



# **UNIVERSIDAD ESPECIALIZADA DE LAS AMÉRICAS**

**Facultad de Biociencias y Salud Pública**

**Escuela de Biociencias**

**Trabajo de Grado para optar por el título de Licenciada**

**en**

**Ingeniería en Biomédica**

Modalidad

Tesis

Título de Grado

Generación de Sustratos Biomiméticos y la Evaluación de Fuerzas Celulares  
mediante Herramientas Computacionales para el Estudio de Ecosistemas  
Extracelulares

Presentado por:

Lombardo Galarza, Mayleen Ashley, 8-962-374

Asesor:

Ph.D Diego Reginensi

Panamá, 2025

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo con todo mi admiración y aprecio a mi madre, por su amor incondicional, su apoyo y su sacrificio, que me ha permitido ser la persona que soy.

A mi familia, por estar siempre presente y acompañarme en los momentos en los que más lo necesitaba. A Manuel Falquez, por siempre haber creído en mí, incluso cuando yo lo dudaba y por su apoyo sincero a lo largo de mi vida.

A mis amistades, compañeros y futuros colegas, por hacer este proceso mucho más ligero y llevadero.

Ashley Galarza

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi tutor de tesis Ph.D Diego Reginensi, por brindarme la oportunidad de formar parte del laboratorio de Ingeniería Tisular y Regenerativa para desarrollar este trabajo, en el cual, tuve la posibilidad de adentrarme en un área de la ingeniería biomédica poco explorada en el país.

Al Ph.D Luis Luis, por su compañía constante, su paciencia y su ayuda invaluable durante el desarrollo de cada uno de los experimentos realizados. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo de este trabajo. Igualmente, al Ph.D Didio Ortiz, por su colaboración en los últimos experimentos realizados en este trabajo los cuales fueron fundamentales en el análisis de los resultados.

Agradezco a los profesores de la Universidad Especializada de las Américas que, con su dedicación y enseñanzas, contribuyeron a mi formación académica.

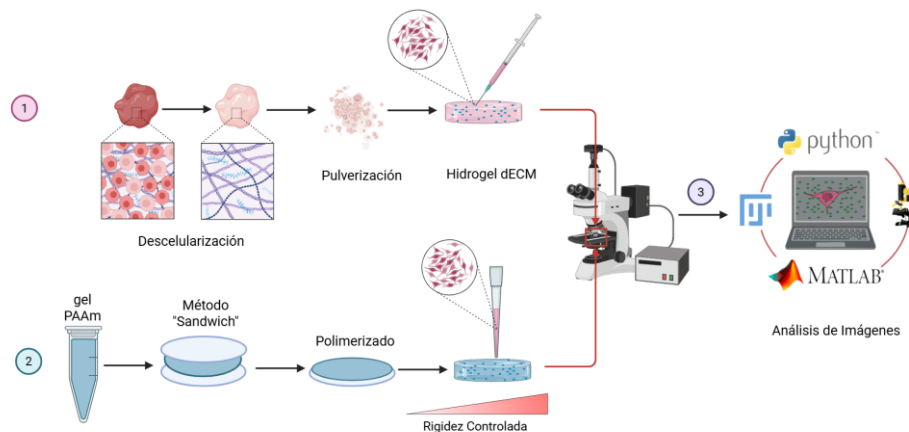
Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos mis compañeros de investigación, por su invaluable apoyo y colaboración a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Ashley Galarza

## RESUMEN

La matriz extracelular (MEC) constituye un microambiente dinámico y complejo encargada de brindar soporte, señales bioquímicas y mecánicas a las células, en donde estas señales, se ven involucradas en distintas respuestas celulares como por ejemplo adhesión, proliferación y migración celular. Este trabajo se centra en el estudio de la mecánica que ocurre a nivel celular, en donde las células reciben estímulos de parte del sustrato y las convierte en respuestas biológicas. Para ello, se emplearán sustratos de distinta rigidez que simulen un tejido en particular con el uso de geles de poliacrilamida, al igual que sustratos provenientes de matriz extracelular descelularizada de cerebro, lo que asemeja más el ambiente real de las células. Además, se aplicará herramientas computacionales para realizar la técnica de microscopía de fuerza de tracción, que nos ayudará a cuantificar estas fuerzas generadas, analizando así la influencia que tiene el sustrato en la respuesta celular.

**Palabras clave:** matriz extracelular (MEC), mecanotransducción, biomecánica celular, patologías, cerebro, hidrogel, gel de poliacrilamida, microscopía de fuerza de tracción (TFM).



## **ABSTRACT**

The extracellular matrix (ECM) constitutes a dynamic and complex microenvironment responsible for providing support and biochemical and mechanical signals to cells. These signals are involved in various cellular responses such as cell adhesion, proliferation, and migration. This work focuses on the study of the mechanics that occur at the cellular level, where cells receive stimuli from the substrate and convert them into biological responses. To this end, substrates of varying stiffness will be used to simulate a specific tissue using polyacrylamide gels, as well as substrates from decellularized brain extracellular matrix, which more closely resembles the actual environment of cells. In addition, computational tools were applied to perform traction force microscopy, which will help us quantify these generated forces, thereby analyzing the influence of the substrate on the cellular response.

**Keywords:** extracellular matrix (ECM), mechanotransduction, cell biomechanics, pathologies, brain, hidrogel, polyacrylamide gel, traction force microscopy (TFM)

## CONTENIDO GENERAL

|  |    |
|--|----|
| CONTENIDO GENERAL .....  | 6  |
| Introducción .....   | 9  |
| CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES DE LA INVESTIGACIÓN .....                         | 12 |
| 1.1 Planteamiento del problema .....   | 12 |
| 1.1.1 Problema de la investigación.....  | 14 |
| • Pregunta de investigación .....  | 14 |
| 1.2 Justificación.....   | 15 |
| 1.3 Hipótesis.....   | 16 |
| 1.4 Objetivos .....  | 17 |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....   | 19 |
| 2.1 Matriz Extracelular (MEC) .....  | 19 |
| 2.1 Componentes de la Matriz Extracelular (MEC) .....                            | 19 |
| 2.1.1 Propiedades mecánicas y bioquímicas de la matriz extracelular .....        | 21 |
| 2.2.1 Mecanotransducción Celular: De fuerza mecánica a respuesta biológica ..... | 23 |
| 2.2.3 Propiedades Mecánicas a Nivel Celular .....                                | 28 |
| 2.2.4 Rigidez de los Tejidos .....   | 29 |
| 2.3.3 Alteraciones en la MEC y su Relación con Condiciones Patológicas.....      | 31 |
| • Cáncer.....  | 31 |
| • Envejecimiento .....   | 32 |
| • Enfermedades Cerebrales .....  | 34 |
| 2.4 Matriz Extracelular Descelularizada (dECM).....                              | 35 |
| • Métodos Químicos .....   | 38 |
| • Métodos Físicos .....  | 39 |

|   |    |
|---|----|
| • Métodos Enzimáticos .....                                   | 40 |
| • Hidrogel dECM .....   | 41 |
| • Evaluación del Proceso de Descelularización .....           | 42 |
| 2.5 Gel Sintético basado en Poliacrilamida (PA) .....         | 44 |
| 2.6 Técnicas para detección de Rigidez de Sustrato .....      | 48 |
| • Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....                   | 48 |
| • Pinzas Ópticas .....  | 48 |
| 2.7 Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM).....              | 49 |
| 2.6.1 Configuración Experimental en TFM .....                 | 51 |
| • Preparación del Sustrato .....                              | 51 |
| • Microscopía y Adquisición de Imágenes .....                 | 52 |
| 2.6.2 Campo de Desplazamiento de las Microesferas .....       | 54 |
| 2.6.3 Reconstrucción de la Fuerza de Tracción .....           | 56 |
| CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....                        | 59 |
| 3.1 Diseño de investigación y tipo de estudio .....           | 59 |
| 3.2 Población o Universo .....                                | 59 |
| Sujetos o grupo de estudio:.....                              | 59 |
| Tipo de muestra estadística: .....                            | 59 |
| 3.3 Variables.....  | 59 |
| 3.4 Insumos, técnicas de recolección de datos y equipos ..... | 61 |
| 3.5 Procedimiento.....  | 62 |
| 3.5.1 Descelularización de tejido cerebral porcino .....      | 63 |
| 3.5.1.1 Protocolos de Descelularización.....                  | 63 |
| 3.5.1.2 Caracterización de dECM.....                          | 66 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.5.2 Preparación de Sustratos Sintéticos basado en Gel de Poliacrilamida ..... | 69  |
| 3.5.3 Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM) <i>in silico</i> .....            | 73  |
| CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS .....                                       | 80  |
| RESULTADOS .....  | 80  |
| 5.1 Descelularización de Secciones de Cerebro Porcino .....                     | 80  |
| 5.2 Cuantificación de ADN de dbECM.....   | 84  |
| 5.3 Gel de Poliacrilamida (PA).....   | 87  |
| 5.4 Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM).....                                | 89  |
| DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....   | 93  |
| 5.1 Descelularización de Cerebro Porcino.....                                   | 93  |
| 5.2 Cuantificación de ADN.....  | 96  |
| 5.3 Gel de Poliacrilamida.....  | 97  |
| 5.4 Microscopía de Fuerza de Tracción.....                                      | 99  |
| CONCLUSIONES .....  | 110 |
| RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES .....  | 111 |
| Recomendaciones.....  | 111 |
| Limitaciones .....  | 111 |
| Referencias Bibliográficas e Infografía .....                                   | 112 |
| ANEXOS.....   | 138 |
| ÍNDICE DE TABLAS .....  | 139 |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS.....   | 139 |

## Introducción

La mecanobiología es un campo encargado de estudiar cómo las propiedades físicas y bioquímicas del microambiente celular juegan un papel en el comportamiento celular.

En la actualidad, se pueden utilizar geles de distinto origen, siendo tanto de origen biológico como de origen sintético. Estos geles, independientemente de su origen, son necesarios para realizar estudios de la mecánica celular y deben cumplir la característica principal de imitar, lo más posible, el microambiente celular. Los geles de origen biológico mantienen una composición química muy cercana a la matriz de un tejido, pero carece de la capacidad de ajustar sus propiedades mecánicas. En cambio, los geles de origen sintético nos permiten realizar ajustes en las propiedades mecánicas, pero carece de la composición química esencial en la matriz requiriendo una funcionalización química del mismo.

En este trabajo, nos enfocaremos primero, en la descelularización de matriz extracelular de cerebro porcino para obtener un hidrogel a partir de esta materia prima, seguido de la generación de geles sintéticos de rigidez variada basada en gel de poliacrilamida, lo que nos puede ayudar a comprender diversos comportamientos mecánicos que ocurren a nivel celular dependiendo del sustrato utilizado. Además de esto, integramos el uso de herramientas computacionales que son utilizadas para la cuantificación de las fuerzas de tracción generadas por las células dependiendo del sustrato en el que están adheridas.

En el Capítulo I correspondiente al planteamiento del problema, se presenta la problemática de estímulos mecánicos aberrantes que provienen del microambiente celular y cómo las células pueden responder a ellas con un comportamiento igual de aberrante.

En el Capítulo II correspondiente al marco teórico, se presenta la base conceptual de esta investigación abordando los fundamentos que están detrás de la biomecánica celular.

En el Capítulo III, correspondiente al marco metodológico, se describe el diseño de investigación, procedimientos y técnicas utilizadas para realizar la investigación.

En el Capítulo IV, correspondiente al análisis de los resultados, se presenta los resultados obtenidos y la discusión de estos.

# **CAPÍTULO I**

## **CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.1 Planteamiento del problema**

La matriz extracelular es una red tridimensional compleja y dinámica que está compuesta de macromoléculas que proporciona un soporte tanto estructural como bioquímico a las células, modulando diversos procesos celulares que son específicos por tejido (Z. Chen et al., 2024; Dalton & Lemmon, 2021; Frantz et al., 2010; Hay, 1981; Lehoux et al., 2006; Macri-Pellizzeri et al., 2018; B. Sun, 2021; Yue, 2014).

La mecanobiología es un campo de investigación enfocada en el estudio de cómo las células son capaces de detectar y de responder a estímulos o señales mecánicas provenientes del microambiente externo por medio del proceso denominado mecanotransducción, fundamental en el análisis de cómo las células y tejidos toman forma durante el desarrollo y la enfermedad (Mechanobiology Institute, 2023; Nelson et al., 2024).

A través de complejas vías de detección mecánica que involucran integrinas, quinasas de adhesión focal, vías de señalización celular RhoA/ROCK y cascadas de señalización YAP/TAZ, las células son capaces de regular diversas funciones esenciales. Un ejemplo clave lo realizó el trabajo de Engler et al., en el cual evidenciaron que la rigidez del sustrato puede dirigir la diferenciación de células madre mesenquimales en linajes celulares neuronales, musculares u osteogénicos dependiendo de la rigidez del sustrato (Engler et al., 2006).

