadas.

VALORES DE VELOCIDAD DE OSTEOBLASTOS HOB			
VELOCIDAD (µm/min)			
CONDICIONES	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR	MEDIANA
Control	0.161	0.001	0.0805
TG2	0.167	0.001	0.0722
Marimastat	0.073	0.002	0.0352
Marimastat + TG2	0.073	0.002	0.0321

Para confirmar los experimentos realizados *in vitro* sobre los mecanismos principales de la dinámica de protrusión celular y su efecto en la migración celular, la Dra. Clara Valero, propuso un modelo que incluye tanto las propiedades mecánicas y

químicas de la matriz extracelular como la mecánica de la protrusión de una sola célula [310], tal y como se ha mencionado anteriormente. Este modelo predice la evolución de las protuberancias celulares y la migración resultante basada en la interacción mecánica entre las protuberancias y la matriz extracelular circundante, aunque no pudo capturar completamente las diferencias de las máximas longitudes de las ramas, sobreestimándolas para las condiciones estudiadas. De todas formas, los valores obtenidos están dentro del rango experimental llevado a cabo en este trabajo.

#### **3.3.14. Discusión y conclusiones**

En este trabajo se estudia el efecto de la mecánica de la matriz sobre la capacidad de los osteoblastos para formar protrusiones y cómo estas protrusiones regulan la migración individual de los osteoblastos. Específicamente, se enfoca el análisis en los efectos inducidos por el entrecruzamiento de la matriz, la capacidad de degradación de la matriz y su efecto combinado, así como el efecto de inhibidores del citoesqueleto de actina y miosina II, el tratamiento de la matriz con fibronectina y con distintas concentraciones de colágeno. Se encontraron diferencias significativas en el tamaño de la protrusión y la velocidad celular cuando marimastat bloqueó la actividad de degradación. Sin embargo, la rigidez de la matriz mediante la introducción de TG2 solo indujo variaciones pequeñas y no significativas tanto en el tamaño de la protrusión como en la velocidad de la célula. Estos resultados sugieren que, al menos en el rango estudiado, la capacidad de las células para crear un camino a través de la matriz (proteolisis) es más crítica que las propiedades mecánicas de la matriz. De hecho, se puede concluir que la migración individual de osteoblastos sigue una estrategia intersticial proteolítica, es decir, este resultado está de acuerdo con experimentos previos en células de fibrosarcoma humano cultivadas en 3D, lo que sugiere que la microarquitectura de las fibras guía la actividad proteolítica y las protrusiones, regulando su motilidad [313].

Los entrecruzantes de la matriz se han agregado generalmente a los hidrogeles para aumentar su rendimiento mecánico [223], [270]. En este trabajo, se agregaron 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de TG2, por lo tanto, se variaron las propiedades mecánicas de la matriz extracelular. Dado que no se han medido las deformaciones del hidrogel, no se puede

confirmar qué tan diferente fue el entorno mecánico detectado por las células con y sin TG2. De hecho, la adición de este entrecruzante no causó variaciones significativas en la velocidad de las células ni en la longitud de los brazos (Figura 3.55 y Figura 3.54D). Solamente la longitud total del brazo (incluyendo los brazos secundarios) se redujo significativamente con la adición de TG2 (Figura 3.54B), mientras que el número de brazos activos y de ramificaciones no se vieron afectados (Figura 3.54A y C). Esto, por lo tanto, implica que el número de sub-ramificaciones (ramificación de las ramas secundarias) se redujo con respecto al caso de control sin TG2, aunque aún no está claro cuál es el papel de estas ramificaciones, ya que aparentemente no tienen un efecto inmediato.

Por otro lado, el bloqueo de la capacidad de las células para degradar la matriz mediante la inhibición de las MMPs con marimastat, tuvo un mayor impacto tanto en la formación de protrusiones como en la velocidad de las células. Curiosamente, las células presentaron el mismo número de brazos activos (Figura 3.54A), pero con menos ramificaciones (Figura 3.54C) y, por lo tanto, menor longitud total de brazos (Figura 3.54B). Esto podría deberse a la imposibilidad de abrir nuevos caminos al degradar la MEC, lo que a su vez podría llevar a las células a expandir su cuerpo celular en lugar de crear más ramificaciones. Como se ha mencionado anteriormente, la adición de TG2 tuvo un efecto insignificante, obteniendo diferencias no significativas para todos los parámetros medidos, lo que sugiere que el proceso de degradación de la MEC es más importante para la migración de los osteoblastos que las propiedades mecánicas de la MEC, al menos con respecto a la rigidez debida al entrecruzamiento.

La inhibición del complejo Arp2/3 impide la polimerización de la actina y se ha demostrado que reduce la velocidad celular en 3D. Giri y col. [314] analizaron las células MCF 10A (células epiteliales) y sus resultados indican que presentan aproximadamente 1 o 2 protuberancias principales saliendo del cuerpo celular. El grosor promedio de estas protuberancias principales es de 5  $\mu\text{m}$ , que es aproximadamente diez veces más grueso que las protuberancias observadas en las células que crecen en 2D. Otra característica importante de las protuberancias en 3D es la presencia de microtúbulos de tubulina, mientras que los filopodios en 2D solamente contienen filamentos de actina. Estos estudios demostraron que la generación de protrusiones secundarias y terciarias se redujo un 70-80% en comparación con las células control. Un efecto semejante se

produjo en el número de ramificaciones y la longitud total de los brazos, en los experimentos llevados a cabo en este trabajo, con los osteoblastos en hidrogeles de colágeno tratados con el inhibidor de Arp2/3, los cuales también disminuyeron de forma relevante. Esto indica que el complejo Arp2/3 y sus activadores (familia de WASP) actúan en la nucleación y ramificación de la actina, además de tener un papel determinante en la formación de la protrusión celular, la migración celular y la invasión [315]–[317].

El tratamiento con el inhibidor de la miosina II indujo un mayor número de protrusiones iniciales para compensar el aumento de la resistencia del núcleo, que se encuentra atrapado en los poros del hidrogel y no puede migrar hacia adelante. El osteoblasto pierde la capacidad para deformarse en respuesta a la matriz que tiene a su alrededor. Se ha demostrado que la inhibición con blebistatina previene la adhesión celular en 3D [208], [286]. Incluso si se producen adhesiones, no alcanzan un tamaño umbral para transmitir la tracción al cuerpo celular lo que también explicaría la reducción de ramificaciones, la longitud de brazos y la total. Todo esto sugiere que el ensamblaje de los filamentos de actina y la contractilidad de la actomiosina se requieren para la generación de ramificaciones y la migración de la célula.

La presencia de fibronectina en los hidrogeles de colágeno produce un incremento en la activación de Rac 1, tanto en 2D como en 3D, induciendo una rápida migración individual [318]. La unión de la fibronectina a los receptores de integrinas puede estimular la organización del citoesqueleto de actina y activar los eventos de señalización intracelular que controlan la proliferación celular [319]. La fibronectina induce la formación de mayor cantidad de adhesiones, aunque más pequeñas, pero son más dinámicas [320]. Las concentraciones más altas de colágeno (2.5 mg/ml) reducen la propagación celular mediada por fibronectina dando lugar a estructuras más compactas [321]. Esto concuerda con los resultados que se han obtenido con el tratamiento de fibronectina, ya que se determinaron un mayor número de brazos comparado con las demás condiciones analizadas. El hecho de que las protrusiones de la célula no avanzaran puede deberse a la alta concentración de la matriz (4 mg/ml) con fibronectina, ya que dichas protrusiones al ser más dinámicas y presentar una alta tasa de recambio, no tienen tanta capacidad para degradar la matriz y poder avanzar.

La concentración del colágeno influye en la velocidad, en la distancia de invasión y en la orientación de las protrusiones en 3D. A concentraciones más bajas de 2 mg/ml,

los osteoblastos emitieron protrusiones más rápida y persistentemente, invadiendo distancias lejos de su punto de origen (205.6  $\mu\text{m}$ ). En la mayoría de los casos, los osteoblastos mantuvieron la orientación de sus protrusiones durante las 4 h de seguimiento, es decir, la gran mayoría de las protrusiones celulares permanecieron polarizadas a lo largo del eje original del alargamiento de la célula. Este mismo efecto se ha visto en células HT-1080 de fibrosarcoma humano [270]. Al aumentar la concentración de colágeno a 4 mg/ml, los osteoblastos emitieron protrusiones más lentamente e invadieron distancias más pequeñas desde el punto de origen. El número de protrusiones fue aproximadamente el mismo, pero la direccionalidad de las mismas fue más isotrópica (igual en todas direcciones al mismo tiempo) que en los hidrogeles de 2 mg/ml.

Los factores químicos externos pueden actuar como atrayentes celulares, pero también pueden modificar procesos intracelulares como la polimerización de proteínas o las protrusiones celular, que a su vez regulan la migración celular. Cuando los receptores, ubicados en la membrana celular, se unen a agentes químicos externos, se puede iniciar una cascada de señalización intracelular [322].

De los resultados experimentales obtenidos, se puede concluir que las protrusiones emitidas por los osteoblastos tienen propiedades fuertemente dependientes de las propiedades mecánicas de la matriz circundante. De hecho, cuando un bloqueador de la actividad de las metaloproteasas (como el marimastat) está presente, la dinámica de las protrusiones se ve fuertemente alterada, afectando directamente a la movilidad, al igual que sucede con los inhibidores de actina (CK-636 y blebistatina). Estos resultados sugieren que, a pesar de la baja motilidad de los osteoblastos, su velocidad está claramente gobernada por la dinámica de las protrusiones, que regula su movimiento en función de la interacción mecánica entre estas protrusiones con la matriz adyacente.

## **4. CONCLUSIONES**

---



En esta Tesis se han empleado sistemas microfluídicos que han permitido el cultivo celular en 3D para simplificar, reproducir y caracterizar el microentorno celular mecanobiológico enfocado a procesos regenerativos de curación de heridas y de regeneración ósea. Las principales conclusiones de la presente Tesis se detallan a continuación, organizadas según el proceso biológico.

❖ **Regeneración de heridas: migración de fibroblastos humanos de piel**

- Las condiciones de haptotaxis analizadas en los dispositivos microfluídicos con una combinación de factor químico adherido a la matriz extracelular producen un movimiento diferente en la migración de los fibroblastos de la monocapa, los cuales presentan una migración individual, siendo este movimiento más destacado cuando el factor químico no se elimina después del pretratamiento, probablemente debido al efecto de la atracción del factor soluble presente en la matriz extracelular.
  
- La aplicación de un gradiente químico o quimiotaxis en matrices con distinta concentración de colágeno y con modificación de la estructura mediante TG2 provoca una estimulación muy relevante en la migración y en la proliferación de los fibroblastos de la monocapa en la matriz de colágeno.
  
- Los resultados del estudio de durotaxis en los dispositivos microfluídicos de tres canales con diferente concentración de colágeno sugieren que la interfaz generada en la polimerización de los hidrogeles disminuye la migración de los fibroblastos hacia zonas de menor rigidez, siendo esta interfaz dominante sobre el gradiente químico generado por el PDGF-BB.

❖ **Regeneración ósea: migración de osteoblastos humanos de tejido óseo trabecular femoral**

- Los dispositivos microfluídicos utilizados fueron capaces de recrear el microambiente de crecimiento de los osteoblastos. Estos dispositivos, unidos al procesamiento de imágenes y la obtención de datos cuantitativos a partir de las mismas presentan una herramienta con gran potencial para analizar el efecto de las distintas condiciones físico-químicas en la migración de los osteoblastos *in vitro*.
  
- El patrón migratorio en 3D de los osteoblastos se ve afectado por las propiedades del hidrogel, es decir, de la alineación de fibras en la red de colágeno, del gradiente de PDGF-BB y de la deformación de la matriz de colágeno por la dinámica de las fuerzas de tracción de los osteoblastos, aunque el factor regulador más importante es la capacidad de las células para remodelar la matriz.
  
- Las protrusiones emitidas por los osteoblastos dependen en gran medida de la proteólisis extracelular mediada por éstos para la degradación del entorno de la matriz. La dinámica de estas protrusiones se altera significativamente, reduciendo el número y el tamaño de ramificaciones secundarias cuando está presente el inhibidor de las metaloproteasas marimastat y los inhibidores de actina blebistatina y CK-636, afectando directamente a la movilidad de los osteoblastos.

## **5. CONCLUSIONS**

---

---



In this Thesis, microfluidic systems have been used, suitable for 3D cell culture to reproduce and characterize the mechanobiological cell microenvironment focusing on regenerative processes that occur during wound healing and bone regeneration. The main conclusions of this Thesis are detailed below, organized according to biological process.

❖ **Wound regeneration: migration of human fibroblasts from skin**

➤ The haptotaxis conditions that were analyzed in microfluidic devices with a combination of chemical factor attached to the extracellular matrix produced a differential movement in the migration of the fibroblast monolayer, which present an individual migration, being more prominent when the chemical factor is not removed after pretreatment, probably due to the effect of the attraction of the soluble factor present in the extracellular matrix.

➤ The application of a chemical gradient or chemotaxis in different matrix densities and with modification of the structure by means of TG2 causes a very relevant effect on the migration and proliferation of the monolayer fibroblasts in the collagen matrix.

➤ Results from durotaxis assay in three-channel microfluidic devices with different collagen concentration suggest that the interface generated in the polymerization of hydrogels decreases the migration of fibroblasts towards areas of lower stiffness, being this interface dominant over the chemical gradient generated by PDGF-BB.

❖ **Bone regeneration: migration of human osteoblasts from femoral trabecular bone tissue**

- The microfluidic devices used to recreate the microenvironment of osteoblast growth, together with image processing and the obtention of quantitative data from them, are an important tool for analyzing the effect of different physical and chemical conditions of osteoblast migration *in vitro*.
  
- The 3D migration pattern of osteoblasts is affected by the properties of the hydrogel, that is, the alignment of collagen network fibers, the PDGF-BB gradient and the deformation of the collagen matrix by dynamics of the tensile forces of the osteoblasts, although the most important regulatory factor is determined by the ability of the cells to remodel the matrix.
  
- Protrusions emitted by osteoblasts depended largely on extracellular proteolysis mediated by the osteoblasts for degradation of the matrix environment. The dynamics of these protrusions are significantly altered by reducing the number and size of secondary branches when the metalloprotease inhibitor marimastat and the inhibitors blebistatin and CK-636 are present, directly affecting the mobility of the osteoblasts.

## **6. TRABAJO FUTURO**

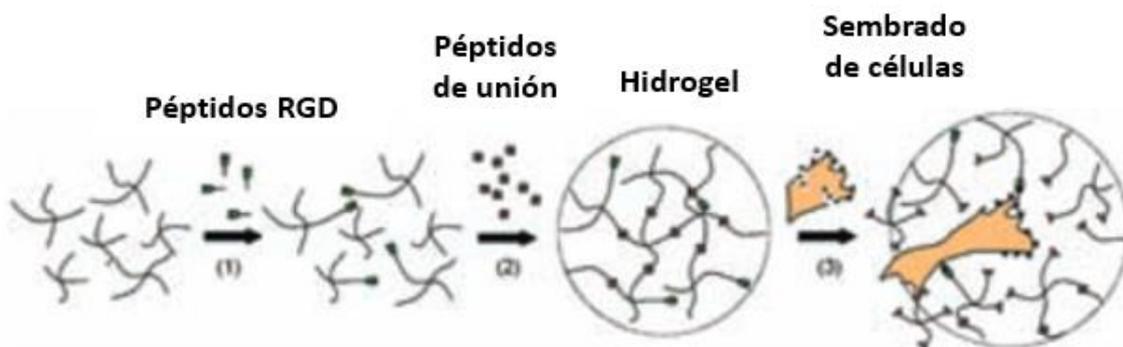
---





En la presente Tesis, se han desarrollado diferentes sistemas microfluídicos para avanzar en el entendimiento del papel regulatorio que ejerce la matriz extracelular en la migración 3D de las células en procesos regenerativos que pretenden recrear la curación de heridas y la regeneración ósea. Como consecuencia de los resultados obtenidos se han generado nuevos e interesantes retos:

➤ El cultivo de células en 3D es hoy en día una técnica esencial en muchas áreas de investigación como la ingeniería tisular, la medicina regenerativa o el desarrollo de nuevos fármacos. Las tecnologías en 3D mayoritariamente utilizan hidrogeles de colágeno, matrigel, fibrina, gelatina, entre otros, para el cultivo celular, pero también resultaría muy interesante utilizar hidrogeles de polímeros sintéticos biocompatibles como PEG, procediendo a su caracterización biofísica y biomecánica y analizando la respuesta celular. Estos hidrogeles de PEG tienen la ventaja de ser hidrofóbicos e inertes y tienen baja adsorción de proteínas, además de permitir la degradación enzimática del polímero y/o la liberación de agentes terapéuticos. El PEG se puede modificar con una gran cantidad de grupos funcionales diferentes y estos hidrogeles se pueden utilizar en diversas aplicaciones de cultivos celulares, incluida la diferenciación de células madre, la mecanobiología y la angiogénesis [323], [324]. Recientemente, se han sintetizado hidrogeles de PEG que incorporan moléculas de adhesión celular como el péptido RGD [194], [325]. Este péptido es una secuencia de unión a integrinas, derivada de la fibronectina, que promueve la adhesión celular y la invasión del hidrogel por las células. La degradación de este hidrogel se puede controlar mediante el uso de péptidos de unión entre los macrómeros de PEG diseñados para que sean sensibles a enzimas secretadas por las propias células, como por ejemplo las metaloproteasas. Esto hace que el hidrogel sea estable y su degradación tenga lugar progresivamente a medida que se coloniza por las células (Figura 6.1) [193], [195].

