

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DE LOS PÉPTIDOS DE MATRIZ EXTRACELULAR
DESCELULARIZADA DE HÍGADO SOBRE EL ESPARCIMIENTO Y
AGREGACIÓN DE HEPATOCITOS PRIMARIOS CON RIGIDEZ
CONTROLADA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

IBt. LORENA OMEGA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR

Dr. MIGUEL ANGEL PEÑA RICO

CO-DIRECTOR

Dr. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Marzo, 2021



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2021/MBE/068
ASUNTO	Jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 17 de marzo de 2021

C. LORENA OMEGA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Oscar A. Ramírez Marroquín	Universidad del Papaloapan	Presidente
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	Universidad del Papaloapan	Secretario
Dr. Mathieu Hautefeuille	Universidad Nacional Autónoma de México	Vocal
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	Universidad del Papaloapan	Suplente 1
Dr. Adolfo López Torres	Universidad del Papaloapan	Suplente 2

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.


Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Hau Le-tama, chí jí jú


Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico – Director de Posgrado
C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Coordinadora de la Maestría en Biotecnología
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Asesoría Estudiantil
C.c.p. Archivo




M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 206, Col. Parque Industrial,
C.P. 78301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOHA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729200



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2021/MBT/076
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 07 de mayo de 2021

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Lorena Omega Martínez Hernández**, matrícula **18140008**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Efecto de los péptidos de matriz extracelular descelularizada de hígado sobre el esparcimiento y agregación de hepatocitos primarios con rigidez controlada”**, para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dr. José Abad Zavaleta

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Lorena Omega Martínez Hernández – Estudiante
C.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico – Director de Tesis
C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Coordinador de la maestría en Biotecnología
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

CARTA DE RESPONSABILIDAD

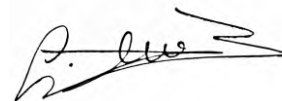
Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de *tesis* "Efecto de los péptidos de matriz extracelular descelularizada de hígado sobre el esparcimiento y agregación de hepatocitos primarios con rigidez controlada" es responsabilidad de los C. Dr. Miguel Ángel Peña Rico y Lorena Omega Martínez Hernández, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido aceptados o empleados para el otorgamiento de título, grado diferente o adicional al actual en el país o en el extranjero. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas y ésta fue examinada por un comité tutorial, conformado por: *Dr. Adolfo López Torres, Dr. Genaro Vázquez Victorio y Dr. Miguel Ángel Peña Rico*; así como un jurado de examen conformado: *Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, Dr. Mathieu Hautefeuille y Dr. Miguel Ángel Peña Rico* de acuerdo con el Reglamento General de Posgrado vigente, con la finalidad de darle seguimiento al estudiante, así como validar que es un trabajo de investigación original e inédito.

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 13 de mayo del 2021.

ATENTAMENTE,



IBt. Lorena Omega Martínez Hernández



Dr. Miguel Ángel Peña Rico

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioprocesos y en el Laboratorio de Innovación Tecnológica Sustentable en Materiales y Nanotecnología (LINTSUS-MN) de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec y el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Peña Rico y la co-dirección del Dr. Genaro Vázquez Victorio.

Se contó con el apoyo de la beca CONACyT con número de becario 942316 en el marco del programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131 y el apoyo Complementario para Estancias Nacionales CONACyT, así como también con el financiamiento del proyecto DGAPA-PAPIIT #IA206818 y CONACyT (número 272894).

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTE TRABAJO

Artículo:

Serna-Márquez, N., Rodríguez-Hernández, A., Ayala-Reyes, M., **Martínez-Hernández, L. O.**, Peña-Rico, M. Á., Carretero-Ortega, J., Carretero-Ortega, J., Hautefeuille, M & Vázquez-Victorio, G. Fibrillar Collagen Type I Participates in the Survival and Aggregation of Primary Hepatocytes Cultured on Soft Hydrogels. *Biomimetics*, 5(2), 30, 2020. DOI: 10.3390/biomimetics5020030.

Congresos:

Lorena Omega Martínez-Hernández, Viviana Barron-Pérez, Marisol Ayala-Reyes, Miguel Ángel Peña-Rico, Mathieu Hautefeuille y Genaro Vázquez-Victorio. Incorporación de proteínas de matriz extracelular de hígado descelularizados a hidrogeles de rigidez variable. VII Congreso de la Rama Transducción de Señales. Juriquilla, Querétaro. Noviembre 4-7, 2019. Cartel.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, **Dr. Miguel Ángel Peña Rico**, por permitirme colaborar en interesantes proyectos en la ciencia a lo largo de toda mi carrera profesional en la universidad. Gracias por ser un buen profesor y amigo.

Sinceramente, de manera especial a los doctores **Genaro Vázquez Victorio** y **Mathieu Hautefeuille** por permitirme colaborar en este interesante e importante proyecto en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la UNAM, donde obtuve todo el apoyo y oportunidad de adquirir grandes experiencias profesionales, conocimientos, habilidades técnicas de laboratorio, ética y valores importantes de la ciencia. Asimismo, extendo mi agradecimiento con mucho cariño a **Marisol Ayala, Viviana Barrón, Adriana Hernández, Stephi Aguirre**, y a los doctores **Natalia Serna, Jorge Carretero** y **Beatriz Bello**, por compartir su conocimiento, apoyo, aportaciones y, sobretodo, por ser excelentes compañeros de trabajo y por haberme brindado siempre su amistad durante mis estancias profesionales.

A mi madre **Araceli** y hermanas **Alfa Karen** y **Rubí Abril**, por todo su amor y cariño.

DEDICATORIA

A mi madre Araceli, por ser el soporte que me mantiene firme, por estar conmigo siempre, por acompañarme en mi felicidad, en mis malos momentos y por ayudarme a enfrentar los obstáculos; pero sobretodo, por su amor incondicional.

CONTENIDO

Índice de Figuras	XI
Índice de tablas	XII
Abreviaturas	XIII
Resumen.....	X
Abstract	XI
1. Introducción.....	17
2. Antecedentes.....	19
2.1 Hígado	19
2.1.1 Anatomía y fisiología general	19
2.1.2 Células hepáticas.....	21
2.1.3 Matriz extracelular (MEC)	23
2.1.4 Composición bioquímica de la MEC hepática	23
2.1.5 La mecánica y la rigidez en el microambiente hepático	26
2.2 Descelularización de tejidos y órganos	28
2.2.2 Técnicas de descelularización	30
2.2.3 Perfusión	31
2.2.4 Inmersión/agitación	32
2.3 Cultivo celulares biomiméticos	32
2.3.1 Hidrogeles en cultivo celular	33
2.3.1.1 Hidrogeles de colágena	34
2.3.1.2 Hidrogeles de Matrigel.....	35
2.3.1.3 Hidrogeles de MEC descelularizada	36
2.3.1.4 Incorporación de proteínas de MEC en hidrogeles de PA.....	38
3. Justificación	40
4. Hipótesis	41
5. Objetivos.....	41
5.1 Objetivo general.....	41
5.2 Objetivos específicos.....	41
6. Materiales y métodos.....	42
6.1 Descelularización de hígados de rata.....	42
6.2 Aislamiento de péptidos de MECd	44
6.3 Caracterización de proteínas de MECd	44
6.4 Cultivo primarios de hepatocitos	45
6.5 Ensayo de inmunofluorescencia y TUNEL	46

6.6 Procesamiento de imágenes para cuantificar área celular, área nuclear, esparcimiento y agregados celulares, y análisis estadístico.....	47
7. Resultados y discusión	48
7.1 El proceso de descelularización de hígados de rata generó MEC libres de componentes celulares.....	48
7.2 Los perfiles de proteína de las MECd presentan diferencias en función del tiempo de digestión con pepsina	49
7.3 La mecánica y la composición de proteínas de MEC conjugadas a los sustratos de hidrogel de PA influyen en el comportamiento de los hepatocitos	51
8. Conclusiones	64
9. Perspectivas	66
10. Anexos.....	67
10.1 Anexo I.....	67
10.1.1 Protocolos de tinción para geles SDS-PAGE	67
10.2 Anexo II.....	70
10.2.1 Protocolo de Western blot.....	70
10.3 Anexo III.....	74
10.3.1 Elaboración de hidrogeles de poliacrilamida para cultivo celular	74
10.4 Anexo IV	78
10.4 Protocolo de cuantificación celular en el <i>software</i> Fiji-ImageJ.....	78
11. Referencias bibliográficas	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional del lóbulo hepático.....	15
Figura 2. Matriz extracelular.....	19
Figura 3. Análisis proteómico de MEC de hígado de rata.....	20
Figura 4. Rigidez del hígado en diferentes estadios fibróticos.....	22
Figura 5. Línea del tiempo de estudios basados en órganos descelularizados.....	25
Figura 6. Microscopías electrónicas de estructuras tridimensionales de MEC.....	28
Figura 7. Reacción de polimerización de la acrilamida.....	33
Figura 8. Esquema general de la metodología experimental.....	37
Figura 9. Proceso de canulación durante la descelularización.....	38
Figura 10. Proceso de descelularización de hígado de rata, a través del tiempo.....	42
Figura 11. Caracterización de proteínas para sustratos de hidrogel.....	44
Figura 12. Hepatocitos de cultivo primario en hidrogeles de distinta rigidez y MEC conjugada.....	47
Figura 13. Área nuclear de los hepatocitos depende de la rigidez y MEC conjugada.....	51
Figura 14. El factor de crecimientos epidermal (EGF) favorece la formación de agregados, pero no rescata la viabilidad de los hepatocitos.....	55
Figura 15. Componentes para la transferencia de proteínas en el Western blot.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones principales de los hepatocitos.....	17
Tabla 2. Soluciones para la elaboración de geles SDS-PAGE.....	59
Tabla 3. Soluciones para tinción con nitrato de plata.....	60
Tabla 4. Soluciones para la técnica de Western blot.....	62
Tabla 5. Módulo de elasticidad esperado después de la polimerización de las concentraciones relativas de acrilamida y bis-acrilamida.....	69

ABREVIATURAS

μL: microlitro

μm: micrómetro

°C: grados centígrados

3D: tercera dimensión

A: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

APS: persulfato de amonio

ARNm: ácido ribonucleico ribosomal mensajero

BSA: albúmina de suero bovino

CL: cromatografía líquida

CO₂: dióxido de carbono

Col: colágena

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DPBS: buffer de fosfatos salino Dulbecco

E: módulo de elasticidad

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidermal

FN: fibronectina

g: gramos

g: gravedades

G: módulo cortante

h: hora

HCl: ácido clorhídrico

hMSC: células madre mesenquimales humanas

HNFα: factor de transcripción nuclear del hepatocito alfa

hPSC: células pluripotenciales humanas

kDa: kilodalton

kPa: kilopascal

M: molar

MB: membrana basal

MEC: matriz extracelular

MECd: matriz extracelular descelularizada

mg: miligramo

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

MP: Marcador de masa molecular

MS: espectrometría de masas

mTorr: millitorr

N: normal

NaCl: cloruro de sodio

NaH₂CO₃: dihidrocarbonato de sodio

nm: nanómetros

Pa: pascal

PA: poliacrilamida

PBS: buffer de fosfatos salino

PFA: paraformaldehído

pH: potencial de hidrógeno

PVDF: polivinildifluoruro

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SDS: dodecilsulfato de sodio

TBST: buffer tris salino con Tween

TEMED: tetrametiletilendiamina

Tris: Tris-hidroximetil-aminometano

TUNEL: marcaje del extremo terminal de dUTP por desoxinucleotidil transferasa

UI: unidades internacionales

UV: ultravioleta

V: volt

NH₄OH: hidróxido de amonio

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

LN: laminina

PDMS: polidimetilsiloxano

PKA: proteína kinasa dependiente de cAMP

ng: nanogramo

No: número

AgNO₃: nitrato de plata

Na₂S₂O₃ • 5 H₂O: tiosulfato de sodio pentahidratado

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

mA: miliampere

NaOH: hidróxido de sodio

APTES: (3-aminopropil)trietosiloxano

DCDMS: diclorodimetilsilano

RESUMEN

La matriz extracelular (MEC) es una estructura tridimensional compuesta de proteínas fibrosas como colágena, fibronectina, elastina, laminina, entre otras moléculas, que regulan procesos vitales como la adhesión celular, preservación de tejidos y coordinación de señalizaciones bioquímicas; además, la MEC determina la plasticidad y especificidad celular en función de la composición y proporción de cada una de sus moléculas estructurales. En el hígado, las alteraciones en la composición y estructura de la MEC producen modificaciones en el microambiente celular, así como también en otras propiedades físicas como la rigidez o el módulo de elasticidad, que influyen en el desarrollo de enfermedades fibróticas que afectan la biología de las células hepáticas, principalmente a los hepatocitos. Dentro de este contexto, el objetivo de este trabajo fue elaborar una plataforma biomimética a partir de proteínas aisladas de matriz extracelular descelularizada (MECd) de hígados de rata para promover la adhesión y supervivencia de hepatocitos de cultivo primario. Para ello, se extrajeron hígados de rata Wistar y se descelularizaron por perfusión. Las MEC obtenidas se liofilizaron, pulverizaron, hidrolizaron enzimáticamente a distintos tiempos con pepsina y los productos se neutralizaron para obtener solamente la fracción de proteína soluble. Por otro lado, en vidrios funcionalizados, se elaboraron hidrogeles de poliacrilamida a 1 y 20 kPa conjugados con proteínas de MECd, colágena tipo I (Col I), membrana basal (MB) y proporciones 75/25 y 50/50 de Col I y MB, respectivamente, donde hepatocitos de cultivo primario fueron sembrados y evaluados durante 24 y 72 h. Los resultados obtenidos, mostraron interesantemente que los hepatocitos se adhieren preferentemente a los hidrogeles que contienen cualquiera de las concentraciones de Col I, pero no en los sustratos que contienen proteínas de MECd. Estos hallazgos sugieren que el colágeno fibrilar juega un papel importante en la adherencia y sobrevivencia de hepatocitos. No obstante, es necesario realizar mayor trabajo de investigación para encontrar la combinación ideal de proteínas de MECd y derivadas de MEC para generar plataformas de cultivo que promuevan la adherencia celular y mantengan el fenotipo de los hepatocitos.

ABSTRACT

The extracellular matrix (ECM) is a three-dimensional structure composed of fibrous proteins such as collagen, fibronectin, elastin, laminin, among other molecules, which regulate vital processes such as cell adhesion, tissue preservation and coordination of biochemical signaling; furthermore, ECM determines cell plasticity and specificity based on the composition and ratio of each of its structural molecules. In the liver, alterations in the composition and structure of the ECM produce modifications in the cellular microenvironment, as well as in other physical properties such as rigidity or modulus of elasticity, which influence the development of fibrotic diseases that affect the biology of liver cells, mainly hepatocytes. Within this context, the aim of this experimental work was to develop a biomimetic scaffold with isolated proteins from rat livers to promote adhesion and survival of primary hepatocytes cultured. For this, Wistar rat livers were extracted and decellularized by perfusion. The decellularized extracellular matrix (dECM) obtained were lyophilized, pulverized, enzymatically hydrolyzed at different times with pepsin and the products were neutralized to obtain only the soluble protein fraction. On the other hand, in functionalized glasses, 1 and 20 kPa polyacrylamide hydrogels were made with dECM proteins conjugated, collagen type I (Col I), basement membrane (BM) and 75/25 and 50/50 ratios of Col I and BM, respectively, where primary hepatocytes culture were seeded and evaluated for 24 and 72 h. Interestingly, the results obtained showed that hepatocytes preferentially adhere to hydrogels containing any of the Col I concentrations, but not to substrates containing dECM proteins. These findings suggest that fibrillar collagen plays an important role in hepatocyte adherence and survival. However, more research is needed to find the ideal combination of dECM and ECM-derived proteins to generate culture scaffolds that promote cell adherence and maintain the hepatocytes phenotype.

1. INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular (MEC) es una estructura tridimensional situada entre el intersticio de las células, compuesta de proteínas fibrosas como la colágena, fibronectina, elastina y laminina, y algunos polisacáridos como glucosamino y proteoglicanos que permiten regular procesos vitales como la adhesión celular, preservación de tejidos y coordinación de señalizaciones bioquímicas (Silvera *et al.*, 2002; Porth *et al.*, 2014). La plasticidad y especificidad celular, son otros de los procesos dependientes de la MEC, en función de la composición y proporción de cada uno de sus moléculas estructurales (Tomas *et al.*, 2010; Porth *et al.*, 2010).

Interesantemente, la MEC hepática, por ejemplo, está compuesta principalmente por fibronectina, colágena tipo I y cantidades mínimas de colágena tipo III, IV, V y VI (Arvelo y Poupon, 2001). Su integridad bioquímica y biomecánica, tienen gran importancia para el mantenimiento del fenotipo de los hepatocitos (células parenquimatosas), que constituyen alrededor del 80% de la masa total del hígado (Arias *et al.*, 2001), así como de otras células como las no parenquimatosas (Martínez-Hernández y Amenta, 1995). Asimismo, las alteraciones en la composición y la estructura tridimensional de la MEC hepática producen modificaciones en el microambiente celular, desencadenando enfermedades crónicas como la cirrosis y la generación de tumores, que afectan evidentemente los tejidos y la biología de los hepatocitos (Rojkind *et al.*, 1980; Milani *et al.*, 1990; Vracko, 1974). Dentro de los tratamientos para estos padecimientos generalmente incluyen el trasplante del órgano completo y la siembra de hepatocitos a través de la vena porta; sin embargo, estos suelen presentar incompatibilidad y una pérdida de la viabilidad temprana de las células, ocasionando solamente una solución temporal para el paciente, ya que una de las características que resalta los cultivos *in vitro* de hepatocitos primarios es el cambio de su morfología, dediferenciación y su transformación de células epiteliales a mesenquimales (Soto-Gutiérrez *et al.*, 2011; Baptista, 2011).

Diversos grupos de investigación se han encargado de crear nuevas tecnologías de cultivo que permiten generar un sistema biomimético para los distintos tipos celulares (Uygun *et al.*, 2010; Azhim *et al.*, 2011). Para los hepatocitos, la generación de plataformas de 2D y 3D, como los cultivos en placa con recubrimientos de hidrogel y cultivos en sándwich a partir de componentes

de MEC de hígados descelularizados, hacen interactuar las proteínas de la MEC con los receptores celulares y, por efecto, desencadenar una serie de transducción de señales que influyen en la diferenciación celular y en la conservación del fenotipo (Cukierman *et al.*, 2001; Hynes *et al.*, 2002). Las distintas proteínas que integran la MEC regulan los mecanismos celulares en respuesta a estímulos ambientales, logrando la supervivencia celular, motilidad, migración, disposición del citoesqueleto y expresión génica (Legate *et al.*, 2009).

En los últimos años, se han intentado diseñar modelos *in vitro* que simulen el microambiente *in vivo* del órgano. Los andamios de MEC resultantes de la descelularización de tejidos hepáticos han mostrado ser excelentes para el crecimiento de múltiples tipos de células hepáticas al favorecer la conservación de sus actividades metabólicas (Wang *et al.*, 2011; Soto-Gutierrez *et al.*, 2011). Con ello se genera la posibilidad de ampliar las aplicaciones en la ingeniería de tejidos para la regeneración y/o trasplante de órganos, y para la realización de ensayos pre-clínicos ante las pruebas de nuevos fármacos y así estudiar una respuesta celular más cercana a la que se observa en el microambiente nativo (Crapo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014; Ware *et al.*, 2017).

Dada la importancia de los modelos biomiméticos para la realización de pruebas pre-clínicas de nuevos fármacos, surge la necesidad de generar plataformas de cultivo que mantengan el fenotipo de hepatocitos. Para ello, en el presente trabajo de investigación, se pretende hacer uso de matrices extracelulares de hígados descelularizados de rata para implementar una técnica que permita incorporar proteínas de MEC en plataformas de hidrogel de rigidez controlada para el cultivo primario *in vitro* de hepatocitos y favorecer condiciones biológicas como la adhesión celular y la prolongación de la viabilidad. Asimismo, se espera evaluar el esparcimiento y agregación celular como respuesta antes las condiciones del cultivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hígado

2.1.1 Anatomía y fisiología general

El hígado, es un órgano con alta actividad metabólica (Byung-Soo *et al.*, 2011). Participa primordialmente en el mantenimiento de la homeostasis y realiza otras funciones importantes como la regulación del volumen sanguíneo y de las vías de señalización endócrinas del crecimiento; metabolismo de ácidos grasos; síntesis de proteínas como la albúmina y factores de coagulación; producción de ácidos biliares, secreción de urea y almacenamiento de compuestos como el glucógeno, vitaminas (A y D) y algunos minerales como el hierro. Además, es el sitio principal donde se lleva a cabo la detoxificación o eliminación de xenobióticos y otros compuestos endógenos (Cascales, 2008; Trefts *et al.*, 2017; Delgado y Mas, 2017).

En los mamíferos, el hígado representa aproximadamente del 2 al 3% de la masa corporal (Bismuto *et al.*, 1982). A nivel macroscópico, consta de cuatro compartimentos denominados lóbulos y cada uno realiza funciones independientes; por otra parte, el lobulillo hepático es la organización microscópica del hígado considerada como la unidad estructural y funcional de este órgano (Delgado y Mas, 2017).

El lobulillo hepático tiene una forma hexagonal o poligonal que consta de un sistema vascular denominado tríada portal, conformado por la arteria hepática, vena portal y un conducto biliar, tal como se muestra en la Figura 1. A su vez, el flujo sanguíneo, así como productos metabolizados provenientes de la arteria hepática y la vena portal, son transportados hacia la vena central (situada en la zona central del lobulillo) para ser posteriormente distribuidos a otros órganos (Colnot y Perret, 2011; Krishna, 2013).

La tríada portal se encuentra dividida en 3 segmentos funcional y bioquímicamente diferentes: las zonas periportal, lobular central y perivenosa (Krishna, 2013). Cada zona contiene poblaciones heterogéneas de células altamente especializadas con plasticidad funcional definida que les permiten realizar procesos metabólicos de manera simultánea para mantener la homeostasis del

organismo, en función de los gradientes de concentración distintos de oxígeno, nutrientes, hormonas y productos de desecho que circulan a través de la sangre (Colnot y Perret, 2011; Trefts *et al.*, 2017).

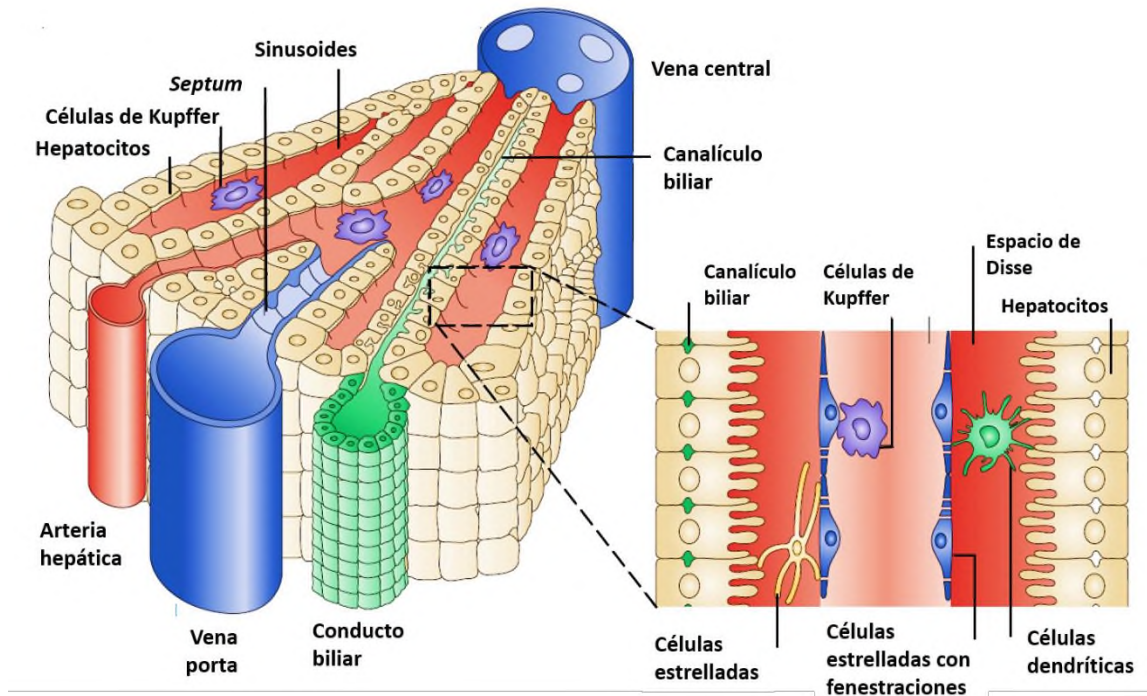


Figura 1. Estructura tridimensional del lóbulo hepático. El lóbulo hepático consiste en una organización de distintos componentes celulares, a partir de la vena central de la zona centro lobular, limitada en cada extremo por la tríada portal que consiste en la vena porta, la arteria hepática y un conducto biliar (Imagen obtenida y modificada de Adams *et al.*, 2006).

A este fraccionamiento de funciones se conoce como zonación metabólica (Kietzmann, 1996; Colnot y Perret, 2011). No obstante, con relación a procesos moleculares, se han llevado a cabo investigaciones donde han demostrado que son varios los mecanismos involucrados en la zonación del hígado. Entre ellos, el factor de transcripción nuclear del hepatocito alfa (HNF α) (Colnot y Perret, 2011) en coordinación con la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, han sido considerados recientemente como los impulsores principales para la zonación hepática (Kietzmann, 2017; Tomlinson *et al.*, 2019).

Otra de las características más destacables del hígado, es su capacidad de regeneración de una manera coordinada por todos los tipos celulares para restaurar su masa y volumen original después de una resección quirúrgica (hepatectomía) parcial o por un daño inducido por xenobióticos, toxinas o virus (Anti *et al.*, 1994; Berasain *et al.*, 2015; Michalopoulos, 2016). Se ha evidenciado que, posterior a la inducción de sustancias hepatotóxicas, como el tetracloruro de carbono, el proceso de regeneración ocurre en respuesta a la inflamación y al estrés oxidativo a través de diferentes mecanismos moleculares en las vías de señalización que regulan la proliferación celular (García-Trevijano *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2019; Huck *et al.*, 2019), así como también los distintos cambios epigenéticos que regulan la activación e inactivación de genes involucrados durante la regeneración (Arechederra *et al.*, 2019).