Para estudiar las interacciones que ocurren a nivel celular, se emplean biomateriales capaces de imitar propiedades mecánicas y bioquímicas de los ambientes nativos, a nivel celular. Pueden ser de origen sintético, como geles de poliacrilamida o de origen biológico como matriz extracelular descelularizado de una variedad de órganos y tejidos del cuerpo. Los biomateriales de origen sintético ofrecen buen control en las propiedades mecánicas, pero tiene baja

biocompatibilidad (Tibbitt & Anseth, 2009), por otro lado, las de origen biológico conservan la arquitectura y composición bioquímica de los tejidos originales, pero son más limitados en cuanto al control de su propiedad mecánica (Crapo et al., 2011; Mangani et al., 2025).

Por ejemplo, sustratos sintéticos basados en gel de poliacrilamida han permitido estudiar cómo diferentes células tisulares responden a la variación de la mecánica del sustrato (Discher et al., 2005). Estudios *in vitro*, han indicado que la elasticidad afecta la adhesión, la organización del citoesqueleto y la diferenciación, con implicaciones para la regeneración tisular y la administración de fármacos (Rehfeldt et al., 2007).

Paralelamente, se han utilizado diversos andamios biológicos tridimensionales derivados de tejidos descelularizados y órganos completos para reparar o reemplazar tejido dérmico, válvulas cardíacas y estructuras vasculares, entre otros. Destaca el trabajo de Ott et al., donde fabricaron con éxito un andamio de matriz extracelular (MEC) derivada de corazón de rata cadavérica mediante un proceso de descelularización por perfusión, permitiendo la preservación de la arquitectura orgánica y los componentes funcionales (Ott et al., 2008). Poco después, se ampliaron diversas metodologías similares en la bioingeniería de pulmones, hígados y riñones, demostrando resultados funcionales prometedores, como el intercambio de gases en los pulmones y la actividad metabólica en los andamios hepáticos (Tapias & Ott, 2014). Los andamios de matriz extracelular descelularizada se han convertido en biomateriales versátiles, capaces de procesarse en biotintas para aplicaciones de bioimpresión 3D. Por ejemplo, (Jang et al., 2017) emplearon bio-tintas derivadas de dECM cardíaco para mejorar la reparación del tejido cardíaco (Jang et al., 2017).

Un enfoque complementario involucra el uso de la técnica de microscopía de fuerza de tracción, que permite estudiar y cuantificar las fuerzas de tracción que

ocurre a nivel celular, la cual ha sido aplicada en estudios de migración colectiva, invasión tumoral, morfogénesis y contractilidad celular (Y. Huang et al., 2019; Joshi et al., 2022; Lekka et al., 2021; Trepap et al., 2009).

El remodelado de la matriz extracelular (ECM) es un proceso fundamental para el desarrollo, la cicatrización de tejidos y el mantenimiento de la homeostasis orgánica. Sin embargo, su desregulación conduce a numerosas enfermedades crónicas, como el cáncer, fibrosis, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras, que afectan a millones de personas y representan importantes cargas socioeconómicas, además representan causas principales de discapacidad y de mortalidad a nivel global (Cox & Erler, 2011).

La malignidad y la progresión metastásica de muchos cánceres están fuertemente influenciadas por la remodelación aberrante de la ECM, la cual causa más del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer (Cox & Erler, 2011).

La matriz extracelular descelularizada ha demostrado aplicaciones exitosas en órganos como el intestino delgado, corazón, hígado y riñón (Crapo et al., 2011; Gilpin & Yang, 2017; Golebiowska et al., 2024; Saldin et al., 2017), sin embargo, el uso de matriz extracelular descelularizada de cerebro para estudios específicos de cerebro, es menos frecuente dado lo complejo y delicado del sistema nervioso central (SNC) y sus propiedades únicas, limitando el desarrollo de biomateriales optimizados para aplicaciones de estudios neuroregenerativas (Crapo et al., 2012; Mahdian et al., 2023; Reginensi et al., 2025; Simsa et al., 2021; Turan Sorhun et al., 2023).

### 1.1.1 Problema de la investigación

- Pregunta de investigación

La matriz extracelular (MEC) es una red dinámica en el cual el proporciona a las células un microambiente adecuado para cumplir sus funciones regulares, está

involucrado en procesos clave como la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, las cuales se ven influenciadas por los componentes bioquímicos y propiedades mecánicas de la matriz extracelular específico por tejido. Esto sucede debido a que la matriz extracelular les envía a las células un estímulo mecánico, que es recibida por las células y responden a ella por medio de una respuesta biológica. A pesar de ello, cuando se presenta una alteración en las propiedades mecánicas de la matriz, principalmente su rigidez, las células responden a estas alteraciones también con un comportamiento alterno, o sea, no el comportamiento habitual. Esta respuesta a esta alteración está asociada al desarrollo y progresión de patologías, los cuales afectan la calidad de vida y suponen una carga significativa en el sistema de salud, de manera económica y en su entorno familiar/social. Aunque haya habido avances en la medicina regenerativa y en el diseño de biomateriales, aún existe una brecha en la comprensión de la respuesta mecánica y funcional de las células con respecto al sustrato en el que se encuentra adherido, ya sea de origen sintético u origen biológico. Aunque se reconozca que la rigidez de la matriz extracelular influye en el destino celular, aún se debe realizar investigaciones a profundidad de estas interacciones celulares dependiendo del sustrato utilizado y, cuantificar las fuerzas generadas por las células dependiendo del sustrato. Esto nos ayudaría a diseñar soluciones en un futuro en el campo de la ingeniería tisular y de medicina regenerativa. Sabiendo esto, nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de la variación en la rigidez de sustratos de origen sintético y de origen biológico en la respuesta celular?

## 1.2 Justificación

El rol de un ingeniero biomédico ha cambiado significativamente a través de los años, durante las décadas de 1950 y 1960, se centró en el diseño y desarrollo de dispositivos a incluir hoy un espectro más amplio de actividades (Bronzino, 2005), en donde combina ciencias físicas, biológicas y matemáticas con tecnologías

avanzadas (informática, robótica, materiales, óptica, imágenes, energía) para desarrollar soluciones médicas costo-efectivas (Ibrahim et al., 2024).

Teniendo este contexto, este trabajo se enfoca en la comprensión de las interacciones que ocurren entre las células y su entorno extracelular y como es capaz de detectar los estímulos generados por la matriz y generar una respuesta. Por medio del análisis de las fuerzas celulares utilizando herramientas computacionales y sustratos de distinta rigidez, tanto de origen animal como de origen sintético, son piezas clave para comprender cómo las células responden a los estímulos mecánicos generados en la matriz extracelular. Comprender estas interacciones nos permite no solo comprender lo que ocurre a nivel celular como aporte de valor académico, sino que también nos permitirá realizar aplicaciones en el campo de ingeniería tisular y regenerativa, con el diseño de nuevas terapias, biomateriales y andamios que puedan contrarrestar dichas alteraciones.

Para esto, nuestra investigación abordará este tema utilizando dos enfoques. Por una parte, se preparan sustratos basados en gel de poliacrilamida e hidrogel basada en matriz extracelular descelularizada de cerebro porcino. Mientras que, por otro lado, se recurre a un enfoque in silico mediante herramientas computacionales de microscopía de fuerza de tracción (TFM), aprovechando imágenes y códigos abiertos provenientes de literatura científica, que nos permite avanzar en el análisis de fuerzas celulares en un entorno bajo costo y accesible. Con este trabajo se busca establecer una base de estudios relacionados a la mecanotransducción con el uso de sustratos ya estandarizados en literatura científica como, geles de poliacrilamida, y el uso de matrices extracelulares origen animal y la cuantificación de las fuerzas generadas en ella integrando la técnica de microscopía de fuerza de tracción (TFM).

### 1.3 Hipótesis

**H<sub>1</sub>:** Los análisis experimentales e in silico de la matriz extracelular cerebral y de sustratos sintéticos permiten validar que las propiedades mecánicas del

microambiente influyen en la respuesta celular de manera diferenciada según el tipo de sustrato.

**H<sub>0</sub>:** Los análisis experimentales e in silico de la matriz extracelular cerebral y de sustratos sintéticos no evidencian diferencias en la respuesta celular relacionadas con las propiedades mecánicas del sustrato.

## 1.4 Objetivos

### **1.4.1 Objetivo general:**

Evaluar metodologías experimentales y computacionales para el estudio de la interacción célula–matriz extracelular.

### **1.4.2 Objetivos específicos:**

- Obtener matriz extracelular descelularizada, como estrategia in vitro para modelar ecosistemas extracelulares.
- Establecer la fabricación de sustratos de poliacrilamida para el análisis de la distribución de fuerzas celulares mediante microscopía de fuerza de tracción in silico, aplicando distintas herramientas computacionales.

## **CAPÍTULO II**

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### 2.1 Matriz Extracelular (MEC)

Las células residen en un ambiente complejo y altamente organizado denominado matriz extracelular (Handorf et al., 2015). La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional dinámica que rodea las células en todos los tejidos del cuerpo (Frantz et al., 2010; Hay, 1981; Lehoux et al., 2006; Macri-Pellizzeri et al., 2018), la cual no solo proporciona un soporte físico para las células, sino que también genera señales bioquímicas y estímulos mecánicos importantes involucrados en distintas funciones biológicas tales como: morfogénesis, diferenciación, homeostasis, adhesión, migración y proliferación celular (Dalton & Lemmon, 2021; Frantz et al., 2010; B. Sun, 2021; Yue, 2014).

### 2.1 Componentes de la Matriz Extracelular (MEC)

La matriz extracelular (MEC) está compuesta principalmente de proteínas estructurales (colágeno y elastina), glicoproteínas (laminina y fibronectina), proteoglicanos (PGs) y glicosaminoglicanos (GAGs) (Frantz et al., 2010; Hay, 1981; Lacueva-Aparicio et al., 2022; Lu et al., 2012; Ozbek et al., 2010) Figura 1. La matriz extracelular puede variar en composición y concentración, teniendo diferentes propiedades de la matriz extracelular por tejido (Watt & Huck, 2013).

El colágeno constituye aproximadamente el 25% - 30% de la masa proteica total humana (Frantz et al., 2010; B. Sun, 2021), está involucrada en procesos como la regulación de la adhesión celular, el apoyo a la migración celular y la guía del desarrollo tisular (Heino, 2007; Zhou et al., 2024).

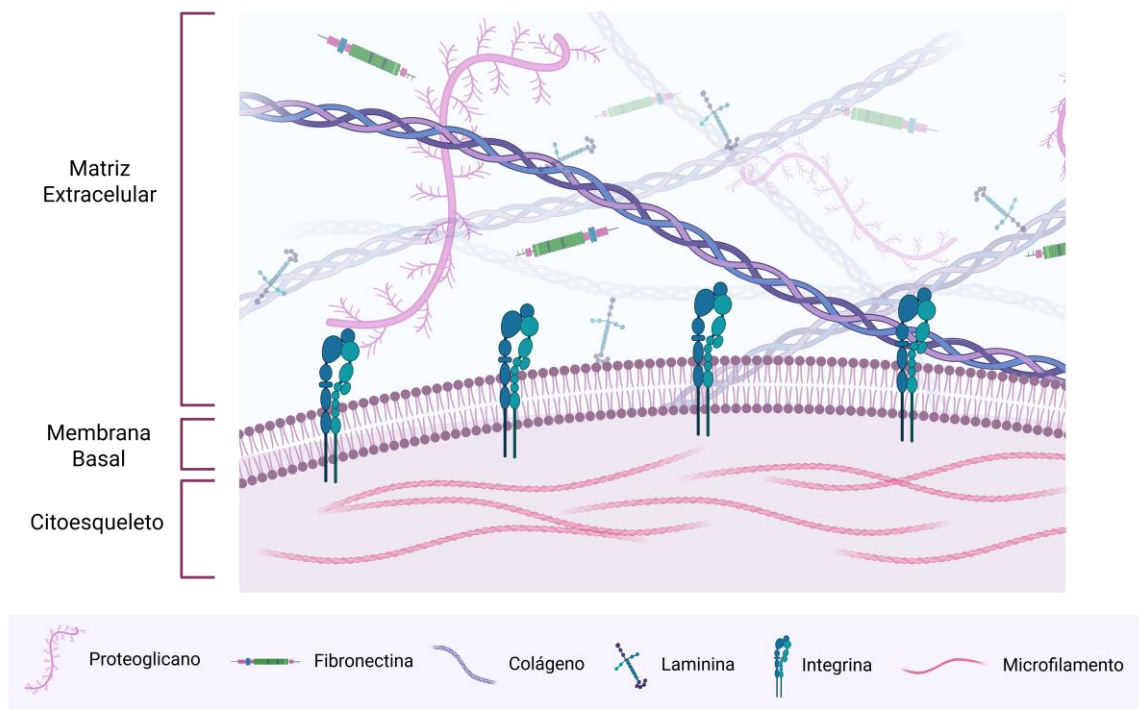
Por otro lado, la elastina, otorga la capacidad de estiramiento y retracción a los tejidos que se someten a tensión repetida (Frantz et al., 2010). Esta proteína forma fibras elásticas que se unen firmemente a las fibrillas de colágeno, lo que ayuda a

los tejidos a recuperar su forma original después de la compresión o el estiramiento (B. Sun, 2021).