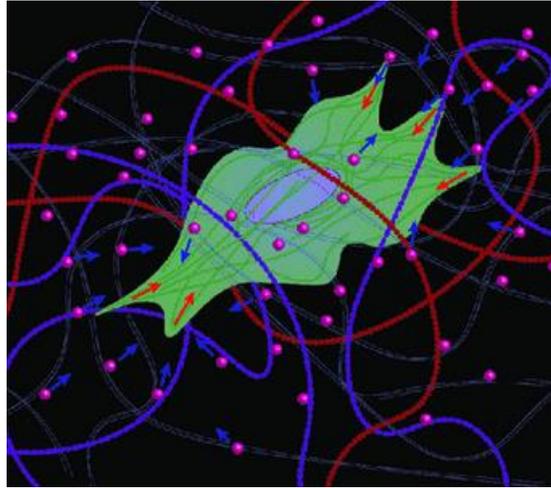


**Figura 6.1. Hidrogel de PEG-RGD**

Los péptidos RGD se añaden al macrómero PEG formando el hidrogel PEG-RGD. Las células se añaden en el hidrogel, éstas se unen al péptido RGD y migran mediante la degradación de los péptidos de unión por la acción de las metaloproteasas. *Imagen adaptada de [326].*

➤ Para procesos de regeneración de heridas, a partir de la monocapa de fibroblastos, podría resultar de interés aplicar flujo intersticial a los microdispositivos para evaluar el proceso migratorio de la monocapa, ya que la señalización química paracrina, autocrina y por contacto directo puede verse fuertemente afectada por este flujo intersticial.

➤ Por otro lado, sería interesante cuantificar las fuerzas que ejercen los fibroblastos en la matriz de colágeno en distintos ambientes químicos de haptotaxis y quimiotaxis utilizando la técnica de microscopía de fuerza de tracción 3D (TFM 3D). Un posible método es añadir partículas fluorescentes dentro del hidrogel de colágeno que sirven de marcadores de referencia y las fuerzas de tracción celulares se obtienen a partir del desplazamiento de las esferas y de las propiedades mecánicas del hidrogel de colágeno (Figura 6.2). Se utilizan enzimas o fármacos para inhibir la actividad celular, eliminando las tracciones que la célula ejerce y mediante microscopía confocal se obtienen imágenes de los desplazamientos resultantes en 3D de las esferas fluorescentes. Finalmente, mediante algoritmos de cálculo, se calculan los desplazamientos de las esferas, y mediante la resolución de un problema inverso, conociendo las propiedades del material, es posible obtener las tracciones ejercidas por las células en su entorno [327], [328].



**Figura 6.2. Técnica de TFM 3D (Microscopía de fuerzas de tracción 3D)**

Célula embebida en una matriz 3D ejerciendo fuerzas de tracción y desplazando las partículas fluorescentes embebidas en el hidrogel. *Imagen tomada de [329].*

- En los procesos de regeneración ósea los resultados obtenidos en este trabajo demostraron cómo los osteoblastos son capaces de deformar y remodelar la matriz que los rodea mediante la deformación y degradación de la misma. Para una mejor cuantificación de la capacidad de deformación de la matriz por los osteoblastos, sería también de gran utilidad utilizar TFM 3D calculando las fuerzas producidas por los osteoblastos en la matriz de colágeno, con y sin inhibición de la matriz extracelular inducida por el inhibidor de las metaloproteasas (marimastat).
  
- Los osteoblastos se unen a la matriz extracelular a través de moléculas de adhesión celular, y la respuesta de unión de la célula a la matriz se controla a través de integrinas. Las integrinas al unirse a estas moléculas se asocian rápidamente con la red de actina del citoesqueleto y se agrupan para formar adhesiones focales, las cuales funcionan como vínculos estructurales entre el citoesqueleto y la MEC para mediar la adhesión y la migración celular [330]. Algunas moléculas de adhesión celular para las integrinas de los osteoblastos son el colágeno tipo I, laminina, fibronectina y vitronectina, cada una de las cuales está presente en etapas específicas del desarrollo óseo [331]. Sería muy interesante seguir profundizando en la respuesta al tratamiento con estas moléculas de adhesión en los estudios de formación de protrusiones, proliferación y migración de los osteoblastos en 3D.



## **7. NOTA BIOGRÁFICA**

---



### **7.1. Publicaciones obtenidas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral**

1. María Anguiano, Xabier Morales, Carlos Castilla, Alejandro Rodríguez Pena, Cristina Ederra, Martín Martínez, Mikel Ariz, Hippolyte Amaveda, Mario Mora, **Nieves Movilla**, José Manuel García Aznar, Iván Cortés Domínguez, Carlos Ortiz-de-Solorzano. *“The use of mixed collagen-Matrigel matrices of increasing complexity recapitulates the biphasic role of cell adhesion in cancer cell migration: ECM sensing, remodeling and tractions at the leading edge of cancer invasion”*. Plos One. 2020 Jan 16;15(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0220019.
2. **Nieves Movilla**, Clara Valero, Carlos Borau, JM. García-Aznar. *“Matrix degradation regulates osteoblast protrusion dynamics and individual migration”*. Integrative Biology. 2019. Nov; 11(11):404-413. DOI: 10.1371/journal.pone.0220019.
3. **N. Movilla**, C. Borau, C. Valero and J.M. García-Aznar. *“Degradation of extracellular matrix regulates osteoblast migration: a microfluidic-based study”*. Bone. 2017. Feb; 107: 10-17. DOI: 10.1016/j.bone.2017.10.025.
4. Carlos Borau, Cristina del Amo, Jesús Asín, **Nieves Movilla**, Mar Condor, and José Manuel García-Aznar. *“A workbench for Biomedical Applications Based on Image Analysis”*. 2017. Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics book series (LNCVB, volume 27). DOI: 10.1007/978-3-319-68195-5\_59.
5. C. Del Amo, C. Borau, **N. Movilla**, Jesús Asín and J.M García-Aznar. *“Quantifying 3D chemotaxis in microfluidic-based chips with step gradients of collagen hydrogel concentrations”*. Integrative Biology. 2017. April 18;9 (4):339-349. DOI: 10.1039/c7ib00022g.

### **7.2. Contribuciones en conferencias y congresos**

1. C. Borau, C. Del Amo, J. Asín, **N. Movilla**, M. Córdor, J. M. García-Aznar. IMAGO: an online platform for microscopy image analysis in in-vitro experiments. Virtual Physiological Human Conference 2018- VPH for In Silico Medicine. 5-7 septiembre 2018, Zaragoza (España).

2. C. Borau, C. Del Amo, J. Asín, **N. Movilla**, M. Córdor, J.M. García-Aznar.  
Image-based quantification of 3D cell cultures in microfluidic devices: a step forward the validation of computational models.  
WCB2018-8th Word Congress of Biomechanics, 8-12 Julio 2018, Dublín (Irlanda).
3. C. Del Amo, J. Plou, **N. Movilla**, M. Córdor, V. Olivares, C. Borau, JM García-Aznar.  
Cultivos celulares en microfluídica: de migración individual a colectiva.  
TerCel. Red de Terapia Celular, enero 2018, Madrid.
4. C. Borau, C. Del Amo, **N. Movilla**, J.M. García-Aznar.  
Workbench for biomedical applications based on image analysis.  
VipIMAGE2017-VI ECCOMAS Thematic Conference on Computational Vision and Medical Image Processing. 18-20 octubre 2017, Oporto (Portugal).
5. C. Valero, C. Borau, J. Escribano, M. Córdor, J. Plou, **N. Movilla**, C. del Amo, JM García- Aznar.  
The biomechanics of cell motility: integration of experimental and numerical models.  
23<sup>rd</sup> Congress of the European Society of Biomechanics, 2017, Seville, Spain.
6. C. Del Amo, C. Borau, **N. Movilla**, J. Asín and JM. García-Aznar.  
Combining chemical gradients and material step gradients for 3D cell migration analysis.  
The 7<sup>th</sup> European Cell Mechanics Meeting, UK, 21-23 junio 2017.
7. JM. García-Aznar, **N. Movilla**, C. Valero, C. Borau. C. Del Amo.  
The role of matrix mechanics on 3D cell migration: from microfluidics to numerical modeling.  
Mechanical force in physiology and disease, CNIC, Madrid, noviembre 2016.
8. **N. Movilla**, C. del Amo, C. Borau, C. Valero, JM. García-Aznar.  
3D migration of human osteoblasts in microfluidic devices.  
European Orthopaedic Research Society 24th annual Meeting 2016, Bolonia, Italia.
9. Cristina del Amo, **Nieves Movilla**, Carlos Borau, José Manuel García-Aznar.  
Microfluidic-based experiments for 3D mesenchymal cell migration: impact of different mechano-chemical factors.  
EMBO workshop Stem cell mechanobiology in development and disease, Capri, Italy- October 18-21, 2015.

10. O. Moreno-Arotzena, C. Borau, **N. Movilla**, M. Vicente-Manzanares and J.M. García- Aznar.

The synergy between haptotactic cues and non-muscle myosin II regulates human fibroblasts migration in 3D.

6<sup>th</sup> European Cell Mechanic Meeting Cell Mech 2015, Barcelona, Spain.

### **7.3. Docencia**

1. *Dirección de trabajo fin de master (TFM)*

Estudiante: Alejandro Martín Contreras. Cocultivo en 3D de esferoides tumorales y fibroblastos en dispositivos de microfluídica. 2020/2021.

2. *Dirección de trabajo fin de master (TFM)*

Estudiante: Ijeoma Charity Asilebo. *In silico* modeling of single-cell fibroblast migration in response to 3D chemical gradients. 2019/2020.

3. *Codirección de prácticas universitarias curriculares*

Estudiante: Pilar Alamán Díez. Cultivos celulares 3D para contabilizar proliferación en células tumorales. 2018.

4. *Codirección de trabajo final de grado (TFG)*

Estudiante: Manuel Sáez Delgado. Estudio del comportamiento celular en 3D en una plataforma de microfluídica para aplicaciones en medicina regenerativa. 2014/2015.



## **APÉNDICE**

---



### **A.1. Marcaje del PDGF-BB con Alexa Fluor 647 para la estimación de la cantidad de factor químico unido al hidrogel de colágeno**

Los ensayos de haptotaxis y quimiotaxis propuestos en este trabajo han requerido el análisis del transporte de moléculas a lo largo de los hidrogeles de colágeno en los dispositivos microfluídicos. Está demostrado que existen uniones específicas de factores de crecimiento a proteínas de la matriz extracelular [332], tal y como hemos mencionado en el apartado 2.4.1 de material y métodos. En el apartado 3.1 de este trabajo se demostró como el factor de crecimiento PDGF-BB influyó en la migración de los fibroblastos de la monocapa, tanto en procesos de haptotaxis como de quimiotaxis.

El objetivo descrito en esta sección se centró en desarrollar un método para cuantificar la cantidad de PDGF-BB que se quedaba unido covalentemente al hidrogel de colágeno, y así poder distinguir entre un proceso haptotáctico y quimiotáctico.

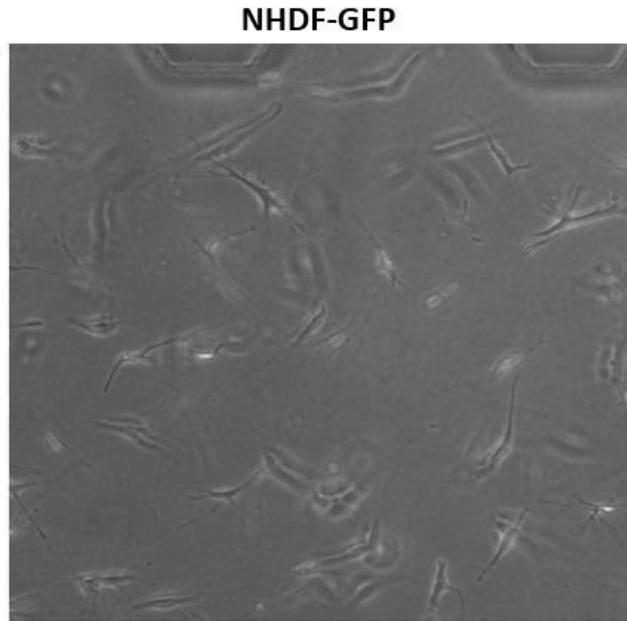
Para llevar a cabo este estudio, se procedió a la unión del PDGF-BB con el marcador Alexa Fluor 647, tal y como se describe en el apartado 2.4.1 de material y métodos. La concentración final aproximada obtenida de PDGF-BB-Alexa Fluor 647, fue de 0.87 mg/ml en PBS.

En primer lugar, se llevó a cabo una prueba de viabilidad de los osteoblastos HOB con una concentración de 5 ng/ml de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 durante 48 h y los resultados obtenidos indicaron que no afectaba a la viabilidad de las células. Para ello se comprobó que los fibroblastos mostraban una morfología elongada y aspecto normal en 3D, como se observa en la Figura A.1.1.

Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos de difusión con distintas concentraciones crecientes del PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en hidrogeles de 2.5 mg/ml de colágeno, en el dispositivo microfluídico que se muestra en la Figura A.1.2.

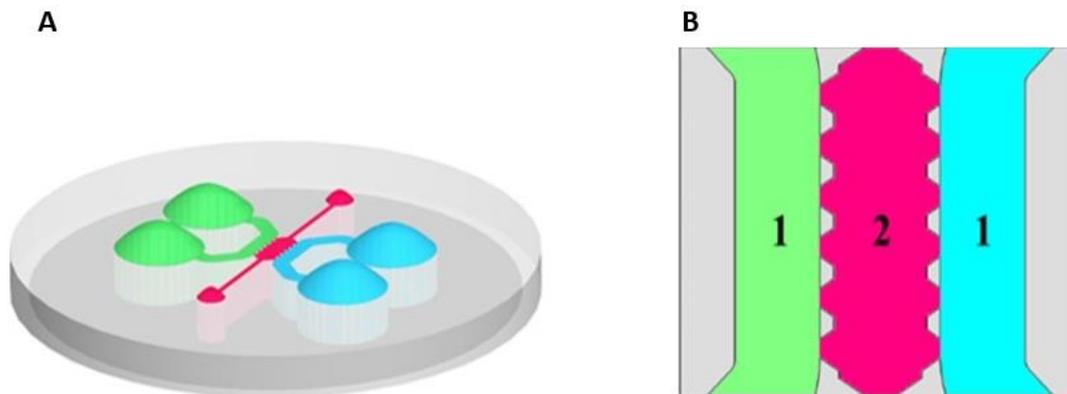
Los primeros experimentos se llevaron a cabo con concentraciones de 5, 50 y 100 ng/ml de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml, aplicando el factor químico en el canal de adición 1 (verde). Se tomaron imágenes con distintas exposiciones para intentar detectar la fluorescencia emitida por Alexa Fluor 647, con el filtro Cy5 del microscopio Nikon D-Eclipse, pero no se pudo detectar ninguna emisión.

Lo mismo sucedió con concentraciones de 0.5, 1 y 2 ng/ $\mu$ l en las que tampoco se detectó fluorescencia.



**Figura A.1.1. Morfología de los fibroblastos NHDF-BB en presencia de PDGF-BB-Alexa Fluor 647**

La imagen muestra la morfología de los fibroblastos en presencia de 5 ng/ml de PDGF-BB-Alexa Fluor 647, al cabo de 48 h, en hidrogeles de 2.5 mg/ml.