2.1.2 Células hepáticas

El hígado está compuesto por diversos tipos celulares de diferente origen embriológico. Estas células altamente diferenciadas incluyen a los hepatocitos o células parenquimatosas, células epiteliales biliares (también llamados colangiocitos), células estrelladas, células de Kupffer y células endoteliales sinusoidales (Trefts *et al.*, 2017). Cada tipo celular tiene una función particular; no obstante, dentro del lobulillo hepático, las funciones de las células actúan de manera cooperativa para el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Particularmente los hepatocitos, son las células que mayoritariamente componen al tejido hepático (alrededor del 80-85% de la masa celular) y por lo tanto, las que realizan gran parte de las funciones del órgano (Valatas *et al.*, 2003; Trefts *et al.*, 2017) e influyen de manera significativa en la fisiopatología del hígado (Zakim y Boyer, 1993).

Las funciones principales de los hepatocitos se encuentran resumidas en la Tabla 1, con base a las aportaciones realizadas por Schiff y Schiff (1993) y Zakim y Boyer (1996).

Los hepatocitos miden alrededor de 20 a 30 μm ; poseen núcleos redondeados y algunas son binucleadas (Kmiec *et al.*, 2001). La particularidad que presentan estas células es la función especializada que va a depender de su localización y distribución a lo largo de las tríadas portales del lobulillo hepático, pues se ha demostrado que son las que primordialmente zonifican al hígado (Katz *et al.*, 1977; Stanger, 2015). En el lobulillo, los hepatocitos se encuentran organizados en

placas o láminas ordenadas, que a su vez, forman conductos o espacios vasculares denominados sinusoides (ver Figura 1). A través de ellos circula el oxígeno y los nutrientes de la sangre provenientes de la arteria hepática y vena porta, respectivamente (Delgado y Mas, 2017; Trefts *et al.*, 2017).

Los sinusoides se encuentran conformados por las células endoteliales sinusoidales (de ahí se deriva su nombre), formando fenestraciones que permiten el paso de moléculas de elevada masa molecular como proteínas y quilomicrones (Cascales, 2008). Además, dentro de los sinusoides también se encuentran las células epiteliales biliares, células de Kupffer y células estrelladas (Delgado y Mas, 2017). Por lo tanto, estas estructuras sinusoidales son las que permiten que los hepatocitos tengan acceso a la sangre circulante (Cascales, 2008). Los sinusoides se encuentran separados de los hepatocitos a través de un espacio perisinusoidal llamado espacio de Disse (Schmid, 1991) y se encarga del intercambio de nutrientes y de la comunicación con los otros tipos celulares a través de señalizaciones autócrinas y parácrinas (Delgado y Mas, 2017).

Tabla 1. *Funciones principales de los hepatocitos*

Actividad	Ejemplos
Producción de proteínas transportadoras del plasma sanguíneo	Albúmina, ceruloplasmina, transferrina y lipoproteínas.
Producción de inhibidores de proteasas	α_1 -antitripsina, antitrombina y α_2 -macroglobulina.
Generación de factores de coagulación sanguínea	Fibrinógeno, protrombina y factores V, VII, IX, X, entre otros.
Producción de complejos de inmunidad e inflamación	Complemento C3 y proteína C reactiva.
Control de la homeostasis de moléculas energéticas	Glucosa, glucógeno y ácidos grasos, entre algunos derivados como los triglicéridos, colesterol, ácidos biliares, vitaminas A y D.
Metabolismo de moléculas	Aminoácidos, urea, metales como el hierro y cobre; bilirrubina y hemo A.
Destoxificación de xenobióticos	Solventes orgánicos, pesticidas, herbicidas, toxinas provenientes de plantas, animales y hongos, drogas y fármacos.
Nota. Información recopilada de Schiff y Schiff, (1993); Zakim y Boyer, (1996).	

2.1.3 Matriz extracelular (MEC)

La matriz extracelular (MEC) es un sistema dinámico (Huxley-Jones *et al.*, 2008) formado por una red tridimensional constituida de macromoléculas en el espacio intersticial celular, cumple funciones vitales e indispensables como la multiplicación celular, mantenimiento de la homeostasis, preservación fenotípica, procesos bioquímicos y de señalización (Figura 2). De manera general, los principales componentes de una MEC son las colágenas de tipo I, III, IV, VII (Rubin *et al.*, 2006), fibronectina, laminina, integrinas (Schalper *et al.*, 2003) que confieren estructura, flexibilidad, adherencia celular (Qin *et al.*, 2004; Timpl *et al.*, 2006), la unión con otras células circundantes y promueven los procesos de señalización (Aumailley y Smyth, 1998; Heino, 2007); también se encuentran moléculas como los proteoglicanos, con alta capacidad de retención de agua proporcionan turgencia y estabilidad a la MEC, y almacenan factores de crecimiento y citocinas (Bosman y Stamenkovic, 2003); glucoproteínas especializadas (Scott, 2005), elastina, entactina, fibrilinas, receptores de membrana, factores de crecimiento, glucosaminoglicanos y metaloproteinasas (Eynard y Mirta, 2008). En conjunto, estas moléculas de MEC interactúan directamente con los receptores de la superficie celular para regular la actividad de las células a través de vías de señalización (Zaachigna *et al.*, 2006).

Otro punto importante de la MEC es su finalidad para determinar la especificidad tisular, es decir, su cantidad y composición llevan a la formación de un tipo de tejido y funciones particulares (Tomas *et al.*, 2010; Porth *et al.*, 2014).

2.1.4 Composición bioquímica de la MEC hepática

De manera concreta, la MEC hepática está compuesta principalmente por fibronectina, colágena tipo I y cantidades mínimas de colágena tipo III, IV, V y VI (Arvelo *et al.*, 2001) que se distribuyen de distinta manera en el órgano: las colágenas I, III y VI están presentes en el exterior del hígado formando una capa fibrosa junto con otras células mesoteliales en el intersticio de las tríadas portales, las venas centrales y como recubrimientos delgados en el espacio de Disse, aunque en este último, abundan más las tipo III y VI (Martinez-Hernandez, 1984). Estas colágenas (I, III y VI) denominadas como fibrilares contienen estructuras rígidas de aminoácidos en forma de una triple

hélice, conformadas a su vez por haces de fibras heterogéneas que le proporcionan las propiedades mecánicas al hígado (Rodés, 2007).

La colágena tipo IV es una proteína no fibrilar conformada por cadenas de péptidos en triple hélice, intercaladas a su vez con fragmentos de proteínas lamininas que le proporcionan flexibilidad molecular (Xu *et al.*, 2018). Es una de las proteínas más abundantes de la membrana basal y es secretado principalmente por las células endoteliales (Rodés, 2007). En el lobulillo hepático, se encuentra predominantemente distribuido en el espacio de Disse principalmente en los sinusoides, estructuras vasculares, musculares, mesoteliales, neurales y epiteliales (Martinez-Hernandez, 1984).

Finalmente, la fibronectina rodea la superficie de la vasculatura en el intersticio de las tríadas portales de manera discontinua en el espacio de Disse, y cuando el hígado se encuentra en regeneración, esta proteína rodea las venas centrales (Sell y Ruoslahti, 1982).

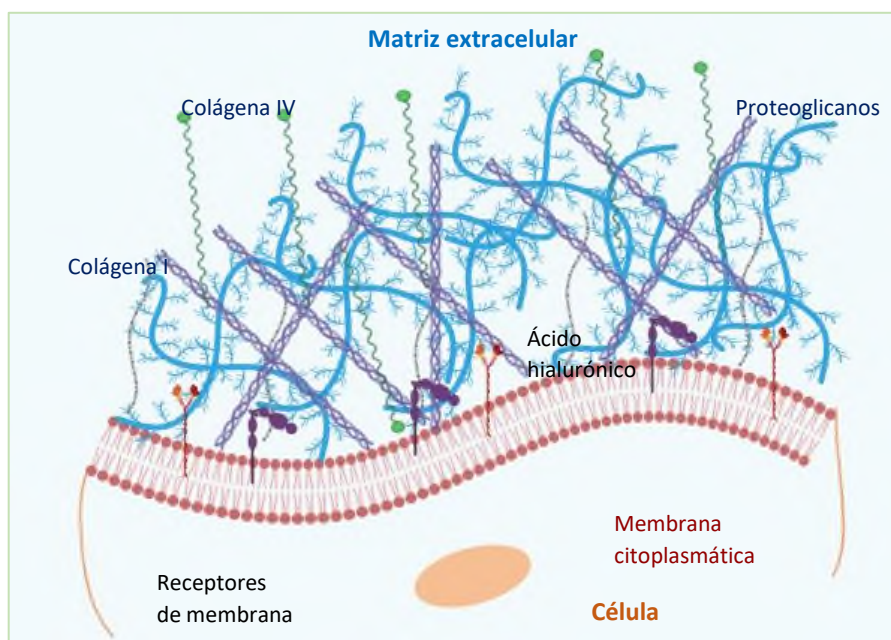


Figura 2. Matriz extracelular. Representación esquemática de los componentes principales de la matriz extracelular en su forma tridimensional, el cual tiene interacción con los receptores y proteínas transmembranales de la célula (Imagen realizada en Biorender, 2020).

La integridad bioquímica y biomecánica de la MEC hepática tienen gran importancia para el mantenimiento del fenotipo de los hepatocitos, así como de los otros tipos celulares (Martínez-Hernández y Amenta, 1993), pues las células tienen la capacidad de detectar cambios en las propiedades mecánicas de la MEC que pueden afectar sus vías de señalización (Pelham *et al.*, 1998). Estudios han encontrado diferencias significativas en las vías de señalización de las células cultivadas en modelos de cultivos *in vitro* de hepatocitos, donde su fenotipo, evidentemente depende de la naturaleza de la MEC donde se cultiva (Rojkind *et al.*, 1980; Geiger *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2013). En los sistemas *in vivo*, las alteraciones en la composición y la estructura tridimensional de la MEC hepática ocasionan la formación de tejido cicatricial conocido como fibrosis, hasta llegar a la generación del último estadio conocido como cirrosis, que afectan el microambiente de los tejidos y la biología de los hepatocitos (Rojkind *et al.*, 1979; Schuppan *et al.*, 1990; Arvelo *et al.*, 2001).

En análisis proteómicos de hígados de rata realizados por Goddard *et al.*, (2016), a través de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), se lograron determinar las proporciones de proteínas pertenecientes a MEC, mismas que corresponden a un 44%, seguido de un 26.4% de colágenos fibrilares, 15.3% de otros colágenos fibrilares y estructurales, y aproximadamente 10% de proteínas de membrana basal (Figura 3a). De este total de proteínas, se destaca que el colágeno tipo I, es la más abundante. Asimismo, dentro de la proporción de proteínas de MEC, se determinaron las veinte más abundantes, distintas a colágeno tipo I (Figura 3b).

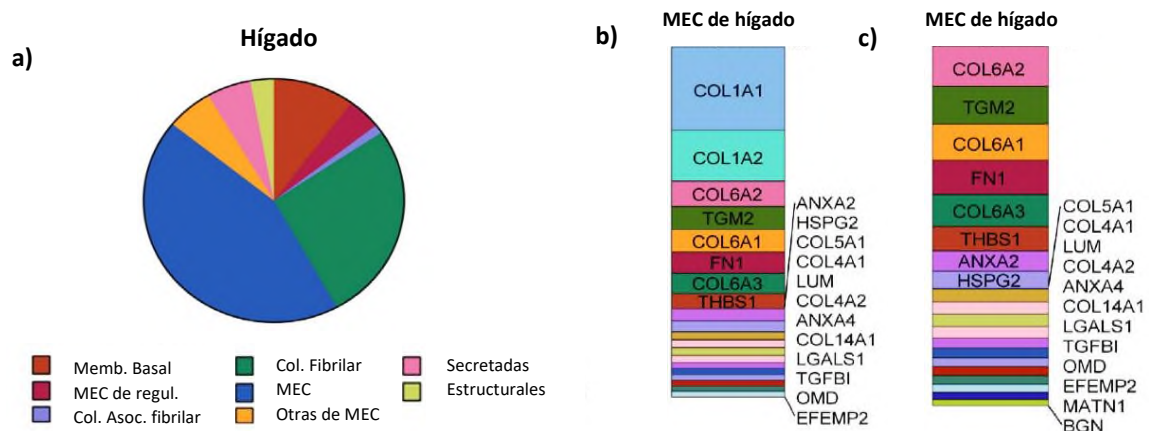


Figura 3: Análisis proteómico de MEC de hígado de rata. a) Proporción de proteínas de MEC y otras asociadas a MEC; b) veinte proteínas más abundantes de MEC de hígados de rata y c) veinte proteínas más abundantes de MEC distintas a colágeno tipo I (versión modificada de Goddard *et al.*, 2016).

El conocimiento de la composición y cuantificación de proteínas de MEC ha tenido gran aplicabilidad en estudios e investigaciones relacionados con la ingeniería de tejidos y de biomateriales, con la finalidad de esclarecer las respuestas a diferentes estímulos de diversos tipos celulares para ensayos de tratamientos a enfermedades, biología de células madre, regeneración de tejidos y prueba pre-clínicas de nuevos fármacos.

2.1.5 La mecánica y la rigidez en el microambiente hepático

Las propiedades mecánicas de la MEC afectan evidentemente el comportamiento de las células, y los cambios en la estructura de la MEC ocurridos por algún daño impactan de manera significativa las funciones de un órgano o tejido, pudiendo generar como resultado el desarrollo de enfermedades degenerativas (Kim *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 2014; Klaas *et al.*, 2016).

Todas las células del cuerpo humano se encuentran susceptibles a cambios de fuerza física como la tensión, compresión, presión de flujo sanguíneo, esfuerzo cortante, fuerzas mecánicas estáticas y la gravedad (Wells, 2008). Cada una de ellas son percibidas a través de mecanorreceptores localizados en la superficie de la membrana plasmática que interactúan directamente con la MEC. Estas interacciones generan estímulos que convierten las señales mecánicas en señales bioquímicas que desencadenan una respuesta celular a través de vías de señalización (You *et al.*, 2018). Este proceso es conocido como mecanotransducción. Las señales de fuerza del exterior son transmitidas al interior de la célula en cooperatividad con diversos complejos celulares como receptores mecanosensores de membrana (adhesiones focales, integrinas de unión, cadherinas, moléculas de adhesión celular, canales iónicos activados por estiramiento, receptores de tirosina quinasa, etc.), complejos de proteínas asociados y mecanotransductores como la red citoesquelética (Lim *et al.*, 2018). La red del citoesqueleto está conformada por los microfilamentos de actina, microtúbulos y los filamentos intermedios; forman una estructura dinámica que une la membrana con el núcleo celular, y que además le confieren estabilidad y resistencia a los tejidos ante la deformación celular. Por su parte, los filamentos de actina se acoplan a complejos de adhesiones focales mediante las proteínas talina, vinculina o α -catenina, influyendo en la contractilidad y tensión citoesquelética, aumentando las fuerzas mecánicas y de adherencia. En conjunto, estas moléculas perciben los cambios de fuerzas y promueven la

participación de proteínas que amplifican y transmiten las fuerzas para su conversión en señales bioquímicas (Mathieu, 2019; Kang, 2020).

Durante una lesión hepática, las células y la MEC generan cambios en la microestructura del tejido hepático y la circulación sanguínea, conllevando a la modificación de las propiedades mecánicas del hígado en términos de rigidez, esfuerzo cortante y presión intersticial (Eipel *et al.*, 2010). El módulo elástico (E) y el módulo cortante (G) son dos unidades principales de rigidez (Venkatesh y Ehma, 2014), cuyos valores en el microambiente mecánico del hígado están co-relacionado con los diferentes estadios de las patologías hepáticas con base a estudios confirmados (Figura 4) (Castera *et al.*, 2008; Baiocchi *et al.*, 2016). Los hígados fibróticos son más rígidos que el hígado sano o normal, debido a una elevada deposición y reticulación de MEC durante el proceso de fibrogénesis (Iwakiri, 2014).

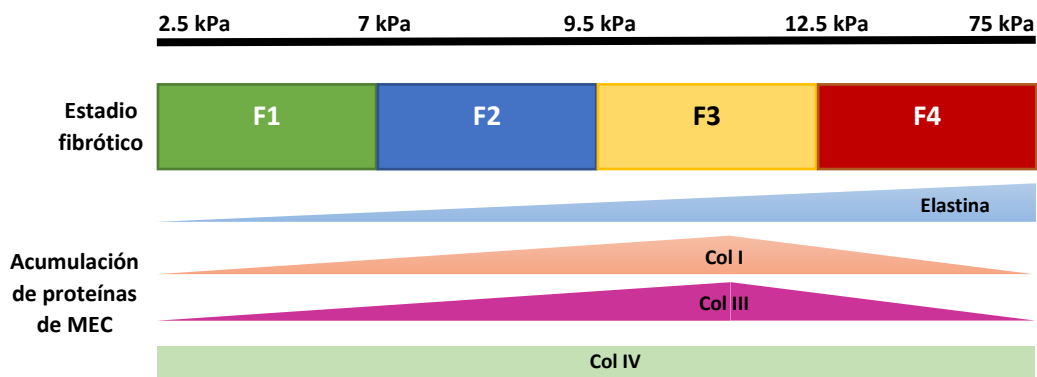


Figura 4. Módulo de elasticidad (E) del hígado en diferentes estadios fibróticos. Representación esquemática de la co-relación del módulo elástico (en kPa) y el estadio fibrótico del hígado. Durante la progresión de la fibrosis se refleja la abundancia de las principales proteínas de MEC involucradas (Adaptado de Castera *et al.*, 2008; Baiocchi *et al.*, 2016).

En los cultivos celulares para el modelo de enfermedades, los hepatocitos han sido el principal tipo celular utilizado para evaluar los efectos que producen los cambios en la rigidez. En cultivos primarios de hepatocitos se ha demostrado que en sustratos rígidos o blandos (representando entornos fibróticos y no fibróticos, respectivamente), las células presentan fenotipos totalmente diferentes. En los sustratos blandos las células permanecen diferenciadas y el tamaño celular se

observa constante; por el contrario, en los sustratos rígidos, las células se extienden y proliferan (Hansen *et al.*, 2006). También, se ha observado que los niveles de mRNA de albúmina se reducen significativamente ante el aumento de la rigidez. De este modo se concluye que los microambientes rígidos pueden conducir a una desdiferenciación celular de los hepatocitos (Görtzen *et al.*, 2015; Desai *et al.*, 2016).

El entendimiento de las vías de señalización por mecanotransducción y su influencia en el comportamiento celular podría ayudar a la construcción de sistemas biomiméticos que permitan simular el entorno y la homeostasis de un microambiente hepático. De este modo se generarían métodos más confiables para la generación de modelos de enfermedades hepáticas o para estudios de respuesta celular ante ensayos de nuevos fármacos.

2.2 Descelularización de tejidos y órganos

La descelularización es un proceso que consiste en la eliminación total del material celular de los órganos o tejidos, con la finalidad de obtener MEC, cuyas propiedades bioquímicas y mecánicas sean preservadas (Lee, 2014). En su mayoría, estos procedimientos son orientados a la generación de biomateriales para mejorar las condiciones de los cultivos celulares.

Las investigaciones pioneras en la generación de MEC de tejidos tuvieron sus orígenes en la década de los ochenta (Hjelle *et al.*, 1979; Rojkind *et al.*, 1980). Más tarde, a mediados de la década de los noventa, Badylak *et al.*, (1995), generaron MEC de submucosa intestinal descelularizada a través de métodos mecánicos para conservar únicamente las capas de tejido conectivo. Posteriormente, el mejoramiento de los protocolos de descelularización, permitió obtener MEC de tejidos simples de piel (Chen *et al.*, 2004), tejido vascular (Schmidt *et al.*, 2000), válvulas cardíacas (Elkins *et al.*, 2001), vejiga (Schultheiss *et al.*, 2005), hasta órganos más complejos como el hígado (Gilbert *et al.*, 2006) y corazón (Mazza *et al.*, 2015), mostrando resultados prometedores que conllevarían a su utilización en el área biomédica y de ingeniería de tejidos. Estos acontecimientos destacados se encuentran resumidos en la Figura 5.

Las funciones de los órganos se encuentran directamente relacionados con la composición bioquímica y propiedades biofísicas de las MEC, y esto ha determinado el motivo por el cual las

células de un órgano específico muestran una preferencia innata hacia los biomateriales de MEC descelularizadas del órgano de origen (Cortiella *et al.*, 2010). Este argumento fue demostrado experimentalmente por Nakayama *et al.*, (2013) al recelularizar con células madre embrionarias humanas, MEC descelularizadas de riñón y pulmón de mono Rhesus (*Macaca mulatta*). Las células madre lograron diferenciarse a células renales y pulmonares, respectivamente, presentando características morfológicas propias de cada tipo celular; además, los niveles de expresión génica de los genes asociados a los órganos aumentaron significativamente en el tiempo de cultivo.

Los análisis proteómicos de las MEC de riñón y pulmón, revelaron entre sí variaciones entre las proporciones de proteínas, por lo que probablemente, estas combinaciones junto con otros factores de crecimiento residuales y moléculas solubles permanecidos en las MEC descelularizadas, sean responsables de llevar a cabo la diferenciación y la organización de las células (Nakayama *et al.*, 2013). La explicación más cercana que sostiene estos fenómenos es debido a que las proteínas específicas de las MEC se distribuyen de manera muy distintiva a través de los compartimentos del órgano, quedando como 'huellas' para las células que llegasen a residir (Luque *et al.*, 2013).

Las MEC descelularizadas de tejidos y órganos ofrecen múltiples ventajas para la fabricación de biomateriales:

- i. Preservación de la estructura y composición ante una organización y remodelación de los tejidos (Badylak *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011).
- ii. Las propiedades fisicoquímicas de las MEC regulan los procesos de migración y diferenciación celular (Cortiella *et al.*, 2010; Nakayama *et al.*, 2013; Garreta, 2016).
- iii. Durante la realización de un trasplante, no se genera rechazo o incompatibilidad por el sistema inmune debido a la conservación de los componentes de las MEC (Bernard *et al.*, 1983; Chung *et al.*, 2006).
- iv. Conservan las propiedades biomecánicas de manera muy similar al tejido nativo (Ott *et al.*, 2008; Luque *et al.*, 2013).
- v. Promueven una respuesta constructiva de remodelación en una variedad de tejidos para la realización de estudios pre-clínicos y clínicos (Londono *et al.*, 2015; Badylak *et al.*, 2016).

- vi. Garantiza el mantenimiento de las funciones celulares, así como la conservación del fenotipo (Bissell *et al.*, 1987; Cortiella *et al.*, 2010).

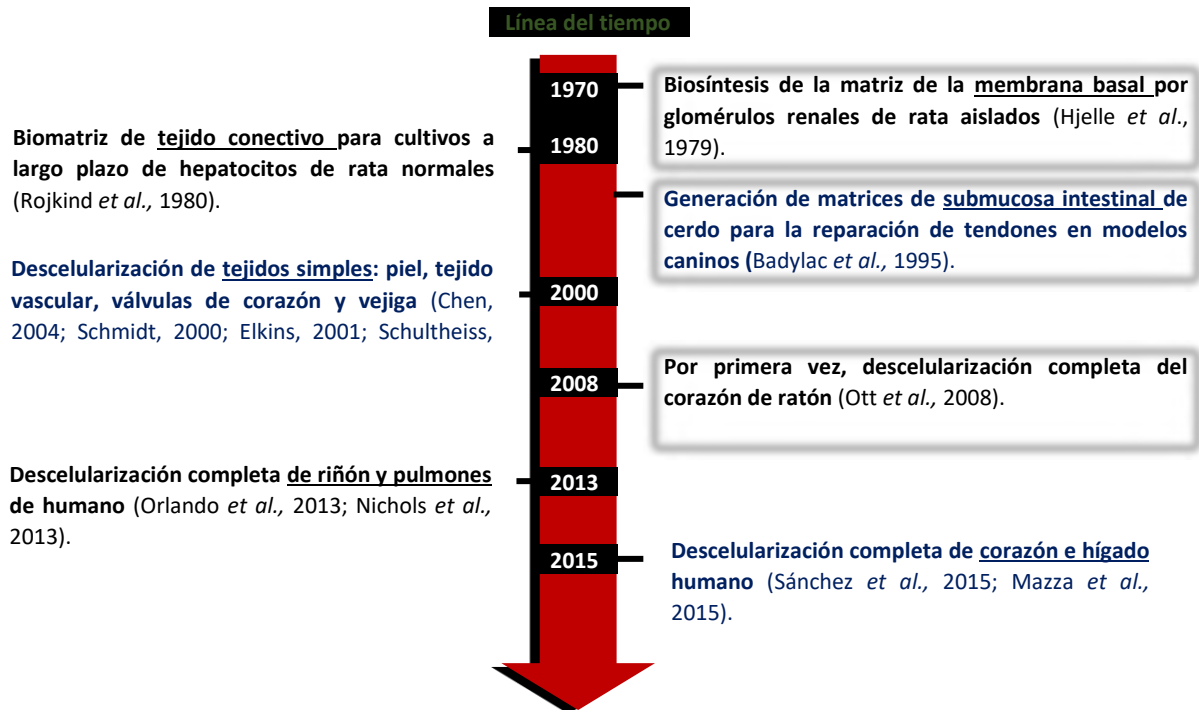


Figura 5. Línea del tiempo de estudios basados en órganos descelularizados. En el esquema se representan las investigaciones con tejidos y órganos descelularizados más destacadas y pioneras las últimas 4 décadas.

2.2.2 Técnicas de descelularización

Los protocolos de descelularización óptimos generan MEC libres de componentes celulares y material genético (ADN y ARN) en un tiempo determinado que dependerá de la naturaleza del tejido u órgano y, por supuesto, de la técnica empleada. Con base a ello, se pretenden obtener MEC cuyas propiedades bioquímicas, estructurales y mecánicas sean conservadas (Montoy *et al.*, 2009; Sawada *et al.*, 2008).

Técnicas como la perfusión y de inmersión/agitación han sido principalmente utilizadas para los procesos de descelularización; sin embargo, existen otras técnicas como por gradiente de presión

(Montoya *et al.*, 2009), fluido supercrítico (Sawada *et al.*, 2008), lavados por soluciones hipo e hipertónicas (Dahl *et al.*, 2003), digestión enzimática con proteasas y nucleasas (Woods y Gratzer, 2005; Bader *et al.*, 1998), sonicación (Fitzpatrick *et al.*, 2010), entre otros.