Glicoproteínas como la fibronectina (FN), tienen la capacidad de unirse al colágeno y juega un papel importante en la regulación de adhesión, migración y diferenciación celular, además de mediar las interacciones entre célula-matriz (Anderson et al., 2010; Mayer et al., 2013). En cambio, la laminina (LN), interactúa con receptores anclados en la membrana plasmática de las células adyacentes a ellas, regulando actividades celulares y vías de señalización (Aumailley, 2013) tales como la adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular (Hamill et al., 2009).

Los proteoglicanos (PGs), son macromoléculas que contribuyen a la hidratación y al volumen del tejido (Frantz et al., 2010), mientras que los glicosaminoglicanos (GAGs) provee señales bioquímicas que regula las funciones celulares y la organización de la matriz extracelular en sí (Lacueva-Aparicio et al., 2022).

Figura 1. Componentes de la Matriz Extracelular



Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

Fuente: Adaptado de Dzobo & Dandara, 2023

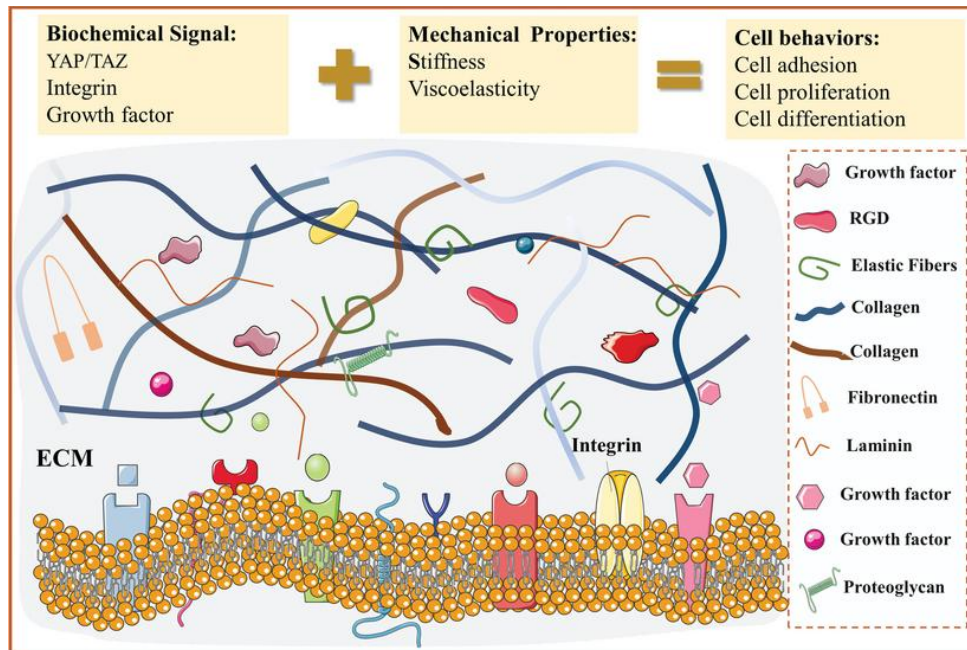
### 2.1.1 Propiedades mecánicas y bioquímicas de la matriz extracelular

La matriz extracelular además de funcionar como un soporte estructural también contiene propiedades bioquímicas y físicas que regulan las funciones celulares, tales como supervivencia, proliferación, morfogénesis y diferenciación celular (Hoshiba et al., 2010) Figura 2.

Las propiedades bioquímicas de la matriz extracelular permiten a las células sensor e interactuar con ella, por medio de vías de transducción de señales, proporcionadas por los componentes de la matriz extracelular tales como la fibronectina, integrina y factores de crecimiento (Yue, 2014). Las propiedades bioquímicas de la matriz extracelular regulan diversos comportamientos celulares, como determinación del destino celular, diferenciación y función tisular (Lu et al., 2012).

Las propiedades mecánicas de la matriz extracelular se refieren a diversos aspectos, tales como: rigidez, porosidad, densidad, topografía, entre otras características que proporciona señales físicas a las células. Además, estas propiedades actúan como un andamio que sirve de apoyo a la arquitectura tisular y mantiene su integridad (Lu et al., 2011, 2012; Yue, 2014). Las propiedades mecánicas dependen principalmente de su arquitectura y la cinemática de las fibras de colágeno (Badylak, 2007).

*Figura 2. Composición de la Matriz Extracelular y las Señales Bioquímicas y Propiedades Mecánicas que afecta Comportamientos Celulares*



Fuente: L. Zhu et al., 2023

La interacción entre células y la matriz extracelular es inherentemente recíproca. Por un lado, las células remodelan constantemente los componentes de la matriz extracelular para modificar una o más propiedades de esta. Por otro lado, la matriz extracelular regula diversos comportamientos celulares, cualquier cambio en su dinámica como resultado de las actividades celulares influirá a su vez en las

células adyacentes y modificará su comportamiento. Este mecanismo de regulación bidireccional entre las células y la matriz extracelular permite que las células y los tejidos se adapten rápidamente a su entorno (Lu et al., 2012).

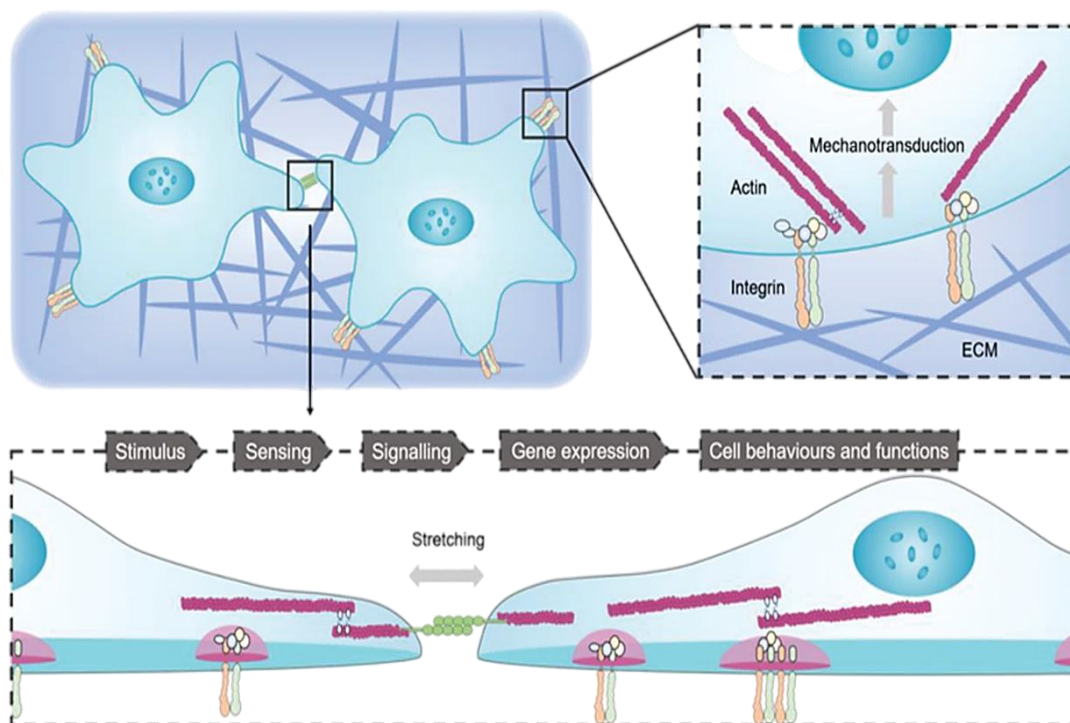
### 2.2.1 Mecanotransducción Celular: De fuerza mecánica a respuesta biológica

Entender cómo las señales mecánicas influyen en las respuestas celulares requiere de métodos para medir las fuerzas generadas por las células mientras se modula su entorno mecánico. Las fuerzas entre las células y su entorno se transmiten a través de las adhesiones célula-matriz extracelular y célula-célula. Estas fuerzas pueden ser generadas externamente y aplicadas a las células, o bien ser originadas por las propias células y transmitidas a la matriz extracelular (Ribeiro et al., 2016).

Las células poseen la capacidad de sensor estímulos mecánicos y convertirlas en respuestas bioquímicos que inducen un comportamiento celular, proceso conocido como mecanotransducción (Bajpai et al., 2021; Cao et al., 2024; Hoffman et al., 2011; Jaalouk & Lammerding, 2009; Marjoram et al., 2014; Moreno-Flores, 2020; Vogel & Sheetz, 2006). Esta respuesta celular puede ser fisiológica o de movimiento y puede ser tanto estímulos provenientes de la matriz extracelular como de interacciones con otras células (H. Huang et al., 2004; Moreno-Flores, 2020; Vogel & Sheetz, 2006) Figura 3.

Según Hoffman et al. (2011), el proceso de mecanotransducción se puede dividir en 3 pasos: mecanotransmisión, mecanosensación y mecanorespuesta.

Figura 3. Proceso de Mecanotransducción



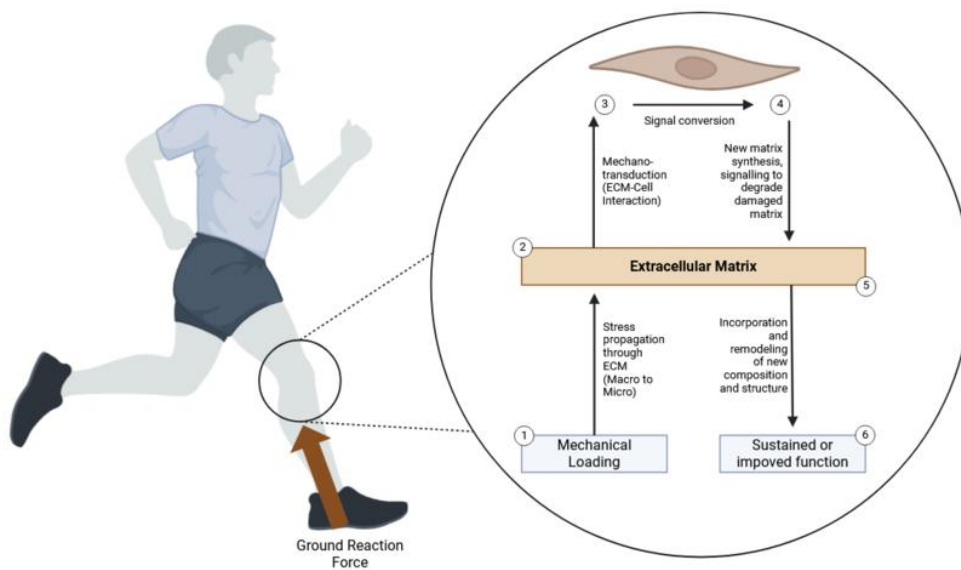
Fuente: Sun et al., 2022

Se sugiere que la mecanotransducción ocurre a través de distintas escalas biológicas. A nivel corporal, fuerzas mecánicas como la fuerza de gravedad e inducidas por realizar actividades físicas, modulan la homeostasis sistemática. A nivel tisular, la mecanotransducción juega un rol en el desarrollo y funcionabilidad de los órganos. A nivel celular, existen diversos procesos celulares que son regulados por estímulos mecánicos y se traducen en proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular. Y finalmente, a nivel nuclear, el núcleo detecta y responde a las fuerzas mecánicas transmitidas por el citoesqueleto (Cao et al., 2024; Lu et al., 2011).

Como se ilustra en la Figura 4, se muestra el proceso de mecanotransducción que ocurre en los tendones en respuesta a la carga mecánica. Por ejemplo, cuando se está practicando un deporte, la MEC experimenta una propagación de estrés

desde el nivel macro (órgano) y a nivel micro (celular) en respuesta a las fuerzas de reacción del suelo al correr. Esta señal mecánica es convertida en señales bioquímicas dentro de los tenocitos a través de las interacciones entre la matriz y la célula, por lo tanto, se incrementan la síntesis de componentes de la matriz extracelular, obteniendo una función del tendón sostenida para soportar cargas mecánicas futuras, contribuyendo a la homeostasis y prevención de lesiones (Stańczak, 2024). Sin embargo, una carga excesiva o insuficiente y su repetición continua pueden desencadenar respuestas catabólicas que conducen a patologías tendinosas (Gehwolf et al., 2025).

*Figura 4. Mecanotransducción desde la Fuerza Externa a Nivel Celular*



*Fuente: Stańczak, 2024*

La mecanotransducción celular inicia por medio del citoesqueleto de actina, que es una red dinámica de fibras proteicas que se encuentran dentro de las células, que mantienen la forma de la célula y ayudan a mantener su estabilidad mecánica. Además de esto, el citoesqueleto actúa como un transductor interno de señales, regulando procesos celulares como, movimiento, crecimiento y diferenciación celular (Handorf et al., 2015).

La rigidez de la matriz extracelular afecta directamente la organización y contractilidad del citoesqueleto de actina, permitiendo que la célula responda en algún comportamiento, ya sea adhesión, migración, división y maduración celular, en función de las propiedades mecánicas de su entorno (Handorf et al., 2015). Esta respuesta se genera por acción de las integrinas, que son receptores transmembranales específicos que conectan el microambiente externo al citoesqueleto de actina dentro de la célula. Una vez que las integrinas se unen a sus ligandos en la matriz extracelular (MEC), se agrupan y reclutan proteínas adaptadoras como la quinasa de adhesión focal (FAK), la vinculina y la talina para formar estructuras llamadas adhesiones focales, los cuales actúan como puntos de anclaje cruciales donde los filamentos de actina se unen y se organizan en paquetes llamados fibras de estrés (Aina Albajar Sigalés, 2021; Giordano, 2023; Handorf et al., 2015). Estas fibras generan fuerzas contráctiles y de tensión dentro de la célula, lo que le permite interactuar físicamente con su entorno. Además de la unión mecánica, las adhesiones focales desencadenan diversas cascadas de señalización que regulan actividades celulares fundamentales (Handorf et al., 2015).