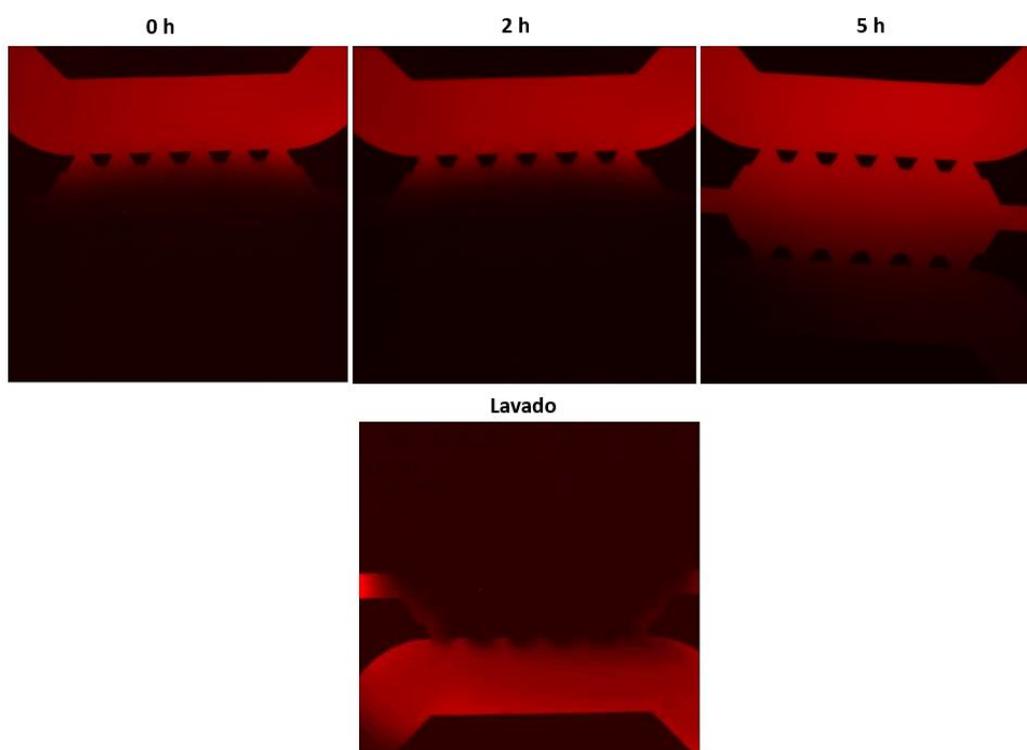


**Figura A.1.2. Geometría del dispositivo microfluídico**

En la imagen (A) se muestra una vista general del dispositivo microfluídico, y en la imagen (B) se detalla el área central de la geometría. Los canales principales están representados por el número 1 y el hidrogel se inyecta en la cavidad central (2), cuyas dimensiones son 2.5 x 1.3 mm. Cuando se agrega el PDGF-BB-Alexa Fluor 647 para establecer un gradiente químico, se añade en el canal de adición (verde) y se difunde a través del hidrogel hacia el canal opuesto (azul). *Imagen tomada de [333].*

Se procedió a incrementar la concentración a 5 y 10 ng/ $\mu$ l y los resultados obtenidos en ambos casos indicaron que se puede detectar fluorescencia emitida por

Alexa Fluor 647 con exposiciones de 2 s. Se tomaron imágenes a distintos tiempos (0, 2 y 5 h) hasta que el factor químico difundió a través de todo el hidrogel de colágeno. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió al lavado del hidrogel (tres veces con PBS) y se volvieron a tomar imágenes para detectar la posible unión del factor químico al hidrogel. Los resultados obtenidos después del lavado indicaron que no se puede detectar el factor químico unido al hidrogel de colágeno, como se observa en la Figura A.1.3.

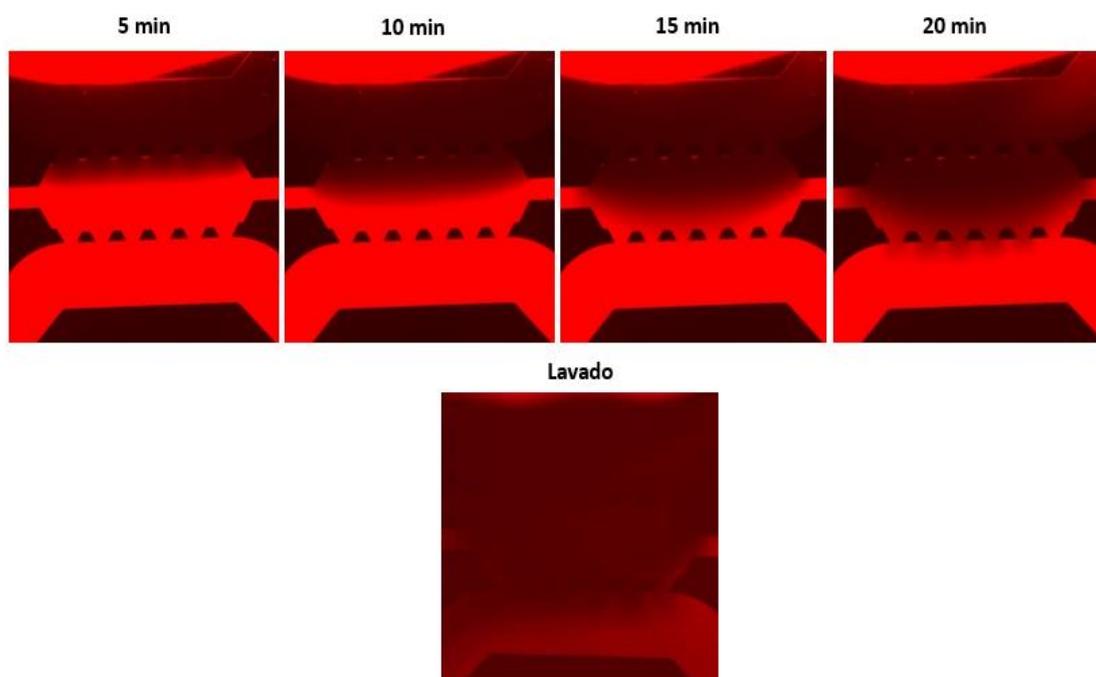


**Figura A.1.3. Perfil de difusión de la molécula de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en la concentración de 5 ng/ $\mu$ l a través del hidrogel de colágeno de 2.5 mg/ml**

El PDGF-BB-Alexa Fluor 647 se inyectó en el canal de adición del dispositivo microfluídico, y el patrón de difusión se analizó a tiempo 0, 2 y 5 h (panel superior). Posteriormente fue lavado tres veces con PBS para eliminar el factor químico no adherido (panel inferior). Las imágenes fueron tomadas con 2 s de exposición, aumentando el contraste para poder visualizar mejor la fluorescencia, con el filtro Cy5 del microscopio Nikon D-Eclipse, con el objetivo 5X.

En la Figura A.1.4 se muestra el seguimiento del proceso de lavado del PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en los hidrogeles de 2.5 mg/ml. La concentración utilizada de factor químico en este experimento fue de 10 ng/ $\mu$ l y la toma de imágenes se llevó a cabo cada 5 min, incrementando la exposición a 30 s para poder visualizar mejor la fluorescencia.

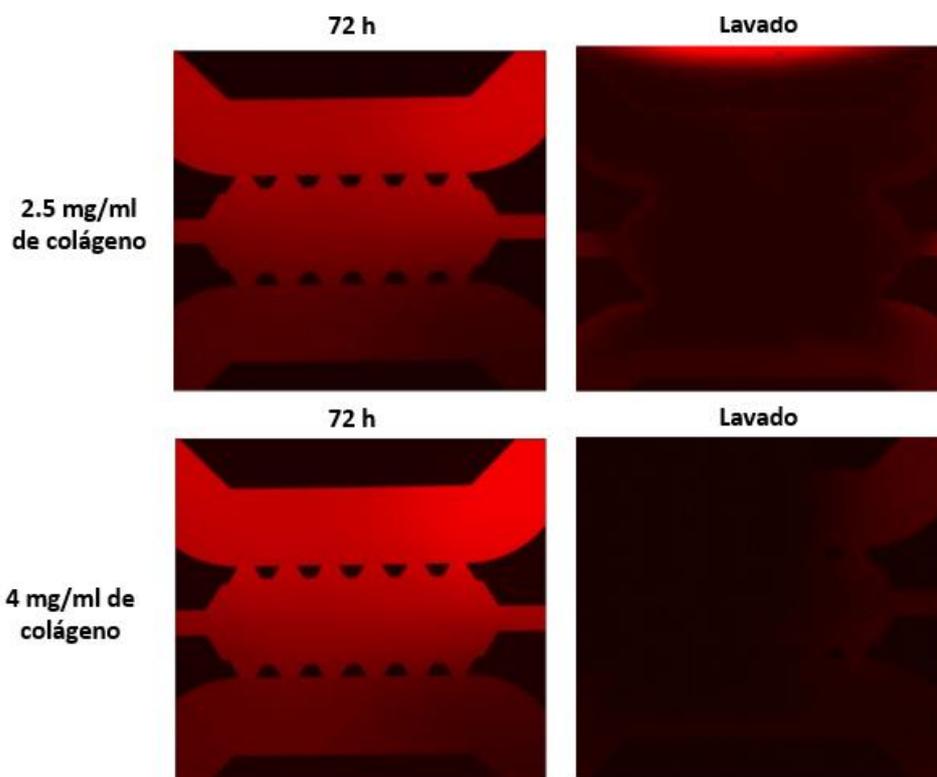
El resultado obtenido de nuevo es que no se detecta ninguna unión del factor químico al hidrogel de colágeno.



**Figura A.1.4. Proceso de lavado de la molécula de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en la concentración de 10 ng/ $\mu$ l a través del hidrogel de colágeno de 2.5 mg/ml**

Las imágenes muestran el lavado del PDGF-BB-Alexa 647 no adherido al hidrogel de colágeno al cabo de 5, 10, 15 y 20 min (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen del hidrogel lavado tres veces con PBS para eliminar el factor químico no adherido. Las imágenes se tomaron con 30 s de exposición, aumentando el contraste para poder visualizar mejor la fluorescencia, con el filtro Cy5 del microscopio Nikon D-Eclipse, con el objetivo 5X.

Para comprobar si la unión del factor químico se favorecía con mayor tiempo de incubación se dejó difundir el PDGF-BB-Alexa Fluor 647, a una concentración de 10 ng/ $\mu$ l, durante 72 h en hidrogeles de 2.5 y 4 mg/ml. Posteriormente, se procedió a eliminar el factor no adherido mediante dos lavados con PBS y los resultados obtenidos fueron similares a las condiciones anteriormente analizadas, y se muestran en la Figura A.1.5.



**Figura A.1.5. Difusión de la molécula de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 en hidrogeles de colágeno de 2.5 y 4 mg/ml**

Las imágenes muestran la difusión del PDGF-BB-Alexa Fluor 647, a una concentración de 10 ng/ $\mu$ l, al cabo de 72 h y su posterior eliminación mediante lavados del factor químico no adherido en hidrogeles de colágeno de 2.5 mg/ml (panel superior) y de 4 mg/ml (panel inferior). Las imágenes fueron tomadas con 2 s de exposición, aumentando el contraste para poder visualizar mejor la fluorescencia, con el filtro Cy5 del microscopio Nikon D-Eclipse, con el objetivo 5X.

Finalmente, se decidió comprobar la concentración y la posible degradación del PDGF-BB-Alexa Fluor 647 mediante un análisis de la proteína en una electroforesis en gel de poliácridamida. Para ello se llevó a cabo una colaboración con el Dr. José Alberto Carrodegua, investigador del Instituto Universitario de Investigación de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) y los resultados obtenidos muestran que el PDGF-BB-Alexa Fluor 647 migra en el gel de acrilamida con una movilidad compatible con la de un tetrámero, mayoritariamente, con un peso molecular aproximado entorno a los 55 KDa, tal y como se puede observar en la Figura A.1.6. La proteína activa de PDGF-BB es un dímero de 24.9 KDa, por lo que estos resultados tendrían que ser analizados más a fondo, ya que este tamaño puede influir en la difusión de la proteína en el hidrogel de colágeno.

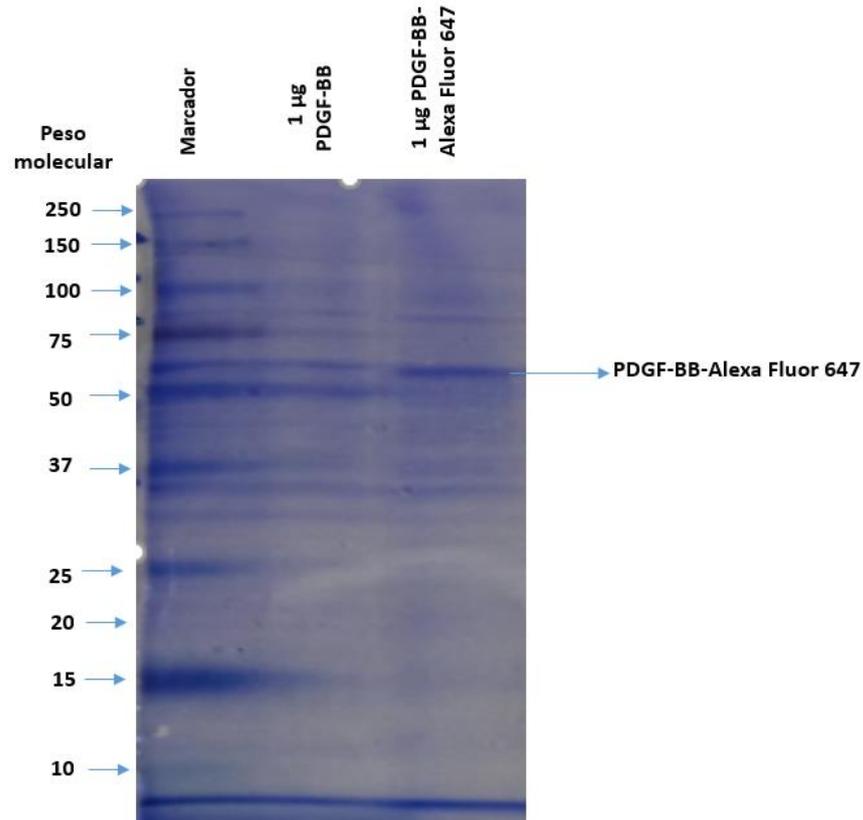


Figura A.1.6. Análisis del PDGF-BB-Alexa Fluor 647 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizó la carga de 1 µg de factor químico PDGF-BB y 1 µg de PDGF-BB Alexa Fluor 647 en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) que fue teñido con azul de Coomassie, para detectar las proteínas en el gel.

### Resultados y conclusión

Los resultados obtenidos de los experimentos de difusión con distintas concentraciones de PDGF-BB-Alexa Fluor 647 para intentar estimar la cantidad de factor químico unido a la matriz de colágeno no fueron concluyentes, ya que no se ha podido detectar ninguna señal de factor adherido a la misma. Estos experimentos, sin embargo, permitieron demostrar cómo el factor químico es capaz de difundir a lo largo de todo el hidrogel de colágeno hasta el canal opuesto al de adición del factor, lo que permite la estimulación mediante el gradiente de PDGF-BB de los fibroblastos de la monocapa.

## **A.2. Estudio del efecto de los entrecruzantes en los hidrogeles de colágeno**

Los hidrogeles de colágeno son redes tridimensionales con capacidad de absorber agua, además de ser aptos para el crecimiento celular, retener moléculas bioactivas y tener facilidad para transferir nutrientes [195]. Estos hidrogeles, por lo tanto, presentan una alta biocompatibilidad para utilizarlos en la reparación de tejidos dañados, tanto a nivel de curación de heridas como de regeneración ósea [334], [335]. Sin embargo, para su aplicación en la ingeniería tisular y biomedicina, es necesario mejorar su estabilidad estructural y mecánica, debido a su capacidad de degradación por diferentes entornos biológicos, y para ello se utilizan distintos agentes entrecruzantes [336].

Durante este trabajo se han utilizado varios métodos de entrecruzamiento enzimático, lo cual implica la formación de enlaces covalentes entre moléculas dando más estabilidad a los hidrogeles de colágeno y evitando la contracción de los mismos. Los agentes entrecruzantes que se han analizado fueron GA, LOX y TG2. Los hidrogeles de colágeno se prepararon siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3 de material y métodos y la adición del entrecruzante, a la concentración deseada, se efectuó durante la preparación del hidrogel.

Los primeros experimentos se llevaron a cabo con glutaraldehído (Sigma, G7526), un agente químico que reacciona directamente con las aminas primarias de los residuos de los aminoácidos lisina e hidroxilisina de las cadenas de proteínas, especialmente del colágeno.