2.2.3 Perfusión

La descelularización por perfusión es comúnmente utilizada en órganos que presenten una estructura vascular ramificada y definida, para que los componentes y soluciones descelularizantes puedan ser distribuidos a través de la vasculatura de manera homogénea por todo el órgano. Esta técnica ha sido empleada en órganos como corazón e hígado, donde su arteria o vena principal pueden ser canuladas para perfundir soluciones de descelularización bajo condiciones fisiológicas (Ott *et al.*, 2008). Generalmente, los protocolos de descelularización por perfusión se basan en el uso de detergentes iónicos y no iónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y Tritón X-100, respectivamente. El SDS se encarga de eliminar la mayoría de los componentes celulares al desnaturalizar algunas moléculas de las membranas citoplasmáticas y nucleares (Rieder *et al.*, 2004; Woods y Gratzer, 2005). Asimismo, Shupe *et al.*, (2010), lograron generar el primer protocolo de descelularización de hígados de ratones empleando SDS, el cual permitió eliminar cualquier componente celular, específicamente ADN.

El Tritón X-100 es el agente más utilizado para la descelularización de hígados (Nari *et al.*, 2013). Y aunque todavía su función no está muy clara, se ha demostrado en trabajos previos su capacidad de eliminar residuos celulares y nucleares (Dahl *et al.*, 2003; Grauss *et al.*, 2005). A diferencia del SDS, el Tritón X-100 conserva la integridad de las colágenas de la MEC (Guyette *et al.*, 2014). Las formulaciones para la descelularización también se ven complementadas con enzimas como la tripsina y nucleasas para una mejor extracción de ADN/ARN (Soto-Gutierrez, 2011), hidróxido de amonio (Baptista *et al.*, 2011) y agentes quelantes como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y EGTA (ácido aminopolicarboxílico) (De Kock *et al.*, 2011).

2.2.4 Inmersión/agitación

La descelularización por medio de la técnica de inmersión/agitación se logra mediante la sumersión de tejidos en fragmentos pequeños en soluciones descelularizantes mientras se somete a agitación mecánica. Por lo regular, se realiza cuando los órganos carecen de una vasculatura o el acceso a estas estructuras es difícil; a diferencia de la perfusión, esta técnica requiere de un mayor tiempo de proceso para la descelularización (Garreta *et al.*, 2017).

Existen dos tipos de agitación: la directa e indirecta. La primera, consiste en el uso de un agitador orbital para la remoción celular de tejidos sumergidos en las soluciones descelularizantes (Meezan *et al.*, 1975). Por otro lado, la sonicación es una agitación mecánica indirecta que ocasiona daño celular a causa de las ondas sonoras (Fitzpatrick *et al.*, 2005); no obstante, no logra ser suficiente este paso para una descelularización completa del tejido (Takami *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2013), es por ello que esta técnica deber ser complementado con agentes químicos.

2.3 Cultivo celulares biomiméticos

Los cultivos celulares biomiméticos son sistemas que proporcionan un microambiente óptimo que permite mejorar y mantener las actividades metabólicas de la célula. En este sentido, es necesario el uso de sistemas de andamiaje o biomateriales, como soportes o sustratos que contengan las características físicas y fisiológicas cercanos a los modelos *in vivo*; de este modo, se llevarán a cabo estímulos celulares que permitirá generar una respuesta a través de vías de señalización, regulando procesos de proliferación y diferenciación (Lanza *et al.*, 2011; Ijima *et al.*, 2019). En otras palabras, los andamios tienen el objetivo de imitar el medio biológico y fisicoquímico de una MEC natural, ejerciendo como un sustrato de adhesión de las células cultivadas, para proveer un soporte mecánico temporal y dirigir la diferenciación o mantener el fenotipo celular (Yeong *et al.* 2004).

Evidencias experimentales han mostrado que en los sistemas de andamiaje, la rigidez o módulo de elasticidad es una de las propiedades mecánicas que tienen gran influencia en el comportamiento celular, en conjunto con otras propiedades bioquímicas. En los sistemas *in vivo*, cambios en la rigidez del órgano o tejido están estrechamente relacionados con la fibrosis, el

cáncer y algunas enfermedades (Pelham y Wang, 1997; Yeung *et al.*, 2005). Por tal motivo, se intentan diseñar plataformas de cultivo cuyas características mecánicas sean controlables en función de la MEC que se requiera biomimetizar, ya que la mayoría de los modelos biológicos de cultivo *in vitro* tradicionales, se basan en el uso de sustratos planos y rígidos como vidrio (cubreobjetos) o plástico (cajas de cultivo de poliestireno), donde sus propiedades mecánicas se encuentran alejadas de las condiciones fisiológicas de los tejidos (Yeung *et al.*, 2005), conllevando a destacables cambios en el comportamiento celular como morfología aplanada, polarización anormal, proliferación, adhesión y pérdida del fenotipo diferenciado (Pelham y Wang, 1997; Engler *et al.*, 2004b; Reinhart-King *et al.*, 2005; Khatiwala *et al.*, 2006; Baker y Chen, 2012).

2.3.1 Hidrogeles en cultivo celular

Existe una amplia diversidad de materiales para la construcción de andamios, cuyas características fisicoquímicas como la geometría, propiedades de superficie (ejemplos visualizados en la Figura 6), porosidad, tamaño de poro, densidad, tamaño de fibras, fuerzas de tensión mecánicas y biocompatibilidad, influyen de manera importante en la adhesión celular y proliferación (Boyan *et al.*, 1996). Cumpliendo con algunas características anteriormente mencionadas, los hidrogeles se han convertido en una alternativa prometedora para el cultivo celular debido a la estrecha semejanza con la MEC nativa (Liaw *et al.*, 2018), su capacidad de adhesión celular y retención de proteínas (Tibbitt y Anseth, 2009), además de poseer propiedades mecánicas y bioquímicas interesantes para múltiples aplicaciones en el área biomédica y biotecnológica (Cruz-Acuña y García, 2016).

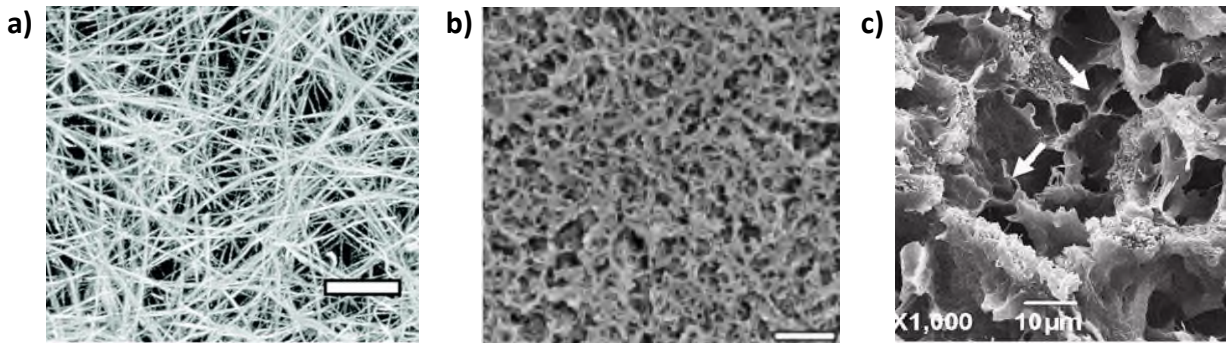


Figura 6. Microscopías electrónicas de estructuras tridimensionales de MEC. Imágenes representativas de las nanoestructuras de a) fibras de colágena de un hidrogel de colágena tipo I, b) Matrigel® y c) MEC de hígado de rata con la presencia de fibras de colágena. Claramente, se logra apreciar la arquitectura particular de cada biomaterial. Imágenes obtenidas de Safer *et al.*, (2015); Poincloux *et al.*, (2009).

Los hidrogeles son materiales poliméricos altamente hidratados, con un contenido de agua mayor a 30% en peso, conformados por redes reticuladas de las cadenas poliméricas en presencia de agua o medio fisiológico, otorgándoles una organización estructural tridimensional, formado a su vez por interacciones físicas o por interacciones químicas entre los grupos funcionales presentes (Peppas, 1986; Peppas, 1996; Hoffman, 2002; Drury, 2003; Klouda, 2008). Las cadenas poliméricas que conforman los hidrogeles pueden ser de origen natural o sintético. Dentro de los naturales se encuentran colágena (Wallace y Rosenblatt, 2003), fibrina (Eyrich *et al.*, 2007), alginato (Kong *et al.*, 2003), ácido hialurónico (Solchaga *et al.*, 2002), gelatina (Kim *et al.*, 2004) y quitosano (Suh y Matthew, 2000); los polímeros de origen sintético se encuentran copolímeros como fumarato de propileno (PPF) (Behravesch y Mikos, 2003), polietilenglicol (PEG), polivinil alcohol (PVA) (Bryant *et al.*, 2004) y poliacrilamida (PA) (Tse y Engler, 2010).

2.3.1.1 Hidrogeles de colágena

La colágena es una de las proteínas que principalmente conforma a los tejidos; particularmente la colágena tipo I es la más común y el principal componente estructural de muchos tejidos (Shoulders y Raines, 2009). Debido a esto, resulta ser un material muy atractivo para los modelos en cultivos celulares. Los principales materiales consisten en hidrogeles de colágena tipo I, pero también se incluyen los tipos II y III. Para la obtención de la colágena tipo I para la elaboración de los hidrogeles, generalmente se derivan del tendón de cola de rata y

posteriormente, se lleva a cabo una solubilización con pepsina o ácido; sin embargo, actualmente los hidrogeles de colágena tipo I se pueden encontrar disponibles con una gran variedad de proveedores (Caliari y Burdick, 2016).

Por representar uno de los principales componentes de la MEC, los hidrogeles de colágena tipo I ofrecen la ventaja de generar un microambiente biomimético para las células, pues son ideales para la adhesión celular y presentan un entorno viscoelástico similar al nativo; por el contrario, la desventaja que disponen es la baja rigidez, disminución de la estabilidad a largo plazo y su variación entre lotes. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles se determinan en función de la concentración de colágena; la elaboración de hidrogeles $> 1\text{kPa}$, implica dificultades al ocasionar un grado de reticulación extenso, generando así la degradabilidad de las fibras de colágena. Asimismo, han reflejado cambios en la accesibilidad de los ligandos de adhesión celular, viéndose limitado su control y uso. A pesar de ello, los hidrogeles de colágena tipo I al menos han evidenciado ser excelentes modelos en los cultivos *in vitro* durante los procesos de migración celular (Kim *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2015).

2.3.1.2 Hidrogeles de Matrigel

Además de los hidrogeles de colágena tipo I, existen otros hidrogeles derivados de MEC y que también contienen colágena en su composición. Matrigel® es una preparación de proteínas extraídas de membrana basal de tumores de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), compuesta principalmente de laminina (~60%), colágena tipo IV (~30%), entactina (~8%), proteoglicanos de sulfato de heparán, perlecano (~2-3%) (Corning, 2019) y factores de crecimiento (Kleinman y Martin, 2005). Matrigel ha sido protagonista de múltiples investigaciones en diversos tipos celulares y ha demostrado ser una herramienta práctica y útil; se han utilizado para cultivar y expandir células pluripotenciales humanas (hPSC) (Xu *et al.*, 2001), neuronas (Quian y Saltzman, 2004; Lee *et al.*, 2015), cardiomiocitos (Laflamme *et al.*, 2007) y hepatocitos (Sellaro *et al.*, 2010). Además, los recubrimientos de Matrigel ante los modelos de tubulogénesis endotelial (Ponce, 2001, 2009) y encapsulación 3D para la ingeniería de tejidos (Mondrino *et al.*, 2006; Li y Guan, 2011), son otras de las múltiples aplicaciones en las que los hidrogeles de Matrigel han destacado. A pesar de su versatilidad de aplicaciones, Matrigel se encuentra rigurosamente limitada debido a la variabilidad en su composición entre lotes o proveedores, y

por la presencia de contaminantes exógenos. En consecuencia, han surgido indicaciones para tener la precaución en la confiabilidad e interpretación de los resultados en los cultivos celulares, sugerida por la variabilidad de la composición de hidrogel (Vukicevic *et al.*, 1992; Benton *et al.*, 2011).

De modo similar a lo que sucede en la composición, las propiedades mecánicas también presentan variabilidad entre lotes y también pueden variar en función de la temperatura y método de prueba. En experimentaciones, se ha logrado determinar la variación de la rigidez o módulo de elasticidad de los hidrogeles de Matrigel. Por ejemplo, con microscopía de fuerza atómica, los valores encontrados han sido de 400-840 Pa hasta 1-3 kPa (Soofi *et al.*, 2009); con interferometría mecánica *in situ* el promedio de las mediciones a granel es ~650 Pa con variaciones hasta los 1-2 kPa (Reed *et al.*, 2009). La heterogeneidad en la rigidez de Matrigel se le ha atribuido principalmente a los cambios graduales en la remodelación de la MEC y al espesor del hidrogel a lo largo del tiempo (Reed *et al.*, 2009), así como también a la influencia del sustrato subyacente sobre el hidrogel (Kohen *et al.*, 2009).

2.3.1.3 Hidrogeles de MEC descelularizada

Los tejidos y órganos descelularizados han tenido un enfoque importante en las aplicaciones clínicas para la reparación y regeneración de tejidos, así como también para estudios pre-clínicos en la medicina regenerativa y farmacología. Recientemente, se ha mostrado un gran interés en la producción de hidrogeles de MEC de tejidos descelularizados debido a su esperada biocompatibilidad y bioactividad por encima de los hidrogeles convencionales (Malafaya *et al.*, 2007); además, los componentes de las MECd proporcionan la cantidad de información suficiente y necesaria para el funcionamiento celular como el crecimiento, diferenciación, proliferación y migración (Frantz *et al.*, 2010). En este sentido, los andamios a partir de MECd parecen ser prometedores para ser los sustratos biomiméticos ideales para recrear el microambiente celular.

El proceso que ejerce la formación de los hidrogeles de MEC descelularizada (MECd) es el autoensamblaje de proteínas y péptidos regulado principalmente por la presencia de colágena, glucosaminoglicanos y proteoglicanos de la MEC (Brightman *et al.*, 2000). Después de la descelularización, las MEC se pulverizan y luego se someten a procesos de solubilización o

digestiones enzimáticas; los protocolos más comunes de solubilización enzimática utilizan pepsina gástrica bovina (Drake *et al.*, 1966; Miller, 1972) con la finalidad de romper enlaces de telopéptidos de la estructura de la triple hélice de la colágena bajo condiciones ácidas (ácido clorhídrico diluido) (Hulmes, 2008; Freytes *et al.*, 2008), seguido de una reacción de neutralización. De esta manera, los monómeros proteicos disponibles y la neutralización controlada por temperatura y pH, permitirán el ensamblaje espontáneo de los enlaces intramoleculares para la formación del hidrogel. A su vez, la cinética de polimerización estará influenciada por la naturaleza bioquímica del tejido nativo y las proteínas que hayan quedado prevaecidas después del proceso de descelularización (Crapo *et al.*, 2011; Keane *et al.*, 2012).

Las propiedades mecánicas y biológicas de los hidrogeles de MECd muchas veces son dependientes del tipo específico de MEC y su concentración en solución (Wolf *et al.*, 2012); no obstante, muchas de estas propiedades se han visto modificadas después de la descelularización (Nakayama *et al.*, 2010; Goh *et al.*, 2013). En células madre, estos cambios en la rigidez de los hidrogeles de MECd pueden afectar la diferenciación celular, alterando la función a causa de los procesos de mecanotransducción (Engler *et al.*, 2006, 2007; Reilly y Engler, 2010; Pennesi *et al.*, 2011; Tse y Engler, 2011); sin embargo, existen reticulantes químicos como el glutaraldehído (Singelyn y Christman, 2011), etildimetilaminopropil carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (Liao y Simionescu, 2013) que modulan la rigidez de los hidrogeles en función a las necesidades del cultivo.

En modelos hepáticos, múltiples investigaciones han dilucidado que la MEC tiene la capacidad de mantener el fenotipo de los hepatocitos. Las células fueron cultivadas entre dos capas de hidrogel de MECd de hígado porcino y preservaron su fenotipo al observarse los marcadores bioquímicos como la producción de albúmina, urea y capacidad de transporte (Sellaro *et al.*, 2010). Por otro lado, en hepatocitos de cultivo primario embebidos en hidrogeles de MECd de hígado, mostraron alta actividad de síntesis de albúmina y actividad etoxi-resorufina-O delilasa (EROD) durante 3 semanas de cultivo; además mostraron una alta supervivencia cuando los hidrogeles con los hepatocitos embebidos fueron implantados en ratas hepatectomizadas, logrando demostrar la formación de una estructura muy similar al tejido hepático 2 veces con respecto a hepatocitos embebidos en hidrogeles de colágena (Ijima *et al.*, 2019).

2.3.1.4 Incorporación de proteínas de MEC en hidrogeles de PA

Los hidrogeles, a pesar de mostrar una gran capacidad de imitar una MEC en cuanto a su microestructura y composición (Tibbitt y Anseth, 2009), no logran todavía obtener la complejidad biológica consistida por la gran diversidad de moléculas propias de la MEC nativa (Boudreau y Bissell, 1998). Regularmente, muchos hidrogeles son complementados con moléculas de MEC como el ácido hialurónico (Hassan *et al.*, 2013), colágenas (Rafat *et al.*, 2008; Callahan *et al.*, 2012), lamininas (Suri y Schmidt, 2010), elastinas (Annabi *et al.*, 2013) o fibronectinas (Ingenito *et al.*, 2010), con la finalidad de modificar el entorno celular y mejorar algunas de sus funciones biológicas. Por tal motivo, se han intentado incorporar péptidos conjugados a las cadenas poliméricas de los hidrogeles, como alternativa ante las desventajas que estos materiales proporcionan. Hasta ahora, uno de los mejores candidatos considerados para realizar las mencionadas modificaciones, son los hidrogeles sintéticos.

Particularmente, la poliacrilamida es un polímero sintético producto de la reacción de monómeros de acrilamida y el reticulante bis-acrilamida, en presencia de persulfato de amonio (APS) y tetrametiletilendiamina (TEMED) (Figura 7); ambos funcionan como fuente de radicales libres y como catalizadores para iniciar la polimerización por los radicales redox, respectivamente. Por otro lado, la PA ofrece interesantes ventajas para su aplicación en los cultivos celulares; entre ellas, es la posibilidad de modificar su módulo de elasticidad o rigidez variando las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida (Pelharm y Wang, 1997; Tse y Engler, 2010), sin alterar la naturaleza química de la superficie del material, misma que es importante para la propagación celular debido a la densidad del ligando conjugado (Engler *et al.*, 2004a); además, la PA es un polímero inerte donde interactúan moléculas adhesivas selectivas para unirse covalentemente a la red polimérica, funcionando así como ligandos para la adhesión celular (Georges y Janmey, 2005). Debido a esto, existen protocolos estandarizados para la fabricación de hidrogeles de PA con rigidez controlable y acoplamiento de proteínas (Tse y Engler, 2010); recientemente, estos protocolos también han sido diseñados para el cultivo celular en cajas de poliestireno multipozos para ensayos de mecanobiología (Díaz-Bello *et al.*, 2019). La modulación de la mecánica y la bioquímica, puede dirigir a una compresión más profunda de las posibles respuestas celulares complejas que muchas veces no se logran visualizar con hidrogeles naturales.

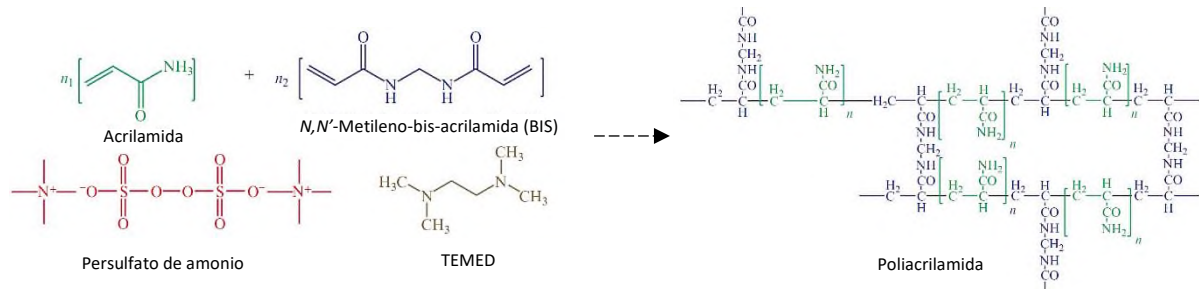


Figura 7. Reacción de polimerización de la acrilamida. La *N,N'*-Metileno-bis-acrilamida (BIS) actúa como un reticulante entre las subunidades de la acrilamida. La catálisis está dada por la generación de radicales libres por el persulfato de amonio en presencia de TEMED. El producto final es una red polimérica, la cual su tamaño de poro puede ser controlada por la concentración de acrilamida y BIS reticulante. Imagen tomada y modificada de Kamdow *et al.*, (2007).

En un estudio realizado con células madre mesenquimales humanas (hMSC), se observó que su propagación y proliferación aumentan en proporción al incremento de la rigidez de la PA, pero ocurría menos en los hidrogeles de PA recubiertos con laminina con respecto a los recubiertos con proteínas de MEC, lo que sugiere que la presencia de ligandos adhesivos a la superficie pueden modificar la respuesta celular (Rowlands *et al.*, 2008). De la misma forma, otra de las investigaciones más sobresalientes, ha sido el cultivo de hepatocitos sobre sustratos de PA con distintos rangos de rigidez fisiológica recubiertos con proteínas de colágena, como modelos de fibrosis hepática. En este experimento, las células cultivadas en los sustratos más cercanos a las condiciones fisiológicas al hígado sano, mostraron una mayor regulación funcional del factor nuclear 4α de los hepatocitos (HNF4 α), mientras que la matriz fibrótica inhibió la regulación transcripcional de este factor típico de fenotipo de hepatocitos (Desai *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

El hígado representa uno de los órganos más importantes en seres humanos, desempeña funciones como el metabolismo de xenobióticos y la síntesis de biomoléculas indispensables para la vida, por lo que el daño en este órgano podría comprometer las funciones vitales en los individuos. De ahí la importancia de los cultivos celulares para la evaluación de fármacos en las pruebas pre-clínicas y verificar si estas tienen efectos hepatotóxicos. Sin embargo, los cultivos *in vitro* convencionales de hepatocitos, muchas veces no disponen de las condiciones adecuadas de adhesión celular al sustrato o soporte en que se encuentran, lo que implica que la célula pierda algunas de sus características fenotípicas a las pocas horas de cultivo. Como alternativa, se han intentado generar biomateriales derivados de proteínas derivadas de matriz como la colágena tipo I de tendón de cola de rata y Matrigel®, debido a su capacidad adherente en la interacción célula-sustrato; no obstante, la principal desventaja que presentan, es que todavía no logran recrear el microambiente de una matriz hepática, lo que podría desencadenar una pérdida de fenotipo de los hepatocitos. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias biotecnológicas para la generación de materiales biomiméticos a partir de proteínas de MECd, que permitan imitar y recrear de mejor manera el microambiente mecánico y bioquímico de un tejido hepático nativo en conjunto con combinaciones de otras proteínas derivadas de MEC. Asimismo, encontrar la combinación ideal de componentes proteicos de MEC, sería un desafío para la promoción de la adhesión celular en hepatocitos sobre los andamios de cultivos celulares, pues se ha evidenciado que la adherencia celular al sustrato es un proceso clave para el mantenimiento de la sobrevivencia y conservación fenotípica de los hepatocitos.

Con esta tecnología, en un futuro se podrían realizar cultivos celulares para la regeneración de tejidos hepáticos, así como ensayos pre-clínicos para la prueba de nuevos fármacos que induzcan una respuesta celular.

4. HIPÓTESIS

Los péptidos diferenciales de MECd incorporados a hidrogeles de rigidez suave, proporcionarán mejores condiciones en la respuesta al esparcimiento y agregación celular en cultivo primario de hepatocitos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los péptidos diferenciales derivados de MECd de hígado sobre el esparcimiento y agregación de hepatocitos cultivados en hidrogeles de rigidez controlada.

5.2 Objetivos específicos

1. Extraer péptidos diferenciales derivados de MECd de hígados de rata.
2. Incorporar péptidos diferenciales a hidrogeles de poliacrilamida de diferente rigidez.
3. Evaluar los cambios ocurridos en el esparcimiento, agregación y supervivencia celular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

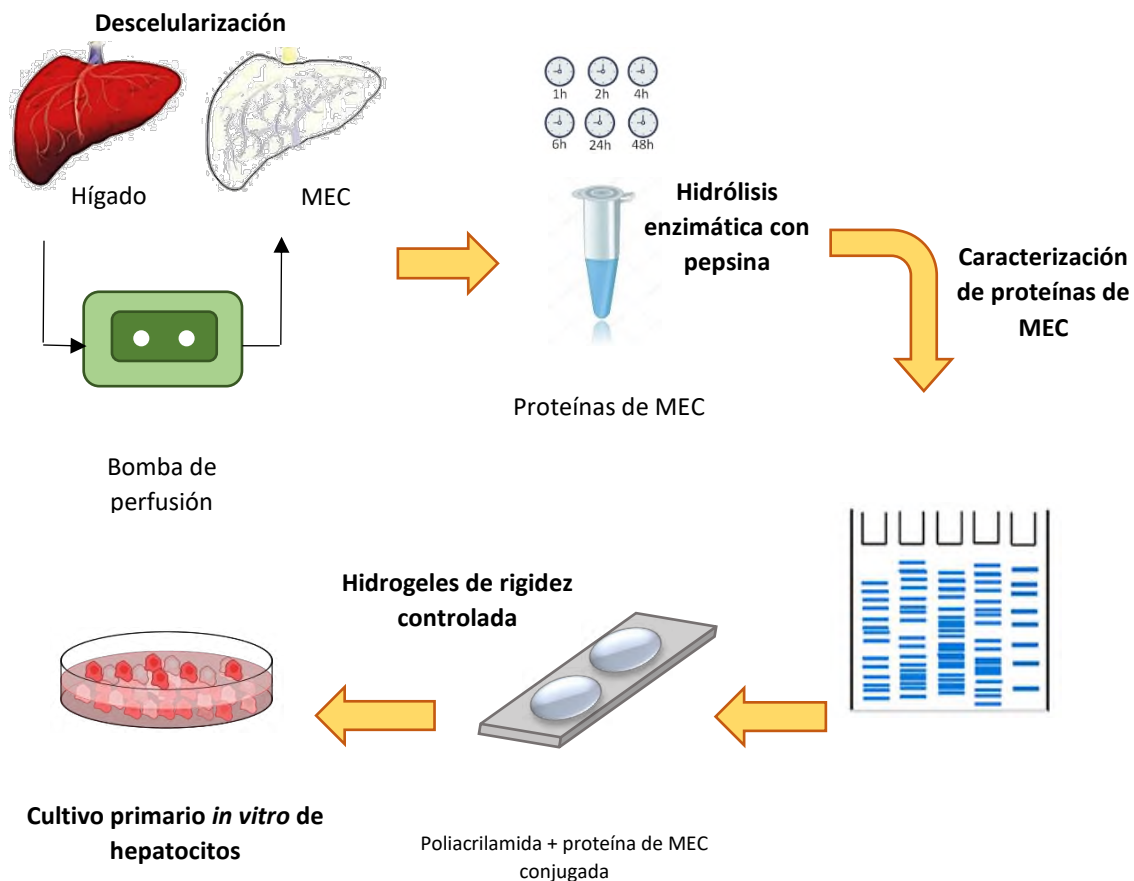


Figura 8. Esquema general de la metodología experimental.