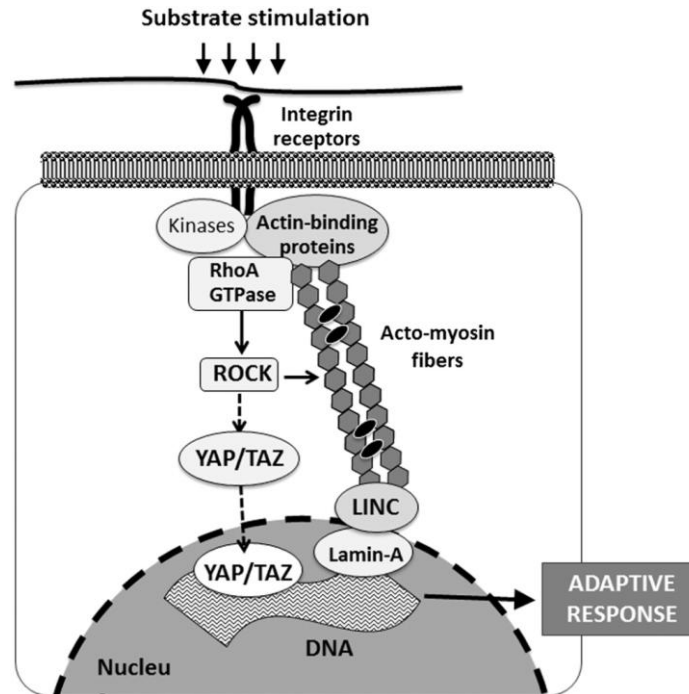
El citoesqueleto se conecta mecánicamente con el núcleo mediante el complejo LINC, constituyendo un sistema integrado que transmite fuerzas de la membrana celular al núcleo. Esta conexión rápida y eficiente hace que al núcleo le afecten tanto fuerzas externas como internas generadas por la contracción celular (Aina Albajar Sigalés, 2021). Dentro del núcleo, la mecanotransducción modifica la estructura y función molecular, regulando procesos celulares cruciales como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. La disfunción en este mecanismo está relacionada con enfermedades como fibrosis, cáncer y trastornos vasculares (Jaalouk & Lammerding, 2009).

Cuando ocurre un cambio en la rigidez de la matriz extracelular, se activan los receptores de integrinas en la superficie celular. En el lado intracelular de la

membrana plasmática, proteínas adaptadoras, proteínas unidas a la actina y quinasas, se reclutan para formar el complejo de adhesiones focales, que conecta mecánicamente la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina.

La vía de señalización RhoA/ROCK regula la contractilidad de las fibras acto-miosina, generando tensión mecánica dentro de la célula y facilitando la translocación nuclear de factores de transcripción mecanosensibles como YAP/TAZ, que modulan la expresión génica para inducir respuestas adaptativas a estímulos mecánicos (Handorf et al., 2015; Macri-Pellizzeri et al., 2018). La vía de señalización YAP y TAZ son relevos nucleares de señales mecánicas ejercidas por la rigidez de la MEC y la forma celular (Dupont et al., 2011) y sirven como coactivadores transcripcionales que integran señales mecánicas de la matriz extracelular, como la rigidez y la tensión de cizallamiento del fluido, con modificaciones epigenéticas para impulsar procesos oncogénicos (T. Liu et al., 2025). Esta vía regula diversas funciones biológicas, incluyendo proliferación, metástasis, evasión inmunitaria, autofagia y metabolismo (T. Liu et al., 2025). Además, la proteína Lamin-A, ubicada en la cara interna de la envoltura nuclear, interactúa con proteínas del complejo LINC, que conecta mecánicamente el citoesqueleto con el núcleo, y también con el ADN (Macri-Pellizzeri et al., 2018) Figura 5.

Figura 5. Mecanotransducción y la Respuesta Adaptativa Celular



Fuente: Macri-Pellizzeri et al., 2018.

La desregulación de la señalización YAP/TAZ contribuye a diversas patologías, incluido el cáncer, donde “la activación de YAP/TAZ conduce a la metástasis del cáncer”, así como a la fibrosis tisular y las afecciones degenerativas (Chang et al., 2020).

### 2.2.3 Propiedades Mecánicas a Nivel Celular

La rigidez de un material se define como el grado en que un material se resiste a la deformación en respuesta a una fuerza aplicada, indicando si un material es flexible (blando) o rígido (duro). En biología, la rigidez medida – expresada en Pascales ( $\text{N/m}^2$ ) – ha sido utilizado para representar colectivamente las propiedades mecánicas de un sustrato biológico (Barber-Pérez, 2019; Handorf et al., 2015; Kolb et al., 2021; Moeendarbary & Harris, 2014; Petzold & Gentleman, 2021; Tse & Engler, 2010).

Esta característica se cuantifica mediante el módulo de elasticidad de Young ( $E$ ), el cual expresa la relación entre la tensión aplicada y la deformación resultante dentro del régimen elástico del material. Es característico de la matriz extracelular y a nivel celular, ya que regula procesos como la proliferación, diferenciación y migración celular, contribuyendo a la homeostasis tisular y a la configuración del microambiente celular (Tse & Engler, 2010).

Cuando se aplica una fuerza a un material, se genera en él una tensión, que indica la magnitud de la fuerza aplicada a un objeto, normalizada al área sobre la que se aplica la fuerza (Vining & Mooney, 2017). La respuesta del material a dicha tensión se denomina deformación, medida como el cambio relativo en la longitud o forma del objeto. La relación entre estas depende de las propiedades específicas del material, como la matriz extracelular en tejidos biológicos (Vining & Mooney, 2017).

Los tejidos formados por células y matrices extracelulares combinan propiedades mecánicas de sólidos y líquidos, denominado como viscoelásticos. Los materiales viscoelásticos presentan relajación de la tensión (disminución de la tensión a lo largo del tiempo para mantener un nivel constante de deformación) y fluencia (aumento de la deformación a lo largo del tiempo en respuesta a una tensión constante) (Courbot & Elosegui-Artola, 2025; Mierke, 2022; Vining & Mooney, 2017). Por ello, una matriz más rígida requerirá mayores fuerzas para deformar la red, mientras que una matriz más blanda puede deformarse con fuerzas menores. La rigidez de las matrices suele determinarse bajo el supuesto de un comportamiento elástico lineal, lo que la convierte en sinónimo de elasticidad (Vining & Mooney, 2017).

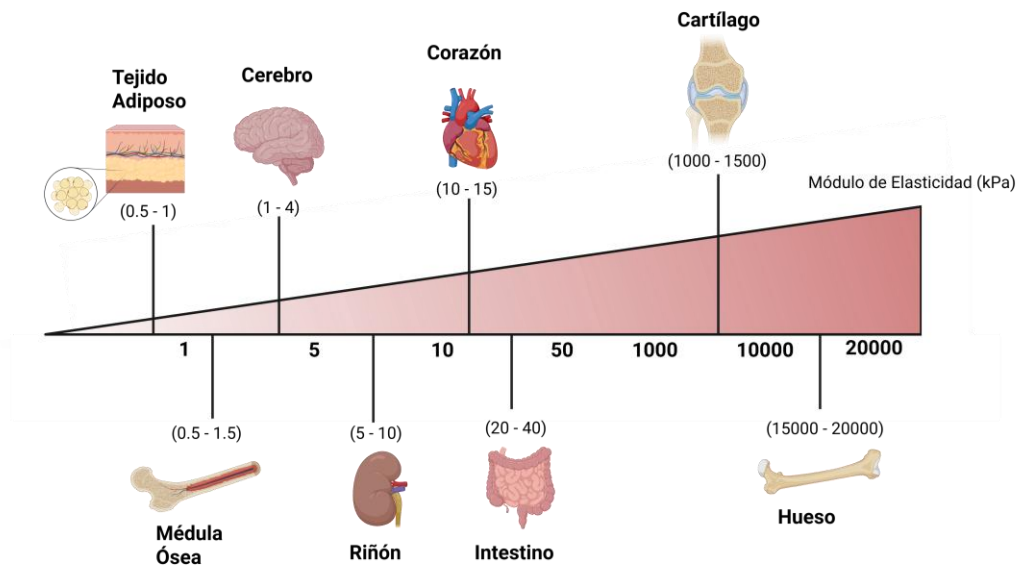
#### 2.2.4 Rigidez de los Tejidos

La composición, estructura y propiedades mecánicas de la MEC varía según cada tejido y órgano específico del cuerpo (Hoshiba et al., 2010; Watt & Huck, 2013).

La rigidez es específica por tejido y responde a sus requerimientos funcionales (Barber-Pérez, 2019; Butcher et al., 2009; Hoshiba et al., 2010; Macri-Pellizzeri et al., 2018; Watt & Huck, 2013) Figura 6.

Por ejemplo, el cerebro es uno de los órganos más blandos del cuerpo, con una rigidez de 0.1 kPa a 1 kPa (Engler et al., 2006; Flanagan et al., 2002; Macri-Pellizzeri et al., 2018; Tse & Engler, 2010), lo cual está relacionado con su bajo contenido de colágeno fibroso I y su alto contenido lipídico (Axpe et al., 2020; Simsa et al., 2021). A contrario del hueso, presenta una rigidez mayor de 100 kPa (Zioupos & Currey, 1998), debido a que está enriquecido de compuestos de fosfato de calcio como hidroxapatita y colágenos fibrilares, lo cual le confiere la propiedad de resistencia y resiliencia a la fractura y la compresión (Macri-Pellizzeri et al., 2018).

*Figura 6. Propiedad Mecánica de Los Tejidos y Órganos del Cuerpo*



*Fuente: Adaptada de Princen et al., (2023)*

### 2.3.3 Alteraciones en la MEC y su Relación con Condiciones Patológicas

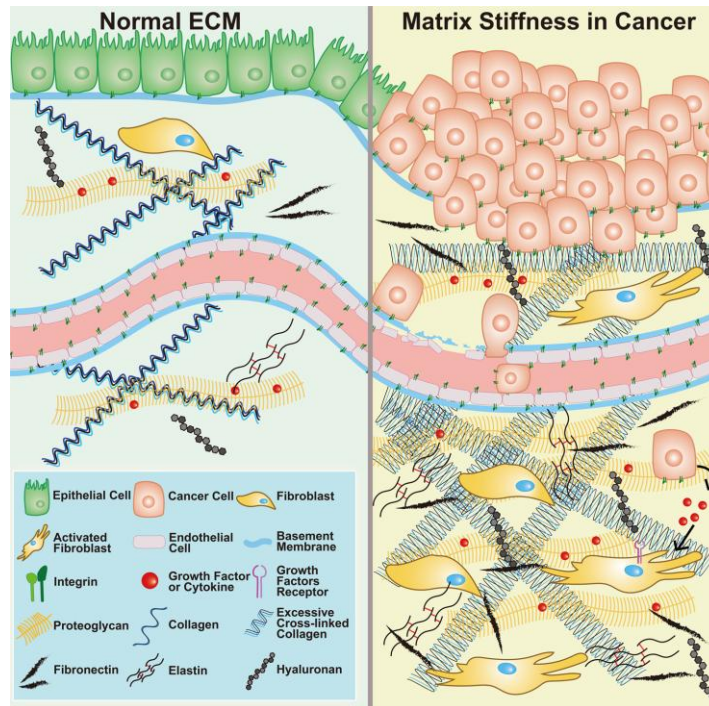
Una desregulación en la rigidez de la MEC se asocia al desarrollo de ciertas condiciones patológicas, resultando en un comportamiento celular aberrante lo cual puede exacerbar el estado de la enfermedad (Lampi & Reinhart-King, 2018; Macri-Pellizzeri et al., 2018). Se han identificado diversas patologías causadas por el aumento de la rigidez, incluyendo cáncer, envejecimiento, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrales, fibrosis, distrofias musculares, problemas en la cicatrización de heridas, entre otros (Barber-Pérez, 2019; Butcher et al., 2009; Guimarães et al., 2020; Handorf et al., 2015).

- Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, y en 2020 causó casi 10 millones de muertes (Ferlay et al., 2021). Se ha demostrado que el microambiente biomecánico en tumores difiere del tejido circundante, ya que, durante el desarrollo del cáncer, las células cancerígenas se proliferan de manera excesiva lo cual altera las propiedades mecánicas del microambiente incluyendo, tensión sólida, aumento de la rigidez de la matriz extracelular y una presión anormal del líquido intersticial Figura 7. La creciente acumulación de ECM cambia la densidad del tejido, lo que eventualmente conduce a un cambio gradual en la rigidez del tejido (Barber-Pérez, 2019; Tian et al., 2021).