En primer lugar, se analizó la citotoxicidad del GA utilizando fibroblastos y osteoblastos primarios humanos en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml. El análisis de citotoxicidad se realizó con una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml en los hidrogeles en los dispositivos microfluídicos, durante 96 h. La viabilidad a distintas concentraciones de GA se muestra en la Tabla A.2.1.

Tabla A.2.1. Análisis de citotoxicidad del GA en fibroblastos y osteoblastos primarios

GA (%)	LÍNEA CELULAR	VIABILIDAD 96 H
0.1	Fibroblastos-GFP	No
0.01	Fibroblastos-GFP	No
0.005	Fibroblastos-GFP	No
$2.5 \times 10^{-3}$	Fibroblastos-GFP/ Osteoblastos	Células muy redondeadas
$12.5 \times 10^{-4}$	Fibroblastos-GFP	Células muy redondeadas
$6.25 \times 10^{-4}$	Fibroblastos-GFP	Sí
$3.12 \times 10^{-4}$	Fibroblastos-GFP	Sí

La viabilidad de los fibroblastos con las distintas concentraciones de GA mostrada en la Tabla A.2.1 se comprobó mediante análisis morfológico y fluorescencia producida por la proteína verde fluorescente (GFP), donde parte de las células presentaban una morfología esférica sin ramificaciones (células muy redondeadas) aparentemente vivas pero en mal estado o muriéndose, por el contrario, los fibroblastos sin el entrecruzante GA eran alargados y con ramificaciones en las mismas condiciones (Figura A.2.1).

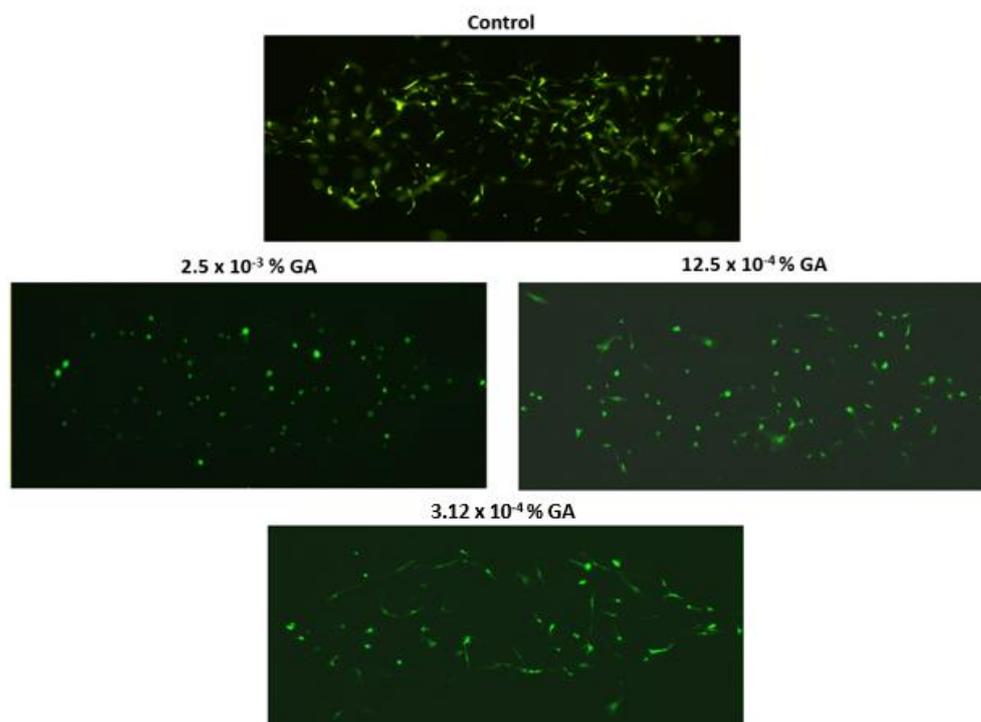
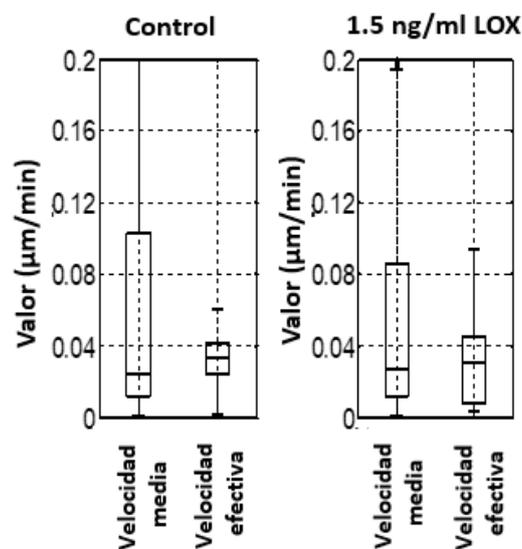


Figura A.2.1. Viabilidad de los fibroblastos, en hidrogel de colágeno de 2 mg/ml, tratados con distintas concentraciones de GA

Las imágenes muestran la viabilidad de los fibroblastos en concentraciones decrecientes de GA ( $2.5 \times 10^{-3}$ ,  $12.5 \times 10^{-4}$  y  $3.12 \times 10^{-4}$  %) comparadas con fibroblastos sin entrecruzante (control) y fueron tomadas con el microscopio Nikon D-Eclipse C1, al cabo de 96 h, con fluorescencia con el objetivo 10X.

En segundo lugar, se analizó el efecto del entrecruzante LOX (Sigma, SRP0179) con fibroblastos primarios humanos en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml. LOX es una quinoenzima que contiene cobre y lisil-tirosilquinona como cofactor y desempeña un papel decisivo en la biogénesis de las matrices de tejido conectivo, mediante el entrecruzamiento de las proteínas de la matriz extracelular como son el colágeno o la elastina.

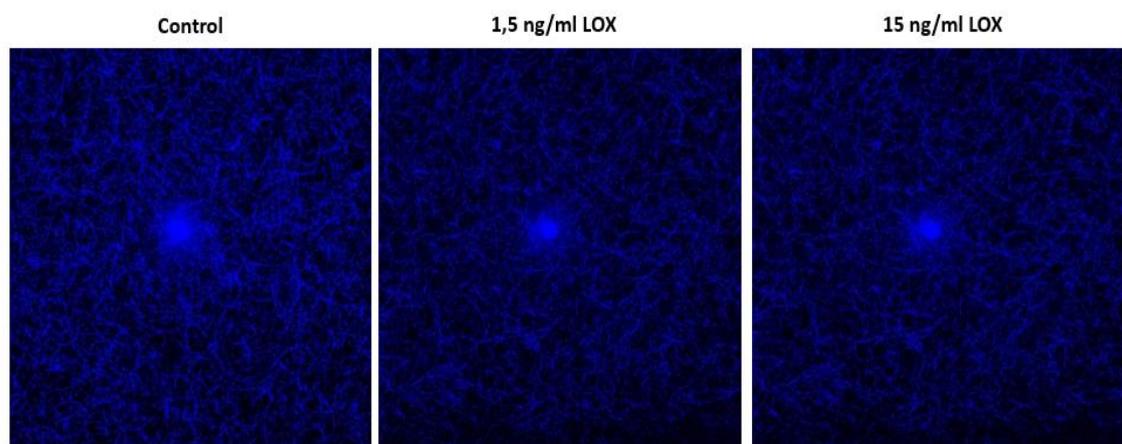
Para el análisis llevado a cabo con LOX se utilizaron concentraciones de 1.5 y 15 ng/ml, en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml con una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml. La viabilidad de las células a las 24 h, basada en la morfología, fue similar a las células control con las dos concentraciones. Se procedió a continuación a realizar un ensayo de migración *in vivo*, durante 24 h, para ver si la velocidad de migración estaba afectada y si la adición del entrecruzante mejoraba la estabilidad estructural de los hidrogeles. Los resultados obtenidos mostraron que las velocidades de migración media y efectiva eran muy similares en el control y con la concentración de 1.5 ng/ml de LOX (Figura A.2.2). La concentración de 15 ng/ml no se pudo analizar porque los fibroblastos sembrados en los hidrogeles de colágeno habían desprendido los hidrogeles de los postes de la cámara central del dispositivo microfluídico, lo que indica que la estabilidad estructural no se vio favorecida por la presencia de LOX.



**Figura A.2.2.** Velocidad media y efectiva de migración de los fibroblastos con LOX

Se utilizaron hidrogeles de 2 mg/ml de colágeno con 1.5 ng/ml de LOX. Se llevó a cabo un experimento con tres réplicas técnicas en cada condición.

De manera simultánea, se llevaron a cabo análisis mediante microscopía confocal de reflexión para ver la disposición de las fibras de colágeno en los hidrogeles entrecruzados con LOX. Este tipo de microscopía es una microscopía óptica basada en reflexiones que sufre el rayo incidente de luz polarizada al cruzar diferentes materiales, cada uno con su índice de refracción específico. Esta técnica, gracias a su alta resolución y contraste, permite ver las fibras de colágeno [337]. Los resultados obtenidos no muestran una diferencia clara en la orientación o la distribución de las fibras de colágeno, tal y como podemos observar en la Figura A.2.3.



**Figura A.2.3. Imágenes de microscopía de reflexión en hidrogeles de colágeno de 2 mg/ml**

Sección transversal de un hidrogel de colágeno de 2 mg/ml, sin y con 1.5 y 15 ng/ml del entrecruzante LOX. Las imágenes se tomaron con el microscopio Nikon D-Eclipse C1 con el objetivo Plan Apo VC 60XH.

En tercer lugar, se analizó el efecto del agente entrecruzante TG2 (RD Systems, 4376-TG-050), una enzima multifuncional con actividad entrecruzante que cataliza enlaces covalentes entre el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina y el grupo  $\gamma$ -carboxilo de un residuo de glutamina, que afecta a las interacciones célula-matriz, a la migración y a la reorganización celular y de la matriz extracelular. TG2 es capaz de entrecruzar una gran variedad de proteínas como colágeno, elastina, fibronectina y laminina, entre otras. El entrecruzamiento del colágeno con TG2 lo vuelve más resistente a las proteasas estabilizando la matriz extracelular.

Los experimentos llevados a cabo con TG2 emplearon osteoblastos humanos sembrados a una densidad de  $0.5 \times 10^5$  células/ml, en hidrogeles de colágeno de 2 y 2.5 mg/ml. Inicialmente se empezó con una concentración de 10  $\mu$ g/ml de TG2 y se comprobó la viabilidad de los osteoblastos, al igual que en los casos anteriores,

mediante análisis morfológico, y no se encontró variación en la misma. Los resultados que se obtuvieron, relativos a la estabilidad estructural de los hidrogeles de colágeno, indicaron que con la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de TG2 los hidrogeles se desprendían de los postes debido a la fuerza ejercida por los osteoblastos. Para intentar solventar la estabilidad de los hidrogeles se procedió a aumentar, por un lado, la concentración de TG2 a 25  $\mu\text{g/ml}$  y, por otro, la de los hidrogeles a 4  $\text{mg/ml}$ . Los resultados que se obtuvieron fueron alta viabilidad en dicha concentración de TG2, y además los hidrogeles eran mucho más estables, con mayor alineamiento de las fibras de colágeno. La cuantificación del alineamiento de fibras de colágeno se llevó a cabo como se indica en el apartado 2.7 de material y métodos. A continuación, se analizó la concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de TG2 y los resultados obtenidos tanto a nivel de viabilidad como de alineamiento de fibras de colágeno indicaron que no existe una diferencia significativa con los tratados con 25  $\mu\text{g/ml}$ , tal y como se puede observar en la Figura 3.36 y en la Figura 3.32.

### **Resultados y discusión**

Los resultados obtenidos del análisis de los distintos entrecruzantes (GA, LOX y TG2) en los hidrogeles de colágeno, relativos a la viabilidad de las células y a la de la estabilidad de los hidrogeles, llevaron a seleccionar el entrecruzante TG2 para realizar los experimentos que se muestran en este trabajo. Las concentraciones utilizadas fueron 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de TG2, las cuales no afectan a la viabilidad de las células analizadas y proporcionan estabilidad a los hidrogeles, así como un mayor alineamiento de las fibras de colágeno, lo cual favorece los ensayos de migración en los dispositivos microfluídicos.

### **A.3. Análisis de la degradación de la matriz de colágeno mediante DQ colágeno**

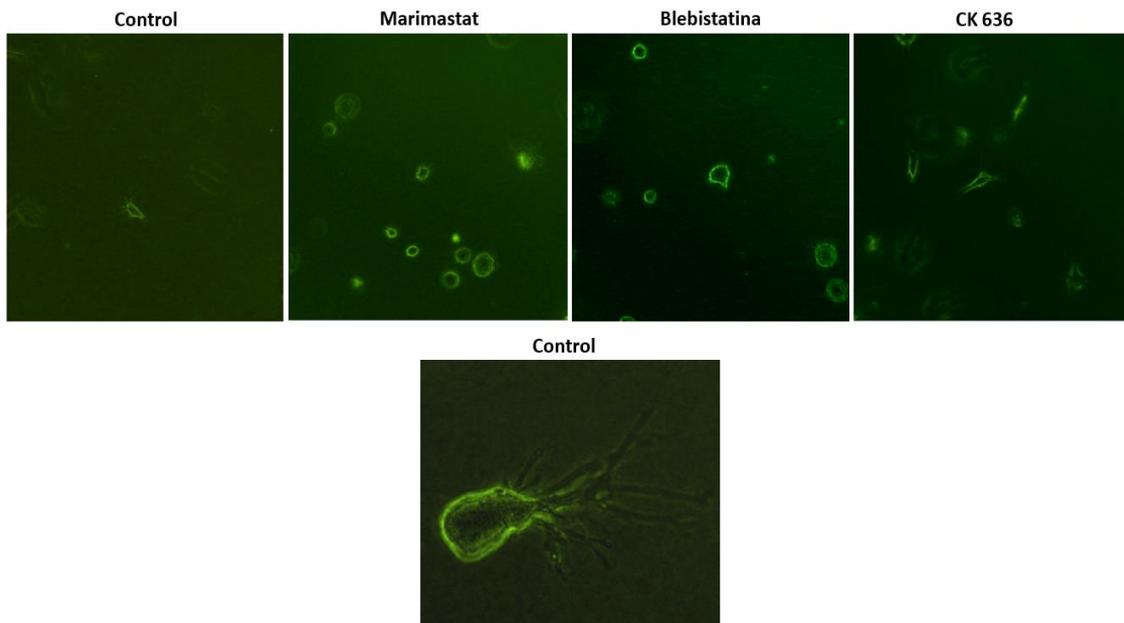
El microambiente celular donde se encuentran las proteínas de la matriz extracelular está en constante renovación y modificación. Durante el crecimiento y la migración celular, las células remodelan su microambiente a través de la degradación proteolítica de la matriz extracelular [13]. Por esta razón, es crucial el analizar la degradación proteolítica de la matriz extracelular por las células vivas para comprender muchos aspectos de la motilidad celular en muchos procesos biológicos, incluido el cáncer [338].

Para poder analizar esta degradación de la matriz *in vitro* mediante imágenes se ha llevado a cabo un ensayo que permite medir cuantitativamente la proteólisis extracelular asociada a la degradación de la matriz extracelular que rodea a las células. Este ensayo está basado en el cultivo de las células en presencia de un sustrato proteico fluorescente no activado, el DQ colágeno, el cual se mezcla con la matriz de colágeno. Las células comenzarán a degradar los sustratos DQ poco después de la siembra, permitiendo que comiencen a emitir fluorescencia, la cual refleja el nivel de proteólisis producido por las células. Mediante microscopía confocal, se detecta la fluorescencia y se realiza una medición de la degradación proteolítica en 3D [338].

Estos experimentos se llevaron a cabo con DQ colágeno tipo I conjugado con fluoresceína (ThermoFisher, D12060) para analizar la degradación del colágeno producida por los osteoblastos humanos. Se prepararon hidrogeles de 4 mg/ml siguiendo el protocolo del apartado 2.3 de material y métodos, añadiendo 10  $\mu$ l de DQ colágeno y obteniendo una concentración final de 25  $\mu$ g/ml [338]. Las distintas condiciones analizadas consistieron en la utilización de osteoblastos control con los inhibidores de la miosina II (blebistatina), del complejo Arp2/3 (CK 636) y del inhibidor de las metaloproteasas de la matriz (marimastat), a concentraciones de 30, 100 y 10  $\mu$ M, respectivamente.