6.1 Descelularización de hígados de rata

Las MECd se obtuvieron de hígados de rata macho de la cepa Wistar de 250-300 g. Primeramente, las ratas se anestesiaron con 0.5 mL de pentobarbital sódico y se realizó la laparotomía realizando una incisión en línea recta en el centro del abdomen y dos cortes perpendiculares en dirección a los riñones. Los órganos de la cavidad abdominal fueron removidos para dejar expuesto solamente al hígado y las venas porta y cava.

Con el apoyo de unas pinzas de sujeción, se colocaron dos hilos por debajo de la vena porta: uno sencillo denominado *hilo guía* y el segundo (doble o triple) denominado *hilo de amarre*, tal como se observa en la Figura 6a. El *hilo de guía* ayuda a tensar la vena para observar su dirección y el *hilo de amarre*, colocado antes de la bifurcación que se dirige hacia los diferentes lóbulos, es el que posteriormente sujetará la vena porta con la cánula y soportará todo el peso del hígado.

Una vez colocado los hilos, se administró 0.2 mL de heparina sódica 1000 UI/mL en la vena cava para evitar la coagulación en caso que el animal falleciera antes del término de la operación. A continuación, se realizó una pequeña incisión en la vena porta y con el apoyo del *hilo guía* se insertó cuidadosamente una cánula (previamente conectada a una bomba peristáltica) para iniciar un pre-lavado con agua desionizada a 4°C y desgasificada por sonicación, a un flujo de 5 mL/min. La vena porta y la cánula quedaron sujetas entre sí realizando un nudo firme con el *hilo de amarre* y finalmente, se extrajeron los hígados completos retiraron los excesos de tejido adiposo, muscular y conectivo. En seguida, los hígados fueron colocados y sujetados cuidadosamente en vasos de precipitados hasta concluir con el pre-lavado por 30 min (Figura 9b-c).

Los hígados lavados se trasladaron a vasos de precipitados que contenían 600 mL de una solución de descelularización previamente desgasificada, compuesta por 1% Tritón X-100, 0.1% NH₄OH [30%], 0.01 µg/mL de DNAsa pancreática bovina [10 µg/mL] y 0.1 mM de MgCl₂ en agua desionizada. Los hígados fueron perfundidos con la solución de descelularización y se mantuvieron en recirculación durante toda la noche a un flujo constante de 5 mL/min, a temperatura ambiente (Figura 6d).

Al finalizar el proceso de descelularización, los hígados se lavaron con agua desionizada durante 4 h y las MEC resultantes se colocaron en cajas Petri de vidrio, se eliminó el exceso de agua y por último, se almacenaron a -70°C hasta su posterior uso.

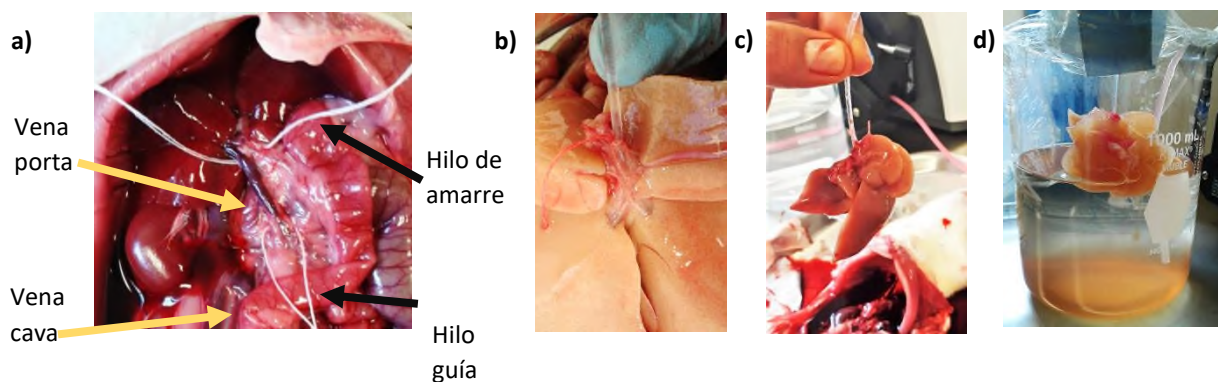


Figura 9. Proceso de canulación durante la descellularización. a) La vena porta queda expuesta para colocar los hilos guía y de amarre. b) La punta de la cánula y su sujeción con la vena debe situarse antes de la bifurcación. c) El nudo durante la sujeción debe ser suficientemente fuerte para sostener al hígado durante todo el proceso de descellularización y d) el hígado debe estar sumergido ligeramente en la solución.

6.2 Aislamiento de péptidos de MECd

Las MECd se liofilizaron a -70°C y 200 mTorr durante 12 h o hasta observar la ausencia total de agua. Se obtuvo el peso seco de cada una y se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino. Luego, en tubos cónicos se realizaron las digestiones enzimáticas con pepsina gástrica bovina con base a la relación de 10 mg de MECd/mg de pepsina/mL de HCl 0.1 N y se mantuvieron en un agitador orbital a temperatura ambiente. Los productos de la reacción enzimática se recuperaron en microtubos de 1.5 mL a 1, 2, 4, 6, 24 y 48 h, y estos se neutralizaron con NaOH 10 M para inactivar la reacción en cada tiempo de digestión. Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron a 13300 rpm (17000 xg), durante 10 min a 4°C , se recuperaron los sobrenadantes (proteínas solubles) de cada producto de la digestión enzimática y finalmente, se conservaron a -70°C .

6.3 Caracterización de proteínas de MECd

Las proteínas digeridas enzimáticamente se cuantificaron por el método de Lowry con base al protocolo del Kit DC Protein Assay de BioRad®, empleando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) [1.5 mg/mL] con las concentraciones [0.25, 0.5, 1.0 y 1.5] mg/mL y como muestra blanco se empleó buffer de fosfatos salino (PBS). Las proteínas de MECd a cuantificar se diluyeron en PBS a una relación 1:10.

Los datos de absorbancia se obtuvieron por espectrofotometría a una longitud de onda de 750 nm y se determinó la ecuación lineal en Microsoft® Office Excel para conocer las concentraciones de proteínas en la dilución.

Con la finalidad de realizar un perfil comparativo de péptidos de las proteínas a utilizar para la fabricación de los sustratos de cultivo, se realizó SDS-PAGE 8% y sobre los geles de poliacrilamida (29:1) se colocaron 40 µg de proteínas de MECd y 20 µg de otras proteínas derivadas de MEC: colágena tipo I (Col I) de tendón de cola de rata, membrana basal (MB) de Matrigel® y combinaciones (en término de porcentaje) 50/50 y 75/25 de Col I y MB, respectivamente. Las proteínas se separaron durante 1.5 h a 120 V. Finalizando, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R250 y nitrato de plata (ver Anexo I) para visualizar el perfil de péptidos obtenidos.

Para identificar las proteínas presentes y su abundancia en cada una de las muestras, se realizó inmunoblot (protocolo detallado en Anexo II). Para ello, las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de PVDF (polivinildifluoruro), se incubaron con una solución de bloqueo compuesta por 5% suero de leche baja en grasa en TBST 1X (Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0.1% Tween-20, pH 7.6) por 1 h en agitación y se lavaron tres veces con agua desionizada y uno con TBST 1X. Luego, las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales primarios de ratón para colágena tipo I a una dilución 1:2000 en 5 mL de TBST 1X durante toda la noche en agitación a 4°C y los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1:5000 en TBST 1X durante 1 h en agitación, a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBST 1X, cada uno durante 5 min; se incubaron con luminol y sustrato para peroxidasa para la reacción quimioluminiscente y, finalmente, fueron reveladas en placas de rayos X.

6.4 Cultivo primarios de hepatocitos

Para el cultivo primario de hepatocitos de rata, primeramente se elaboraron sustratos de hidrogel de PA de rigidez controlada de 1 y 20 kPa, sobre cubreobjetos de 20 mm de vidrio funcionalizados, con base a los protocolos descritos por Tse y Engler, 2010 y Cretu *et al.*, 2010 (ver Anexo III). Los valores de rigidez fueron seleccionados en función de obtener condiciones cercanas y alejadas al rango fisiológico de la matriz hepática nativa. Posteriormente, se entrecruzaron 0.1 mg/mL de

todas las proteínas derivadas de MEC y MECd empleando el método de fotoadhesión con NH-éster acrilato, Irgacure® 2959, inducidos con luz UV a 365 nm.

Los sustratos de hidrogel de PA entrecruzados con las proteínas fueron colocados en cajas estériles de poliestireno de 12 pozos y se prosiguió con la siembra de los hepatocitos de rata de cultivo primario, en una densidad celular de 2.5×10^5 en medio *Feeding* (medio Dulbecco's modified Eagle's, BSA, tampón de HEPES 1M, piruvato de sodio 100 mM, NaH_2CO_3 , galactosa, prolina, insulina, transferrina, selenio y glutamina 200 mM) complementada con antibióticos, incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 .

Para evaluar la capacidad proliferativa de los hepatocitos, se añadieron 20 ng/mL de el factor de crecimiento epidermal (EGF) a las 72 h de cultivo, en cada uno de los tratamientos.

6.5 Ensayo de inmunofluorescencia y TUNEL

Para el ensayo de detección de apoptosis por TUNEL, los hepatocitos cultivados en los hidrogeles de PA bajo las condiciones descritas anteriormente, se fijaron con 4% PFA y nuevamente se fijaron en una solución pre-enfriada de etanol y ácido acético relación 2:1, durante 5 min a 20°C. Posteriormente, las muestras se procesaron con base a las especificaciones del fabricante del Manual del Kit de Detección *in situ* con fluoresceína ApopTag de Merck Millipore®.

En los ensayos de inmunofluorescencia, las células fueron lavadas con tampón de fosfatos salino Dulbecco (DPBS) 1X precalentado y enseguida, se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA) en DPBS 1X, durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron con 0.1 % de Tritón X-100 en DPBS 1X durante 10 min en agitación a temperatura ambiente. Luego, las células fueron bloqueadas con 10% de suero de caballo en PBS 1X durante 1 h en agitación, a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en una dilución 1:200 en DPBS 1X y finalmente, las muestras se montaron con Mowiol® para su preservación. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia.

6.6 Procesamiento de imágenes para cuantificar área celular, área nuclear, esparcimiento y agregados celulares, y análisis estadístico.

El análisis y procesamiento de imágenes se realizaron con el *software* Fiji de ImageJ, considerando un mínimo de 10 imágenes por condición, de al menos 2 experimentos independientes. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el *software* GraphPad Prism 8, utilizando ANOVA de una sola vía y la prueba de comparación de medias por Tukey, atribuyendo como valores significativos si $p < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 El proceso de descelularización de hígados de rata generó MEC libres de componentes celulares

Del proceso de descelularización se obtuvieron hígados libres de componentes celulares en un promedio de 19 h, al término de los lavados con agua desionizada. Las MEC resultantes mostraron una apariencia traslúcida, preservando su arquitectura y vasculatura innata o árbol vascular, tal y como lo describe Baptista *et al.*, 2011, ver Figura 10. En este paso, los agentes descelularizantes Tritón X-100, NH₄OH y los lavados con agua desionizada, permitieron remover todos los componentes celulares del hígado; la DNAsa I añadida mejoró el proceso al impedir obstrucciones del flujo en la vasculatura debido al material genético que se pudiese acumular. Otros protocolos de descelularización, como el presentado por Lee *et al.*, 2013, no utilizan nucleasas, a cambio emplean detergentes aniónicos como el SDS por la alta eficiencia que muestra para eliminar todo el material celular de los órganos o tejidos; sin embargo, la desventaja que presenta, es que dependiendo del tiempo de exposición con los tejidos, es la probabilidad de generar daños hacia componentes importantes de la MEC como las proteínas, pudiendo generar posibles soportes disfuncionales para los cultivos celulares (Samouillan *et al.*, 1999).

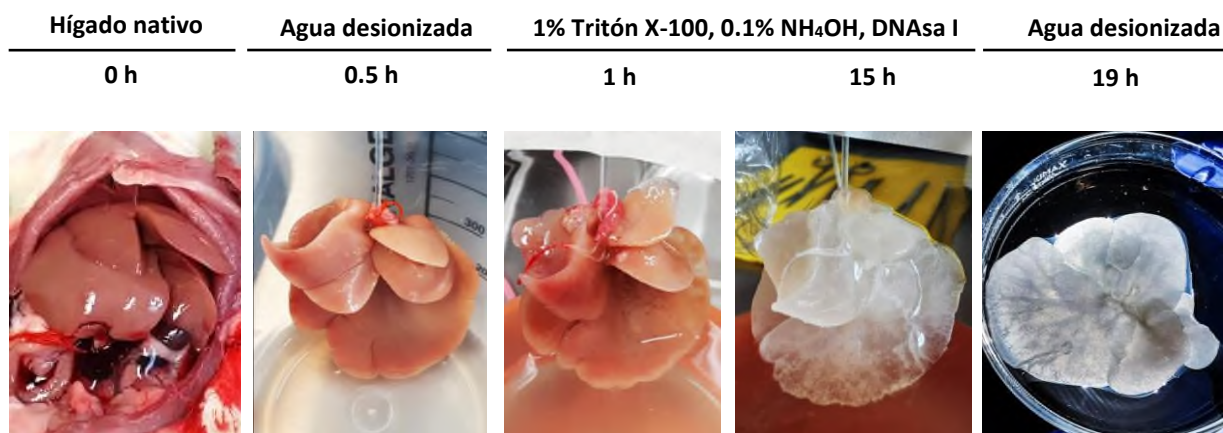


Figura 10. Proceso de descelularización de hígados de rata, a través del tiempo. Las 0 h indican el inicio de la canulación para el primer pre-lavado con agua desionizada (0.5 h). A partir de 1 h a las 15 h, se llevó a cabo la descelularización de los hígados con la solución de Tritón X-100, NH₄OH y DNAsa I. A las 19 h se obtuvieron las MEC al término de un lavado final con agua desionizada.

En modelos de válvulas cardíacas de cerdo, se compararon diferentes procedimientos de descelularización para observar el potencial de eliminación de componentes celulares y preservación de la matriz. El tratamiento con Tritón X-100 y desoxicolato de sodio lograron una descelularización completa y una preservación de la MEC, mientras que el SDS solamente eliminó completamente las células, pero ocasionó evidentes alteraciones estructurales en la MEC (Kasimir *et al.*, 2003). Esto es debido a que el SDS conduce a la desnaturalización de las fibras de colágena al desestabilizar sus hélices (Samouillan *et al.*, 1999).

7.2 Los perfiles de proteína de las MECd presentan diferencias en función del tiempo de digestión con pepsina

En un sistema de andamiaje de MECd para cultivo celular, la conservación de las ‘huellas dactilares’ específicas del tejido es indispensable para la adhesión y diferenciación celular (Crapo *et al.*, 2011), lo que despertó el interés de dirigir este trabajo a la búsqueda de la composición ideal de proteínas que permitiera mejorar la sobrevivencia y capacidad de adhesión de los hepatocitos cultivados en los hidrogeles de PA, ya que de esta manera, permitiría simular la heterogeneidad de la composición proteica del lobulillo hepático. Dicha propuesta, conllevó al análisis del perfil comparativo de las proteínas derivadas de MEC (Col I y MB) y MECd digeridas a distintos tiempos con pepsina, a través de SDS-PAGE, para evidenciar las variaciones en la composición de cada uno los sustratos.

El perfil de separación de proteínas de MECd por SDS-PAGE, mostró que, en tiempos largos de digestión con pepsina (> 24 h), la proporción de proteínas solubles de menor tamaño aumentaba a consecuencia de una mayor fragmentación de otras proteínas, como se visualiza en la Figura 11a. En los SDS-PAGE, los perfiles de digestión con pepsina de las proteínas mostraron diferencias entre los tiempos cortos (<24 h) y largos de digestión, similar a lo demostrado en investigaciones recientes en MECd de pulmones de cerdo (Pouliot *et al.*, 2020) y en tejidos cardíacos descelularizados (Willians *et al.*, 2015), logrando confirmar el efecto que ejerce el tiempo de digestión con pepsina sobre la variabilidad de fracciones de proteínas solubles de MEC obtenidas; además, estas diferencias de fracciones de proteínas por producto de digestión, han evidenciado estar relacionadas en la determinación de las propiedades físicas y bioquímicas de los hidrogeles realizados a partir de MECd, así como en la viabilidad celular (Lin y Liu, 2006; Pouliot *et al.*, 2020).

Asimismo, se ha comprobado que las diferencias en el tiempo de digestión, influyen en la composición de la MECd; en tiempos cortos (a partir de 1 h), las MECd son enriquecidas con fragmentos de proteínas menos reticuladas (como Col IV de membrana basal), mientras que en tiempos largos (a partir de 4 h) las MECd contienen mayores cantidades de colágenas fibrilares (como Col I y Col III) (Serna-Márquez *et al.*, 2020). En este contexto, para demostrar si la variabilidad de fracciones de proteínas de MECd de hígados lograba generar un efecto en el cultivo de hepatocitos, se optó por seleccionar únicamente las proteínas de 2 y 48 h de digestión para los ensayos posteriores de cultivo celular. De esta manera, se esperaba observar qué MEC es la ideal para el cultivo primario de hepatocitos.

Como se esperaba, la acumulación de las fracciones correspondientes a Col I (cadenas α_1 y α_2 entre 100 y 150 kDa) disminuyó en las mezclas Col/MB, pero visualmente más significativo en MB. En MECd 2 h, en donde aparentemente se conserva un perfil muy similar a MB, es decir la carencia de las cadenas α_1 y α_2 del Col I; MECd 48 h, se observa que presenta mayor presencia de Col I, sin embargo, considerar realizar la técnica de Western blot podría ayudar a complementar la información respecto a la presencia, incluso, de otras proteínas.

Para validar estos resultados, se realizó la detección de Col I en las proteínas derivadas de MEC empleando la técnica de inmunoblot. Esta caracterización permitió confirmar la proporción acumulada de la proteína fibrilar vía los perfiles de separación mostrados por SDS-PAGE. En la Figura 11c, claramente se refleja la disminución gradual de Col I a partir de las muestras de proporciones de Col/MB; asimismo, en MB se reafirma que existe una ausencia de la proteína fibrilar, como se mostró en la Figura 11b. En análisis proteómicos realizados en Col I purificado, Matrigel y MECd de hígados de rata por Li *et al.*, (2016), se lograron identificar las proteínas más abundantes y esenciales para la unión celular, crecimiento y diferenciación de los hepatocitos. De manera interesante, se reveló que Col IV con las cadenas α_1 y α_2 (membrana basal ubicua) estuvo presente en las 3 muestras; sin embargo Col IV con las cadenas α_3 , α_5 y α_6 (membrana basal restringida espacial y temporalmente) (Keene *et al.*, 1988) fueron encontrados exclusivamente en MECd de hígados, además de transglutaminasa-2, biglicano, fibrinógeno y fibronectina, entre otras proteínas que se encuentran ausentes en Col I y en Matrigel, mostrando así la singularidad del hígado de rata descelularizado en comparación con estos dos últimos (Li *et al.*, 2016).

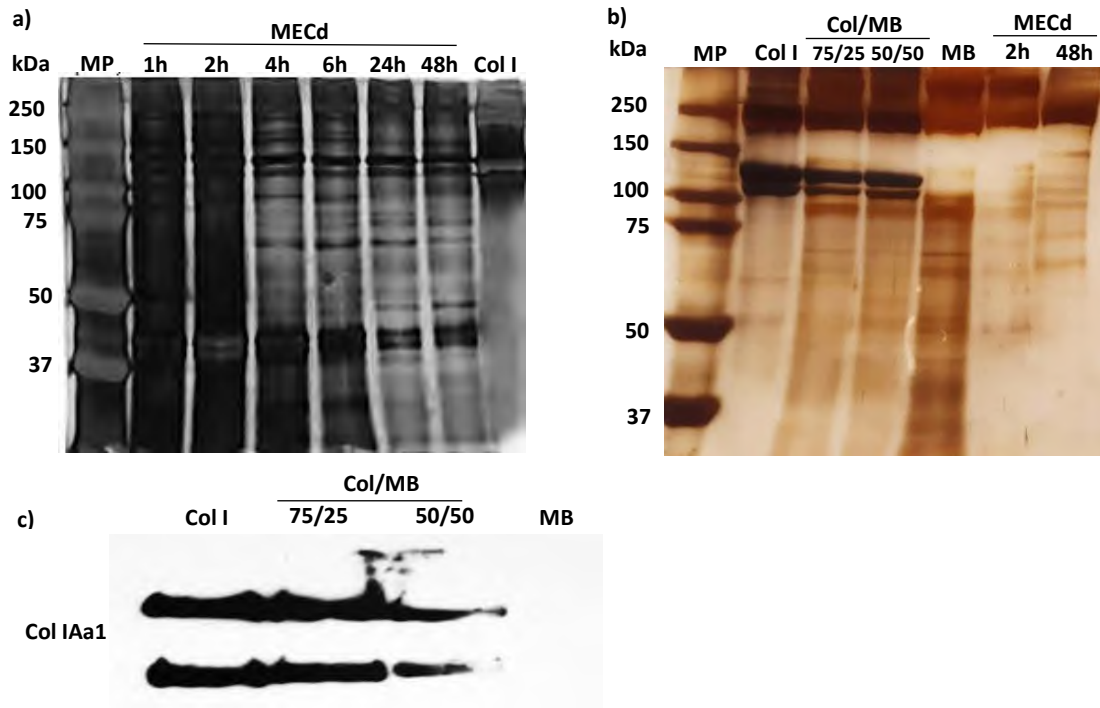


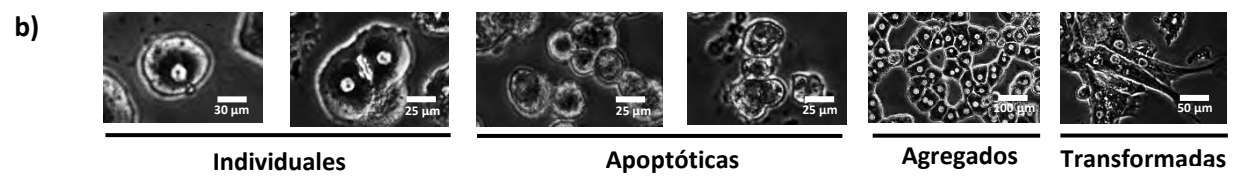
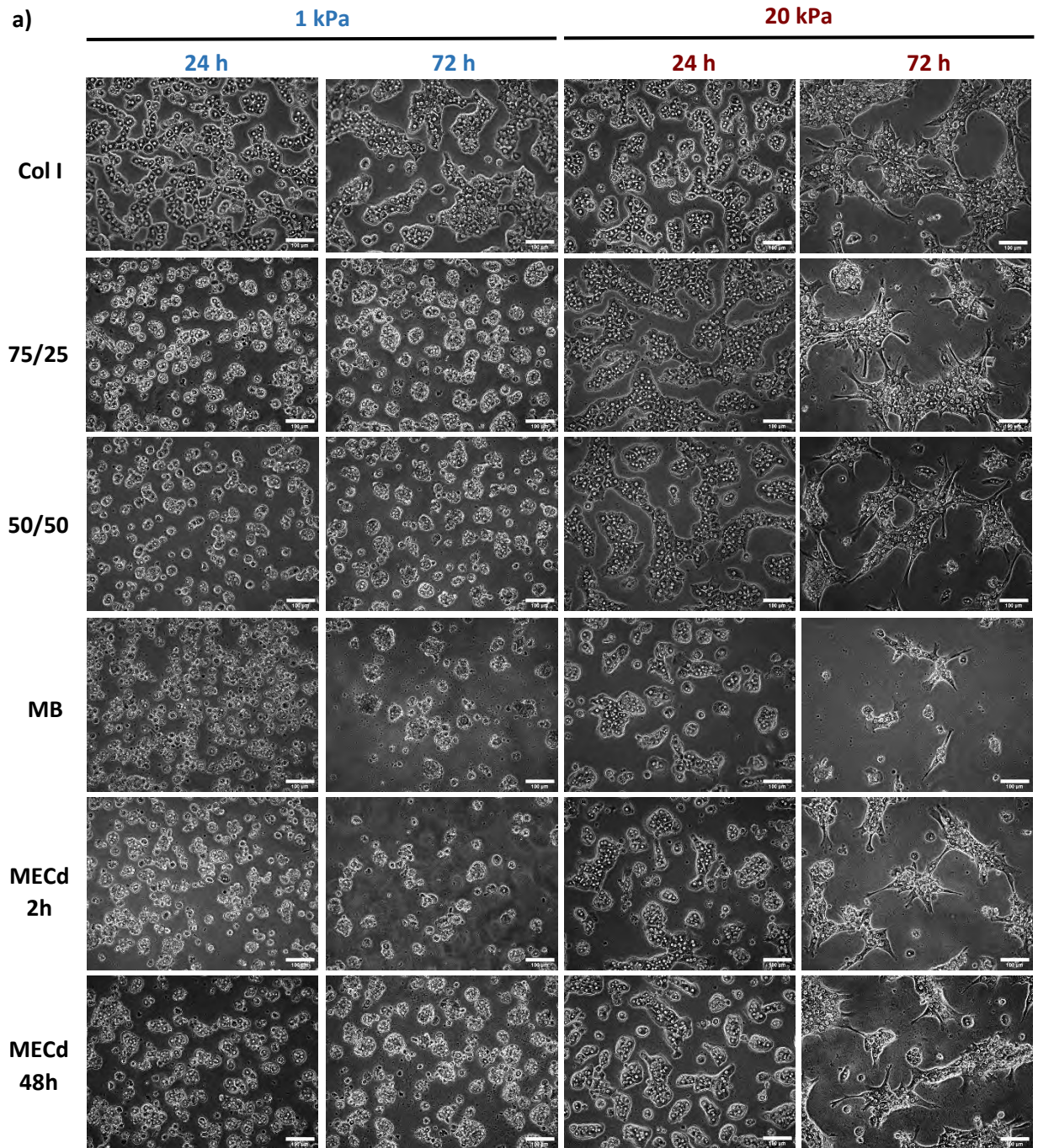
Figura 11. Caracterización de proteínas para sustratos de hidrogel. a) Perfil de separación de las proteínas de MEC hidrolizadas con pepsina a distintos tiempos. b) Comparación de perfiles proteicos de las proteínas de colágena I (COL I), proporciones distintas de Col I y MB, MB, laminina (LN) y fibronectina (FN). MP: marcador de peso molecular.