Por ejemplo, el tejido mamario sano presenta una rigidez aproximada de 0.2 kPa, mientras que su rigidez aumenta a 4 kPa en condiciones cancerígenas (Q. Lin et al., 2017; Macri-Pellizzeri et al., 2018) manera similar, un tejido hepático normal tiene una rigidez que oscila entre 4 kPa a 10 kPa, pero en condiciones cancerígenas aumenta su rigidez a 20 kPa a 50 kPa (Tian et al., 2021).

Figura 7. Alteración en la Composición de la MEC en Cáncer



Fuente: J. Huang et al., 2021

- Envejecimiento

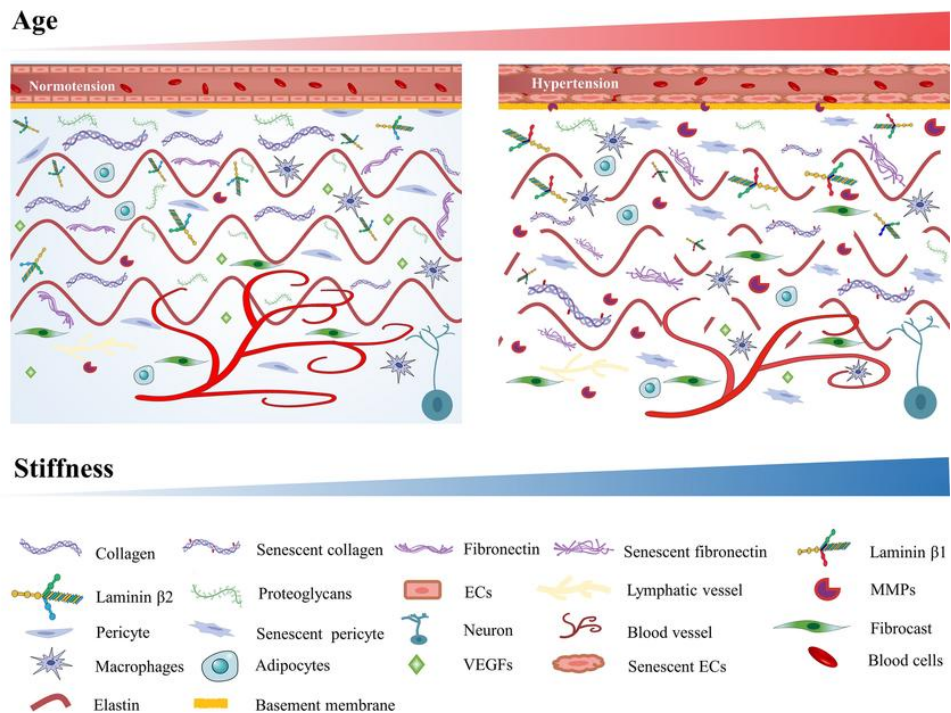
El envejecimiento representa un deterioro celular fisiológico permanente y gradual, que incluye la degradación biológica, como el daño del ADN, la disminución de la replicación celular y la acumulación de daño metabólico, así como el deterioro de las propiedades mecánicas de la célula y la matriz extracelular (ECM) que la acompaña. Esta desregulación mecanobiológica afecta en gran medida las funciones de los sistemas cardiovascular, musculoesquelético, cutáneo e inmunitario, y se refleja en un mayor riesgo de padecer numerosas enfermedades (Bajpai et al., 2021).

La hipertensión afecta a más de mil millones de personas en todo el mundo y se caracteriza con alteraciones funcionales y estructurales de arterias y arterioles, donde se produce un incremento en la rigidez vascular, debido a una acumulación

de colágeno (Arshad Muhammad Iqbal & Syed F. Jamal, 2023; Hoffman et al., 2011; Lehoux et al., 2006).

El envejecimiento y la hipertensión están íntimamente relacionados con la remodelación y rigidez de la matriz extracelular. En la Figura 8, observamos que en condiciones de normales y juventud, la MEC conserva una composición equilibrada de colágeno, elastina, fibronectina y proteoglicanos, lo que mantiene la organización celular y la integridad de los vasos sanguíneos. Durante el envejecimiento, se presenta un aumento del colágeno y una disminución de fibras elásticas, junto con activación de metaloproteinasas, resultando en un endurecimiento arterial progresivo. La hipertensión acelera esta remodelación senescente y promueve fibrosis, intensificando la rigidez vascular y favoreciendo el daño tisular. La rigidez arterial es tanto un marcador como un mecanismo común de estas condiciones, que retroalimentan el deterioro vascular y aumentan el riesgo cardiovascular (Arshad Muhammad Iqbal & Syed F. Jamal, 2023; Harvey et al., 2015).

Figura 8. Cambios en la MEC asociado con el Envejecimiento y la Condición de Hipertensión



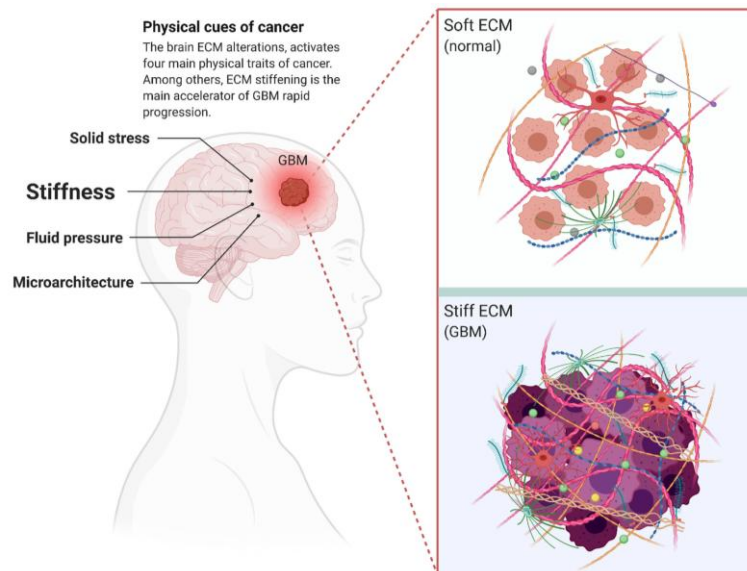
Fuente: Xiao et al., 2023

- Enfermedades Cerebrales

El sistema nervioso central (SNC) tiene una capacidad regenerativa limitada, ya que las neuronas poseen una capacidad mínima para proliferar o regenerar axones tras una lesión o neurodegeneración. Afecciones neurológicas como el traumatismo craneoencefálico (TCE), el ictus, la esclerosis múltiple, el Alzheimer y el Parkinson desencadenan cascadas que conducen a la degeneración neuronal secundaria y la muerte (H. Li et al., 2023; Politrón-Zepeda et al., 2024; Soles et al., 2023). Las alteraciones en la matriz extracelular del cerebro son un hilo conductor común entre diversos trastornos neurológicos, incluidas enfermedades neurodegenerativas, afecciones psiquiátricas y tumores cerebrales como el glioblastoma multiforme (GBM) (Bergs et al., 2024; Khoonkari et al., 2022; H. Li et al., 2023; Politrón-Zepeda et al., 2024; Soles et al., 2023). El GBM se caracteriza por una profunda remodelación de la matriz extracelular (ECM) dentro del

microambiente tumoral, lo que impulsa la progresión e invasión tumoral. Los cambios en la ECM en el GBM provocan una mayor rigidez tisular debido a la mayor expresión de proteínas fibrosas, la reorganización de la microarquitectura y la presencia de espacios confinados que facilitan la migración de células tumorales (Khoonkari et al., 2022) Figura 9.

*Figura 9. MEC Cerebral con Glioblastoma*



*Fuente: Khoonkari et al., 2022*

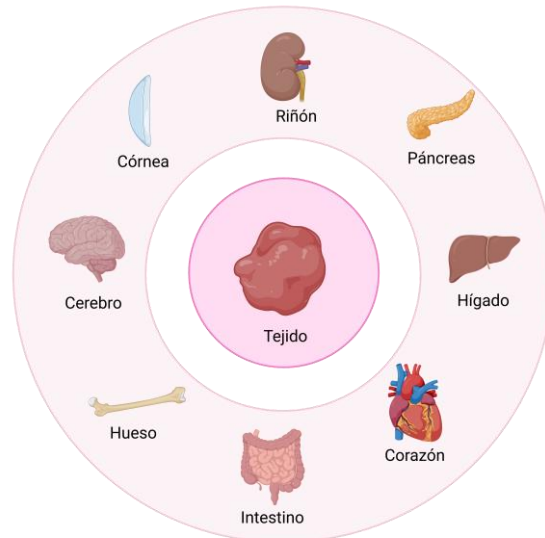
#### 2.4 Matriz Extracelular Descelularizada (dECM)

El uso de matriz extracelular descelularizada (dECM), ha generado considerable atención en estudios de mecánica celular debido a su capacidad para imitar el entorno bioquímico, estructural y mecánico del tejido nativo. Estudios han demostrado que el dECM conserva las propiedades mecánicas heterogéneas de los tejidos nativos, incluyendo sus gradientes de rigidez y anisotropía elástica. Esta heterogeneidad es importante porque las células responden dinámicamente a las señales mecánicas locales, y el dECM proporciona un entorno más natural en comparación con los hidrogeles sintéticos o los sustratos uniformes (Viji Babu et al., 2019; H. Zhang et al., 2023). La dECM puede ser utilizada para fines de

regeneración o restauración de funcionalidad de un tejido, además modelar varias patologías como por ejemplo tumores, lo cual ayuda a comprender la patología, fisiología y la progresión del proceso de la enfermedad (Neishabouri et al., 2022).

Si bien la técnica se reportó inicialmente en 1973 con el fin de preservar tejido destinado a ser utilizado como barrera protectora para pacientes con quemaduras, el hito que impulsó su uso como bioandamio fue el trabajo Badylak et al. (1995) con el uso de la submucosa del intestino delgado (SIS) para la reparación del tendón de Aquiles (Wang et al., 2023).

*Figura 10. Tejidos utilizados para obtener dECM*

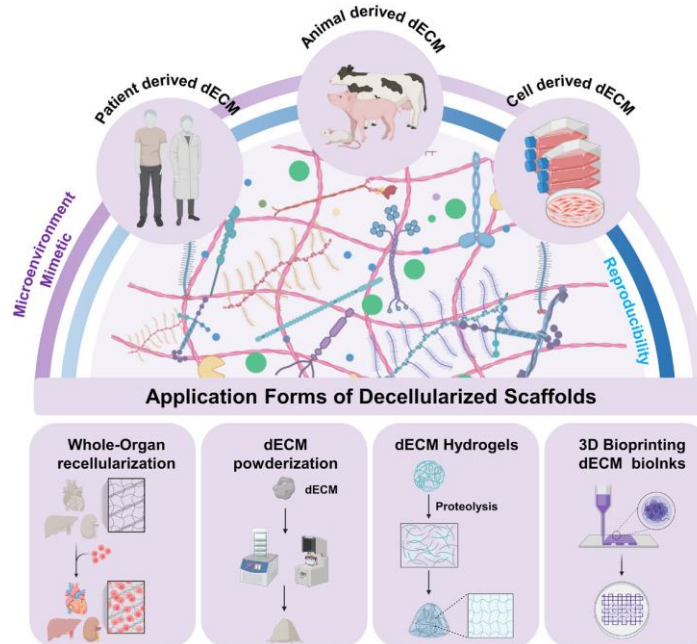


Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

Se han preparado y probado andamiajes de matriz extracelular (ECM) descelularizado de diversos tejidos, como corazón, submucosa del intestino delgado (SIS), pulmón, piel, córnea, esófago, hígado, riñón, vejiga, cartílago, tejido adiposo, entre otros Figura 10. Las matrices extracelulares descelularizadas (dECM) se han consolidado como biomateriales versátiles en aplicaciones biomédicas, destacando por su capacidad para soportar la recelularización de

órganos completos para trasplante, la fabricación de hidrogeles y biotintas para impresión 3D, así como el desarrollo de plataformas avanzadas para modelos in vitro. (Crapo et al., 2012; Guo et al., 2024; Hoshiba et al., 2010; Rosadas et al., 2024; Xu et al., 2024) Figura 11.

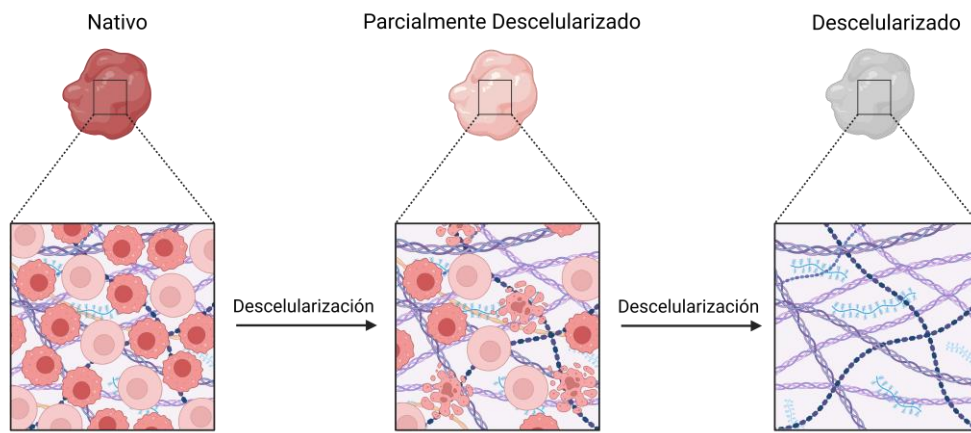
*Figura 11. Aplicaciones Biomédicas basada en el uso de dECM*



*Fuente: Liu et al. (2025)*

La descelularización es el proceso de eliminación de contenido celular de la matriz extracelular mediante métodos químicos, físicos y enzimáticos, donde los agentes que para la descelularización de cada tejido dependerán de diversos factores, como la celularidad del tejido, densidad, contenido lipídico y el grosor del tejido mismo (Crapo et al., 2011; Simsa et al., 2021) Figura 12. Para remover el contenido celular y preservar la integridad de la matriz, es importante estandarizar los distintos protocolos de descelularización dependiendo de las propiedades mecánicas y bioquímicas del tejido a descelularizar (Crapo et al., 2011; Neishabouri et al., 2022; Simsa et al., 2021; H. Zhang et al., 2023).