Los resultados obtenidos mostraron mucha fluorescencia alrededor del cuerpo celular casi desde el inicio de la siembra, lo cual hace sospechar que el sustrato DQ no estuviese en buen estado, ya que es un producto bastante sensible. La Figura A.3.1

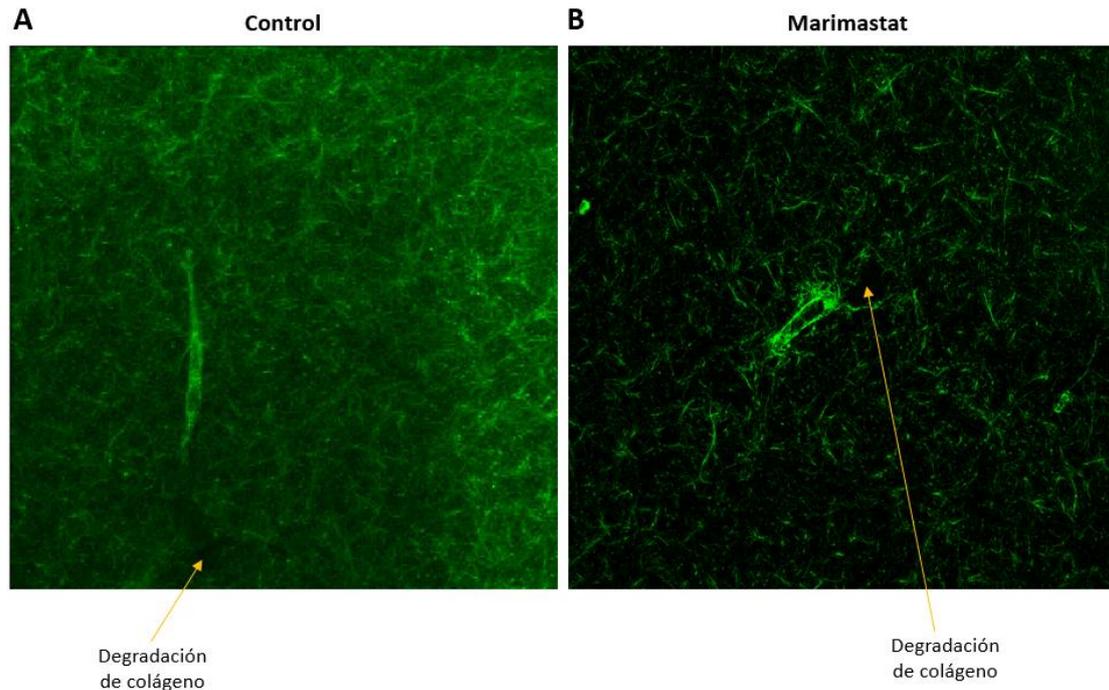
muestra los osteoblastos al cabo de 24 h en las distintas condiciones analizadas. Se puede apreciar, como se ha mencionado anteriormente, la señal del DQ colágeno alrededor de todo el cuerpo celular en las distintas condiciones, lo que sugiere que podía estar alterado.



**Figura A.3.1. Análisis de la proteólisis extracelular en osteoblastos cultivados en DQ colágeno en distintas condiciones**

Las imágenes muestran la degradación de los osteoblastos cultivados en DQ colágeno en hidrogeles de 4 mg/ml, al cabo de 24 h, en condiciones control y con los inhibidores marimastat, blebistatina y CK-636 (panel superior). La señal de degradación del DQ colágeno (verde) está presente alrededor de todo el cuerpo de la célula. En el panel inferior, se muestra un osteoblasto a las 24 h donde se aprecia la fluorescencia alrededor del cuerpo celular. Las imágenes se tomaron con el microscopio Nikon D-Eclipse C1 con el objetivo 20X (panel superior) y 40X (panel inferior).

El cultivo de osteoblastos en presencia del DQ colágeno se mantuvo durante 168 h, y se procedió a la toma de imágenes con el microscopio confocal Zeiss LSM 880 de alta resolución. El análisis de las imágenes permitió la visualización de las fibras de colágeno, además de los osteoblastos. Cabe destacar que el DQ colágeno no se utiliza habitualmente para visualización de las fibras, sino para medir la degradación de la matriz por las células [338]. La Figura A.3.2 muestra las zonas degradadas por los osteoblastos (zonas negras), lo que sugiere que van degradando la matriz extracelular a medida que se produce la migración.



**Figura A.3.2. Análisis de la proteólisis extracelular en osteoblastos cultivados en DQ colágeno al cabo de 168 h**

Se muestra la degradación de la matriz por los osteoblastos cultivados en DQ colágeno en hidrogeles de 4 mg/ml, en las condiciones control (A) y con marimastat (B). La señal de degradación del DQ colágeno (verde) está presente alrededor de todo el cuerpo de la célula incluidos los brazos principales y las ramificaciones, así como en las fibras de la matriz. Las zonas negras mostradas con flechas naranjas corresponden a zonas donde los osteoblastos han degradado la matriz extracelular para poder migrar, siendo más significativas en los osteoblastos control que en los tratados con el inhibidor de metaloproteasas. Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con el objetivo 20X.

## **Resultados y discusión**

Los resultados obtenidos del análisis de la degradación de la matriz mediada por DQ colágeno sugieren que el reactivo podía estar alterado, debido a la cantidad de fluorescencia detectada alrededor de las células y en la matriz de colágeno, casi desde el momento de la siembra; sin embargo, esta fluorescencia de las fibras de colágeno por efecto del DQ colágeno permitió visualizar claramente la degradación que producen los osteoblastos en la matriz de colágeno durante su migración, al cabo de 168h.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- [1] J. B. Beltman, A. F. M. Marée, and R. J. De Boer, "Analysing immune cell migration," *Nature Reviews Immunology*. 2009, doi: 10.1038/nri2638.
- [2] F. Spill, V. Andasari, M. Mak, R. D. Kamm, and M. H. Zaman, "Effects of 3D geometries on cellular gradient sensing and polarization," *Phys. Biol.*, 2016, doi: 10.1088/1478-3975/13/3/036008.
- [3] H. R. Bourne and O. Weiner, "Cell polarity: A chemical compass," *Nature*, 2002, doi: 10.1038/419021a.
- [4] O. D. Weiner, "Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: The chemotactic compass," *Current Opinion in Cell Biology*. 2002, doi: 10.1016/S0955-0674(02)00310-1.
- [5] A. Bergman, J. S. Condeelis, and B. Gligorijevic, "Invadopodia in context," *Cell Adhesion and Migration*. 2014, doi: 10.4161/cam.28349.
- [6] A. Diz-Muñoz *et al.*, "Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment," *PLoS Biol.*, 2010, doi: 10.1371/journal.pbio.1000544.
- [7] J. S. Harunaga and K. M. Yamada, "Cell-matrix adhesions in 3D," *Matrix Biology*. 2011, doi: 10.1016/j.matbio.2011.06.001.
- [8] J. A. Broussard, N. L. Diggins, S. Hummel, W. Georgescu, V. Quaranta, and D. J. Webb, "Automated analysis of cell-matrix adhesions in 2D and 3D environments," *Sci. Rep.*, 2015, doi: 10.1038/srep08124.
- [9] A. D. Doyle and K. M. Yamada, "Mechanosensing via cell-matrix adhesions in 3D microenvironments," *Experimental Cell Research*. 2016, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.033.
- [10] M. Poujade *et al.*, "Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, doi: 10.1073/pnas.0705062104.
- [11] W. J. Rappel and L. Edelstein-Keshet, "Mechanisms of cell polarization," *Current Opinion in Systems Biology*. 2017, doi: 10.1016/j.coisb.2017.03.005.
- [12] M. Lee and V. Vasioukhin, "Cell polarity and cancer - Cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor," *J. Cell Sci.*, 2008, doi: 10.1242/jcs.016634.
- [13] P. Friedl and K. Wolf, "Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms," *Nature Reviews Cancer*. 2003, doi: 10.1038/nrc1075.

- [14] R. Poincioux, F. Lizárraga, and P. Chavrier, "Matrix invasion by tumour cells: A focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia," *J. Cell Sci.*, 2009, doi: 10.1242/jcs.034561.
- [15] E. Frittoli, A. Palamidessi, A. Disanza, and G. Scita, "Secretory and endo/exocytic trafficking in invadopodia formation: The MT1-MMP paradigm," *European Journal of Cell Biology*. 2011, doi: 10.1016/j.ejcb.2010.04.007.
- [16] K. Wolf *et al.*, "Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis," *J. Cell Biol.*, 2003, doi: 10.1083/jcb.200209006.
- [17] L. J. Kaufman *et al.*, "Glioma expansion in collagen I matrices: Analyzing collagen concentration-dependent growth and motility patterns," *Biophys. J.*, 2005, doi: 10.1529/biophysj.105.061994.
- [18] R. C. Nayak, K. H. Chang, N. S. Vaitinadin, and J. A. Cancelas, "Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells," *Immunol. Rev.*, 2013, doi: 10.1111/imr.12119.
- [19] C. D. Nobes and A. Hall, "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement," *J. Cell Biol.*, 1999, doi: 10.1083/jcb.144.6.1235.
- [20] A. J. Ridley and A. Hall, "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors," *Cell*, 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90163-7.
- [21] T. Kunschmann, S. Puder, T. Fischer, A. Steffen, K. Rottner, and C. T. Mierke, "The Small GTPase Rac1 Increases Cell Surface Stiffness and Enhances 3D Migration Into Extracellular Matrices," *Sci. Rep.*, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43975-0.
- [22] M. Parri and P. Chiarugi, "Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control," *Cell Communication and Signaling*. 2010, doi: 10.1186/1478-811X-8-23.
- [23] A. J. Ridley and A. Hall, "Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase.," *EMBO J.*, 1994, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06550.x.
- [24] A. Pathak and S. Kumar, "Biophysical regulation of tumor cell invasion: Moving beyond matrix stiffness," *Integrative Biology*. 2011, doi: 10.1039/c0ib00095g.
- [25] A. J. Ridley, "Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility," *FEBS Letters*. 2001, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02481-4.

- [26] X. R. Bustelo, "Vav family exchange factors: An integrated regulatory and functional view," *Small GTPases*. 2014, doi: 10.4161/21541248.2014.973757.
- [27] D. R. Spurrell *et al.*, "Vav1 Regulates the Migration and Adhesion of Dendritic Cells," *J. Immunol.*, 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0802096.
- [28] B. P. Liu and K. Burridge, "Vav2 Activates Rac1, Cdc42, and RhoA Downstream from Growth Factor Receptors but Not  $\beta$ 1 Integrins," *Mol. Cell. Biol.*, 2000, doi: 10.1128/mcb.20.19.7160-7169.2000.
- [29] C. Citterio *et al.*, "The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells," *Sci. Signal.*, 2012, doi: 10.1126/scisignal.2002962.
- [30] G. A. Cardama, N. Gonzalez, J. Maggio, P. Lorenzano Menna, and D. E. Gomez, "Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review)," *Int. J. Oncol.*, 2017, doi: 10.3892/ijo.2017.4093.
- [31] A. J. Ridley *et al.*, "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back," *Science*. 2003, doi: 10.1126/science.1092053.
- [32] P. Friedl, S. Borgmann, and E. B. Bröcker, "Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement.," *J. Leukoc. Biol.*, 2001, doi: 10.1189/jlb.70.4.491.
- [33] T. Lämmermann and M. Sixt, "Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration," *Current Opinion in Cell Biology*. 2009, doi: 10.1016/j.ceb.2009.05.003.
- [34] E. Sahai and C. J. Marshall, "Differing modes for tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis," *Nat. Cell Biol.*, 2003, doi: 10.1038/ncb1019.
- [35] J. B. Wyckoff, S. E. Pinner, S. Gschmeissner, J. S. Condeelis, and E. Sahai, "ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo," *Curr. Biol.*, 2006, doi: 10.1016/j.cub.2006.05.065.
- [36] J. L. Orgaz *et al.*, "Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration," *Nat. Commun.*, 2014, doi: 10.1038/ncomms5255.
- [37] E. K. Paluch and E. Raz, "The role and regulation of blebs in cell migration," *Current Opinion in Cell Biology*. 2013, doi: 10.1016/j.ceb.2013.05.005.

- [38] P. Friedl, K. S. Zänker, and E. B. Bröcker, "Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function," *Microscopy Research and Technique*. 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19981201)43:5<369::AID-JEMT3>3.0.CO;2-6.
- [39] P. Friedl and D. Gilmour, "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, doi: 10.1038/nrm2720.
- [40] P. Friedl and K. Wolf, "Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model," *Journal of Cell Biology*. 2010, doi: 10.1083/jcb.200909003.
- [41] G. Haemmerli, B. Arnold, and P. Sträuli, "Cellular motility on glass and in tissues: Similarities and dissimilarities," *Cell Biol. Int. Rep.*, 1983, doi: 10.1016/0309-1651(83)90199-6.
- [42] M. L. Taddei, E. Giannoni, G. Comito, and P. Chiarugi, "Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out," *Cancer Letters*. 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.042.
- [43] P. Friedl and R. Mayor, "Tuning collective cell migration by cell-cell junction regulation," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a029199.
- [44] D. A. Lauffenburger, "Making connections count," *Nature*. 1996, doi: 10.1038/383390a0.
- [45] J. Plou, Y. Juste-Lanas, V. Olivares, C. del Amo, C. Borau, and J. M. García-Aznar, "From individual to collective 3D cancer dissemination: roles of collagen concentration and TGF- $\beta$ ," *Sci. Rep.*, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30683-4.
- [46] R. Riahi, Y. Yang, D. D. Zhang, and P. K. Wong, "Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration," *Journal of Laboratory Automation*. 2012, doi: 10.1177/2211068211426550.
- [47] O. Iliina and P. Friedl, "Mechanisms of collective cell migration at a glance," *J. Cell Sci.*, 2009, doi: 10.1242/jcs.036525.
- [48] S. Alexander, G. E. Koehl, M. Hirschberg, E. K. Geissler, and P. Friedl, "Dynamic imaging of cancer growth and invasion: A modified skin-fold chamber model," *Histochem. Cell Biol.*, 2008, doi: 10.1007/s00418-008-0529-1.

- [49] C. M. Niessen, "Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function," *Journal of Investigative Dermatology*. 2007, doi: 10.1038/sj.jid.5700865.
- [50] Y. Kametani and M. Takeichi, "Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions," *Nat. Cell Biol.*, 2007, doi: 10.1038/ncb1520.
- [51] E. W. Thompson and E. D. Williams, "EMT and MET in carcinoma - Clinical observations, regulatory pathways and new models," *Clinical and Experimental Metastasis*. 2008, doi: 10.1007/s10585-008-9189-8.
- [52] H. Cousin, "Cadherins function during the collective cell migration of Xenopus Cranial Neural Crest cells: revisiting the role of E-cadherin," *Mechanisms of Development*. 2017, doi: 10.1016/j.mod.2017.04.006.
- [53] D. J. Montell, "Border-cell migration: The race is on," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003, doi: 10.1038/nrm1006.
- [54] A. Ghysen and C. Dambly-Chaudière, "The lateral line microcosmos," *Genes and Development*. 2007, doi: 10.1101/gad.1568407.
- [55] A. Haeger, K. Wolf, M. M. Zegers, and P. Friedl, "Collective cell migration: Guidance principles and hierarchies," *Trends in Cell Biology*. 2015, doi: 10.1016/j.tcb.2015.06.003.
- [56] R. Mayor and S. Etienne-Manneville, "The front and rear of collective cell migration," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016, doi: 10.1038/nrm.2015.14.
- [57] Y. L. Chen *et al.*, "Interferon-stimulated gene 15 modulates cell migration by interacting with Rac1 and contributes to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma cells," *Oncogene*, 2019, doi: 10.1038/s41388-019-0731-8.
- [58] B. Trappmann, B. M. Baker, W. J. Polacheck, C. K. Choi, J. A. Burdick, and C. S. Chen, "Matrix degradability controls multicellularity of 3D cell migration," *Nat. Commun.*, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00418-6.
- [59] S. Lehmann *et al.*, "Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells," *Curr. Biol.*, 2017, doi: 10.1016/j.cub.2016.11.057.
- [60] B. Alberts, *Biología Molecular de la Célula*. 2016.