7.3 La mecánica y la composición de proteínas de MEC conjugadas a los sustratos de hidrogel de PA influyen en el comportamiento de los hepatocitos

Los hepatocitos son las células más abundantes del hígado y realizan la mayoría de las funciones fisiológicas en el órgano. Si bien estas funciones se ven reguladas por la composición de las proteínas presentes en la matriz a lo largo de los lobulillos hepáticos (Zeisberg *et al.*, 2006), varias investigaciones han demostrado que la función y comportamiento de los hepatocitos también se ven influenciados por los cambios en la rigidez de su microambiente *in vivo*, es decir, son células altamente mecanosensibles; incluso está relacionado con el desarrollo de enfermedades hepáticas crónicas (Gomez-Dominguez *et al.*, 2008; Sporea *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2011; Cassinotto *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2017). En los sistemas biológicos, la rigidez es referida como una propiedad biomecánica del tejido que actúa como un mediador importante del comportamiento celular como el crecimiento, supervivencia y motilidad (Wells, 2008, 2013; Handorf *et al.*, 2015).

Por esta razón, además de evaluar el efecto que ejercen las variaciones de proteínas conjugadas en los sustratos de hidrogel sobre los hepatocitos, se decidió evaluar el efecto de la rigidez en condiciones suaves (1 kPa) y rígidas (20 kPa) a las 24 y 72 h de cultivo (Figura 9a).

En todos los sustratos de cultivo en las condiciones suaves y rígidas, los hepatocitos mostraron diferencias estadísticamente significativas en el área de células individuales a partir de las 24 h; no obstante, esta diferencia no fue evidente entre los hepatocitos cultivados solamente en 1 kPa a las 24 y 72 h, pero sí un cambio significativo en 20 kPa (Figura 12c). En estas condiciones rígidas a las 24 h, las células se adhirieron, se extendieron y exhibieron un aumento del área de esparcimiento y de formación de agregados en todos los hidrogeles; a las 72 h, los hepatocitos condujeron su morfología a una forma extendida, aplanada y de huso, tipo fibroblastoide (ver Figura 12a), atribuida principalmente a la formación de fibras de estrés (o de tensión) en respuesta a la polimerización de la actina a consecuencia de esfuerzos mecánicos (Nekouzadeh *et al.*, 2008) y al crecimiento y elongación de las adhesiones focales, tal como se demostró en células mesenquimales humanas cultivadas en hidrogeles de PA en distintos intervalos de rigidez (Engler *et al.*, 2006). Otros estudios, han logrado determinar que la unión y aumento del área de los hepatocitos se maximiza a partir de 4.6 kPa cuando son cultivados en MECd incorporada a hidrogeles de ácido hialurónico (Deegan, 2015). Además, en cultivo primario de hepatocitos de ratón, se destacó que la tensión del citoesqueleto se incrementa logarítmicamente en proporción al aumento de la rigidez de los sustratos de geles de PA con Col I entrecruzada; las células se muestran aplanadas y con los núcleos más visibles. En sustratos de rigidez cercana al de un hígado normal (~140 Pa), los hepatocitos se muestran redondeados con sus núcleos más definidos (Desai *et al.*, 2016).



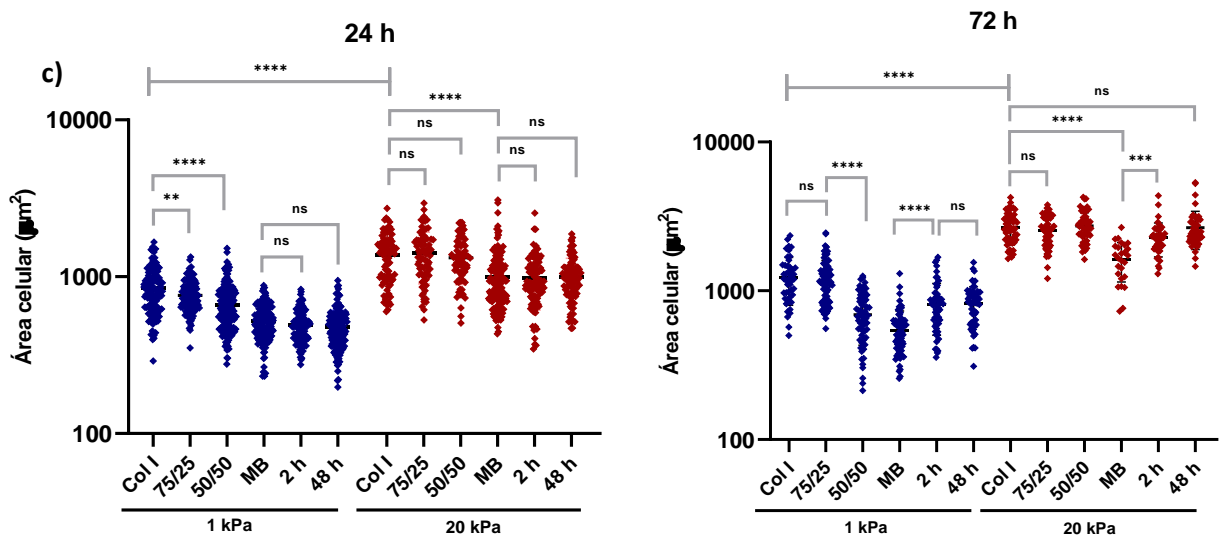


Figura 12. Hepatocitos de cultivo primario en hidrogeles de distinta rigidez y MEC conjugada. a) Micrografías de campo claro de hepatocitos cultivados en hidrogeles de PA de 1 y 20 kPa con diferentes proteínas derivadas de MEC y MECd conjugadas, después de las 24 y 72 h. Objetivo 20X; barra de escala: 100 µm. b) Magnificaciones representativas de hepatocitos individuales, en apoptosis, en agregados y transformadas en estado indiferenciado. Barra de escala: indicada en cada imagen. c) Área de hepatocitos individuales cultivados en hidrogeles de PA de 1 y 20 kPa con distintas proteínas derivadas de MEC y MECd, después de 24 y 72 h. Los datos son representados como la media \pm desviación estándar (SD) de 2 experimentos independientes, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p = 0.0021$, ns: no significativo. Proteínas de MEC: Col I: colágena tipo I; MB: membrana basal; 75/25: porporciones de 75% colágena tipo I y 25% membrana basal; 50/50: proporciones de 50% colágena tipo I y 50% membrana basal; MECd 2h: matriz extracelular descelurizada digerida enzimáticamente a las 2 h; MECd 48 h: matriz extracelular descelurizada digerida enzimáticamente a las 48 h.

Por su naturaleza, las células suelen presentar cambios dependientes de las características de la superficie en que se encuentran, influyendo en su forma, polaridad, migración, proliferación y diferenciación (Clark *et al.*, 1991; Dickinson *et al.*, 1994; Brunetti *et al.*, 2010). Las células interactúan físicamente con la MEC a través de las adhesiones focales para su dependencia de anclaje (Wang *et al.*, 2002); estas interacciones ejercen fuerzas de estrés suficientes para generar cambios en los tejidos, por medio de la conversión de estímulos mecánicos en señales bioquímicas que propician la activación de distintas vías de señalización como las vías intrínsecas de agrupación de integrinas, la vía de la proteína quinasa asociada a Rho y otras quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Paszek *et al.*, 2005; Provenzano *et al.*, 2009; Lessey *et al.*, 2012). Asimismo, la variación de la rigidez en los sustratos afecta las adhesiones focales y la formación del citoesqueleto de células diferenciadas. Las isoformas de miosina II no musculares son las principales proteínas responsables de tensar las estructuras corticales del citoesqueleto

de actina, implicadas a su vez, en transmitir la fuerza desde el interior de la célula a la matriz (Beningo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Tamada *et al.*, 2004; McBeath *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). En este mismo contexto, los cambios presentados en los hepatocitos por efecto de la rigidez en este estudio, contribuyen al complemento de las investigaciones realizadas previamente con células hepáticas (hepatocitos, endoteliales, estrelladas y carcinoma) sobre sustratos de PDMS (Natarajan *et al.*, 2015) e hidrogeles de PA y colágena (Ford *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

Múltiples investigaciones han resaltado la importancia de la estructura y composición bioquímica de MEC para influir en el dinamismo celular (Rojkind *et al.*, 1980; Geiger *et al.*, 2001; Tomas *et al.*, 2010; Porth *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013). Además de los cambios convincentes de los hepatocitos por efecto de la rigidez, las células mostraron diferencias en su comportamiento en función al sustrato de proteínas de MEC y MECd. A las 24 h de cultivo en condiciones suaves (1 kPa), las células manifestaron una adherencia preferencial al sustrato en los hidrogeles de PA que contenían cualquiera de las concentraciones de Col I conjugado (Figura 12a); asimismo, se observó que el número y tamaño de aglomerados, al igual que el esparcimiento celular, incrementaban proporcionalmente al aumento de la concentración de Col I en el hidrogel. Mientras tanto, en los hidrogeles de MB (100%) de Matrigel, las células mostraron una morfología redonda y con la presencia de cuerpos apoptóticos, incluso, hasta las 72 h, evidenciando menor población celular en comparación con los hidrogeles con Col I. Por otro lado, el comportamiento de los hepatocitos cultivados a las 24 h sobre los hidrogeles de MECd 2 y 48 h en condiciones suaves, aparentemente fue muy similar a los cultivados sobre MB en cuanto a la morfología y la aparición de algunos cuerpos apoptóticos. Después de las 72 h, en MECd 48h, los hepatocitos formaron un mayor número de agregados celulares; por el contrario, en MECd 2 h, la población celular disminuyó en relación con el aumento de los cuerpos apoptóticos. En este contexto, desde finales del siglo pasado, se ha dilucidado la relación de la apoptosis con las moléculas señal de adhesión celular (célula-célula y célula-MEC) y su importancia para la señalización y unión celular como factores de supervivencia (Re *et al.*, 1994; Schwartz, 1997); asimismo, la pérdida de estas interacciones celulares puede desencadenar la activación de vías de señalización que conducen a la apoptosis (Su *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2019). Durante este proceso, comúnmente se observa la formación de pequeñas vesículas debido a la encapsulación de residuos celulares provenientes

de proteínas degradadas, fragmentos de material genético por daño nuclear, orgánulos, citoplasma y de membrana plasmática, en la etapa temprana de la apoptosis celular, observándose claramente en microscopía óptica como pequeños ‘cuerpos luminosos’, tal como se observa en MB de la Figura 12a; además, las células que se encuentran en apoptosis experimentan disminución de su tamaño, formación de ampollas en la membrana y un empaquetamiento intracelular más denso (Moss *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2019).

Como se mencionó anteriormente, la mecánica ejerce efecto importante sobre la respuesta celular. Por esta razón, los hepatocitos cultivados en las condiciones rígidas (20 kPa), la adhesión al sustrato fue favorecida a las 24 h en todos los hidrogeles de MEC y MECd, incluyendo MB y MEC 2h. En 72 h, los hepatocitos inmersos a estos entornos no fisiológicos, modificaron evidentemente su morfología hacia formas aplanadas, ramificadas y de huso, similares a células mesenquimales indiferenciadas, particularmente al fenotipo de un fibroblasto. En condiciones fisiológicas de rigidez (1.5-4.5 kPa) (Takeda *et al.*, 2006), las variaciones en la composición de la MEC tienen gran influencia en el fenotipo de los hepatocitos, tal como en su morfología; sin embargo, los microambientes rígidos o fibróticos (>4.1 kPa) (Takeda *et al.*, 2006), estimulan una acelerada desdiferenciación y promueven la proliferación celular (Semler *et al.*, 2005; Sharp *et al.*, 2005) a causa de la alteración de las actividades de las vías de mecanotransducción, principalmente de reguladores transcripcionales como HNF-4 α , involucrado en la diferenciación de los hepatocitos (Desai *et al.*, 2016).

Hasta ahora, los resultados han revelado que la relación de MEC y rigidez de los sustratos afectan la adherencia, morfología, formación de aglomerados y el área de esparcimiento de los hepatocitos de cultivo primario, determinados a su vez por la organización del citoesqueleto de actina. Y que además, aparentemente, la presencia de Col I conjugado en los hidrogeles mejora la adherencia de los hepatocitos a diferencia de los colágenos de membrana basal, como Col IV, y las fracciones de proteínas presentes en MECd digeridas 2 h.

Las tensiones inducidas por el citoesqueleto en la MEC ocurren fuera de la célula, donde la membrana citoplasmática es la interfaz dinámica a través de las adhesiones focales; no obstante, este fenómeno ocurre de manera similar sobre el interior del núcleo a través de factores análogos a las adhesiones focales pero sobre la membrana nuclear, cuya función es ser el intermediario

sensible a la fuerza entre el citoplasma y la cromatina (Chancellor *et al.*, 2010; Lovett *et al.*, 2013; Swift *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2015). Dicho de este modo, las imágenes de los hepatocitos marcados con DAPI obtenidas por epifluorescencia, revelaron la variación del área nuclear por efecto de la rigidez de los hidrogeles de PA, independientemente de la composición de proteínas conjugadas. Los hepatocitos cultivados en los hidrogeles de 20 kPa, después de las 72 h, mostraron un aumento significativo en las áreas nucleares con respecto a los cultivados en 1 kPa (Figura 13). En los sustratos rígidos surgen tensiones mecánicas mayores en el microambiente extra e intracelular, y las células ensamblan fibras de tensión y adhesiones focales (George y Janmey, 2005; Yeung *et al.*, 2005; Lele *et al.*, 2006; Schelunck *et al.*, 2008; Weng y Fun, 2011); en cambio, en los sustratos suaves, las fibras de tensión no pueden ser ensambladas y por consecuencia se generan fibras de tensión muy bajas. La tensión intracelular, al estar mediada parcialmente por el núcleo, puede desencadenar cambios en la morfología de los núcleos (Sims *et al.*, 1992; Chancellor *et al.*, 2010; Lombardi *et al.*, 2011). Asimismo, estos cambios de fuerza y resistencia externas de los núcleos pueden afectar procesos de conformación y ensamblaje de proteínas, y la localización de factores de transcripción, organización de cromosomas y alteración de la membrana nuclear, afectando posiblemente la expresión génica (Cho *et al.*, 2017).

Se ha mencionado anteriormente que la composición de las proteínas de MEC tiene relación con el área de los hepatocitos. En este sentido, también se observó un comportamiento similar con el área de los núcleos de las células cultivadas en 1 kPa a las 72 h, al observarse diferencias significativas entre el aumento del área nuclear en proporción al incremento de la concentración de Col I (Figura 13b). Asimismo, sobre los hidrogeles de MB y MECd 2 h, el área de los núcleos fue menor con respecto a Col I 100%; inclusive, el área de los núcleos de MECd 2 h fue mucho menor a los de MECd 48 h

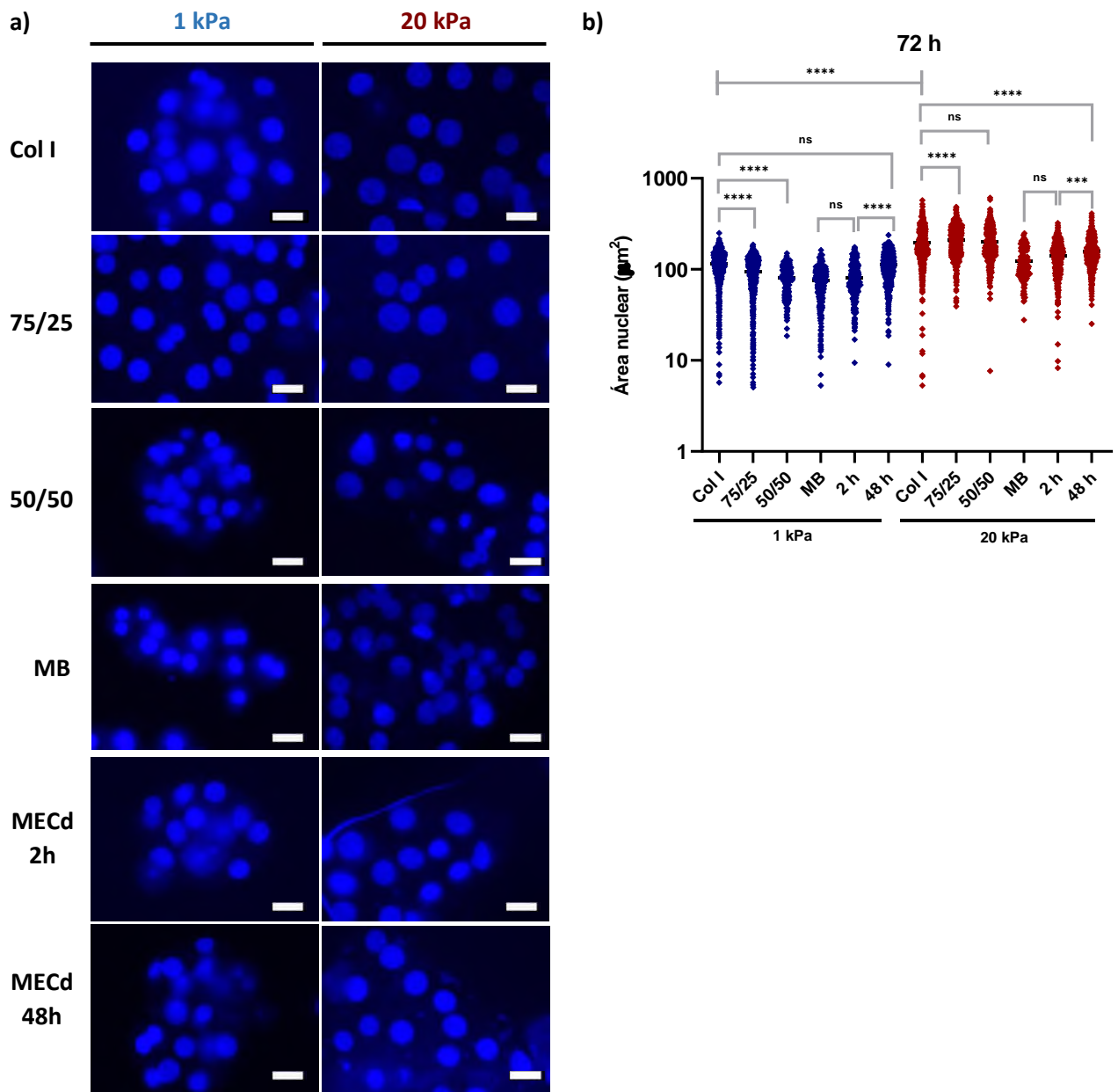


Figura 13. El área nuclear de los hepatocitos depende de la rigidez y MEC conjugada. a) Micrografías de fluorescencia de núcleos marcados con DAPI en hepatocitos cultivados en hidrogel de PA de 1 y 20 kPa, y distintas proteínas de MEC y MECd conjugadas, después de 72 h. Objetivo 40x; barra de escala: 20 μm . b) Área nuclear de hepatocitos individuales cultivados en hidrogel de PA de 1 y 20 kPa con distintas proteínas derivadas de MEC y MECd, después de 72 h. Los datos son representados como la media \pm desviación estándar (SD) de 2 experimentos independientes, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, sn: no significativo.

En 20 kPa, evidentemente el área nuclear fue significativamente mayor (~1.8 veces) con respecto a 1 kPa, en todos los sustratos de proteínas de MEC y MECd conjugadas. Investigaciones han revelado que en la envoltura nuclear, el principal componente estructural es la lámina, conformado a su vez por proteínas de láminas fibrilares abundantes en hélices ensambladas sobre la membrana nuclear interna (Goldman *et al.*, 2002; Gruenbaum *et al.*, 2005). Estas proteínas se encargan de unir el núcleo con el citoesqueleto por medio de complejos de nucleoesqueleto y citoesqueleto, denominados como proteínas LINC (Crisp *et al.*, 2006). De este modo, la lámina inmersa en la envoltura nuclear funciona como intermediario de multiplexado para mecanotransducir las señales ante los estímulos mecánicos (Cho *et al.*, 2017). La mayoría de las tensiones en la MEC nativa mantienen estables a los colágenos fibrilares como Col I (Flynn *et al.*, 2010) y esto permite el mantenimiento de la integridad mecánica del tejido. Aunado a esto, análisis por espectrometría de masas realizados por Swift *et al.*, (2013), descifraron la relación existente entre los niveles de Col I con la cantidad de proteínas de lámina, influyendo consecuentemente, en la elasticidad de los tejidos en una manera proporcional. Las células que se cultivaron en geles recubiertos de Col I de baja rigidez presentaron una forma esférica con núcleos rugosos y relajados; por el contrario, en los sustratos rígidos se generó propagación celular y los núcleos presentaron formas aplanadas y extendidas (Swift *et al.*, 2013). Esta información brindada podría respaldar los resultados de las áreas nucleares de los hepatocitos de cultivo primario sembrados en los hidrogeles de PA con diferentes proteínas de MEC y MECd conjugadas.