*Figura 12. Proceso de Descelularización*



Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

*Fuente: Adaptada de Moffat et al., 2022*

- Métodos Químicos

Implica el uso de agentes químicos como detergentes (iónicos, no iónicos y zwitteriónicos), ácidos; para alterar las membranas celulares, solubilizar componentes celulares Figura 13. Se sumerge el tejido en una solución que contiene un ácido, alcohol o detergente, que se encargan de alterar las interacciones lípido-lípido y proteína-lípido que mantienen unida la membrana celular (Heath, 2019).

Los detergentes iónicos actúan solubilizando el ADN y la membrana celular, y tienden a desnaturalizar las proteínas, disminuyendo así la integridad del colágeno. Son eficaces para eliminar glicosaminoglicanos (GAG) y factores de crecimiento, lo que altera la rigidez y la función de la matriz extracelular (ECM). El dodecil sulfato de sodio (SDS) y el desoxicolato de sodio (SDC) son detergentes iónicos que se han utilizado en la descelularización (Neishabouri et al., 2022).

Los detergentes no iónicos, como el-Triton X-100, pueden romper con fuerza los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína, pero son menos efectivos en la interacción proteína-proteína. Si bien mantienen la ultraestructura del tejido descelularizado y

preservan los factores de crecimiento, son menos efectivos en la eliminación de material celular que el SDS (Neishabouri et al., 2022).

Los detergentes zwitteriónicos poseen propiedades tanto iónicas como no iónicas, demuestran una mejor eliminación celular que los detergentes no iónicos y una mejor conservación de la ultraestructura de la matriz extracelular (ECM) que los detergentes iónicos (Heath, 2019; Neishabouri et al., 2022).

También se utilizan diversos ácidos, como el ácido clorhídrico, ácido peracético, ácido sulfúrico y el ácido acético, que ayudan al proceso de descelularización al alterar los ácidos nucleicos (Heath, 2019; H. Zhang et al., 2023). Alcoholes como el etanol y el metanol pueden lisar las células por deshidratación al reemplazar el agua citosólica y pueden ayudar a eliminar ácidos nucleicos y lípidos residuales (Heath, 2019).

Sin embargo, las soluciones químicas pueden dañar los componentes de la matriz extracelular (ECM), en particular las triples hélices de colágeno a nivel fibrilar y molecular. Por lo tanto, el procedimiento de descelularización debe diseñarse para utilizar una combinación de tratamientos químicos que minimice el daño a la ECM (H. Zhang et al., 2023).

- Métodos Físicos

Implica el aprovechamiento de fuerzas físicas para lisar las células y facilitar su eliminación, como agitación mecánica, ciclos de congelación/descongelación y presión osmótica, (Heath, 2019; Neishabouri et al., 2022; Song et al., 2023) Figura 13.

La agitación mecánica se usa en combinación con la inmersión de un reactivo químico, para provocar la lisis celular, y acelerar el proceso de descelularización. La duración del protocolo y la intensidad de la agitación dependen del grosor del tejido (Neishabouri et al., 2022).

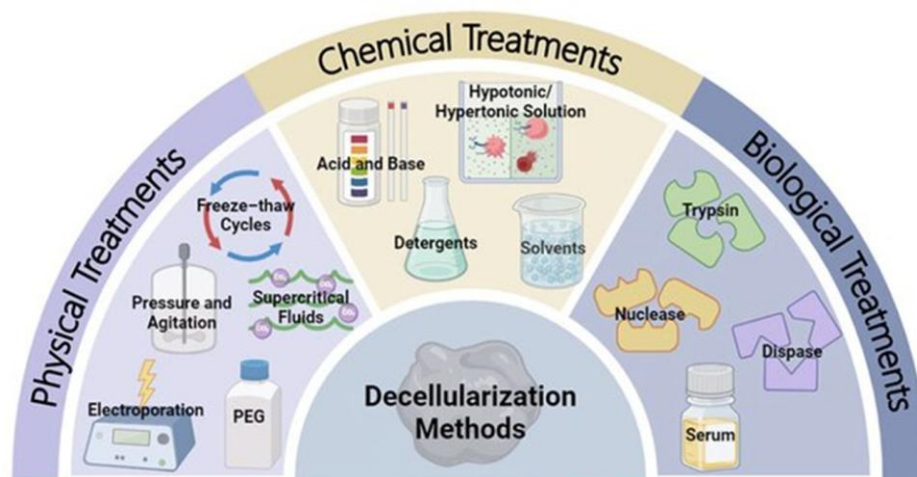
El ciclo de congelación-descongelación se realiza mediante la fluctuación única o repetida entre la temperatura de congelación ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y la temperatura biológica, alterando las membranas celulares y provocando la lisis celular mediante la formación de cristales intracelulares. Se ha demostrado que este método conserva considerablemente la estructura de la matriz extracelular (MEC), pero no elimina eficazmente los restos celulares remanentes; por lo tanto, usualmente se inicia con un ciclo de congelación-descongelación, seguido de tratamientos químicos (H. Zhang et al., 2023).

La técnica de presión osmótica consiste en someter los tejidos a soluciones con diferentes osmolaridades, alternando entre soluciones hipotónicas e hipertónicas, para inducir estrés osmótico en las células. Cuando las células se exponen a una solución hipotónica, la entrada de agua provoca hinchazón y, finalmente, lisis de la membrana celular (lisis osmótica). Posteriormente, una solución hipertónica induce la deshidratación y la contracción de los componentes celulares restantes, lo que promueve una mayor muerte celular y su desprendimiento de la matriz extracelular (MEC) (Rabbani et al., 2021).

- Métodos Enzimáticos

Las enzimas para la descelularización, proteasas, nucleasas, eliminan los residuos de ácido nucleico después de la ruptura celular y escinden las uniones intercelulares y extracelulares. Las nucleasas, como la ADNasa y la ARNasa, hidrolizan cadenas de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, por lo tanto, digieren el material genético residual (Heath, 2019) y se utilizan principalmente en combinación con otros detergentes para acelerar la eliminación de estos (Neishabouri et al., 2022). Las proteasas que actúan escindiendo proteínas adhesivas (p. ej., tripsina y dipasas) (Heath, 2019).

Figura 13. Métodos de Descelularización

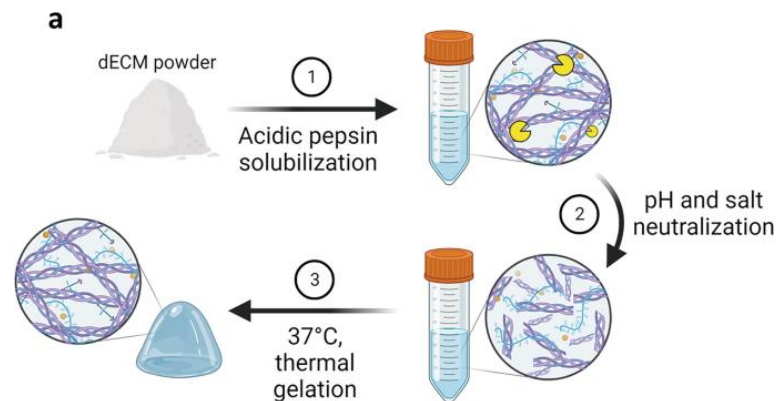


Fuente: Guo et al. (2024)

- Hidrogel dECM

El hidrogel de dECM se genera mediante el proceso de autoensamblaje basado en colágeno, regulado por la presencia de glicosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas de la matriz extracelular (Saldin et al., 2017). La cinética de polimerización se ve influenciada por el perfil bioquímico nativo del tejido origen y de las proteínas remanentes tras la descelularización. Previo a la solubilización, la matriz descelularizada se liofiliza y se pulveriza. El material resultante se disuelve en ambientes ácidos mediante la digestión de la matriz extracelular con pepsina. La pepsina es una enzima derivada de los jugos gástricos porcinos utilizado desde 1972 para solubilizar una porción sustancial (hasta el 99%) del colágeno insoluble en ácido. El material pulverizado se agita en pepsina con ácido clorhídrico diluido “método Freytes” o con ácido acético diluido “método Voytik-Harbin” (H. Zhang et al., 2023). La matriz solubilizada es gelificada a través de un proceso de autoensamblaje impulsado por la entropía y dominado por la cinética del colágeno (Saldin et al., 2017). Esto se logra por medio de tres ajustes controlados (Saldin et al., 2017; H. Zhang et al., 2023): neutralización a un pH de 7.4, un ajuste de concentración salina con PBS 10X e incubación a una temperatura de 37°C Figura 14.

Figura 14. Proceso para obtener un Hidrogel de dECM



Fuente: Magno & Werner, 2023

- Evaluación del Proceso de Descelularización

Para evaluar la efectividad del proceso de descelularización, se deben de realizar técnicas de evaluación cualitativas (inspección visual) y cuantitativas (componentes celulares, mitocondria, ADN, lípidos, colágeno, etc.) Figura 15.

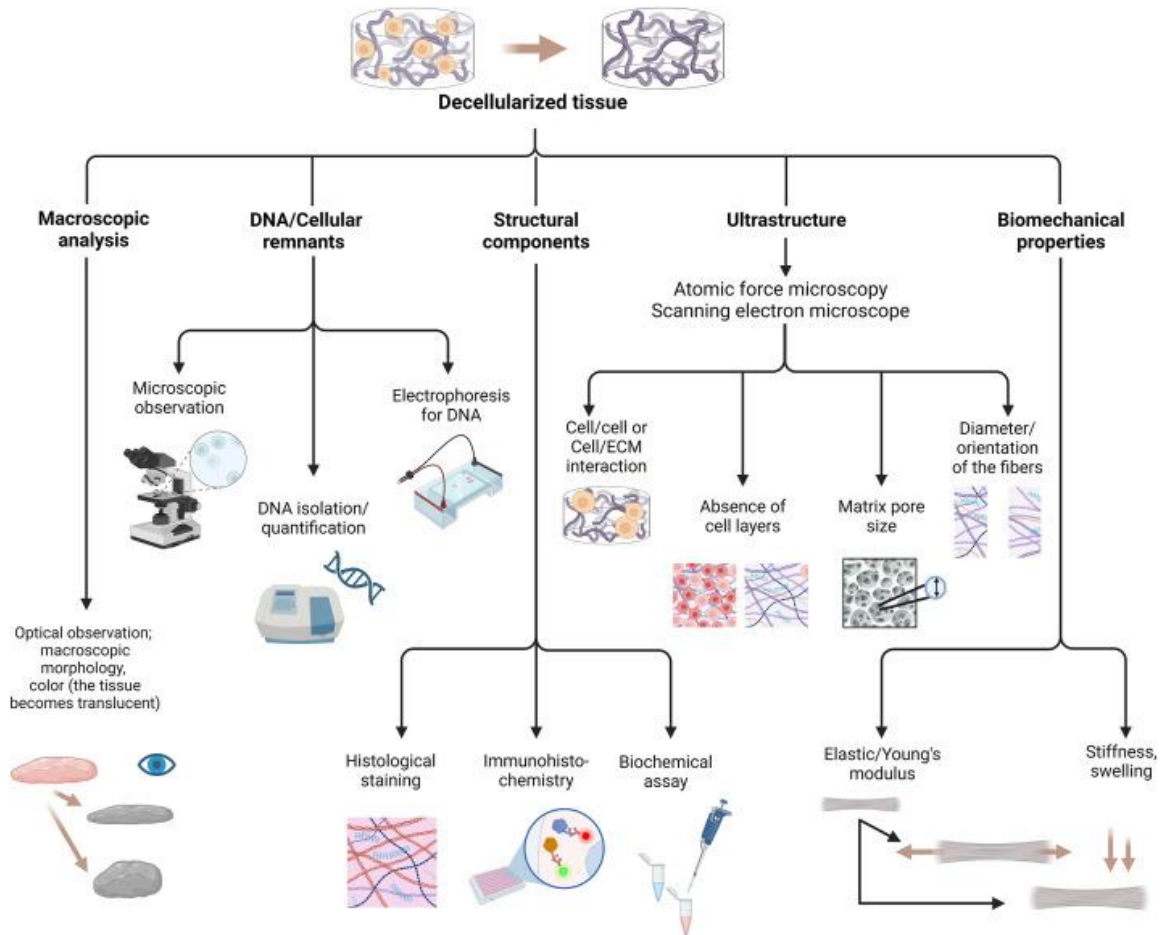
Diferentes estudios utilizan el análisis de imágenes macroscópicas como uno de los primeros pasos de evaluación para determinar el nivel de transparencia de dECM en comparación con el tejido nativo (Philips et al., 2018).