- [61] Y. Shintani, Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M. J. Wheelock, and K. R. Johnson, "Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor," *J. Cell Biol.*, 2008, doi: 10.1083/jcb.200708137.
- [62] A. Boussoimmier-Calleja, R. Li, M. B. Chen, S. C. Wong, and R. D. Kamm, "Microfluidics: A New Tool for Modeling Cancer–Immune Interactions," *Trends in Cancer*. 2016, doi: 10.1016/j.trecan.2015.12.003.
- [63] S. B. Carter, "Haptotaxis and the mechanism of cell motility," *Nature*, 1967, doi: 10.1038/213256a0.
- [64] S. B. Carter, "Principles of cell motility: The direction of cell movement and cancer invasion," *Nature*, 1965, doi: 10.1038/2081183a0.
- [65] R. A. F. Clark, "Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin," *J. Invest. Dermatol.*, 1990, doi: 10.1111/1523-1747.ep12876104.
- [66] K. M. Sawicka, M. Seeliger, T. Musaev, L. K. Macri, and R. A. F. Clark, "Fibronectin Interaction and Enhancement of Growth Factors: Importance for Wound Healing," *Adv. Wound Care*, 2015, doi: 10.1089/wound.2014.0616.
- [67] K. Wolf and P. Friedl, "Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration," *Trends in Cell Biology*. 2011, doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.006.
- [68] V. Kostourou and V. Papalazarou, "Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2014, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.018.
- [69] S. A. DeLong, A. S. Gobin, and J. L. West, "Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration," 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.09.020.
- [70] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification," *Cell*, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [71] J. H. Wen *et al.*, "Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation," *Nat. Mater.*, 2014, doi: 10.1038/nmat4051.
- [72] M. Affolter and C. J. Weijer, "Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis," *Developmental Cell*. 2005, doi: 10.1016/j.devcel.2005.06.003.

- [73] V. Vogel and M. Sheetz, "Local force and geometry sensing regulate cell functions," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006, doi: 10.1038/nrm1890.
- [74] J. H. Wen *et al.*, "Haptotaxis is Cell Type Specific and Limited by Substrate Adhesiveness," *Cell. Mol. Bioeng.*, 2015, doi: 10.1007/s12195-015-0398-3.
- [75] J. Adelman, "No Title Revision history of "Haptotaxis and its role in directing engineering tissue development "," *Open WetWare*, 2017.
- [76] S. Toetsch, P. Olwell, A. Prina-Mello, and Y. Volkov, "The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms," *Integrative Biology*. 2009, doi: 10.1039/b814567a.
- [77] H. L. Wright, R. C. Bucknall, R. J. Moots, and S. W. Edwards, "Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy," *Rheumatology*, 2012, doi: 10.1093/rheumatology/ker338.
- [78] P. Roca-Cusachs, A. Del Rio, E. Puklin-Faucher, N. C. Gauthier, N. Biais, and M. P. Sheetz, "Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by  $\alpha$ -actinin triggers adhesion maturation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, doi: 10.1073/pnas.1220723110.
- [79] F. Merino-Casallo, M. J. Gomez-Benito, Y. Juste-Lanas, R. Martinez-Cantin, and J. M. Garcia-Aznar, "Integration of in vitro and in silico models using Bayesian optimization with an application to stochastic modeling of mesenchymal 3D cell migration," *Front. Physiol.*, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01246.
- [80] E. Donà *et al.*, "Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient," *Nature*, 2013, doi: 10.1038/nature12635.
- [81] D. Cai *et al.*, "Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration," *Cell*, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.03.045.
- [82] R. Sunyer *et al.*, "Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission," *Science (80-. )*, 2016, doi: 10.1126/science.aaf7119.
- [83] D. Joaquin *et al.*, "Cell migration and organization in three-dimensional in vitro culture driven by stiffness gradient," *Biotechnol. Bioeng.*, 2016, doi: 10.1002/bit.26010.

- [84] R. O. Hynes, "Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion," *Cell*. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90115-S.
- [85] P. Honarmandi, H. Lee, M. J. Lang, and R. D. Kamm, "A microfluidic system with optical laser tweezers to study mechanotransduction and focal adhesion recruitment," *Lab Chip*, 2011, doi: 10.1039/c0lc00487a.
- [86] J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, "Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, doi: 10.1073/pnas.0235407100.
- [87] J. H. C. Wang and J. S. Lin, "Cell traction force and measurement methods," *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 2007, doi: 10.1007/s10237-006-0068-4.
- [88] H. Huang *et al.*, "PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development," *Development*, 1999, doi: 10.5167/uzh-627.
- [89] P. Moreno-Layseca and C. H. Streuli, "Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression," *Matrix Biology*. 2014, doi: 10.1016/j.matbio.2013.10.011.
- [90] B. J. S. Sánchez, "Papel de la matriz extracelular en la migración celular durante la embriogénesis," 2016.
- [91] R. O. Hynes, "The extracellular matrix: Not just pretty fibrils," *Science*. 2009, doi: 10.1126/science.1176009.
- [92] S. Frantz, K. A. Vincent, and R. A. Kelly, "Innate immunity and angiogenesis," in *Encyclopedia of the Eye*, 2010.
- [93] A. Theocharis, C. Gialeli, V. Hascall, and N. K. Karamanos, "1.1 Extracellular matrix: a functional scaffold," in *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, 2012.
- [94] A. De Arcangelis and E. Georges-Labouesse, "Integrin and ECM functions: Roles in vertebrate development," *Trends in Genetics*. 2000, doi: 10.1016/S0168-9525(00)02074-6.
- [95] J. Han *et al.*, "Epidermal growth factor stimulates human trophoblast cell migration through rho A and rho C activation," *Endocrinology*, 2010, doi: 10.1210/en.2009-0845.
- [96] W. P. Daley and K. M. Yamada, "ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue morphogenesis," *Current Opinion in Genetics and Development*. 2013, doi: 10.1016/j.gde.2013.05.005.

- [97] M. B. Meyer, N. A. Benkusky, and J. W. Pike, "The RUNX2 cistrome in osteoblasts: Characterization, down-regulation following differentiation, and relationship to gene expression," *J. Biol. Chem.*, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.552216.
- [98] B. Eckes, D. Kessler, M. Aumailley, and T. Krieg, "Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: Implications for the understanding of fibrosis," *Springer Seminars in Immunopathology*. 1999, doi: 10.1007/BF00870303.
- [99] D. Fan, A. Takawale, J. Lee, and Z. Kassiri, "Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease," *Fibrogenesis and Tissue Repair*. 2012, doi: 10.1186/1755-1536-5-15.
- [100] F. Guilak *et al.*, "Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells," *J. Cell. Physiol.*, 2006, doi: 10.1002/jcp.20463.
- [101] A. G. Robling, A. B. Castillo, and C. H. Turner, "BIOMECHANICAL AND MOLECULAR REGULATION OF BONE REMODELING," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2006, doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721.
- [102] O. Biology, "Conexions between Cells and Cellular Activities." .
- [103] Albert L Lehninger, "Principles of Biochemistry," 2000.
- [104] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [105] M. Paulson, "Basement membrane proteins: Structure, assembly, and cellular interactions," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1992, doi: 10.3109/10409239209082560.
- [106] P. Bornstein, "Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1," *J. Cell Biol.*, 1995, doi: 10.1083/jcb.130.3.503.
- [107] T. R. Kyriakides *et al.*, "Megakaryocytes require thrombospondin-2 for normal platelet formation and function," *Blood*, 2003, doi: 10.1182/blood.V101.10.3915.
- [108] J. Starke, K. Maaser, B. Wehrle-Haller, and P. Friedl, "Mechanotransduction of mesenchymal melanoma cell invasion into 3D collagen lattices: Filopod-mediated extension-relaxation cycles and force anisotropy," *Experimental Cell Research*. 2013, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.04.003.
- [109] G. Bao and S. Suresh, "Cell and molecular mechanics of biological materials," *Nature Materials*. 2003, doi: 10.1038/nmat1001.

- [110] M. H. Kural and K. L. Billiar, "Regulating tension in three-dimensional culture environments," *Experimental Cell Research*. 2013, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.06.019.
- [111] W. J. Polacheck, A. E. German, A. Mammoto, D. E. Ingber, and R. D. Kamm, "Mechanotransduction of fluid stresses governs 3D cell migration," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, doi: 10.1073/pnas.1316848111.
- [112] N. D. Kirkpatrick, S. Andreou, J. B. Hoying, and U. Utzinger, "Live imaging of collagen remodeling during angiogenesis," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, 2007, doi: 10.1152/ajpheart.01234.2006.
- [113] T. Rozario and D. W. DeSimone, "The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view," *Developmental Biology*. 2010, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
- [114] B. Fingleton, "Matrix Metalloproteinases as Valid Clinical Target," *Curr. Pharm. Des.*, 2006, doi: 10.2174/138161207779313551.
- [115] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance," *Journal of Cell Science*. 2010, doi: 10.1242/jcs.023820.
- [116] J. Hernández-Montoya *et al.*, "Involvement of extracellular matrix metalloproteinases in COPD," *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.*, 2014.
- [117] M. D. Sternlicht and Z. Werb, "How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001, doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.
- [118] I. Escudero, "Implicación de las metaloproteasas en el envejecimiento cardiovascular." .
- [119] C. M. Overall and C. López-Otín, "Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era," *Nature Reviews Cancer*. 2002, doi: 10.1038/nrc884.
- [120] C. K. Tokuhara *et al.*, "Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases," *J. Appl. Oral Sci.*, 2019, doi: 10.1590/1678-7757-2018-0596.
- [121] "Papel de las Metaloproteinasas de la Matriz en la Degradación del Tejido Pulpar: Una revisión literaria," *Rev. Científica Odontológica*, 2005.

- [122] T. D. Pollard and G. G. Borisy, "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments," *Cell*. 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00120-X.
- [123] T. D. Pollard and J. A. Cooper, "Actin, a central player in cell shape and movement," *Science*. 2009, doi: 10.1126/science.1175862.
- [124] T. D. Pollard and J. Berro, "Mathematical models and simulations of cellular processes based on actin filaments," *Journal of Biological Chemistry*. 2009, doi: 10.1074/jbc.R800043200.
- [125] T. Pollard, *Cell Biology*. 2007.
- [126] T. D. Pollard and J. A. Cooper, "Actin and Actin-Binding Proteins. A Critical Evaluation of Mechanisms and Functions," *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.005011.
- [127] R. J. Petrie, N. Gavara, R. S. Chadwick, and K. M. Yamada, "Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration," *J. Cell Biol.*, 2012, doi: 10.1083/jcb.201201124.
- [128] A. J. Ridley, "Rho GTPase signalling in cell migration," *Current Opinion in Cell Biology*. 2015, doi: 10.1016/j.ceb.2015.08.005.
- [129] S. L. Gupton and F. B. Gertler, "Filopodia: the fingers that do the walking.," *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. 2007, doi: 10.1126/stke.4002007re5.
- [130] P. K. Mattila and P. Lappalainen, "Filopodia: Molecular architecture and cellular functions," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008, doi: 10.1038/nrm2406.
- [131] H. M. Eilken and R. H. Adams, "Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis," *Current Opinion in Cell Biology*. 2010, doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.010.
- [132] *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2019.
- [133] W. -T Chen, "Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells," *J. Exp. Zool.*, 1989, doi: 10.1002/jez.1402510206.
- [134] R. Buccione, G. Caldieri, and I. Ayala, "Invadopodia: Specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix," *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009, doi: 10.1007/s10555-008-9176-1.

- [135] M. Schoumacher, R. D. Goldman, D. Louvard, and D. M. Vignjevic, "Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia," *J. Cell Biol.*, 2010, doi: 10.1083/jcb.200909113.
- [136] O. T. Fackler and R. Grosse, "Cell motility through plasma membrane blebbing," *Journal of Cell Biology*. 2008, doi: 10.1083/jcb.200802081.
- [137] G. T. Charras, "A short history of blebbing," 2008, doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02059.x.
- [138] G. Charras and E. Paluch, "Blebs lead the way: How to migrate without lamellipodia," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008, doi: 10.1038/nrm2453.
- [139] R. J. Petrie, A. D. Doyle, and K. M. Yamada, "Random versus directionally persistent cell migration," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, doi: 10.1038/nrm2729.
- [140] K. Burridge and M. Chrzanowska-Wodnicka, "FOCAL ADHESIONS, CONTRACTILITY, AND SIGNALING," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1996, doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.463.
- [141] O. Moreno-Arotzena, J. G. Meier, C. Del Amo, and J. M. García-Aznar, "Characterization of fibrin and collagen gels for engineering wound healing models," *Materials (Basel)*., 2015, doi: 10.3390/ma8041636.
- [142] H. A. E.-S. Kaoud, "Introductory Chapter: Concepts of Tissue Regeneration," in *Tissue Regeneration*, 2018.
- [143] S. A. Eming, P. Martin, and M. Tomic-Canic, "2014 Science Translation Medicine- Wound repair and regenerationMechanisms,signaling and translation," *Sci. Transl. Med.*, 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
- [144] A. Bayat, D. A. McGrouther, and M. W. J. Ferguson, "Skin scarring," *British Medical Journal*. 2003, doi: 10.1136/bmj.326.7380.88.
- [145] A. J. Singer and R. A. F. Clark, "Cutaneous wound healing," *New England Journal of Medicine*. 1999, doi: 10.1056/NEJM199909023411006.
- [146] E. R. Zielins *et al.*, "Wound healing: An update," *Regenerative Medicine*. 2014, doi: 10.2217/rme.14.54.
- [147] H. E. Desjardins-Park, D. S. Foster, and M. T. Longaker, "Fibroblasts and wound healing: An update," *Regenerative Medicine*. 2018, doi: 10.2217/rme-2018-0073.

- [148] R. J. Phillips *et al.*, "Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis," *J. Clin. Invest.*, 2004, doi: 10.1172/JCI200420997.
- [149] G. W. Gibbons, "Grafix<sup>®</sup>, a Cryopreserved Placental Membrane, for the Treatment of Chronic/Stalled Wounds," *Adv. Wound Care*, 2015, doi: 10.1089/wound.2015.0647.
- [150] A. Pourmousa, D. J. Gardner, M. B. Johnson, and A. K. Wong, "An update and review of cell-based wound dressings and their integration into clinical practice," *Ann. Transl. Med.*, 2016, doi: 10.21037/atm.2016.12.44.
- [151] A. Elosegui-Artola *et al.*, "Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity," *Nat. Cell Biol.*, 2016, doi: 10.1038/ncb3336.
- [152] S. Aarabi *et al.*, "Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis," *FASEB J.*, 2007, doi: 10.1096/fj.07-8218com.
- [153] K. C. Rustad, V. W. Wong, and G. C. Gurtner, "The role of focal adhesion complexes in fibroblast mechanotransduction during scar formation," *Differentiation*, 2013, doi: 10.1016/j.diff.2013.02.003.
- [154] R. Baron, *Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling*. 2000.
- [155] T. A. Einhorn, "The cell and molecular biology of fracture healing," 1998, doi: 10.1097/00003086-199810001-00003.
- [156] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. V. Giannoudis, "Bone regeneration: Current concepts and future directions," *BMC Medicine*. 2011, doi: 10.1186/1741-7015-9-66.
- [157] T. Wirth and S. Yla-Herttuala, "Gene transfer vectors (DNA vehicles) and their incorporation into biomaterials for bone repair," in *Biomaterials for Bone Regeneration: Novel Techniques and Applications*, 2014.
- [158] J. Ratanavaraporn, H. Furuya, and Y. Tabata, "Local suppression of pro-inflammatory cytokines and the effects in BMP-2-induced bone regeneration," *Biomaterials*, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.050.
- [159] A. R. Shrivats, M. C. McDermott, and J. O. Hollinger, "Bone tissue engineering: State of the union," *Drug Discovery Today*. 2014, doi: 10.1016/j.drudis.2014.04.010.

- [160] R. Dimitriou, E. Tsiridis, and P. V. Giannoudis, "Current concepts of molecular aspects of bone healing," *Injury*. 2005, doi: 10.1016/j.injury.2005.07.019.
- [161] C. Sfeir, L. Ho, B. A. Doll, K. Azari, and J. O. Hollinger, "Fracture repair," in *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*, 2005.
- [162] A. Oryan, S. Alidadi, and A. Moshiri, "Current concerns regarding healing of bone defects," *Hard Tissue*, 2013, doi: 10.13172/2050-2303-2-2-374.
- [163] A. Oryan, S. Monazzah, and A. Bigham-Sadegh, "Bone injury and fracture healing biology," *Biomedical and Environmental Sciences*. 2015, doi: 10.3967/bes2015.006.
- [164] O. Chaparro and I. Linero, "Regenerative Medicine: A New Paradigm in Bone Regeneration," in *Advanced Techniques in Bone Regeneration*, 2016.
- [165] A. Lindahl *et al.*, "Cartilage and Bone Regeneration," in *Tissue Engineering: Second Edition*, 2015.
- [166] H. Nakamura, "Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells," *J. Hard Tissue Biol.*, 2007, doi: 10.2485/jhtb.16.15.
- [167] P. V. Giannoudis, T. A. Einhorn, G. Schmidmaier, and D. Marsh, "The diamond concept - open questions," *Injury*, 2008, doi: 10.1016/S0020-1383(08)70010-X.
- [168] G. S. Karagiannis, M. P. Pavlou, and E. P. Diamandis, "Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology," *Molecular Oncology*. 2010, doi: 10.1016/j.molonc.2010.09.001.
- [169] X. Sun, Y. Kang, J. Bao, Y. Zhang, Y. Yang, and X. Zhou, "Modeling vascularized bone regeneration within a porous biodegradable CaP scaffold loaded with growth factors," *Biomaterials*, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.015.
- [170] A. Khojasteh, H. Behnia, N. Naghdi, M. Esmaeelinejad, Z. Alikhassy, and M. Stevens, "Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: A systematic review," *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2013, doi: 10.1016/j.oooo.2012.01.044.
- [171] C. S. Bahney, D. P. Hu, T. Miclau, and R. S. Marcucio, "The multifaceted role of the vasculature in endochondral fracture repair," *Frontiers in Endocrinology*. 2015, doi: 10.3389/fendo.2015.00004.
- [172] W. Ji *et al.*, "Local delivery of small and large biomolecules in craniomaxillofacial bone," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.03.003.