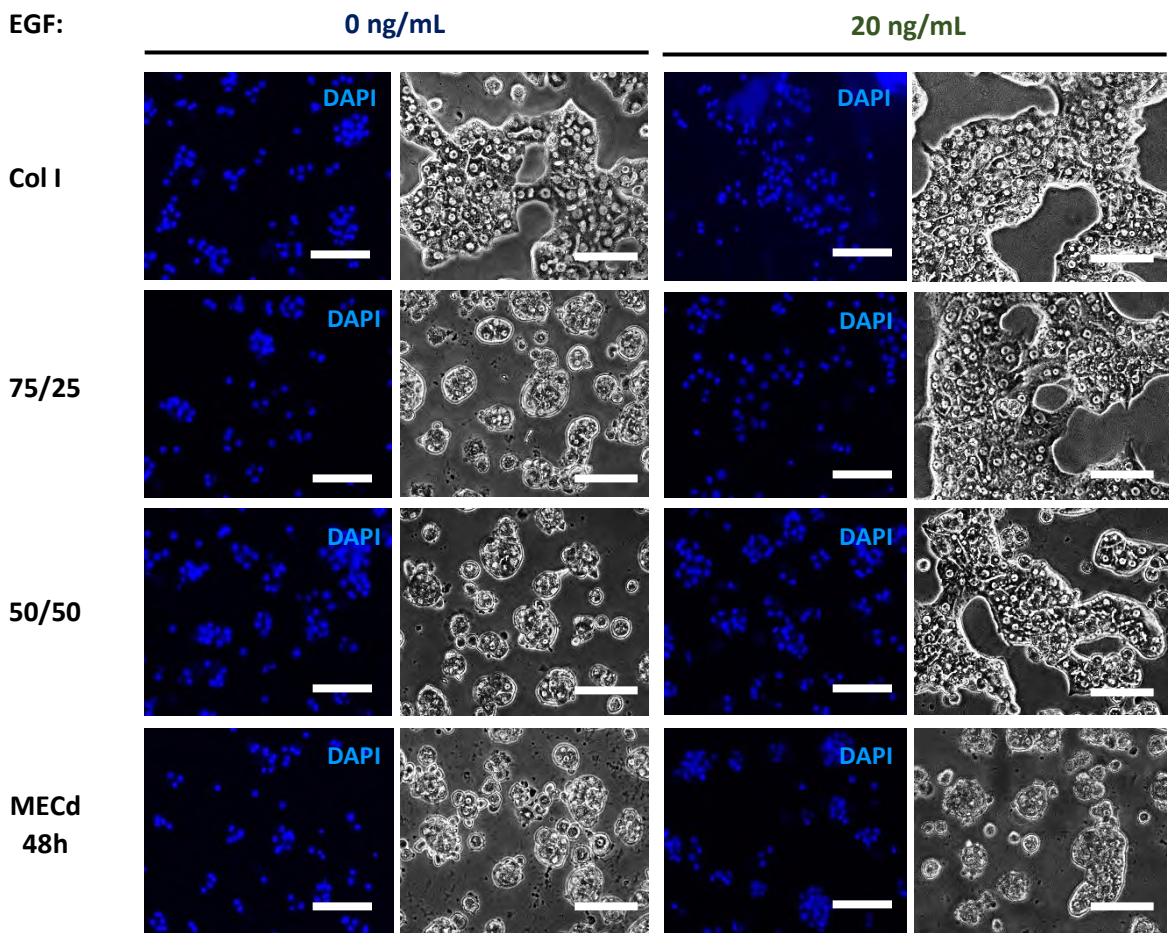
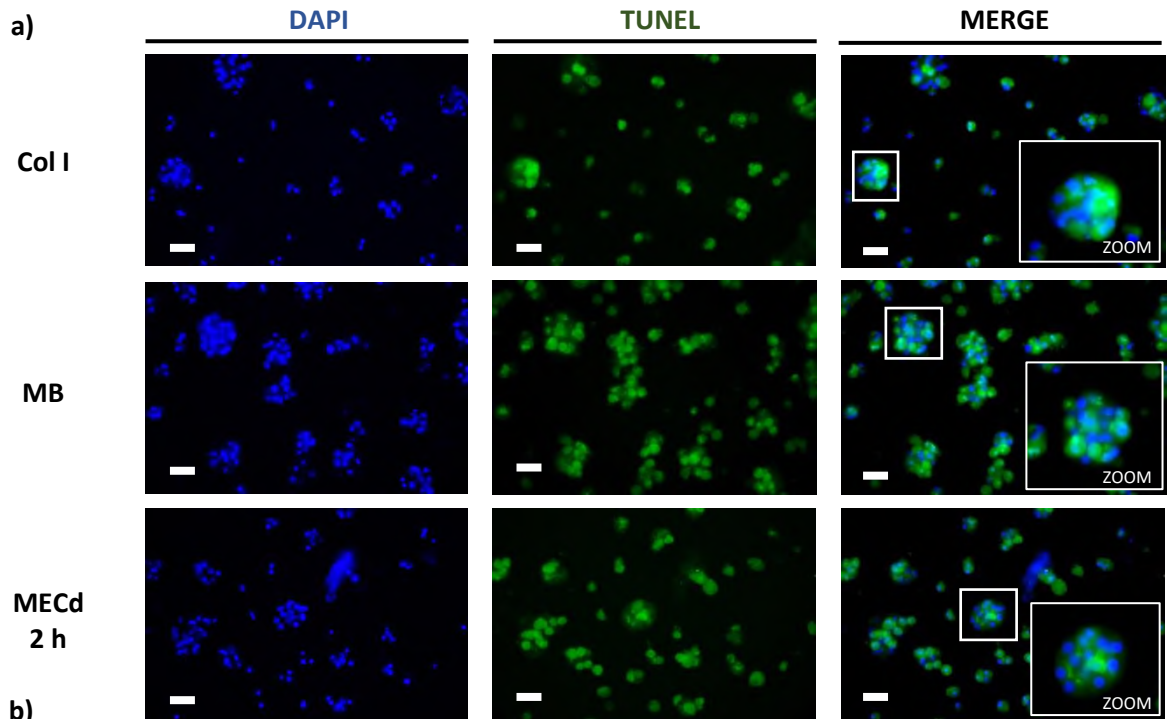
Las micrografías de campo claro (Figura 12) y la tinción de núcleos con DAPI (Figura 13) revelaron mayoritariamente la presencia de cuerpos apoptóticos en los hepatocitos cultivados en MB y MECd 2 h. No obstante, para tener una evidencia más clara del número de células apoptóticas en cada uno de los tratamientos, se realizó el ensayo de TUNEL, el cual identifica fragmentos de ADN bicatenario dañado, mediante TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal). Esta enzima cataliza la adición de dUTP en los extremos 3'-OH del ADN y éstos son detectables mediante técnicas inmunohistoquímicas a través de microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (Rode *et al.*, 2004; Elmore, 2007). De esta forma, los hepatocitos de cultivo primario marcados positivamente por TUNEL representados en la Figura 14a, fueron estadísticamente mayores en MB y MECd 2 h con respecto a Col I en sustratos de 1 kPa, a las 72 h (Figura 14c), visiblemente muy similar a lo

presentado anteriormente en campo claro (Figura 12). Por lo tanto, con la finalidad de observar la posibilidad de un rescate en la viabilidad de los hepatocitos en los sustratos de 1 kPa, las células fueron estimuladas con el factor de crecimiento epidermal (EGF). De modo interesante, solamente en MECd 2 h se logró observar un efecto significativo en la disminución de marcajes positivos por TUNEL y no en MB ni Col I (Figura 14c). No obstante, es considerable realizar más trabajo de investigación para entender los posibles mecanismos que expliquen por qué en determinadas condiciones puede ocurrir o no un rescate en la viabilidad ante el estímulo por EGF.

Las funciones más importantes de EGF son la estimulación de síntesis de ADN, replicación celular y síntesis de proteínas (Cohen *et al.*, 1995), favoreciendo al mismo tiempo el crecimiento celular, diferenciación, sobrevivencia y proliferación (Herbst, 2004); sin embargo, este último efecto no fue presentado en los hepatocitos cultivados en los hidrogeles que contuvieran Col I y MECd 48 h a 1 kPa después de las 72 h (Figura 14b), a pesar que se esperaba que las células aumentaran su estado de proliferación cuando se estimularan con EGF. El número de células proliferantes entre cada uno de los tratamientos con y sin EGF no presentó diferencias estadísticamente significativas (Figura 14d); no obstante, si bien no existió un aumento de células proliferantes, la observación de agregados celulares con estructura similar a cordones hepáticos, fueron más evidentes en las células cultivadas sobre los hidrogeles con Col I (Figura 14d). En contraste, los hepatocitos en MECd 48 h no mostraron este efecto de formación de agregados ante el estímulo con EGF. Probablemente, el efecto de EGF sobre los hepatocitos en cada uno de los tratamientos, aumentó solamente la actividad de moléculas de señal para la adhesión célula-célula y no célula-MEC.

Estudios realizados por Fassett *et al.*, revelaron la influencia de los geles de colágeno fibrilar (Col I) sobre la señalización de EGF y la progresión de ciclo celular en hepatocitos. A partir de las experimentaciones, se demostró que existe una relación entre la adhesión de las células en geles de colágena tipo I [0.5 mg/mL] con el aumento de la actividad de PKA (proteína Kinasa dependiente de cAMP) y la disminución de la fosforilación de los receptores de EGF, sugiriendo que la adhesión celular al colágeno fibrilar suprime la señalización de EGF. PKA es una molécula antagonista de la mitogénesis y de algunas rutas de señalización de EGF (Cook y McCormick, 1993; Wu *et al.*, 1993) y su actividad depende de la arquitectura de la MEC que pudiera llegar a favorecer

o inhibir el crecimiento celular y los posteriores efectos sobre la señalización del factor de crecimiento y morfología celular (Fassett *et al.*, 2006).



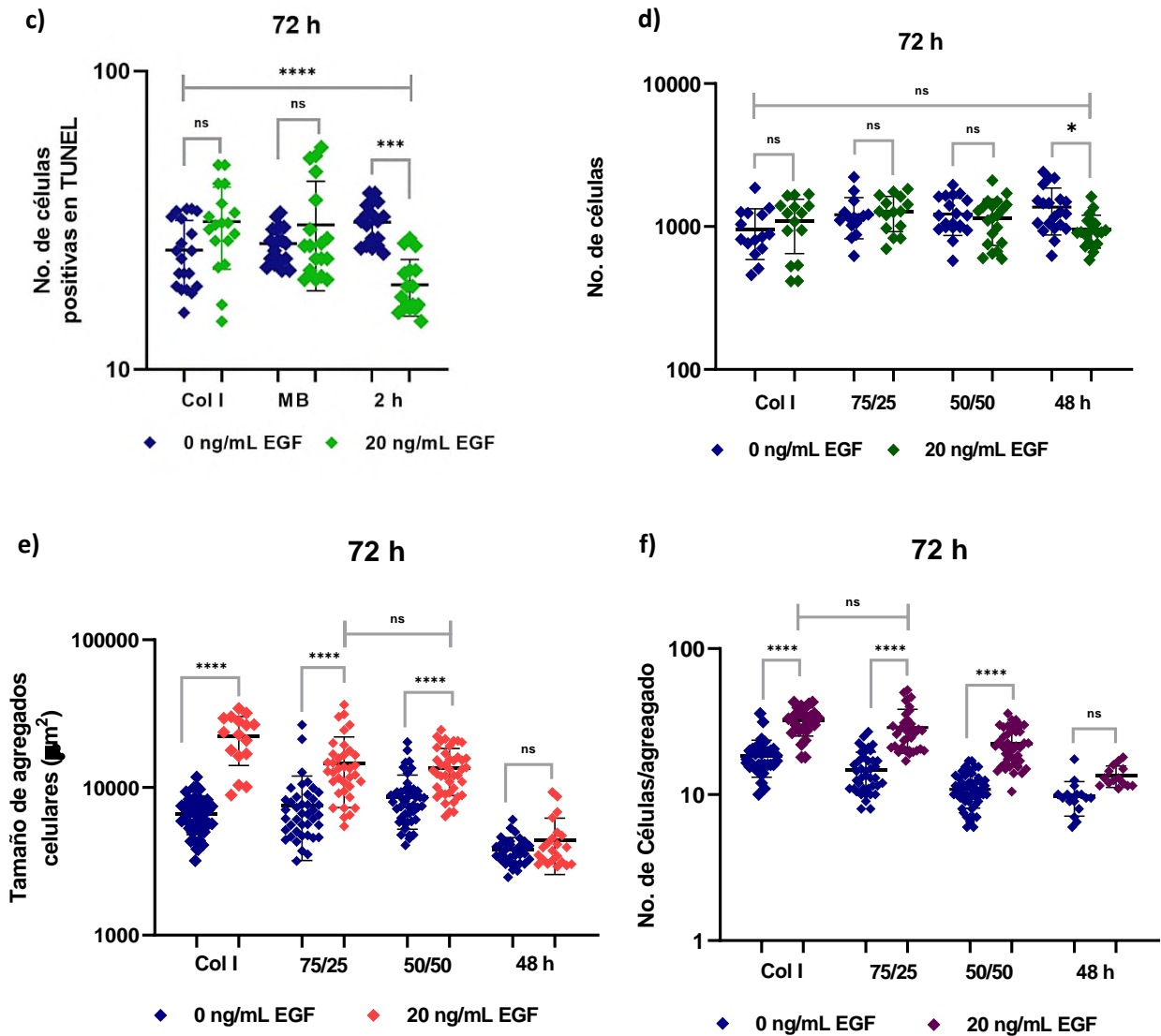


Figura 14. El factor de crecimiento epidermal (EGF) favorece la formación de agregados, pero no rescata la viabilidad de los hepatocitos. a) Micrografías de epifluorescencia de hepatocitos marcados con DAPI y TUNEL para la representación de células en apoptosis. Las imágenes fueron obtenidas de los hepatocitos cultivados en los hidrogeles de 1 kPa con proteínas de Col I, MB y MECd 2 h conjugadas, tratadas con o sin EGF, después de 72 h de cultivo. Objetivo 40x; barra de escala: 30 μm . b) Micrografías representativas de epifluorescencia (DAPI) y campo claro de hepatocitos tratados con y sin EGF, después de 72 h cultivados en hidrogeles de 1 kPa con diferentes proteínas de MEC conjugadas. Objetivos: 40x (epifluorescencia); 20x (campo claro). Barra de escala: 20 μm (epifluorescencia); 100 μm (campo claro). c) Cuantificación de células positivas en TUNEL en hidrogeles de PA de 1 kPa con Col I, MB o 2 h, tratadas con 0 y 20 ng/mL de EGF, correspondiente a las representaciones en a). d) Cuantificación de número de hepatocitos cultivados en hidrogeles de PA de 1 kPa con proteínas de Col I, 75/25, 50/50 o 48 h conjugadas, tratados con 0 y 20 ng/mL de EGF. e) Cuantificación de tamaño de agregados celulares de las representaciones de campo claro en b). f) Conteo de hepatocitos por agregado en las condiciones mencionadas en b). Todos los datos estadísticos están representados como la media \pm SD de 2 experimentos independientes; *ns*= no significativo, ***p*=0.0021, *****p*<0.0001.

Los mecanismos explicados anteriormente por Fassett *et al.*, posiblemente podrían estar relacionados con los hepatocitos cultivados en los hidrogeles de 1 kPa y diferentes proteínas de MEC conjugadas con Col I presente, al no lograr proliferar ante el estímulo con EGF.

Por otro lado, en cultivo primario de queratinocitos humanos, se logró dilucidar que la activación de la señalización de EGF puede regular los efectos de la rigidez de la MEC sobre la proliferación celular, y éste dependerá del ensamblaje de las adhesiones focales y la tensión del citoesqueleto; es decir, el aumento de la rigidez de la MEC promueve la activación de la vía de EGF, al menos, en este tipo celular. Además, se observó que en concentraciones elevadas de EGF [10 ng/mL], se generaba un incremento en el tamaño de las colonias de queratinocitos (Kenny *et al.*, 2018). En este trabajo, la concentración empleada de EGF para el rescate de los hepatocitos en cultivo primario, fue de 20 ng/mL, razón por la cual, probablemente pudo haber influenciado en la formación de un mayor número de aglomerados celulares, reflejando posiblemente el efecto similar a lo observado en las colonias de queratinocitos. Asimismo, como se mostró en los resultados de proliferación de los hepatocitos, quizá la presencia de Col I en los hidrogeles en condiciones suaves, puede influenciar en la baja proliferación celular. No obstante, aún quedan por realizar más investigaciones que permitan demostrar si en condiciones rígidas, la vía de señalización de EGF logra promover la proliferación en hepatocitos, así como se demostró en los trabajos realizados por Kenny *et al.*, (2018).

8. CONCLUSIONES

En los cultivos primarios de hepatocitos se demostró que la mecánica, mediada por el módulo de elasticidad o rigidez, y la variación de la composición de proteínas de MEC influyen evidentemente en el esparcimiento, agregación y supervivencia de los hepatocitos. En este sentido, los hepatocitos cultivados en los hidrogeles de PA de 20 kPa en todas las condiciones, después de las 72 h, presentaron una adherencia total al sustrato, morfología totalmente transformada de tipo mesenquimal similar a fenotipo de fibroblasto, y una mayor área de esparcimiento celular y nuclear con respecto a los cultivados a 1 kPa en 24 y 72 h. Sin embargo, en condiciones suaves, los hepatocitos mostraron mayor supervivencia y una preferencia de adhesión a los sustratos que contenían cualquiera de las concentraciones de Col I (100, 75 y 50%); en contraste, los hidrogeles de MB y de MECd 2 h, al parecer no presentaron las condiciones ideales para la adhesión y supervivencia de los hepatocitos, debido a que se presentó la formación de cuerpos apoptóticos y células no adheridas al sustrato.

Por otro lado, el estímulo con EGF solamente logró rescatar la viabilidad en las células cultivadas en hidrogeles con MECd 2 h; aunque como se mencionó, es necesario realizar más investigación para el entendimiento de este efecto únicamente en esta condición. Con respecto a la proliferación, EGF no logró promover este efecto en las células cultivadas sobre los hidrogeles que contenían Col I y MECd 48 h, pero sí generó un aumento en el número y tamaño de agregados celulares en las condiciones suaves.

En este trabajo de investigación, de manera interesante, se reveló que los hepatocitos se adhieren preferentemente a los hidrogeles que contienen cualquiera de las concentraciones de Col I, pero no en los sustratos que contienen proteínas de MECd, como se hipotetizaba inicialmente. Estos resultados sugieren que el colágeno fibrilar juega un papel importante en la adherencia y supervivencia de hepatocitos. No obstante, a pesar de que diversos grupos de investigación han logrado resultados prometedores con el uso de proteínas de MEC de hígados descelularizados como excelentes sistemas biomiméticos para el cultivo de hepatocitos, todavía es necesario profundizar en las investigaciones para encontrar la fracción ideal de proteínas de MECd y, posiblemente, en combinación con otras proteínas generar plataformas de cultivo que

promuevan la adherencia celular y mantengan el fenotipo de los hepatocitos en un tiempo más prolongado.

9. PERSPECTIVAS

1. Detectar y caracterizar la presencia de otros colágenos fibrilares en las fracciones de MECd digeridas a 2 y 48 h, así como en otras digeridas a distintos tiempos.
2. Evaluar la capacidad de adhesión celular de las fracciones de MECd digeridas a otros tiempos, sobre los sustratos de hidrogel de rigidez variable.
3. Identificar y cuantificar la composición de péptidos de las fracciones de MECd solubilizadas con pepsina, por medio de técnicas analíticas.
4. Probar otras combinaciones de proteínas fibrilares con proteínas de MECd, para observar un posible sinergismo que permita mimetizar el microambiente hepático en andamios celulares.

10. ANEXOS

10.1 Anexo I

10.1.1 Protocolos de tinción para geles SDS-PAGE

- **Tinción con Azul de Coomassie R250**

1. Se elaboraron geles de poliacrilamida 8% (por cada 2 geles) con base a las siguientes relaciones:

Tabla 2. Soluciones para la elaboración de geles SDS-PAGE

Gel separador (<i>Resolving gel</i>) 8%	
Componente	Volumen (mL)
Agua desionizada	9.3
30% Mix Acrilamida/Bis	5.3
1.5 M Buffer Tris, pH 8.8	5.0
10% SDS	0.2
10% Persulfato de amonio (APS)	0.2
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	0.012
Gel Concentrador (<i>Stacking gel</i>) 5%	
Agua desionizada	5.5
30% Mix Acrilamida/Bis	1.3
1.0 M Buffer Tris, pH 6.8	1.0
10% SDS	0.08
10% Persulfato de amonio (APS)	0.80
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	0.008

2. Las mezclas de cada uno de los tipos de geles se colocaron en los mini *plates* de la cámara de electroforesis para la polimerización de ambos. Una vez gelificados, se colocaron las muestras de proteínas solubilizadas en tampón de Laemmli 2X, según la concentración requerida.
3. Las proteínas se separaron a 120 V durante ~1.5 h.
4. Los geles se incubaron por 1.5 h o durante toda la noche en la solución de tinción que contenía 0.25 g de Azul brillante de Coomassie R250 en 90 mL de 1:1 v/v metanol/agua y 10 mL de ácido acético glacial.

5. Se realizaron lavados con la solución desteñidora que contenía 450 mL de 1:1 v/v metanol/agua y 50 mL de ácido acético glacial, y se dejaron incubar por periodos de 2 a 3 h hasta observar la visualización de las bandas de proteínas.
6. Finalmente, los geles se guardaron en agua a 4°C para su posterior análisis.

- **Tinción con nitrato de plata para geles SDS-PAGE 8%**

Tabla 3. Soluciones para tinción con nitrato de plata

Solución	Componentes
Fijación	Para 100 mL: 50% Metanol absoluto 12% Ácido acético glacial 0.5% Formaldehído 37% Agua destilada hasta ajustar volumen
Oxidación	Por litro: 0.2 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / L Agua destilada hasta ajustar volumen
Impregnación	Por litro: 2 g de AgNO_3 7.5 mL Formaldehído 37% Agua destilada hasta ajustar volumen
Revelado	Por litro: 60 g de Na_2CO_3 / L 4 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / L 5 mL Formaldehído 37% Ajustar el volumen con agua destilada

1. Todas las soluciones se prepararon en el mismo día de su aplicación, tomando en consideración que por cada gel se requerían aproximadamente 50 mL de las siguientes soluciones:
2. Se incubaron los geles en la solución de fijación por al menos 2.5 h y se realizaron lavados con agua destilada por 2 min, luego se lavaron 3 veces con metanol al 50% por 10 min cada uno y finalmente se enjuagaron con agua destilada por 2 min.

3. Los geles se incubaron en la solución de oxidación por 35 s. En seguida, se realizaron 3 lavados con agua destilada por 20 s en cada paso.
4. Posteriormente, se prosiguió con la incubación con la solución de impregnación por 3 min, seguido de lavados con agua destilada durante 20 s, 2 veces.
5. Se agregó la solución de revelado (aproximadamente por 5 s) hasta notar la tinción de las bandas de proteínas. En este paso, se tuvo la precaución de no sobrepasar el tiempo con la solución, ya que existe el riesgo de teñir en exceso los geles de poliacrilamida y generar un contraste o *background* inadecuado.
6. Una vez terminado el revelado, se lavaron inmediatamente 2 veces con agua destilada durante 1 min y en seguida, se agregó solución de fijación durante 10 min para detener la reacción de revelado.
7. Finalmente, se realizaron lavados con agua destilada y se guardaron a 4°C.

10.2 Anexo II

10.2.1 Protocolo de Western blot

A continuación, en la Tabla 4 se presentan las soluciones utilizadas durante la técnica de Western blot o inmunoblot:

Tabla 4. Soluciones para la técnica de Western blot

Solución	Composición
Buffer de transferencia 1X	25 mM Tris-base 192 mM Glicina 10% Metanol absoluto Ajustar volumen a 1 L con agua desionizada
Tris-buffer salino (TBS) 10X	200 mM Tris-base 1.5 M NaCl Ajustar volumen a 1 L con agua desionizada Ajustar pH 7.6 con HCl 12 N
Tris-buffer salino (TBS) 1X	20 mM Tris-base 150 mM NaCl Ajustar volumen a 1 L con agua desionizada Ajustar pH 7.6 con HCl 12 N
Tris-buffer salino con Tween-20 (TBST) 1X	20 mM Tris-base 150 mM NaCl 0.1% Tween-20 Ajustar volumen a 1 L con agua desionizada Ajustar pH 7.6 con HCl 12 N

1. Primeramente, se realizaron geles SDS-PAGE con proteínas de MEC digeridas a los tiempos establecidos previamente, junto con las proteínas control.
2. Una vez separadas las proteínas, se seleccionaron fragmentos de membranas de PVDF y en un contenedor fueron hidratadas con metanol absoluto por 3 min y se lavaron 2 veces con buffer de transferencia 1X para eliminar el exceso de metanol.

NOTA: Para la manipulación de las membranas, es importante emplear pinzas y evitar que tenga contacto con las manos o guantes, ya que estos pueden contener restos de proteínas propias del usuario, que podrían transferirse a las membranas e interferir con los resultados.

3. Luego, se prosiguió con la transferencia de las proteínas de los geles SDS-PAGE a las membrana de PVDF, colocando capas de esponjas, papel filtro, membranas y geles SDS-PAGE, en tipo *sandwich* sobre los *cassettes* de la cámara de transferencia, tal como se muestra en la Figura 15.

En este paso debe asegurarse mantener la hidratación de todos los materiales del *sandwich*, con buffer de transferencia.

NOTA: Un punto importante durante la colocación de las membranas sobre los geles, es retirar cualquier burbuja generada para evitar una inadecuada transferencia de las proteínas. Esto se puede realizar deslizando el largo de una pipeta sobre la membrana, hasta observar que se hayan eliminado todas las burbujas.

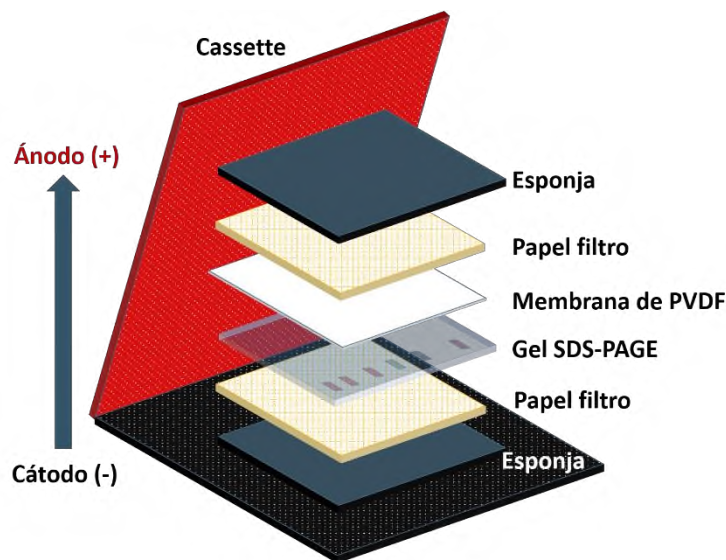


Figura 15. Componentes para la transferencia de proteínas en el Western Blot.

4. Los *cassettes* se colocaron dentro de la cámara con la orientación de cátodo a ánodo, cuidando de mantener la presión sobre los mismos; en seguida, se agregó buffer de transferencia 1X hasta cubrir aproximadamente donde se sitúan los geles y las proteínas se transfirieron a 320 mA (constante) durante 2.5 h.

5. Terminada la transferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (compuesto de suero de leche al 5% baja en grasa, en solución de TBST 1X), durante 1 h en agitación, para reducir propiamente los sitios de unión inespecíficos al anticuerpo.
En caso de que hubiesen dos membranas en un mismo contenedor, se debe tener cuidado que los lados donde se encuentren las proteínas no estén en contacto y que estas sean deslizables mientras están en agitación.
6. Finalizado el bloqueo, se realizaron 3 lavados con agua desionizada y finalmente un lavado con TBST 1X por unos segundos.
7. En bolsas de plástico se colocaron las membranas y con un sellador se ajustó herméticamente al tamaño de la membrana. Al instante, se agregó la solución de anticuerpos primarios con la dilución requerida en aproximadamente 5 mL de TBST 1X, se retiraron restos de burbujas y finalmente, las bolsas se sellaron completamente para dejar incubando durante toda la noche a 4°C, en agitación.
8. Después de la incubación con los anticuerpos, se realizaron 3 lavados con TBST 1X durante 10 min en cada paso.
9. Luego, se continuó con la incubación de los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) a la dilución requerida en TBST 1X durante 1 h en agitación, a temperatura ambiente. En seguida, se realizaron 3 lavados con TBST 1X durante 5 min cada uno.
10. En otro contenedor, se agregó 1 mL del sustrato contra la enzima peroxidasa y 1 mL de luminol (ambos, considerados una unidad) en 4 mL de agua desionizada para que fuese una dilución 1:3. Esta dilución puede variar en función de la intensidad de señal que se cree considerada dependiendo de la concentración de anticuerpo primario añadido. A continuación, se colocó la membrana en la solución y se dejó incubar por 1 min. En este lapso, se preparó nuevamente otra bolsa de plástico a la medida de la membrana para que esta pudiera ser colocada dentro de ella, y a su vez, en la cámara de exposición.
11. Previo a este paso, se prepararon las soluciones de revelado, de fijación y agua, en charolas.

12. Posteriormente, bajo condiciones de oscuridad o con luz roja, se cortaron fragmentos de películas de rayos X y se colocaron sobre las membranas a distintos tiempos de exposición para ver cuál era el ideal para la detección de las proteínas.
13. Al instante, las películas se colocaron en la solución reveladora hasta observar la presencia de las proteínas. Una vez detectadas, se retiró el exceso de solución lavando con agua y en seguida se colocaron en la solución de fijación.
14. Después del revelado, todas las películas se lavaron con abundante agua corriente y se dejaron secar.