El análisis histológico del tejido permite evaluar la morfología general del dECM, así como el contenido celular y la integridad estructural (Neishabouri et al., 2022; Philips et al., 2018). La hematoxilina y eosina (H&E) se utiliza principalmente para evaluar la morfología tisular y los núcleos celulares, mientras que la tinción fluorescente con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se utiliza para detectar estructuras nucleares remanentes (Crapo et al., 2011; Su et al., 2018). Otras tinciones histológicas, como Safranina O y Hoescht, también pueden emplearse para evaluar la existencia de ADN remanente o moléculas citoplasmáticas y extracelulares en tejido descelularizado (Crapo et al., 2011; Neishabouri et al., 2022; H. Zhang et al., 2023).

El ADN residual puede provocar respuestas inmunitarias y afectar la biocompatibilidad de la matriz extracelular descclularizada. El ensayo Picogreen es una técnica fluorométrica sensible que se une específicamente al ADN bicatenario y emite fluorescencia proporcional a la concentración de ADN, lo que permite una cuantificación precisa incluso a niveles bajos (Y. Chen et al., 2012; Klak et al., 2021). Una técnica que complementa el ensayo de Picogreen es la electroforesis en gel de agarosa, una técnica cualitativa que visualiza la distribución del tamaño de los fragmentos de ADN residuales en las muestras (Y. Chen et al., 2012).

Según Crapo et al. (2011), existen tres criterios mínimos que garantiza que la descclularización ha sido efectiva: 1) Menos de 50 ng de ADN bicatenario residual por mg de peso seco de ECM en el caso de Picogreen, 2) < longitud del fragmento de ADN de 200 pares de bases en el caso de gel de Agarosa, y 3) falta de material nuclear visible en secciones de tejido bajo tinción H&E o DAPI (Crapo et al., 2011; Heath, 2019; Neishabouri et al., 2022; H. Zhang et al., 2023).

Figura 15. Caracterización de Tejidos Descelularizados



Fuente: Salgado García et al., 2025

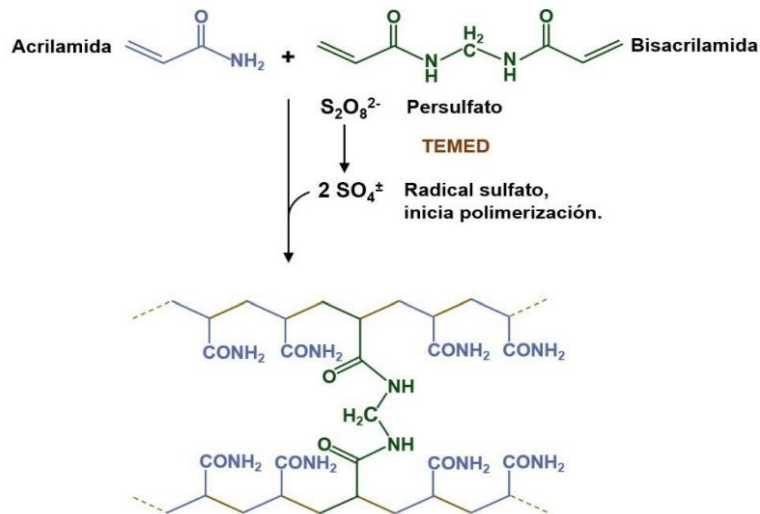
### 2.5 Gel Sintético basado en Poliacrilamida (PA)

Los geles de poliacrilamida (PA) son los más utilizados para estudiar las interacciones mecánicas entre células y matriz extracelular (ECM) (Barber-Pérez, 2019; Kumai et al., 2021). Esto se ha ejemplificado mediante estudios que ilustran la influencia de la rigidez del sustrato en la motilidad celular, la propagación, y la diferenciación (Caliari & Burdick, 2016; Charrier et al., 2020). Es ópticamente transparente, incolora, tiene un índice de refracción similar al del agua y linealmente elástica. Finalmente, la poliacrilamida es bioquímicamente inerte, lo

que permite que las células se unan específicamente solo a la matriz extracelular que está acoplada covalentemente a su superficie (Fischer et al., 2012).

Los hidrogeles de PA se producen mediante la reacción del monómero de acrilamida y el reticulante de bis-acrilamida, generalmente en presencia de persulfato de amonio (APS) y tetrametiletilendiamina (TEMED) Figura 16. Al variar las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida, el rango de rigidez puede cubrir el de la mayoría de los tejidos blandos (Funaki & Janmey, 2017a). El APS actúa como fuente de radicales libres, mientras que el TEMED actúa como catalizador para iniciar la polimerización radical redox del PA (Barber-Pérez, 2019; Caliri & Burdick, 2016).

*Figura 16. Formación de Red Polimérica de Poliacrilamida*

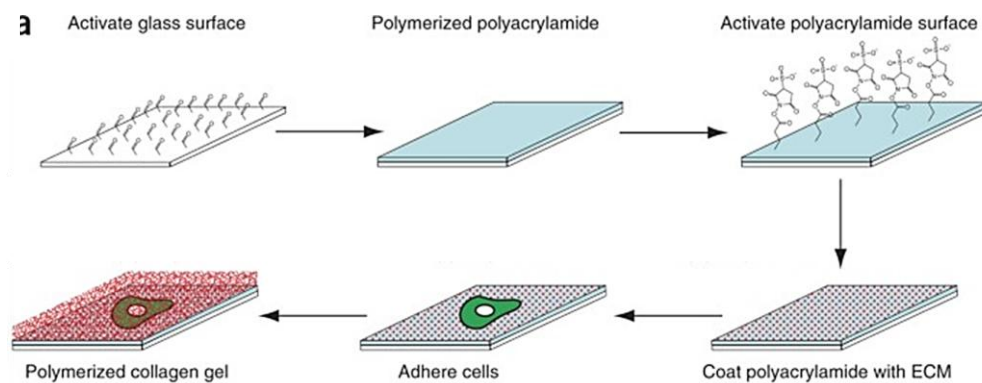


*Fuente: Torres, 2018*

Los hidrogeles de PA se fabrican típicamente como películas delgadas unidas a cubreobjetos (Caliri & Burdick, 2016). Para obtener una capa delgada de poliacrilamida, la solución de prepolímero se intercala entre dos cubreobjetos, lo que determina el área superficial y el espesor del gel Figura 17. El cubreobjetos inferior se funcionaliza con aminosilanos que generan una monocapa de grupos

químicos libres que se unen covalentemente a la poliacrilamida durante su polimerización (Barber-Pérez, 2019; Ribeiro et al., 2016). Se coloca un cubreobjetos hidrofóbico sobre una gota de solución para definir la topografía de la superficie del hidrogel, mientras que la presión aplicada determina el espesor del hidrogel (Ribeiro et al., 2016).

*Figura 17. Proceso de la Técnica "Sandwich" para generar un Gel de Poliacrilamida*



*Fuente: Fischer et al., 2012*

Sin embargo, al utilizar un gel de poliacrilamida como capa inferior del gel sándwich, se deben tener en cuenta algunos aspectos: 1) como la poliacrilamida no tiene carga y no reacciona con las proteínas, las células no se adherirán directamente a las superficies de poliacrilamida. Por lo tanto, se debe tener cuidado con las concentraciones e identidades de las proteínas de la matriz extracelular (ECM) que se entrecruzan con la poliacrilamida, de modo que las células puedan interactuar con el gel, 2) la acrilamida no polimerizada es altamente tóxica para muchos tipos celulares, por lo que no es aconsejable acortar los tiempos de lavado una vez formado el gel de poliacrilamida; las incubaciones durante la noche en grandes volúmenes de tampón son óptimas y 3) se ha demostrado que las células "sienten" y responden a un sustrato más rígido debajo de uno más blando si este último es suficientemente delgado (Fischer et al., 2012).

Antes del cultivo celular, la superficie del hidrogel debe activarse con un agente reticulante (p. ej., sulfo-SANPAH) para permitir la conjugación de proteínas (p. ej., fibronectina, colágeno, etc.) para favorecer la adhesión celular (Barber-Pérez, 2019; Caliari & Burdick, 2016; Tse & Engler, 2010; Wong et al., 2014). El 6-(4'-azido-2'-2 nitrofenilamino)hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SANPAH) es un agente reticulante de gel de PA de uso común (Kumai et al., 2021; Pelham & Wang, 1997), donde su superficie se activa con luz ultravioleta (UV). La región fotoactivable del sulfo-SANPAH se une a la poliacrilamida y el grupo sulfosuccinimidilo del otro extremo reacciona con los grupos amina primarios de la proteína. Las proteínas ECM desplazan los grupos sulfosuccinimidilo de las moléculas sulfo-SANPAH, formando enlaces amida (Kumai et al., 2021).

La proteína de la matriz extracelular (ECM) elegida también debe ser adecuada para el tipo celular en estudio. Distintos tipos celulares secretan diferentes conjuntos de proteínas de la ECM y, por lo general, exhibirán fenotipos más fisiológicos al cultivarse con proteínas que imitan los atributos de la composición de la ECM in vivo, pueden alterar la función celular, expresión génica y cambios en la composición de ECM que puede inducir fenotipos malignos. El colágeno, la fibronectina, la laminina y la vitronectina se encuentran entre las familias de proteínas de la ECM más utilizadas para el cultivo celular in vitro (Funaki & Janmey, 2017a; Ribeiro et al., 2016).

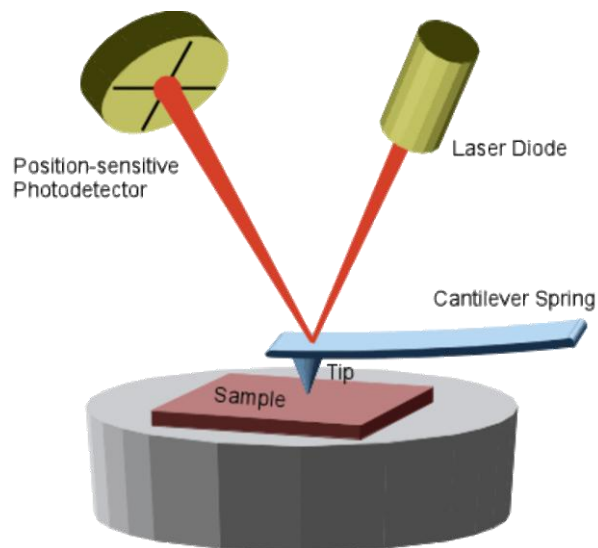
La principal ventaja del método de gel sándwich es que permite obtener imágenes de alta resolución de las respuestas celulares a las matrices de células extracelulares (MEC) 2D y 3D con una rigidez específica (Fischer et al., 2012). Una desventaja importante es que la PA no puede utilizarse para encapsular células en 3D debido a la toxicidad de los precursores del hidrogel (Caliari & Burdick, 2016; Funaki & Janmey, 2017b).

## 2.6 Técnicas para detección de Rigidez de Sustrato

- Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es una técnica utilizada no solo para generar imágenes con resolución atómica, sino que también permite medir propiedades mecánicas de las células, tejidos e hidrogeles; mediante la indentación controlada y la obtención de curvas fuerza-distancia (Rehfeldt & Schmidt, 2017). Como se muestra en la Figura 18, la AFM usa una punta fina que interactúa con la muestra para obtener imágenes y medir fuerzas que revelan propiedades superficiales como dureza y fricción (Gadegaard, 2006; MILAB, 2025).

*Figura 18. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)*



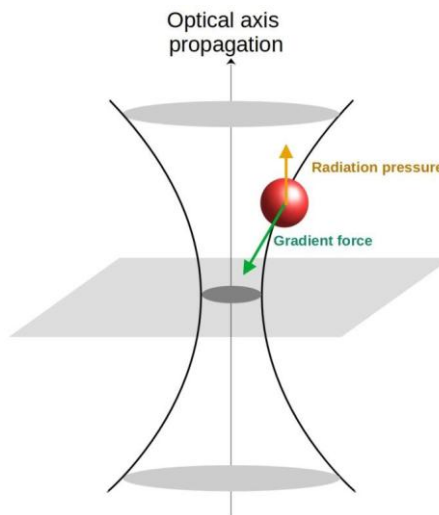
*Fuente: University of Greifswald, 2025*

- Pinzas Ópticas

Las pinzas ópticas constituyen una técnica que emplea un haz láser altamente enfocado para atrapar y manipular partículas dieléctricas, como microesferas suspendidas en un gel (Català-Castro et al., 2021), Figura 19. El gradiente de intensidad del láser genera una fuerza que dirige la partícula hacia el foco, permitiendo medir desplazamientos extremadamente pequeños y, por tanto,

fuerzas en el rango de los piconewtons. Esta herramienta se ha utilizado ampliamente para ejercer y cuantificar fuerzas o pares de torsión en moléculas individuales, lo que ha permitido estudiar procesos bioquímicos a nivel molecular (Bustamante et al., 2021). Además, su versatilidad ha llevado a aplicaciones en numerosos campos, incluyendo física, nanotecnología, química, materiales blandos y nanotermodinámica (Wu, 2023). En conjunto, las pinzas ópticas se han consolidado como una técnica fundamental para investigar fenómenos mecánicos a micro y nanoescala.