- [173] K. D. Hankenson, M. Dishowitz, C. Gray, and M. Schenker, "Angiogenesis in bone regeneration," *Injury*, 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035.
- [174] P. D. Benya and J. D. Shaffer, "Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels," *Cell*, 1982, doi: 10.1016/0092-8674(82)90027-7.
- [175] H. Baharvand, S. M. Hashemi, S. K. Ashtiani, and A. Farrokhi, "Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro," *Int. J. Dev. Biol.*, 2006, doi: 10.1387/ijdb.052072hb.
- [176] A. Astashkina and D. W. Grainger, "Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2014.02.008.
- [177] T. T. Chang and M. Hughes-Fulford, "Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes," *Tissue Eng. - Part A*, 2009, doi: 10.1089/ten.tea.2007.0434.
- [178] O. Zschenker, T. Streichert, S. Hehlhans, and N. Cordes, "Genome-wide gene expression analysis in cancer cells reveals 3D growth to affect ECM and processes associated with cell adhesion but not DNA repair," *PLoS One*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0034279.
- [179] A. C. Luca *et al.*, "Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines," *PLoS One*, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0059689.
- [180] D. H. Lee, C. Y. Bae, S. Kwon, and J. K. Park, "User-friendly 3D bioassays with cell-containing hydrogel modules: Narrowing the gap between microfluidic bioassays and clinical end-users' needs," *Lab Chip*, 2015, doi: 10.1039/c5lc00239g.
- [181] D. D. McKinnon, T. E. Brown, K. A. Kyburz, E. Kiyotake, and K. S. Anseth, "Design and characterization of a synthetically accessible, photodegradable hydrogel for user-directed formation of neural networks," *Biomacromolecules*, 2014, doi: 10.1021/bm500731b.

- [182] E. E. Antoine, P. P. Vlachos, and M. N. Rylander, "Review of collagen i hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: Characterization of mechanics, structure, and transport," *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 2014, doi: 10.1089/ten.teb.2014.0086.
- [183] M. Plotkin *et al.*, "The effect of matrix stiffness of injectable hydrogels on the preservation of cardiac function after a heart attack," *Biomaterials*, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.058.
- [184] S. L. Vega *et al.*, "Combinatorial hydrogels with biochemical gradients for screening 3D cellular microenvironments," *Nat. Commun.*, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03021-5.
- [185] G. Forte *et al.*, "Substrate stiffness modulates gene expression and phenotype in neonatal cardiomyocytes in vitro," *Tissue Eng. - Part A*, 2012, doi: 10.1089/ten.tea.2011.0707.
- [186] T. Yeung *et al.*, "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion," *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2005, doi: 10.1002/cm.20041.
- [187] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification," *Cell*, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [188] S. Even-Ram, V. Artym, and K. M. Yamada, "Matrix Control of Stem Cell Fate," *Cell*. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.08.008.
- [189] F. Ruedinger, A. Lavrentieva, C. Blume, I. Pepelanova, and T. Scheper, "Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice," *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6253-y.
- [190] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Alginate: Properties and biomedical applications," *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2012, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- [191] J. Thiele, Y. Ma, S. M. C. Bruekers, S. Ma, and W. T. S. Huck, "25th anniversary article: Designer hydrogels for cell cultures: A materials selection guide," *Advanced Materials*. 2014, doi: 10.1002/adma.201302958.
- [192] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, and R. Langer, "Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology," *Advanced Materials*. 2006, doi: 10.1002/adma.200501612.

- [193] D. L. Hern and J. A. Hubbell, "Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing," *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<266::AID-JBM14>3.0.CO;2-B.
- [194] J. Lam and T. Segura, "The modulation of MSC integrin expression by RGD presentation," *Biomaterials*, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.091.
- [195] J. Zhu and R. E. Marchant, "Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds," *Expert Review of Medical Devices*. 2011, doi: 10.1586/erd.11.27.
- [196] D. Kesselman, O. Kossover, I. Mironi-Harpaz, and D. Seliktar, "Time-dependent cellular morphogenesis and matrix stiffening in proteolytically responsive hydrogels," *Acta Biomater.*, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.030.
- [197] J. L. Drury and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications," *Biomaterials*. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5.
- [198] J. M. Anderson, J. L. Patterson, J. B. Vines, A. Javed, S. R. Gilbert, and H. W. Jun, "Biphasic peptide amphiphile nanomatrix embedded with hydroxyapatite nanoparticles for stimulated osteoinductive response," *ACS Nano*, 2011, doi: 10.1021/nn203247m.
- [199] J. Patterson and J. A. Hubbell, "Enhanced proteolytic degradation of molecularly engineered PEG hydrogels in response to MMP-1 and MMP-2," *Biomaterials*, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.061.
- [200] M. Bracher *et al.*, "Cell specific ingrowth hydrogels," *Biomaterials*, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.057.
- [201] M. Lovett, K. Lee, A. Edwards, and D. L. Kaplan, "Vascularization strategies for tissue engineering," *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 2009, doi: 10.1089/ten.teb.2009.0085.
- [202] N. Azizipour, R. Avazpour, D. H. Rosenzweig, M. Sawan, and A. Ajji, "Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip," *Micromachines*, 2020, doi: 10.3390/mi11060599.
- [203] D. Huh, G. A. Hamilton, and D. E. Ingber, "From 3D cell culture to organs-on-chips," *Trends in Cell Biology*. 2011, doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.005.

- [204] I. Meyvantsson, J. W. Warrick, S. Hayes, A. Skoien, and D. J. Beebe, "Automated cell culture in high density tubeless microfluidic device arrays," *Lab Chip*, 2008, doi: 10.1039/b715375a.
- [205] Y. Shin *et al.*, "Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels," *Nat. Protoc.*, 2012, doi: 10.1038/nprot.2012.051.
- [206] E. W. K. Young and D. J. Beebe, "Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments," *Chem. Soc. Rev.*, 2010, doi: 10.1039/b909900j.
- [207] Z. Pujic, D. Mortimer, J. Feldner, and G. Goodhill, "Assays for Eukaryotic Cell Chemotaxis," *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2009, doi: 10.2174/138620709788681952.
- [208] O. Moreno-Arotzena, C. Borau, N. Movilla, M. Vicente-Manzanares, and J. M. García-Aznar, "Fibroblast Migration in 3D is Controlled by Haptotaxis in a Non-muscle Myosin II-Dependent Manner," *Ann. Biomed. Eng.*, 2015, doi: 10.1007/s10439-015-1343-2.
- [209] C. Kasperk *et al.*, "Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, doi: 10.1210/jcem.80.8.7629252.
- [210] M. E. Martínez *et al.*, "Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation," *Calcif. Tissue Int.*, 1999, doi: 10.1007/s002239900619.
- [211] P. Levéen, M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, and C. Betsholtz, "Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities," *Genes Dev.*, 1994, doi: 10.1101/gad.8.16.1875.
- [212] R. V. Hoch and P. Soriano, "Roles of PDGF in animal development," *Development*. 2003, doi: 10.1242/dev.00721.
- [213] J. Andrae, R. Gallini, and C. Betsholtz, "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine," *Genes and Development*. 2008, doi: 10.1101/gad.1653708.
- [214] J. Gailit, J. Xu, H. Bueller, and R. A. F. Clark, "Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  by human dermal fibroblasts in vitro," *J. Cell. Physiol.*, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199611)169:2<281::AID-JCP7>3.3.CO;2-P.

- [215] C. Müller, S. Richter, and U. Rinas, "Kinetics control preferential heterodimer formation of platelet-derived growth factor from unfolded A- and B-chains," *J. Biol. Chem.*, 2003, doi: 10.1074/jbc.M212317200.
- [216] C. del Amo, C. Borau, R. Gutiérrez, J. Asín, and J. M. García-Aznar, "Quantification of angiogenic sprouting under different growth factors in a microfluidic platform," *J. Biomech.*, 2016, doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.10.026.
- [217] O. Moreno-Arotzena, G. Mendoza, M. Córdor, T. Rüberg, and J. M. García-Aznar, "Inducing chemotactic and haptotactic cues in microfluidic devices for three-dimensional in vitro assays," *Biomicrofluidics*, 2014, doi: 10.1063/1.4903948.
- [218] O. Moreno-Arotzena, G. Mendoza, M. Córdor, T. Rüberg, and J. M. García-Aznar, "Publisher's Note: 'Inducing chemotactic and haptotactic cues in microfluidic devices for three-dimensional in vitro assays' [Biomicrofluidics 8, 064122 (2014)]," *Biomicrofluidics*. 2014, doi: 10.1063/1.4905312.
- [219] R. Somasundaram and D. Schuppan, "Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB)," *J. Biol. Chem.*, 1996, doi: 10.1074/jbc.271.43.26884.
- [220] J. Taipale and J. Keski-Oja, "Growth factors in the extracellular matrix.," *FASEB J.*, 1997.
- [221] M. F. Brizzi, G. Tarone, and P. Defilippi, "Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche," *Current Opinion in Cell Biology*. 2012, doi: 10.1016/j.ceb.2012.07.001.
- [222] M. M. Martino *et al.*, "Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing," *Science (80-. )*, 2014, doi: 10.1126/science.1247663.
- [223] D. Y. S. Chau, R. J. Collighan, E. A. M. Verderio, V. L. Addy, and M. Griffin, "The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen," *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.017.
- [224] R. A. Jones *et al.*, "Matrix changes induced by transglutaminase 2 lead to inhibition of angiogenesis and tumor growth," *Cell Death Differ.*, 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401816.

- [225] E. A. Sander and V. H. Barocas, "Comparison of 2D fiber network orientation measurement methods," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2009, doi: 10.1002/jbm.a.31847.
- [226] S. I. Fraley *et al.*, "Three-dimensional matrix fiber alignment modulates cell migration and MT1-MMP utility by spatially and temporally directing protrusions," *Sci. Rep.*, 2015, doi: 10.1038/srep14580.
- [227] K. A. Scott, E. J. Wood, and E. H. Karran, "A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction," *FEBS Lett.*, 1998, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01542-7.
- [228] M. Kovács, J. Tóth, C. Hetényi, A. Málnási-Csizmadia, and J. R. Seller, "Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II," *J. Biol. Chem.*, 2004, doi: 10.1074/jbc.M405319200.
- [229] B. J. Nolen *et al.*, "Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex," *Nature*, 2009, doi: 10.1038/nature08231.
- [230] C. Del Amo, C. Borau, N. Movilla, J. Asín, and J. M. García-Aznar, "Quantifying 3D chemotaxis in microfluidic-based chips with step gradients of collagen hydrogel concentrations," *Integr. Biol. (United Kingdom)*, 2017, doi: 10.1039/c7ib00022g.
- [231] N. Movilla, C. Borau, C. Valero, and J. M. García-Aznar, "Degradation of extracellular matrix regulates osteoblast migration: A microfluidic-based study," *Bone*, 2018, doi: 10.1016/j.bone.2017.10.025.
- [232] H. Qian, "A mathematical analysis for the Brownian dynamics of a DNA tether," *J. Math. Biol.*, 2000, doi: 10.1007/s002850000055.
- [233] M. J. Saxton and K. Jacobson, "Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1997, doi: 10.1146/annurev.biophys.26.1.373.
- [234] P. H. Wu, A. Giri, and D. Wirtz, "Statistical analysis of cell migration in 3D using the anisotropic persistent random walk model," *Nat. Protoc.*, 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.030.
- [235] P. H. Wu, A. Giri, and D. Wirtz, "Statistical analysis of cell migration in 3D using the anisotropic persistent random walk model," *Nat. Protoc.*, 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.030.

- [236] Z. Wang, K. D. Fong, T. T. Phan, I. J. Lim, M. T. Longaker, and G. P. Yang, "Increased transcriptional response to mechanical strain in keloid fibroblasts due to increased focal adhesion complex formation," *J. Cell. Physiol.*, 2006, doi: 10.1002/jcp.20486.
- [237] C. Gaggioli *et al.*, "Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells," *Nat. Cell Biol.*, 2007, doi: 10.1038/ncb1658.
- [238] J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. A. Brown, "Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002, doi: 10.1038/nrm809.
- [239] W. J. Kim, R. R. Mohan, R. R. Mohan, and S. E. Wilson, "Effect of PDGF, IL-1 $\alpha$ , and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: Expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999.
- [240] S. Thomopoulos, R. Das, S. Sakiyama-Elbert, M. J. Silva, N. Charlton, and R. H. Gelberman, "BFGF and PDGF-BB for tendon repair: Controlled release and biologic activity by tendon fibroblasts in vitro," *Ann. Biomed. Eng.*, 2010, doi: 10.1007/s10439-009-9844-5.
- [241] O. Moreno-Arotzena, C. Borau, N. Movilla, M. Vicente-Manzanares, and J. M. García-Aznar, "Fibroblast Migration in 3D is Controlled by Haptotaxis in a Non-muscle Myosin II-Dependent Manner," *Ann. Biomed. Eng.*, 2015, doi: 10.1007/s10439-015-1343-2.
- [242] S. B. Carter, "Principles of cell motility: The direction of cell movement and cancer invasion," *Nature*, 1965, doi: 10.1038/2081183a0.
- [243] A. Takawale, S. S. V. P. Sakamuri, and Z. Kassiri, "Extracellular matrix communication and turnover in cardiac physiology and pathology," *Compr. Physiol.*, 2015, doi: 10.1002/cphy.c140045.
- [244] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, H. Krutzsch, E. Schiffmann, and L. A. Liotta, "Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells," *J. Cell Biol.*, 1990, doi: 10.1083/jcb.110.4.1427.

- [245] C. M. King, C. Barbara, A. Prentice, J. D. Brenton, and D. S. Stephen Charnock-Jones, "Models of endometriosis and their utility in studying progression to ovarian clear cell carcinoma," *Journal of Pathology*. 2016, doi: 10.1002/path.4657.
- [246] P. Singh, C. Carraher, and J. E. Schwarzbauer, "Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2010, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.
- [247] G. Balian, E. M. Click, and P. Bornstein, "Location of a collagen-binding domain in fibronectin.," *J. Biol. Chem.*, 1980.
- [248] A. E. Postlethwaite, J. Keski-Oja, G. Balian, and A. H. Kang, "Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of the chemotactic region to a 140,000-molecular weight non-gelatin-binding fragment," *J. Exp. Med.*, 1981, doi: 10.1084/jem.153.2.494.
- [249] K. M. Yamada, "Fibronectin Domains and Receptors," in *Fibronectin*, 1989.
- [250] S. Lucena, C. L. Arocha Piñango, and B. Guerrero, "Fibronectina. Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. Revisión," *Investigacion Clinica*. 2007.
- [251] A. V. Jones and N. C. P. Cross, "Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004, doi: 10.1007/s00018-004-4272-z.
- [252] R. Baker *et al.*, "Fight the flow: The role of shear in artificial rheotaxis for individual and collective motion," *Nanoscale*, 2019, doi: 10.1039/c8nr10257k.
- [253] D. T. Tambe *et al.*, "Collective cell guidance by cooperative intercellular forces," *Nat. Mater.*, 2011, doi: 10.1038/nmat3025.
- [254] A. Ozcelikkale, H. R. Moon, M. Linnes, and B. Han, "In vitro microfluidic models of tumor microenvironment to screen transport of drugs and nanoparticles," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017, doi: 10.1002/wnan.1460.
- [255] M. M. Martino, P. S. Briquez, A. Ranga, M. P. Lutolf, and J. A. Hubbell, "Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, doi: 10.1073/pnas.1221602110.