10.3 Anexo III

10.3.1 Elaboración de hidrogeles de poliacrilamida para cultivo celular

Para la elaboración de hidrogeles de poliacrilamida con rigidez controlable, se empleó el siguiente protocolo con base a Tse y Engler., 2010 y Cretu *et al.*, 2010:

1. Funcionalización de cubreobjetos:

- a. Se colocaron cubreobjetos, de manera ordenada, en una caja Petri de 10 cm de diámetro cubierta con parafilm y a cada uno se agregó 1 mL de NaOH 0.1 M, dejando incubar durante 3 min, a temperatura ambiente. Enseguida, se retiró la solución con una pipeta acoplada a una línea de vacío.
- b. En campana de extracción, se agregó 300 µL de APTES a cada cubreobjetos, durante 3 min a temperatura ambiente e inmediatamente se retiró. Los residuos fueron vertidos en su contenedor de desechos correspondiente.
- c. Luego, se retiró el exceso de APTES con un lavado inmediato con 20 mL de agua desionizada a todos los cubreobjetos contenidos en la caja Petri y enseguida se vertió en su contenedor de desechos. Este paso fue repetido 2 veces.
- d. Posteriormente, cada cubreobjetos fue lavado individualmente 3 veces con agua desionizada y, con ayuda de una pinzas, estos fueron transferidos a otra caja Petri cubierta con parafilm. En este procedimiento se tuvo la precaución que el lado del cubreobjetos donde se realizaron los tratamientos anteriores, quedara con la orientación hacia arriba.
- e. Después, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con agua desionizada en agitación durante 10 min, cada uno a temperatura ambiente.
- f. Finalizando los lavados, el agua se desechó, se retiró el excedente del líquido con toallas de papel absorbentes y se dejaron secar.
- g. En campana de extracción, se agregó 1 mL de una solución 0.5% v/v de glutaraldehído a cada cubreobjetos, durante 30 min a temperatura ambiente.
- h. Se retiró el glutaraldehído con el sistema de vacío y nuevamente se repitió el inciso e.
- i. Los cubreobjetos se dejaron secar completamente y se almacenaron en una caja Petri cubierta con parafilm, a temperatura ambiente, libre de humedad, hasta su posterior uso.

En este paso se tuvo la precaución de mantener consciente la orientación del cubreobjetos con la superficie tratada.

2. Silanización de portaobjetos:

- j. Primeramente, los portaobjetos se limpiaron cuidadosamente con etanol o isopropanol y se colocaron dentro de un recipiente. Luego, en campana de extracción, se agregaron 100 μ L de DCDMS (diclorodimetilsilano) a cada portaobjeto, hasta asegurarse de cubrir toda la superficie.
- k. El DCDMS se incubó por 5 min y el excedente se retiró con papel absorbente. Finalmente, los portaobjetos se almacenaron en recipientes con su etiquetado correspondiente.

3. Elaboración de hidrogeles de poliacrilamida:

- l. En un microtubo de 1.5 mL se prepararon 900 μ L las soluciones de 40 % acrilamida y 2% bis-acrilamida con las proporciones correspondientes en función a la rigidez requerida con base a la Tabla 5. La proporción de cada uno de los componentes fueron considerados para preparar 1 mL de volumen final. Posteriormente, se agregaron 10% APS y 1% TEMED.
- m. En los portaobjetos silanizados se colocaron 100 μ L de la mezcla de hidrogel de acrilamida/bis-acrilamida y en seguida se colocaron los cubreobjetos con la superficie funcionalizada sobre la gota hasta que ésta estuviera esparcida completamente sin formar burbujas o espacio vacíos. Luego, los hidrogeles se dejaron polimerizar por al menos 30 min a temperatura ambiente.
- n. Una vez polimerizados los hidrogeles, con el apoyo de unas pinzas o aguja de jeringa, se retiraron los cubreobjetos cuidadosamente del portaobjetos, evitando dañar o fracturar los hidrogeles.
- o. Finalmente, los hidrogeles (con orientación hacia el lado superior) fueron colocados en cajas de poliestireno de 12 pozos, se lavaron 3 veces con PBS 1X en agitación durante 5 min cada uno y se almacenaron en agua desionizada hasta su posterior uso.

4. Entrecruzamiento de proteína por método entrecruzante:

- p. Se prepararon mezclas de proteínas de colágena tipo I de cola de rata, Matrigel[®], colágena/Matrigel[®] y péptidos de MECd de 2 y 48 h, y posteriormente se les añadió NHS-éster acrilato [1.7 mg/mL] e Irgacure[®] 2949 [11 mg/mL].
- q. Se utilizaron 0.1 mg/mL de cada una de las mezclas de proteínas para conjugarse con los hidrogeles y éstos se entrecruzaron mediante la exposición de luz ultravioleta (365 nm) y una potencia nominal de 3.3 mW/cm², durante 3 min en una cámara reticulante UVP CL-1000L.
- r. Los hidrogeles de poliacrilamida con las proteínas conjugadas se almacenaron en cajas de cultivo celular de 12 pozos hasta su posterior uso.

Tabla 5. Módulo de elasticidad esperado después de la polimerización de las concentraciones relativas de acrilamida y bis-acrilamida (Tse y Engler, 2010).

Acrylamide %	Bis-acrylamide%	Acrylamide from 40% stock solution (ml)	Bis-acrylamide from 2% stock solution (ml)	Water (ml)	$E \pm \text{St. Dev.}$ (kPa)
3	0.03	0.75	0.15	9.1	0.20 ± 0.03
3	0.06	0.75	0.3	8.95	0.48 ± 0.16
3	0.1	0.75	0.5	8.75	1.10 ± 0.34
3	0.15	0.75	0.75	8.5	1.37 ± 0.22
3	0.225	0.75	1.125	8.125	1.67 ± 0.14
3	0.3	0.75	1.5	7.75	1.78 ± 0.19
4	0.03	1	0.15	8.85	0.71 ± 0.24
4	0.06	1	0.3	8.7	1.16 ± 0.54
4	0.1	1	0.5	8.5	2.01 ± 0.75
4	0.15	1	0.75	8.25	2.55 ± 0.17
4	0.225	1	1.125	7.875	3.13 ± 0.42
4	0.3	1	1.5	7.5	3.24 ± 0.58
5	0.03	1.25	0.15	8.6	1.00 ± 0.31
5	0.06	1.25	0.3	8.45	1.80 ± 0.44
5	0.1	1.25	0.5	8.25	3.15 ± 0.85
5	0.15	1.25	0.75	8	4.47 ± 1.19
5	0.225	1.25	1.125	7.625	8.44 ± 0.82
5	0.3	1.25	1.5	7.25	8.73 ± 0.79
8	0.048	2	0.24	7.76	2.61 ± 0.82
8	0.264	2	1.32	6.68	19.66 ± 1.19
8	0.48	2	2.4	5.6	40.40 ± 2.39
10	0.03	2.5	0.15	7.35	2.83
10	0.06	2.5	0.3	7.2	7.43
10	0.1	2.5	0.5	7	10.61
10	0.15	2.5	0.75	6.75	16.70
10	0.225	2.5	1.125	6.375	23.43
10	0.3	2.5	1.5	6	34.88

^aThis table shows the relative concentrations of acrylamide and bis-acrylamide and their expected modulus of elasticity after polymerization in water. Acrylamide and bis-acrylamide can be kept premixed in solution for weeks to months at 4°C. At least 3 hydrogels per sample and 50 indentations per hydrogel were assessed for these measurements.

10.4 Anexo IV

10.4 Protocolo de cuantificación celular en el *software* Fiji-ImageJ

1. Calibración de escala

- a. Antes de iniciar un análisis de cuantificación celular, es primordial calibrar la escala en función de la magnificación u objetivo con que fueron capturadas las imágenes de microscopía. Para ello, primeramente en el *software* ImageJ, seleccionar (**File → Open**) una imagen de microscopía con escala o regla integrada y en la barra de herramientas, seleccionar la recta **straight** y dibujar la línea sobre la longitud de la regla.
- b. Seleccionar la línea dibujada y en **Analyze → Measure** observar su longitud en píxeles. Este paso puede realizarse al menos 3 veces para cerciorarse de una medición exacta.
- c. Posteriormente, dar clic en **Analyze → Set scale** y en **Distance in pixels** insertar el promedio de las mediciones (en píxeles) realizadas previamente. Luego, insertar la distancia conocida (**known distance**) de la recta y las unidades en la que se encuentra (**Unit of length**).

Por ejemplo, para una imagen de un objetivo 20x, si la recta dibujada corresponde a 500 μm (**known distance**) y su distancia en píxeles (**Distance in pixels**) es 1597, entonces la escala automática ajustada correspondería a 3.194 píxeles/ μm .
- d. Finalmente, seleccionar **Global** si la escala será utilizada para un conjunto de imágenes obtenidas con el mismo objetivo y luego dar clic en **OK**.

2. Cuantificación de área de células individuales

- e. Primeramente, en **File → Open** seleccionar la imagen de microscopía a cuantificar.
- f. Las células individuales son consideradas aquellas que se encuentran totalmente separadas del resto (únicamente solas en el campo; pueden ser binucleadas) o dos células muy juntas. De este modo, en la barra de herramientas, en función de la geometría de la célula, seleccionar la opción de polígono (**polygon**) o elipse (**oval**). En seguida, hacer Zoom a la imagen (**Image → Zoom → In [+]**) y delimitar los contornos célula por célula.
- g. Después de delimitar el contorno una célula, presionar la tecla **t** para añadir el elemento a la ventana de **ROI Manager**.

- h. Finalizando la selección total de las células, dar clic en **Measure** del **ROI Manager** y en seguida, aparecerá la ventana de resultados (**Results**) con las áreas de cada una de las células.
- i. En la ventana de **Results**, guardar los datos en **File → Save as → *nombre del archivo.csv** o **.xls***
- j. En la ventana de **ROI Manager**, seleccionar todos los elementos y luego dar clic en **More>>** → **Save... → *nombre del archivo***.

3. Cuantificación de área nuclear en imágenes de fluorescencia con DAPI

- k. Seleccionar la imagen que se desea analizar (**File → Open**) y transformarla a formato de 8 bits (**Image → Type → 8bit**).
- l. Duplicar la imagen (**Ctrl + Shift + D**) y de preferencia guardarla con el nombre que sugiere por *default*.
- m. Para disminuir un poco el ruido que llegase a tener la imagen, seleccionar el filtro **Gaussian** (**Process → Filters → Gaussian Blur**) y asignarle un **Sigma (Radius)** de 0.2 y dar clic en **OK**.
- n. Invertir la imagen (**Edit → Invert**).
- o. Ajustar el contraste en la ventana B&C (**Ctrl + Shift + C**) y dar clic en **AUTO**.
- p. Ajustar los límites de partículas con el Threshold (**Image → Adjust → Threshold**), seleccionar tipo **Huang, Red** y ajustar los límites y relleno deslizando la **segunda barra** (primeramente a la izquierda y poco a poco a la derecha hasta llegar al ajuste deseado). Asegurase que la mayor parte de las partículas queden con forma definida, con bordes regulares y con el menor ruido posible en los alrededores.
Finalmente, dar clic en **Apply**.
- q. Para rellenar completamente las partículas seleccionar **Process → Binary → Fill Holes**. Para dividir algunas partículas 'pegadas', seleccionar **Process → Binary → Watershed**.
- r. Confirmar la calibración de la escala de pixeles a micrómetros (**Analyze → Set Scale**).
- s. Realizar el análisis de partículas (**Analyze → Analyze Particles**) definiendo el rango de tamaño requerido y seleccionando la información que queremos que nos proporcione. Dar clic en **OK**.

- t. En seguida aparecerán las ventanas de **Results, Summary** y **ROI Manager**. Minimizar todas las ventanas excepto ROI Manager y la imagen original (inicialmente convertida a 8 bits). En la ventana de **ROI Manager** dar doble clic en **Show All** para que tome en cuenta ahora los parámetros asignados sobre la imagen original.
- u. Realizar Zoom a la imagen y de manera manual, descartar las partículas que fueron tomadas en cuenta pero que están fuera de los parámetros asignados o no tienen una forma definida (seleccionarlas con la herramienta ***Oval o elipse*** y dar clic en **Delete** del **ROI Manager**); por el contrario, seleccionar la Herramienta ***Oval o elipse*** para seleccionar una partícula que no fue considerada y queremos que se agregue a la lista del ROI Manager. Una vez seleccionada la partícula en la imagen, dar clic en **Add** o presionar la letra **t**.
- v. Una vez definidas todas las partículas a analizar, en la ventana de **Results**, seleccionar todos los elementos (**Edit → Select All**) y eliminarlos (**Edit → Clear**).
- w. En la ventana del **ROI Manager**, seleccionar todos los elementos (**Clic en el primer elemento → Shift + Fin**) y dar clic en **Measure**, así la lista de Results se actualizará con base a las últimas modificaciones realizadas.
- x. Guardar la información de **Results (File → Save As)** en formato de hoja de cálculo (.xls o .csv) y de ROI Manager (**Seleccionar todo → More → Save...**) en el formato por *default*.

4. Cuantificación de área de agregados celulares y número de células por agregado

- y. En **File → Open** seleccionar la imagen de microscopía a cuantificar.
- z. Los criterios que se consideran como agregados celulares son aquellos que son un grupo mayor a 3 células, agrupaciones redondas (no alargadas) y áreas mayores a 2500 μm . Con base a ello, en la barra de herramientas seleccionar **Polygon** y delimitar los contornos de los aglomerados de las células, de acuerdo a las especificaciones mencionadas anteriormente.
- aa. Una vez marcado el contorno del aglomerado, presionar la tecla **t** para añadir el elemento al **ROI Manager**.

- bb. Finalizando la selección de todos los agregados, dar clic en **Measure** del **ROI Manager** y a continuación, aparecerá la ventana de **Results**. Analizar los valores de cada una de las áreas resultantes y eliminar (**Edit → Cut**) aquellos que se encuentren menor a 2500 μm .
- cc. Finalmente, guardar los datos de **Results** y **ROI Manager** como previamente se ha mencionado.
- dd. El conteo de células por aglomerado se realizó de modo manual, almacenando los datos en hojas de cálculo para ser analizados posteriormente.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D. H., and Eksteen, B. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), 244–251.

Alam, S. G., Lovett, D., Kim, D. I., Roux, K. J., Dickinson, R. B., & Lele, T. P. (2015). The nucleus is an intracellular propagator of tensile forces in NIH 3T3 fibroblasts. *Journal of cell science*, 128(10), 1901–1911.

Annabi, N., Tsang, K., Mithieux, S.M., Nikkhah, M., Ameri, A., Khademhosseini, A. and Weiss, A.S. (2013). Highly Elastic Micropatterned Hydrogel for Engineering Functional Cardiac Tissue. *Advanced Functional Materials*, (23), 4950-4959.

Anti, M., Marra, G., Rapaccini, G.L., Rumi, C., Bussa, S., Fadda, G. (1994). DNA ploidy pattern in human chronic liver diseases and hepatic nodular lesions. Flowcytometric analysis on echo-guided needle liver biopsy. *Cancer*, (73), 281–8.

Arechederra, M., Berasain, C., Avila, M. A., Fernández-Barrena, M. G. (2019). Chromatin dynamics during liver regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. XXXXX

Arias, I. M. (1982) *The Liver: biology and pathobiology*. 5th Edition, Raven Press.

Arvelo F, Poupon M. (2001). Aspectos Moleculares y Celulares. *Acta Científica Venez*, (52), 304–312.

Aumailley, M. and Smyth, N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *Journal Anatomy*, (193), 1–21.

Azhim A, Yamagami K, Muramatsu K, Morimoto Y, Tanaka M. (2011). The use of sonication treatment to completely decellularize blood arteries: a pilot study. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference, 2011*, 2468–2471.

Kim, B., Park, I., Hoshiba, T., Jiang, H., Choi, Y., Akaike, T., & Cho, C. (2011). Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 36, 238-268.

Badylak, S. F., Dziki, J. L., Sicari, B. M., Ambrosio, F., & Boninger, M. L. (2016). Mechanisms by which acellular biologic scaffolds promote functional skeletal muscle restoration. *Biomaterials*, 103, 128-136.

Baker, B. M. and Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal Cell Science*, 125,3015–3024.

Baptista, P.M. (2011). The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*, 53, 604–17.

Díaz-Bello, B., Monroy-Romero, A. X., Pérez-Calixto, D., Zamarrón-Hernández, D., Serna-Marquez, N., Vázquez-Victorio, G., and Hautefeuille, M. (2019). Method for the direct fabrication of polyacrylamide hydrogels with controlled stiffness in polystyrene multiwell plates for mechanobiology assays. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(9), 4219-4227.

Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V. and Wang, Y.L. (2011). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *Journal Cell Biology*, 153, 881–888.

Benton, G., Kleinman, H. K., George, J. and Arnaoutova, I. (2011). Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *International Journal Cancer*, 128, 1751–1757

Berasain, C., Avila, M. A., (2015). Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Celular and Molecular Life Sciences*, (72), 3831–3851.

Bernard, M. P., Chu, M., Myers, J. C., Ramirez, F., Eikenberry, E. F., and Prockop, D. J. (1983). Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the proal chain of human type I procollagen. statistical evaluation of structures that are conserved during evolution. *Biochemistry*, 22(22), 5213-5223.

- Bhat, M., Pasini, E., Baciú, C., Angeli, M., Humar, A., Macparland, S., Feld, J., McGilvray, I. (2019). The basis of liver regeneration: A systems biology approach. *Annals of Hepatology*, (18), 422-428.
- Bismuth H. (1982). Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World journal of surgery*, 6(1), 3–9.
- Bosman, F.T. y Stamenkovic, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *Journal Pathology*, (200), 423–428
- Boudreau, N., and Bissell, M. J. (1998). Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Current opinion in cell biology*, 10(5), 640–646.
- Breslin, S. and O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today* 18, 240-249.
- Brightman, A.O., Rajwa, B.P., Sturgis, J.E., McCallister, M.E., Robinson, J.P. and Voytik-Harbin, S.L. (2000). Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro. *Biopolymers*, 54, 222–34.
- Brunetti, V., Maiorano, G., Rizzello, L., Sorce, B., Sabella, S., Cingolani, R., Pompa, P.P. (2010). Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 6264–6269.
- Caliari, S., Burdick, J. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Natural Methods*, 13, 405–414.
- Carol Mattson. (2014). Fisiopatología. Noverna ed. Wisconsin. The Point.
- Cascales, A. M. (2008). Bases Moleculares y Moleculares de la Regeneración Hepática. Instituto de España.
- Cassinotto, C., Boursier, J., de Ledinghen, V., Lebigot, J., Lapuyade, B., Cales, P., Hiriart, J. B., Michalak, S., Le Bail, B., Cartier, V., Mouries, A., Oberti, F., Fouchard-Hubert, I., Vergniol, J., Aubé,

C. (2016). Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: a comparison of supersonic shear imaging, FibroScan, and ARFI with liver biopsy. *Hepatology* 6, 1817–1827.

Castera, L., Forns, X., Alberti, A. (2008). Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *Journal Hepatology*, 5, 835–847.

Celiz, A. D. (2014). Materials for stem cell factories of the future. *Nature Materials*, (13), 570-579.

Chancellor, T. J., Lee, J., Thodeti, C. K., Lele, T. (2010). Actomyosin tension exerted on the nucleus through nesprin-1 connections influences endothelial cell adhesion, migration, and cyclic strain-induced reorientation. *Biophysical journal*, 99(1), 115–123.

Chen, R., Ho, H., Tsai, Y., & Sheu, M. (2004). Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, 25(13), 2679-2686.

Choi, C. Y.; Hwang, K. C.; Kim, B. S. (2005). Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. *Annals Surgery*, 241 (3), 506–515.

Chung, M. I. S., Ming Miao, Stahl, R. J., Chan, E., Parkinson, J., & Keeley, F. W. (2006). Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: Clues to the evolutionary history of elastins. *Matrix Biology*, 25(8), 492-504.

Clark, P., Connolly, P., Curtis, A.S., Dow, J.A. and Wilkinson, C.D. (1991). Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *Journal Cellular Scientific*, 99(Pt 1),73–77.

Colnot, S. and Perret, C. (2011). Liver Zonation. *Molecular Pathology of Liver Diseases*. 7-16.

Corning Incorporated Life Sciences. (2019). Corning Matrigel matrix. Frequently asked questions.

Cox, T.R., Eler, J.T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanism*, 2, 165–178.

Crapo, P.M., Gilbert, T.W., Badylak, S.F (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32, 3233–43.

Crapo, P. M., Medberry, C. J., Reing, J. E.; Tottey, S., van der Merwe, Y. (2012). Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(13), 3539–3547.

Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl, and D. Hodzic. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *Jornal Cellular Biology*, 172, 41–53.

Cruz-Acuña, R. and García, A. J. (2016). Synthetic hydrogels mimicking basement membrane matrices to promote cellmatrix interactions. *Matrix Biology*, 57(58), 324–333.

Cukierman, E., Pankov, R. & Yamada, K. M. (2002). Cell interactions with threedimensional matrices. *Current Opinion Cellular Biology*, 14, 633-639.

Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. & Yamada, K. M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294, 1708-1712.

De Kock, J., Ceelen, L., De Spiegelare, W., Casteleyn, C., Claes, P., Vanhaecke, T. (2011). Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool. *Archives of Toxicology*, 85, 607–12.

Deegan, D. B. (2015). Effects of liver extracellular matrix gel stiffness on primary hepatocyte function. Doctoral of philosophy thesis. Winston-Salem, North Carolina. Wake Forest Univesity Graduate School of Arts and Sciences. 127 p.

Delgado, C. B. A y Mas. O. J. (2017). Avances en el Estudio Experimental de la Bioquímica Hepática. Instituto de Fisiología, UNAM. Ciudad del México.

DeQuach, J. A., Lin, J. E., Cam, C., Hu, D., Salvatore, M. A., Sheikh, F., and Christman, K. L. (2012). Injectable skeletal muscle matrix hydrogel promotes neovascularization and muscle cell infiltration in a hindlimb ischemia model. *European Cells & Material*, 23, 400-412.

DeQuach, J. A.; Yuan, S. H.; Goldstein, L. S.; Christman, K. L. (2011). Decellularized porcine brain matrix for cell culture and tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering, Part A*, 17(21–22), 2583–2592.

Desai, S.S., Tung, J.C., Zhou, V.X., Grenert, J.P., Malato, Y., Rezvani, M., Español-Suñer, R., Willenbring, H., Weaver, V.M. and Chang, T.T. (2016). Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology*, 64, 261-275.

Dickinson, R.B., Guido, S., Tranquillo, R.T. (1994). Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. *Annal of Biomedical Engineering*, 22, 342–356.

Drake, M.P., Davison, P.F., Bump, S., Schmitt, F.O. (1966). Action of proteolytic enzymes on tropocollagen and insoluble collagen. *Biochemistry*, 5, 301–12.

Drury J. L. and Mooney D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, (24), 4337–51.

Eipel, C., Abshagen, K., Vollmar, B. (2010). Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited. *World Journal Gastroenterology*, 48, 6046–6057.

Elkins, R. C., Dawson, P. E., Goldstein, S., Walsh, S. P., & Black, K. S. (2001). Decellularized human valve allografts. *Annals of Thoracic Surgery*, 71(5), S428-S432.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*, 35(4), 495-516.

Engler, A.J., Griffin, M.A., Sen, S., Bonnemann, C.G., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2004b). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments. *Journal Cell Biology*, (166), 877-887.

Eynard, Aldo R., Mirta A. Valentich. RAR. (2008). Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. Cuarta. Buenos Aires: Panamericana.

Fassett, J., Tobolt, D., and Hansen, L. K. (2006). Type I collagen structure regulates cell morphology and EGF signaling in primary rat hepatocytes through cAMP-dependent protein kinase A. *Molecular biology of the cell*, 17(1), 345–356.

Fischer, R., Myers, K., Gardel, M., Waterman-Storer, C. (2012). Stiffness-controlled Three-dimensional Extracellular Matrices for High-resolution Imaging of Cell Behavior. *Nature protocols*, 7, 2056-2066.

Flynn, B.P., Bhole, A.P., Saeidi, N., Liles, M., Dimarzio, C.A. and Ruberti, J.W. (2010). Mechanical strain stabilizes reconstituted collagen fibrils against enzymatic degradation by mammalian collagenase matrix metalloproteinase 8 (MMP-8). *PLoS One*. 5, e12337.

Ford, A.J., Jain, G., Rajagopalan, P. (2015). Designing a fibrotic microenvironment to investigate changes in human liver sinusoidal endothelial cell function. *Acta Biomaterial*, 24, 220–227.

Freytes, D.O., Martin, J., Velankar, S.S., Lee, A.S., Badylak, S.F. (2008). Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials*, 29, 1630–1637.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada, K. M. (2001). Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 793-805.

Georges, P. C., and P. A. Janmey. (2005). Cell type-specific response to growth on soft materials. *Journal of Applied Physiology*, 98(4):1547–1553.

Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683.

Gjorevski, N. (2016). Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*, 539, 560–564.

Godoy, P. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology*, 87, 1315-1530.

Goh, S.K., Bertera, S., Olsen, P., Candiello, J.E., Halfter, W., Uechi, G. (2013). Perfusion decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*, 34, 6760–6772.

Goldman, R.D., Y. Gruenbaum, R.D. Moir, D.K. Shumaker, and T.P. Spann. (2002). Nuclear lamins: Building blocks of nuclear architecture. *Genes and Development*, 16, 533–547

Gomez-Dominguez, E., Mendoza, J., Garcia-Buey, L., Trapero, M., Gisbert, J. P., Jones, E. A., Moreno-Otero, M. (2008). Transient elastography to assess hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 5, 441–447.

Görtzen, J., Schierwagen, R., Bierwolf, J. (2015). Interplay of matrix stiffness and c-SRC in hepatic fibrosis. *Frontiers in physiology*, 6, 359.

Gruenbaum, Y., A. Margalit, R.D. Goldman, D.K. Shumaker, and K.L. Wilson. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 21– 31.

Habibullah, C. M., Syed, I. H., Qamar, A.; Taher-Uz, Z. (1994). Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation*, 58 (8), 951–952.

Heino, J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays*, 29, 1001–1010.

Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 59(2 Suppl), 21-26.

Hjelle, J. T., Carlson, E. C., Brendel, K., & Meezan, E. (1979). Biosynthesis of basement membrane matrix by isolated rat renal glomeruli. *Kidney International*, 15(1), 20-32.

Hoffman, A. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advance Drug Delivery Reviews* (54): 3–12.

Huck, I., Gunewardena, S., Espanol-Suner, R., Willenbring, H., and Apte, U. (2019). Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Activation Is Essential for Termination of Liver Regeneration in Mice. *Hepatology*, 0,1-16.

Hulmes, DJS. (2008). Collagen Diversity, Synthesis, and Assembly. *Springer*.

- Huxley-Jones, J., Foord, S. M., Barnes, M. R. (2008). Drug discovery in the extracellular matrix. *Drug Discovery Today*, 13(15-16), 685-694.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673- 687.
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, (326), 1216–1219.
- Ijima, H., Nakamura, S., Bual, R. P., & Yoshida, K. (2019). Liver-specific extracellular matrix hydrogel promotes liver-specific functions of hepatocytes in vitro and survival of transplanted hepatocytes in vivo. *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(3), 365-372.
- Ingenito, E.P., Sen, E., Tsai, L.W., Murthy, S. and Hoffman, A. (2010), Design and testing of biological scaffolds for delivering reparative cells to target sites in the lung. *Journal of Tissue Engineering and Regeneration Medicine*, 4, 259-272.
- Iwakiri, Y. (2014). Pathophysiology of portal hypertension. *Clinical Liver Disease*, 2, 281–291.
- Janiak, M., Hashmi, H. R. and Janowskawieczorek, A. (1994). Use of the matrigel-based assay to measure the invasiveness of leukemic-cells. *Experimental Hematology* 22, 559-565.
- Jaramillo, M., Yeh, H., Yarmush, M. L., & Uygun, B. E. (2018). Decellularized human liver extracellular matrix (hDLM)-mediated hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(4), e1962–e1973.
- Jungermann, K., y Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual Review of Nutrition* (16), 179–203.
- Kang, N. (2020). Mechanotransduction in Liver Diseases. *Seminars in liver disease*, 40(1), 84–90.
- Kasimir, M.T., Rieder, E., Seebacher, G., Silberhumer, G., Wolner, E., Weigel, G., and Simon, P. (2003). Comparison of Different Decellularization Procedures of Porcine Heart Valves. *The International Journal of Artificial Organs*, 26(5), 421–427.

Katz, N., Teutsch, H.F., Jungermann, K., Sasse, D. (1977). Heterogeneous reciprocal localization of fructose-1, 6-bisphosphatase and of glucokinase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS Letters*. 83(2):272–276.

Keane, T.J., Londono, R., Turner, N.J., Badylak, S.F. (2012). Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 33, 1771–1781.

Keene, D.R., Engvall, E., Glanville, R.W. (1988). Ultrastructure of Type-VI Collagen in Human-Skin and Cartilage Suggests an Anchoring Function for This Filamentous Network. *Journal Cellular Biology* 107,1995-2006.

Kenny, F. N., Drymoussi, Z., Delaine-Smith, R., Kao, A. P., Laly, A. C., Knight, M. M., Philpott, M. P., & Connelly, J. T. (2018). Tissue stiffening promotes keratinocyte proliferation through activation of epidermal growth factor signaling. *Journal of cell science*, 131(10), jcs215780.

Kietzmann, T. (2017). Metabolic zonation of the liver: the oxygen gradient revisited. *Redox Biology*, 11, 622–630.

Kim, K.Y., Kovács, M., Kawamoto, S., Sellers, J.R., Adelstein, R.S. (2005). Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 22769–22775.

Kim, H. E., Dalal, S. S., Young, E., Legato, M. J., Weisfeldt, M. L., and D'Armiento, J. (2000). Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *Journal Clinical Investigation*.

Kim, S. S., Lim, S. H., Hong, Y. S., Cho, S. W., Ryu, J. H., Chang, B. C., Choi, C. Y., Kim, B. S. (2006). Tissue engineering of heart valves in vivo using bone marrow-derived cells. *Artificial Organs*, 30 (7), 554–557.

Klaas, M., Kangur, T., Viil, J., Mäemets-Allas, K., Minajeva, A., Vadi, K., Antsov, M., Lapidus, N., Järvekülg, M., and Jaks, V. (2016). The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Scientific reports*, 6, 27398.

Kleinman, H.K. and Martin, G.R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biology*, 15, 378–386.

Klouda, L. and Mikos, A. (2008). Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (68), 34–45.

Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 161, III-XIII, 1-151.

Knight, C.G., Morton, L.F., Peachey, A.R., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., Barnes, M.J. (2000). The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *Journal Biological Chemistry* 27(5):35–40.

Krishna, M. (2013) Anatomía microscópica del hígado. *Clinical Liver Disease* 2(S5):109-112

Kunz-Schughart, L. A., Freyer, J. P., Hofstaedter, F. and Ebner, R. (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening* 9, 273-285.

Laflamme, M. A. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* 25, 1015–1024.

Larsen, M., Artym, V. V., Green, J. A. & Yamada, K. M. (2006). The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 463-471.

Lee, J. S., Shin, J., Park, H. M., Kim, Y. G., Kim, B. G., Oh, J. W., and Cho, S. W. (2014). Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering. *Biomacromolecules*, 15(1), 206–218.

Lee, H. J., Choi, N. Y., Lee, S. W., Ko, K., Hwang, T. S., Han, D. W., Lim, J., Schöler, H. R., Ko, K. (2016) Epigenetic alteration of imprinted genes during neural differentiation of germline-derived pluripotent stem cells. *Epigenetics* 11(3), 177-183.

Legate, K. R., Wickstroem, S. A. and Faessler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes and Development*, 23, 397-418.

Lele, T.P., Pendse, J., Kumar, S., Salanga, M., Karavitis, J., Ingber, D.E. (2006). Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *Journal Cellular Physiology*, 207(1),187-194.

Lessey, E. C., Guilluy, C., Burridge, K. (2012). From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry*, 51, 7420–7432.

Li, B., Shen, W., Peng, H., Li, Y., Chen, F., Zheng, L., Xu, J., & Jia, L. (2019). Fibronectin 1 promotes melanoma proliferation and metastasis by inhibiting apoptosis and regulating EMT. *Oncotargets and therapy*, 12, 3207–3221.

Li, Q., Uygun, B. E., Geerts, S., Ozer, S., Scaff, M., Gilpin, S. E., Ott, H. C., Yarmush, M. L., Smith, L. M., Welham, N. V., & Frey, B. L. (2016). Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds. *Biomaterials*, 75, 37–46.

Li, Z. and Guan, J. (2011). Hydrogels for cardiac tissue engineering. *Polymers*, 3, 740–761.

Lim, C.G., Jang, J., Kim, C. (2018). Cellular machinery for sensing mechanical force. *BMB Reports*, 51, 623–629.

Lin, Y.K., and Liu, D.C. (2006). Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. *Food Chemistry* 94, 621-625.

Liu, L., You, Z., Yu, H. (2017). Mechanotransduction-modulated fibrotic microniches reveal the contribution of angiogenesis in liver fibrosis. *Nature Materials*, 12, 1252–1261.

Lombardi, M. L., Jaalouk, D. E., Shanahan, C. M., Burke, B., Roux, K. J., Lammerding, J. (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 286(30), 26743–26753.

- Londono, R., & Badylak, S. F. (2015). Biologic scaffolds for regenerative medicine: Mechanisms of in vivo remodeling. *Annals of Biomedical Engineering*, 43(3), 577-592.
- Lovett, D.B., N. Shekhar, J.A. Nickerson, K.J. Roux, and T.P. Lele. (2013). Modulation of nuclear shape by substrate rigidity. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 6, 230–238.
- Malafaya, P. B., Silva, G. A., & Reis, R. L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4-5), 207–233.
- Martinez-Hernandez, A. (1984). The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Laboratory Investigation*, 51, 57-74
- Martínez-Hernández, A., and Amenta, P. S. (1995). The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB Journal*, 8, 1401-1410.
- Mathieu, S., Manneville, J. B. (2019). Intracellular mechanics: connecting rheology and mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 56, 34–44
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell*, 6, 483–495.
- Mercuri, J. J., Patnaik, S., Dion, G., Gill, S. S., Liao, J., & Simionescu, D. T. (2013). Regenerative potential of decellularized porcine nucleus pulposus hydrogel scaffolds: stem cell differentiation, matrix remodeling, and biocompatibility studies. *Tissue engineering. Part A*, 19(7-8), 952–966.
- Merril, C. R., Switzer, R. C., & Van Keuren, M. L. (1979). Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4335-4339.
- Michalopoulos, G. K. (2007). *Liver regeneration*. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 286-300.

Michalopoulos G. K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 65(4), 1384–1392.

Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Kim, K.Y., Riecken, E.O., Stein, H. (1990). Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*. 98(1), 175-84.

Miller, E.J. (1972). Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. *Biochemistry*, 11, 4903–4909.

Mondrinos, M. J. (2006). Engineering three-dimensional pulmonary tissue constructs. *Tissue Engineering* 12, 717–728.

Montoya, C. V., and McFetridge, P. S. (2009). Preparation of ex vivo based biomaterials using convective flow decellularization. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 15(2), 191-200.

Moss D.K., Betin V.M., Malesinski S.D. and Lane J.D. (2006) A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *Journal Cellular Scientific*, 119, 2362–2374.

Nakayama, K.H., Lee, C.C.I., Batchelder, C.A., Tarantal, A.F. (2013). Tissue Specificity of Decellularized Rhesus Monkey Kidney and Lung Scaffolds. *PLoS ONE* 8(5):e64134.

Nakayama, K.H., Batchelder, C.A., Lee, C.I., and Tarantal, A.F. (2010). Decellularized Rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 16, 2207–2216.

Nari, G. A. *et al.* (2013). Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers. *Revista española de enfermedades digestivas: órgano oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva* 105, 138-143.

Natarajan, V., Berglund, E.J., Chen, D.X. (2015). Substrate stiffness regulates primary hepatocyte functions. *RSC Advances*, 99, 80956– 80966.

Nekouzadeh, A., Pryse, K.M., Elson, E.L., Genin, G.M. (2008). Stretch-activated force shedding, force recovery, and cytoskeletal remodeling in contractile fibroblasts. *Journal Biomechanical*, 41(14), 2964–2971.

Olsen, A.L., Bloomer, S.A., Chan, E.P., (2011). Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1, G110–G118.

Onley, D.J., Knight, C.G., Tuckwell, D.S., Barnes, M.J., Farndale, R.W. (2000). Micromolar Ca^{2+} concentrations are essential for Mg^{2+} de-pendent binding of collagen by the integrin $\alpha_2\beta_1$ inhuman platelets. *Journal Biological Chemistry*, 275, 24560–24564.

Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Goh, S.K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., Taylor, D. A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 14(2), 213-221.

Páramo-Hernández, David B., MD, William Otero Regino, MD, Luis F. Pineda Ovalle, MD. (2010). Fibrogénesis hepática. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*, 25(2), 187-190.

Parker, M. W., Rossi, D., Peterson, M., Smith, K., SikstromR, K., White, E. S., et al. (2014). Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *Journal Clinical Investigation*, 124, 1622–1635.

Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8, 241–254.

Patel, N.R., Bole, M., Chen, C., et al. (2012). Cell elasticity determines macrophage function. *PLoS ONE* 79, e410249.

Pelham, R. J., Jr. & Wang, Y. L. (1998). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *The Biological bulletin*, 194, 348- 349.

Peppas, N.A. (1996). Hydrogels in Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine; Academic Press: San Diego, CA, USA, 60–64.

Peppas, N.A. and Mikos, A.G. (1986). Preparation methods and structure of hydrogels. In Hydrogels in Medicine and Pharmacy, CRC Press: Boca Raton, FL, USA, Volumen 1, 1–25.

Petersen, T. H.; Calle, E. A.; Zhao, L.; Lee, E. J.; Gui, L.; Raredon, M. B.; Gavrillov, K.; Yi, T.; Zhuang, Z. W.; Breuer, C. (2010). Tissue engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, 329(5991), 538–541.

Ponce, M. L. (2001). In vitro Matrigel angiogenesis assays. *Methods in Molecular Medicine*. 46, 205–209.

Porth, C. M. SC-G. Porth. (2014). Fisiopatología. Novena ed. Wisconsin. The Point.

Pouliot, R.A., Young, B.M., Link, P.A., Park, H.E., Kanh, A.R., Shankar, K., Schneck, M.B., Weiss, D.J., Heise, R.L. (2020). Porcine Lung-Derived Extracellular Matrix Hydrogel Properties Are Dependent on Pepsin Digestion Time. *Tissue Engineering Part C Methods* 26(6):332-346.

Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Keely, P. J. (2009). Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene*, 28, 4326–4343.

Qi, M., Chen, Y., Zhang, G.Q., Meng, Y. J., Zhao, F. L., Wang, J., Ma, J. (2017). Clinical significance of preoperative liver stiffness measurements in primary HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Future Oncology* 30, 2799–2810.

Qian, L. and Saltzman, W. M. (2004). Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials* 25, 1331–1337.

Quint, C., Kondo, Y., Manson, R. J., Lawson, J. H., Dardik, A., Niklason, L. E. (2011). Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9214– 9219.

Rafat, M., Li, F., Fagerholm, P., Lagali, N. S., Watsky, M. A., Munger, R., Matsuura, T., and Griffith, M. (2008). PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, 29(29), 3960–3972.

Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfranccone, L., Dejana, E., Colotta, F. (1994). Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *Journal Cell Biology*, 127, 537–546.

Reed, J., Walczak, W. J., Petzold, O. N. and Gimzewski, J. K. (2009). In situ mechanical interferometry of Matrigel films. *Langmuir*, 25, 36–39.

Reinhart-King, C.A., Dembo, M., and Hammer, D.A. (2005). The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophysical Journal*, 89, 676- 689.

Reyes, C. D., and García, A. J. (2003). Engineering integrin-specific surfaces with a triple-helical collagen-mimetic peptide. *Journal of Biomedical Materials Research*, 65A, 511–523.

Rode H. D., Eisel D., Frost I. (2004) Apoptosis, cell death and cell proliferation. 3 rd ed. London: Roche Applied Science.

Rodés J. (2007). Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd ed. Malden, Mass: Blackwell.

Rojkind, M., Gatmaitan, Z., Mackensen, S., Giambrone, M. A., Ponce, P., and Reid, L. M. (1980). Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *The Journal of cell biology*, 87(1), 255–263.

Rowlands, A.S., George, P.A. and Cooper-White, J. J. (2008). Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295, C1037–C1044.

Rubin, E., Fred, G., Raphael, Rubin., Roland Schwarting. (2006). DS. Patología Estructural. Fundamentos Clínico patológicos en medicina. Cuarta Edi. Aravaca (Madrid): Elsevier Saunders.

Sangkyun, C., Jerome, I., Dennis, E. (2017). Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships. *Journal Cell Biology*, 216(2), 305–315.

Sawada, K., Terada, D., Yamaoka, T., Kitamura, S., and Fujisato, T. (2008). Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(6), 943-949.

Schalper, J. P., Schalper, K. C., Pierart, C. Z. (2003). Análisis de la distribución de los componentes de membrana basal laminina, fibronectina y colágeno IV en vasos sanguíneos de patología mamaria benigna y maligna. *Revista Chilena de Cirugía*, 55(3), 249–254.

Schlunck, G., Han, H., Wecker, T., Kampik, D., Meyer-ter-Vehn, T., Grehn, F. (2008). Substrate rigidity modulates cell matrix interactions and protein expression in human trabecular meshwork cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(1), 262-269.

Schmid, R. (1991). Who was Disse? *Hepatology*, 14, 1283-1285.

Schmidt, C. E., and Baier, J. M. (2000). Acellular vascular tissues: Natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, 21(22), 2215-2231.

Schultheiss, D., Gabouev, A. I., Cebotari, S., Tudorache, I., Walles, T., Schlote, N., Mertsching, H. (2005). Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: Matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model. *Journal of Urology*, 173(1), 276-280.

Schwartz, M. A. (1997). Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *Journal Cell Biology*, 139, 575–578.

Scott F. Gilbert. (2005). *Biología del Desarrollo*. Séptima. México: Panamericana.

Sellaro, T. L., Ranade, A., Faulk, D. M., McCabe, G. P., Dorko, K., Badylak, S. F., and Strom, S. C. (2010). Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liverderived extracellular matrix gels, *Tissue Engineering. A*, 16, 1075-1082.

Semler, E.J., Lancin, P.A., Dasgupta, A., Moghe, P.V. (2005). Engineering hepatocellular morphogenesis and function via ligand-presenting hydrogels with graded mechanical compliance. *Biotechnology Bioengineering*, 89(3), 296–307.

Serna-Márquez, N., Rodríguez-Hernández, A., Ayala-Reyes, M., Martínez-Hernández, L.O., Peña-Rico, M.Á., Carretero-Ortega, J., Hautefeuille, M., Vázquez-Victorio, G. (2020). Fibrillar Collagen Type I Participates in the Survival and Aggregation of Primary Hepatocytes Cultured on Soft Hydrogels. *Biomimetics* 5(2):30.

Sharma, N. S.; Nagrath, D.; Yarmush, M. L. (2010). Adipocyte-derived basement membrane extract with biological activity: applications in hepatocyte functional augmentation in vitro. *FASEB Journal*, 24 (7), 2364–2374.

Sharp, J.A., Cane, K.N., Lefevre, C., Arnould, J.P.Y., Nicholas, K.R. (2005). Fur seal adaptations to lactation: insights into mammary gland function. *Current Topics in Developmental Biology*, 72, 275–308.

Sherlock, S. (1955). Diseases of the Liver and Biliary System. 11th Edition edn, Blakwell Scientific Publications.

Shoulders, M.D. and Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. *Annuals Review Biochemistry*, 78, 929–958.

Silvera, L., Barrios de Zurbarán C. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte Barranquilla*; 16:9–18.

Sims, J. R., S. Karp, and D. E. Ingber. (1992). Altering the celular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *Journal of Cell Science*, 103(Pt 4), 1215–1222.

Singelyn, J. M., and Christman, K. L. (2011). Modulation of material properties of a decellularized myocardial matrix scaffold. *Macromolecular bioscience*, 11(6), 731–738.

- Skardal, A., Smith, L., Bharadwaj, S., Atala, A., Soker, S., & Zhang, Y. (2012). Tissue specific synthetic ECM hydrogels for 3-D in vitro maintenance of hepatocyte function. *Biomaterials*, 33(18), 4565-4575.
- Song, J. J.; Guyette, J. P.; Gilpin, S. E.; Gonzalez, G.; Vacanti, J. P.; Ott, H. C. (2013). Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nature Medical* 19(5), 646– 651.
- Soofi, S. S., Last, J. A., Liliensiek, S. J., Nealey, P. F. and Murphy, C. J. (2009). The elastic modulus of Matrigel as determined by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*, 167, 216– 219.
- Soto-Gutierrez, A., Zhang, L., Medberry, C., Fukumitsu, K., Faulk, D., Jiang, H. (2011). A whole-Organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Engineering*. 17. 677-686.
- Sporea, I., Sirli, R., Deleanu, A., Tudora, A., Popescu, A., Curescu, M., Bota, S. (2010). Liver stiffness measurements in patients with HBV vs HCV chronic hepatitis: a comparative study. *World Journal Gastroenterology*, 38, 4832–4837.
- Stanger, B. Z. (2015). Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annual Review Physiology*, 77, 179-200.
- Strom, S. C., Fisher, R. A., Thompson, M. T., Sanyal, A. J., Cole, P. E., Ham, J. M., Posner, M. P. (1997). Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*, 63(4), 559–569.
- Su, J. M., Wang, L. Y., Liang, Y. L., and Zha, X. L. (2005). Role of cell adhesion signal molecules in hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *World journal of gastroenterology*, 11(30), 4667–4673.
- Suri, S., and Schmidt, C. E. (2010). Cell-laden hydrogel constructs of hyaluronic acid, collagen, and laminin for neural tissue engineering. *Tissue engineering. Part A*, 16(5), 1703–1716.

Swift, J., I.L. Ivanovska, A. Buxboim, T. Harada, P.C. Dingal, J. Pinter, J.D. Pajerowski, K.R. Spinler, J.W. Shin, M. Tewari, et al. (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*, *341*, 1240104.

Syedain, Z. H., Bradee, A. R.; Kren, S., Taylor, D. A., Tranquillo, R. T. (2013). Decellularized tissue-engineered heart valve leaflets with recellularization potential. *Tissue Engineering., Part A*, *19* (5–6), 759–769.

Takeda, T., Yasuda, T., Nakayama, Y., Nakaya, M., Kimura, M., Yamashita, M., Sawada, A., Abo, K., Takeda, S., Sakaguchi, H., Shiomi, S., Asai, H., & Seki, S. (2006). Usefulness of noninvasive transient elastography for assessment of liver fibrosis stage in chronic hepatitis C. *World journal of gastroenterology*, *12*(48), 7768–7773.

Tamada, M., Sheetz, M. P., Sawada, Y. (2004). Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Developmental Cell*, *7*, 709–718.

Tan, J. L., Tien, J., Pirone, D. M., Gray, D. S., Bhadriraju, K., Chen, C. S. (2003). Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 1484–1489.

Tibbitt, M. W. and Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, *103*(4), 655–663.

Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G., Chu, M. L. (2003). Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nature Review Molecular Cell Biology*, *4*, 479–489

Tomas, A., Noguera- Salva, R., Fariñas-Guerrero F. (2010). La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). *Revista Española de Patología*, *43*(1), 24–32.

Tomlinson, L., Hyndman, L., Firman, J. W., Bentley, R., Kyffin, J.A., Webb, S.D., McGinty, S., and Sharma, P. (2019) In vitro Liver Zonation of Primary Rat Hepatocytes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (7), 17.

Trefts, E., Gannon, M., and Wasserman, D.H. (2017). The Liver. *Current Biology Magazine*, 27, R1141-R1155.

Tse, J. R. and Engler, A. J. (2010). Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Current Protocols in Cell Biology*, 47, 10.16.1-10.16.16.

Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M.L., Guzzardi, M.A., Shulman, C., Milwid, J., Kobayashi, N., Tilles, A., Berthiaume, F., Hertl, M., Nahmias, Y., Yarmush, M.L., Uygun, K. (2010). *Nature Medicine*, 16(7), 814-20.

Valatas, V., Xidakis, C., Roumpaki, H., Kolios, G., Kouroumalis, E. A. (2003). Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell Biology International* (27), 67-73.

Venkatesh, S.K., Ehman, R. L. (2014). Magnetic resonance elastography of liver. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, 22(3), 433–446.

Vracko, R. (1974). Basal lamina Scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *American Journal Pathology* (77), 314-319.

Vukicevic, S. (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Experimental Cell Research*, 202, 1–8.

Wang, N., Tolic-Nørrelykke, I. M., Chen, J., Mijailovich, S. M., Butler, J.P., Fredberg, J.J., Stamenovic, D. (2002). Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. *American Journal of Physiology*, 282, C606–C616.

Wang, Y., Cui, C. B., Yamauchi, M., Miguez, P., Roach, M., Malavarca, R., Costello, M. J., Cardinale, V., Wauthier, E., Barbier, C., Gerber, D. A., Alvaro, D., Reid, L. M. (2011). Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology*, 53(1), 293–305.

- Ware, B. R., Durham, M. J., Monckton, C. P., and Khetani, S. R. (2017). A Cell Culture Platform to Maintain Long-term Phenotype of Primary Human Hepatocytes and Endothelial Cells. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 5(3), 187–207.
- Wells, R. G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*, 47(4), 1394–1400
- Weng, S., and Fu, J. (2011). Synergistic regulation of cell function by matrix rigidity and adhesive pattern. *Biomaterials*, 32(36), 9584–9593.
- Willemse, J., Verstegen, M., Vermeulen, A., Schurink, I.J., Roest, H., Laan, L.V., & Jonge, J.D. (2020). Fast, robust and effective decellularization of whole human livers using mild detergents and pressure controlled perfusion. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 108, 110200.
- Williams, C., Sullivan, K., and Black, L.D. (2015). Partially Digested Adult Cardiac Extracellular Matrix Promotes Cardiomyocyte Proliferation In Vitro. *Advanced Healthcare Materials*, 4, 1545.
- Wolf, M. T., Daly, K. A., Brennan-Pierce, E. P., Johnson, S. A., Carruthers, C. A., D'Amore, A., Nagarkar, S. P., Velankar, S. S., & Badylak, S. F. (2012). A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(29), 7028–7038.
- Woods, T. and Gratzer, P. F. (2005). Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* (26), 7339-7349.
- Wu, Y., Grande-Allen, K., West, J. L. (2016). Adhesive Peptide Sequences Regulate Valve Interstitial Cell Adhesion, Phenotype and Extracellular Matrix Deposition. *Cellular and Molecular Bioengineering* (9), 479-495.
- Xu, C. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19, 971–974.

Xu, T., Zhou, C. Z., Xiao, J. and Liu, J. (2018). Unique conformation in a natural interruption sequence of type XIX collagen revealed by its high-resolution crystal structure. *Biochemistry*, (57), 1087-1095.

Xu, X., Lai, Y., and Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20180992.

Yeong, W.Y., Chua, C.K., Leong, K.F., Chandrasekaran, M. (2004). Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology*, 22(12), 643–652.

Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., and Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, 60(1), 24–34.

Zacchigna, L., Vecchione, C., Notte, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Cifelli, G., Ferrari, A., Maffei, A., Fabbro, C., Braghetta, P., Marino, G., Selvetella, G., Aretini, A., Colonnese, C., Bettarini, U., Russo, G., Soligo, S., Adorno, M., Bonaldo, P., Volpin, D., Piccolo, S., Lembo, G., Bressan, G.M. (2006). Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell* 124(5), 929–942

Zakim, D., and Boyer, T.D. (1996). *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*, 3rd ed., Philadelphia: WB Saunders, vols. I and II.

Zeisberg, M., Kramer, K., Sindhi, N., Sarkar, P., Upton, M., Kalluri, R. (2006). De-differentiation of primary human hepatocytes depends on the composition of specialized liver basement membrane. *Molecular and Cellular Biochemistry*, (283), 181–189.

Zhang, W., Tucker-Kellogg, L., Narmada, B. C., Venkatraman, L., Chang, S.; Lu, Y., Tan, N., White, J. K., Jia, R.; Bhowmick, S. S., Shen, S., Dewey, C. F., Jr., Yu, H. (2010). Cell-delivery therapeutics for liver regeneration. *Advance Drug Delivery Reviews*, 62(7–8), 814–826.