- [256] L. G. Griffith and M. A. Swartz, "Capturing complex 3D tissue physiology in vitro," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006, doi: 10.1038/nrm1858.
- [257] K. Wolf *et al.*, "Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo," *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2009, doi: 10.1016/j.semcd.2009.08.005.
- [258] B. Ladoux and A. Nicolas, "Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues," *Reports Prog. Phys.*, 2012, doi: 10.1088/0034-4885/75/11/116601.
- [259] B. A. C. Harley, H. Do Kim, M. H. Zaman, I. V. Yannas, D. A. Lauffenburger, and L. J. Gibson, "Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions," *Biophys. J.*, 2008, doi: 10.1529/biophysj.107.122598.
- [260] M. Miron-Mendoza, X. Lin, L. Ma, P. Ririe, and W. M. Petroll, "Individual versus collective fibroblast spreading and migration: Regulation by matrix composition in 3D culture," *Exp. Eye Res.*, 2012, doi: 10.1016/j.exer.2012.03.015.
- [261] D. E. Discher, P. Janmey, and Y. L. Wang, "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate," *Science*. 2005, doi: 10.1126/science.1116995.
- [262] C. Wiegand and R. White, "Microdeformation in wound healing," 2013, doi: 10.1111/wrr.12111.
- [263] E. Hadjipanayi, V. Mudera, and R. A. Brown, "Guiding cell migration in 3D: A collagen matrix with graded directional stiffness," *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2009, doi: 10.1002/cm.20331.
- [264] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang, "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate," *Biophys. J.*, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76279-5.
- [265] W. H. Guo, M. T. Frey, N. A. Burnham, and Y. L. Wang, "Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues," *Biophys. J.*, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.070144.
- [266] T. Kuboki, W. Chen, and S. Kidoaki, "Time-dependent migratory behaviors in the long-term studies of fibroblast durotaxis on a hydrogel substrate fabricated with a soft band," *Langmuir*, 2014, doi: 10.1021/la501058j.

- [267] S. Kumar, A. Kapoor, S. Desai, M. M. Inamdar, and S. Sen, "Proteolytic and non-proteolytic regulation of collective cell invasion: Tuning by ECM density and organization," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep19905.
- [268] K. Kessenbrock *et al.*, "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.," *Cell*, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- [269] A. D. Doyle, R. J. Petrie, M. L. Kutys, and K. M. Yamada, "Dimensions in cell migration," *Current Opinion in Cell Biology*. 2013, doi: 10.1016/j.ceb.2013.06.004.
- [270] S. I. Fraley *et al.*, "Three-dimensional matrix fiber alignment modulates cell migration and MT1-MMP utility by spatially and temporally directing protrusions," *Sci. Rep.*, 2015, doi: 10.1038/srep14580.
- [271] D. Y. S. Chau, R. J. Collighan, E. A. M. Verderio, V. L. Addy, and M. Griffin, "The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen," *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.017.
- [272] R. A. Jones *et al.*, "Matrix changes induced by transglutaminase 2 lead to inhibition of angiogenesis and tumor growth," *Cell Death Differ.*, 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401816.
- [273] T. Elsdale and J. Bard, "Collagen substrata for studies on cell behavior," *J. Cell Biol.*, 1972, doi: 10.1083/jcb.54.3.626.
- [274] K. Uchihashi, S. Aoki, A. Matsunobu, and S. Toda, "Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: A novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte," *Bone*, 2013, doi: 10.1016/j.bone.2012.09.001.
- [275] K. C. Dee, T. T. Andersen, and R. Bizios, "Osteoblast population migration characteristics on substrates modified with immobilized adhesive peptides," *Biomaterials*, 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(98)00161-6.
- [276] M. Ehrbar *et al.*, "Elucidating the role of matrix stiffness in 3D cell migration and remodeling," *Biophys. J.*, 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.082.
- [277] M. Robin *et al.*, "Involvement of 3D osteoblast migration and bone apatite during in vitro early osteocytogenesis," *Bone*, 2016, doi: 10.1016/j.bone.2016.04.031.
- [278] C. W. Digiovanni *et al.*, "Recombinant human platelet-derived growth factor-BB and beta-tricalcium phosphate (rhPDGF-BB/ $\beta$ -TCP): an alternative to autogenous bone graft," *J. Bone Jt. Surgery, Am. Vol.*, 2013, doi: 10.2106/JBJS.K.01422.

- [279] S. Bersini *et al.*, "A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone," *Biomaterials*, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.050.
- [280] P. A. Lucas, "Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta," *Bone*, 1989, doi: 10.1016/8756-3282(89)90079-3.
- [281] M. Lind, B. Deleuran, K. Thestrup-Pedersen, K. SØBalle, E. F. Eriksen, and C. BÜNger, "Chemotaxis of human osteoblasts: Effects of osteotropic growth factors," *APMIS*, 1995, doi: 10.1111/j.1699-0463.1995.tb01089.x.
- [282] L. Casati, F. Celotti, P. Negri-Cesi, M. C. Sacchi, P. Castanoy, and A. Colciago, "Platelet derived growth factor (PDGF) contained in Platelet Rich Plasma (PRP) stimulates migration of osteoblasts by reorganizing actin cytoskeleton," *Cell Adhes. Migr.*, 2014, doi: 10.4161/19336918.2014.972785.
- [283] N.-E. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, and R. E. Brenner, "IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration.," *Mol. Med.*, 2013, doi: 10.2119/molmed.2012.00058.
- [284] M. Mehrotra, S. M. Krane, K. Walters, and C. Pilbeam, "Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells," *J. Cell. Biochem.*, 2004, doi: 10.1002/jcb.20138.
- [285] J. O. Hollinger, C. E. Hart, S. N. Hirsch, S. Lynch, and G. E. Friedlaender, "Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2008, doi: 10.2106/JBJS.G.01231.
- [286] D. Fortunati, D. Y. S. Chau, Z. Wang, R. J. Collighan, and M. Griffin, "Cross-linking of collagen I by tissue transglutaminase provides a promising biomaterial for promoting bone healing," *Amino Acids*, 2014, doi: 10.1007/s00726-014-1732-0.
- [287] C. A. Mullen, T. J. Vaughan, K. L. Billiar, and L. M. McNamara, "The effect of substrate stiffness, thickness, and cross-linking density on osteogenic cell behavior," *Biophys. J.*, 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.02.022.
- [288] S. P. Carey, Z. E. Goldblatt, K. E. Martin, B. Romero, R. M. Williams, and C. A. Reinhart-King, "Local extracellular matrix alignment directs cellular protrusion dynamics and migration through Rac1 and FAK," *Integr. Biol. (United Kingdom)*, 2016, doi: 10.1039/c6ib00030d.

- [289] C. Del Amo *et al.*, "Matrix architecture plays a pivotal role in 3D osteoblast migration: The effect of interstitial fluid flow," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2018, doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.04.007.
- [290] L. Liu, Q. Luo, J. Sun, and G. Song, "Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration," *Experimental Cell Research*. 2016, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.09.001.
- [291] P.-H. Wu, A. Giri, S. X. Sun, and D. Wirtz, "Three-dimensional cell migration does not follow a random walk," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2014, doi: 10.1073/pnas.1318967111.
- [292] B. A. Roeder, K. Kokini, J. E. Sturgis, J. P. Robinson, and S. L. Voytik-Harbin, "Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure," *J. Biomech. Eng.*, 2002, doi: 10.1115/1.1449904.
- [293] Y. G. Kang *et al.*, "Quantification of focal adhesion dynamics of cell movement based on cell-induced collagen matrix deformation using second-harmonic generation microscopy," *J. Biomed. Opt.*, 2018, doi: 10.1117/1.jbo.23.6.065001.
- [294] F. Loi, L. A. Córdova, J. Pajarinen, T. Hua Lin, Z. Yao, and S. B. Goodman, "Inflammation, fracture and bone repair," *Bone*. 2016, doi: 10.1016/j.bone.2016.02.020.
- [295] R. Marsell and T. A. Einhorn, "The biology of fracture healing," *Injury*. 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.
- [296] L. Claes, S. Recknagel, and A. Ignatius, "Fracture healing under healthy and inflammatory conditions," *Nature Reviews Rheumatology*. 2012, doi: 10.1038/nrrheum.2012.1.
- [297] P. G. Buxton *et al.*, "Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition," *Bone*, 2008, doi: 10.1016/j.bone.2008.03.028.
- [298] A. J. Steward, D. R. Wagner, and D. J. Kelly, "The pericellular environment regulates cytoskeletal development and the differentiation of mesenchymal stem cells and determines their response to hydrostatic pressure," *Eur. Cells Mater.*, 2012, doi: 10.22203/eCM.v025a12.

- [299] a J. Steward, S. D. Thorpe, C. T. Buckley, D. R. Wagner, and D. J. Kelly, "Cell-matrix interactions regulate mesenchymal stem cell response to hydrostatic pressure.," *Acta Biomater.*, 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.016.
- [300] M. Ahearne, "Introduction to cell–hydrogel mechanosensing," *Interface Focus*, vol. 4, no. 2, p. 20130038, Apr. 2014, doi: 10.1098/rsfs.2013.0038.
- [301] M. Buszczak, M. Inaba, and Y. M. Yamashita, "Signaling by Cellular Protrusions: Keeping the Conversation Private," *Trends Cell Biol.*, vol. 26, no. 7, pp. 526–534, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.tcb.2016.03.003.
- [302] A. J. Ridley *et al.*, "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back," *Science*. 2003, doi: 10.1126/science.1092053.
- [303] C. J. Cyron, K. W. Müller, A. R. Bausch, and W. A. Wall, "Micromechanical simulations of biopolymer networks with finite elements," *J. Comput. Phys.*, 2013, doi: 10.1016/j.jcp.2012.10.025.
- [304] G. A. Holzapfel, M. J. Unterberger, and R. W. Ogden, "An affine continuum mechanical model for cross-linked F-actin networks with compliant linker proteins," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.05.014.
- [305] A. P. G. Castro, P. Laity, M. Shariatzadeh, C. Wittkowske, C. Holland, and D. Lacroix, "Combined numerical and experimental biomechanical characterization of soft collagen hydrogel substrate," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2016, doi: 10.1007/s10856-016-5688-3.
- [306] J. S. Palmer and M. C. Boyce, "Constitutive modeling of the stress-strain behavior of F-actin filament networks," *Acta Biomater.*, 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2007.12.007.
- [307] A. Aung *et al.*, "3D traction stresses activate protease-dependent invasion of cancer cells," *Biophys. J.*, 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.078.
- [308] S. K. Akiyama, S. S. Yamada, W. T. Chen, and K. M. Yamada, "Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: Roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization," *J. Cell Biol.*, 1989, doi: 10.1083/jcb.109.2.863.
- [309] A. Morla, Z. Zhang, and E. Ruoslahti, "Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin," *Nature*, 1994, doi: 10.1038/367193a0.

- [310] N. Movilla, C. Valero, C. Borau, and J. M. García-Aznar, "Matrix degradation regulates osteoblast protrusion dynamics and individual migration," *Integr. Biol. (Camb).*, 2019, doi: 10.1093/intbio/zyz035.
- [311] A. Das, A. Kapoor, G. D. Mehta, S. K. Ghosh, and S. Sen, "Extracellular matrix density regulates extracellular proteolysis via modulation of cellular contractility," *J. Carcinog. Mutagen.*, vol. 13, 2013.
- [312] S. M. Wojtowicz-Praga, R. B. Dickson, and M. J. Hawkins, "Matrix metalloproteinase inhibitors," *Invest. New Drugs*, 1997, doi: 10.4196/kjpp.2011.15.2.115.
- [313] R. J. Petrie, N. Gavara, R. S. Chadwick, and K. M. Yamada, "Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration," *J. Cell Biol.*, 2012, doi: 10.1083/jcb.201201124.
- [314] A. Giri, S. Bajpai, N. Trenton, H. Jayatilaka, G. D. Longmore, and D. Wirtz, "The Arp2/3 complex mediates multigeneration dendritic protrusions for efficient 3-dimensional cancer cell migration," *FASEB J.*, 2013, doi: 10.1096/fj.12-224352.
- [315] K. M. Om Alblazi and C. H. Siar, "Cellular protrusions - Lamellipodia, filopodia, invadopodia and podosomes - and their roles in progression of orofacial tumours: Current understanding," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015, doi: 10.7314/APJCP.2015.16.6.2187.
- [316] A. M. Weaver, J. E. Heuser, A. V. Karginov, W. Iih Lee, J. T. Parsons, and J. A. Cooper, "Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex," *Curr. Biol.*, 2002, doi: 10.1016/S0960-9822(02)01035-7.
- [317] H. Yamaguchi and J. Condeelis, "Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2007, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.07.001.
- [318] G. De Oliveira Ramos, L. Bernardi, I. Lauxen, M. S. A. Filho, A. R. Horwitz, and M. L. Lamers, "Fibronectin modulates cell adhesion and signaling to promote single cell migration of highly invasive oral squamous cell carcinoma," *PLoS One*, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151338.
- [319] A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, and R. Juliano, "Integrin signaling and cell growth control," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, doi: 10.1016/S0955-0674(98)80144-0.

- [320] D. Chen *et al.*, “Fibronectin signals through integrin  $\alpha 5\beta 1$  to regulate cardiovascular development in a cell type-specific manner,” *Dev. Biol.*, 2015, doi: 10.1016/j.ydbio.2015.09.016.
- [321] C. A. Sevilla, D. Dalecki, and D. C. Hocking, “Extracellular matrix fibronectin stimulates the self-assembly of microtissues on native collagen gels,” *Tissue Eng. - Part A*, 2010, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0316.
- [322] B. Haribabu, R. M. Richardson, M. W. Verghese, A. J. Barr, D. V Zhelev, and R. Snyderman, “Function and regulation of chemoattractant receptors,” *Immunol. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 271–279, 2000, doi: 10.1385/ir:22:2-3:271.
- [323] J. J. Moon *et al.*, “Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties,” *Biomaterials*, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.104.
- [324] A. M. Kloxin, A. M. Kasko, C. N. Salinas, and K. S. Anseth, “Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties,” *Science (80-. )*, 2009, doi: 10.1126/science.1169494.
- [325] F. Yang, C. G. Williams, D. A. Wang, H. Lee, P. N. Manson, and J. Elisseeff, “The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells,” *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.018.
- [326] I. Román Dégano, “Análisis del comportamiento de combinaciones de células troncales y biomateriales mediante un procedimiento de imagen fotónica no invasivo,” 2008.
- [327] C. Franck, S. A. Maskarinec, D. A. Tirrell, and G. Ravichandran, “Three-dimensional traction force microscopy: A new tool for quantifying cell-matrix interactions,” *PLoS One*, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0017833.
- [328] M. Córdor and J. M. García-Aznar, “An iterative finite element-based method for solving inverse problems in traction force microscopy,” *Comput. Methods Programs Biomed.*, 2019, doi: 10.1016/j.cmpb.2019.105056.
- [329] T. Ando *et al.*, “The 2018 correlative microscopy techniques roadmap,” *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2018, doi: 10.1088/1361-6463/aad055.
- [330] A. J. García, “Get a grip: Integrins in cell-biomaterial interactions,” *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.029.

- [331] S. Gronthos, P. J. Simmons, S. E. Graves, and P. G. Robey, "Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix," *Bone*, 2001, doi: 10.1016/S8756-3282(00)00424-5.
- [332] G. S. Schultz and A. Wysocki, "Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing," *Wound Repair and Regeneration*. 2009, doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x.
- [333] O. Moreno-Arotzena, G. Mendoza, M. Córdor, T. Rüberg, and J. M. García-Aznar, "Inducing chemotactic and haptotactic cues in microfluidic devices for three-dimensional in vitro assays," *Biomicrofluidics*, 2014, doi: 10.1063/1.4903948.
- [334] A. Vasconcelos and A. Cavaco-Paulo, "Wound dressings for a proteolytic-rich environment," *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3135-4.
- [335] R. Lara-Rico, J. A. Claudio-Rizo, E. M. Múzquiz-Ramos, and C. M. Lopez-Badillo, "Hidrogeles de colágeno acoplados con hidroxapatita para aplicaciones en ingeniería tisular," *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, 2020, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2020.0.224.
- [336] N. Davidenko *et al.*, "Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics," *Acta Biomater.*, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.034.
- [337] V. a. Barr and B. S. C., "Interference Reflectance Microscopy," *Curr Protoc Cell Biol*, 2010, doi: 10.1002/0471143030.cb0423s45.Interference.
- [338] C. Jedeszko, M. Sameni, M. B. Olive, K. Moin, and B. F. Sloane, "Visualizing protease activity in living cells: From two dimensions to four dimensions," *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2008, doi: 10.1002/0471143030.cb0420s39.