*Figura 19. Técnica de Pinzas Ópticas*



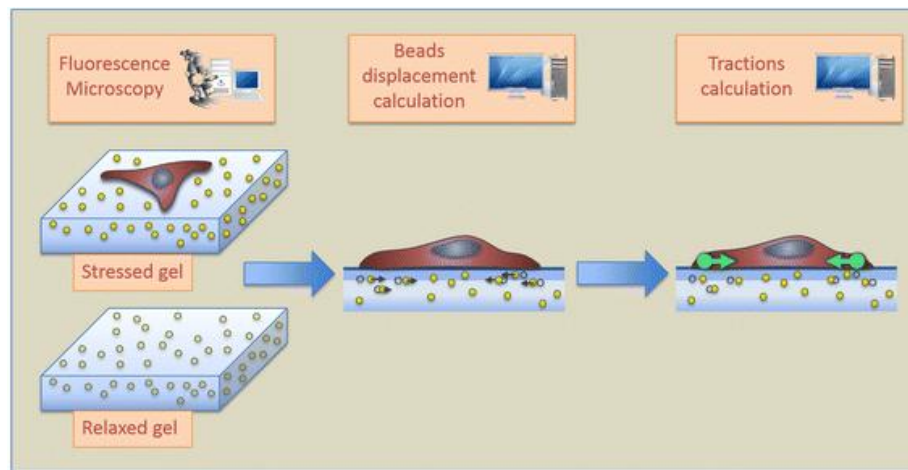
*Fuente: Asgharsharghi et al., 2022*

### 2.7 Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM)

La microscopía de fuerza de tracción es una técnica ampliamente utilizada para la medición de fuerzas de tracción *in vitro*. Utiliza sustratos elásticos embebidos con microesferas fluorescentes que actúan como marcadores fiduciales. Al capturar imágenes del sustrato en presencia y en ausencia de las células adherentes, se cuantifica el campo de desplazamiento de las microesferas generadas por las células (Aina Albajar Sigalés, 2021; Joshi et al., 2022) Figura 20.

Los primeros estudios cualitativos sobre la interacción mecánica entre célula y MEC comenzaron en la década de 1980, cuando se observó el arrugamiento de una membrana de silicona debido a las fuerzas de tracción ejercida por fibroblastos (Ribeiro et al., 2016). Posteriormente, en 1999, Dembo y Wang introdujeron la TFM moderna, como método para cuantificar las fuerzas ejercidas por las células adherentes sobre un sustrato de hidrogel con marcadores fiduciales (Dembo & Wang, 1999).

*Figura 20. Técnica de Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM)*



*Fuente: Suñé-Auñón et al., 2017*

Las células interactúan mecánicamente con su alrededor al adherirse a sustratos o a la matriz extracelular, ejerciendo fuerzas denominadas como fuerzas de tracción. Estas fuerzas son originadas principalmente por la contractilidad de actomiosina dentro del citoesqueleto de actina (Aina Albajar Sigalés, 2021; Joshi et al., 2022). Las fuerzas de tracción juegan un rol crucial en la regulación de procesos celulares tales como adhesión migración, diferenciación, demostrando su importancia en el estudio de estas fuerzas para la mejor comprensión de la mecanobiología (H. Chen et al., 2024; Qingzong, 2011). Las fuerzas celulares pueden ser categorizadas en fuerzas transmitidas a la matriz extracelular (fuerzas

de tracción), fuerzas transmitidas entre células y fuerzas intracelulares (Bauer et al., 2021).

Conceptualmente, el TFM consta de tres pasos principales (Z. Yang et al., 2006):

1. Fabricación de un sustrato elástico con microesferas fluorescentes embebidas.
2. Obtención de imágenes con y sin presencia de fuerzas celulares, y el cálculo de los desplazamientos de las microesferas.
3. Cálculo de las fuerzas de tracción a partir de los campos de desplazamiento mediante modelos basados en la teoría de la elasticidad y las propiedades mecánicas del sustrato.

### 2.6.1 Configuración Experimental en TFM

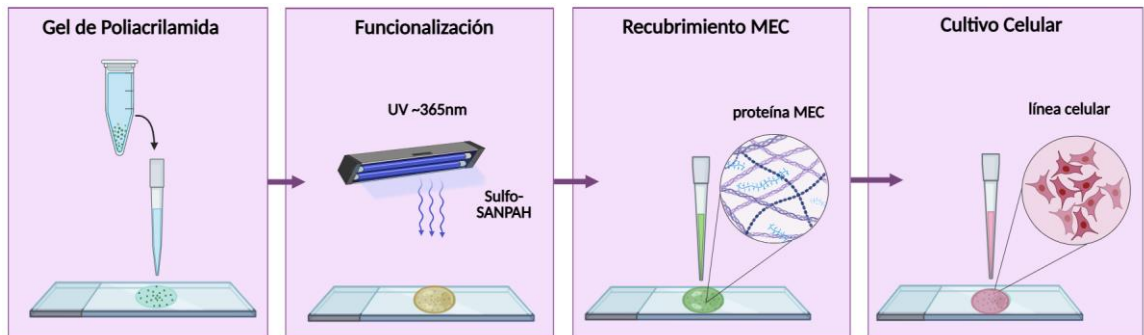
- Preparación del Sustrato

Los geles de poliacrilamida son utilizados amplia y comúnmente, en experimentos de microscopía de tracción, debido a que es considerado como un material linealmente elástico bajo un amplio rango de tensiones (hasta un 90%), en la que se pueden ajustarse a una rigidez específica (0,2–150 kPa) mediante la modificación de la concentración de acrilamida y bisacrilamida (Denisin & Pruitt, 2016; Knoll et al., 2014; Ribeiro et al., 2016; Tse & Engler, 2010). Esta última, facilita la investigación del cómo las células logran sensor y responder a las señales mecánicas del microambiente dependiendo de una rigidez en particular.

Las microesferas fluorescentes sirven como marcadores fudiciales (Aina Albajar Sigalés, 2021; Chen et al., 2024; Denisin et al., 2024; Joshi et al., 2022; Mulligan et al., 2018). Por medio de estas, utilizando la microscopía de fluorescencia, es capaz de trazar la deformación del sustrato (Mulligan et al., 2018). Esta deformación dependerá de la magnitud de la fuerza aplicada por las células y las propiedades elásticas del gel (Knoll et al., 2014). Típicamente, estas microesferas están integradas en la solución de poliacrilamida, previo a la iniciación, de la polimerización, lo cual resulta en una distribución uniforme de las microesferas a

lo largo del volumen del gel (Knoll et al., 2014; Kumari et al., 2020). Dado que el gel de poliacrilamida no facilita la adhesión proteica espontáneamente, debe ser funcionalizado químicamente para permitir la fijación de proteínas de matriz extracelular. Uno de los protocolos más comunes emplea el reactivo sulfo-SANPAH activado con luz UV para enlazar covalentemente proteínas sobre la superficie del gel (De La Pena et al., 2021). Finalmente, se realiza el cultivo celular con la línea celular a investigar Figura 21.

*Figura 21. Cultivo Celular para TFM*

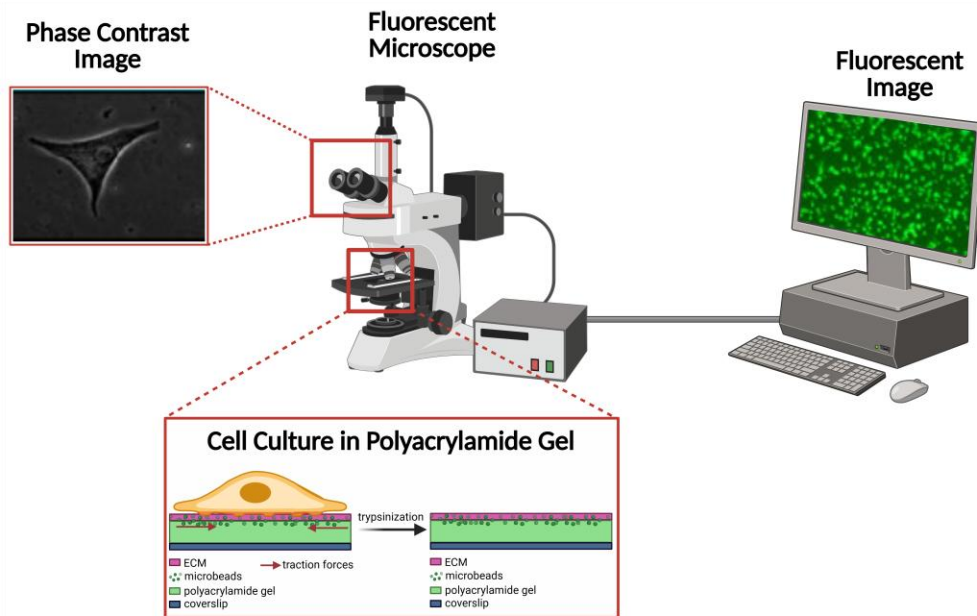


Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

- Microscopía y Adquisición de Imágenes

Para la adquisición de las imágenes se utiliza un microscopio confocal de fluorescencia, donde se captura imágenes del estado deformado (uno o varios puntos del tiempo en la que las células ejercen fuerzas de tracción) y una imagen en el estado de referencia (sin fuerzas de tracción) (Denisin & Pruitt, 2016; Giordano, 2023; Mulligan et al., 2018; Ribeiro et al., 2016; Zhu et al., 2023). Luego, las imágenes de referencia y deformadas se comparan para generar mediciones de las deformaciones del sustrato (Giordano, 2023) Figura 22.

Figura 22. Adquisición de Imágenes para TFM



Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

Fuente: Adaptado de J. Huang et al., 2012

Para la reconstrucción de las fuerzas, se asume que:

1. Las fuerzas normales a la superficie son insignificantes porque las interacciones célula-sustrato se desarrollan principalmente a lo largo de la superficie del sustrato.
2. El sustrato de hidrogel es un plano elástico bidimensional que se extiende lateralmente hasta el infinito (un semiespacio semiinfinito).
3. Las deformaciones son infinitesimalmente pequeñas y, por lo tanto, el material del sustrato se deforma dentro de un régimen de elasticidad lineal.
4. Las propiedades del material del sustrato se mantienen homogéneas (Ribeiro et al., 2016).

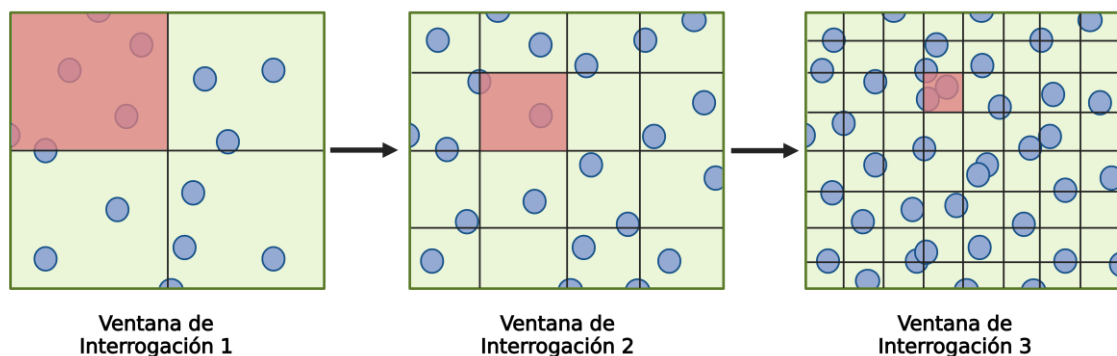
La adquisición de imágenes de las microesferas y su preparación para el análisis es un paso crucial en el TFM, ya que cualquier irregularidad adquirida se amplificará en el procesamiento posterior, lo que limitará la interpretación de los resultados. Para obtener vectores de desplazamiento precisos a partir del

desplazamiento de las microesferas, se requieren imágenes nítidas de las microesferas fluorescentes en la interfaz célula-sustrato. Las microesferas desenfocadas inducen vectores erróneos que aumentan el ruido y pueden provocar la detección de energía de deformación que no se corresponde con la generación de fuerza de la célula (De La Pena et al., 2021).

### 2.6.2 Campo de Desplazamiento de las Microesferas

Para determinar la deformación del sustrato a partir de las imágenes de los marcadores fluorescentes embebidos en él, un algoritmo ampliamente utilizado es la Velocimetría por Imágenes de Partículas (PIV) basada en correlación cruzada. Esta técnica, originada en el campo de la dinámica de fluidos para medir el campo de velocidades en un plano, se aplica sembrando el fluido con marcadores y adquiriendo imágenes o videos para analizar la variación de la posición de dichos marcadores entre cuadros consecutivos. Las imágenes se dividen en ventanas de exploración sucesivas que se correlacionan entre sí, y a partir de la posición del máximo de correlación se obtiene el desplazamiento correspondiente en esa región (Giordano, 2023) Figura 23.

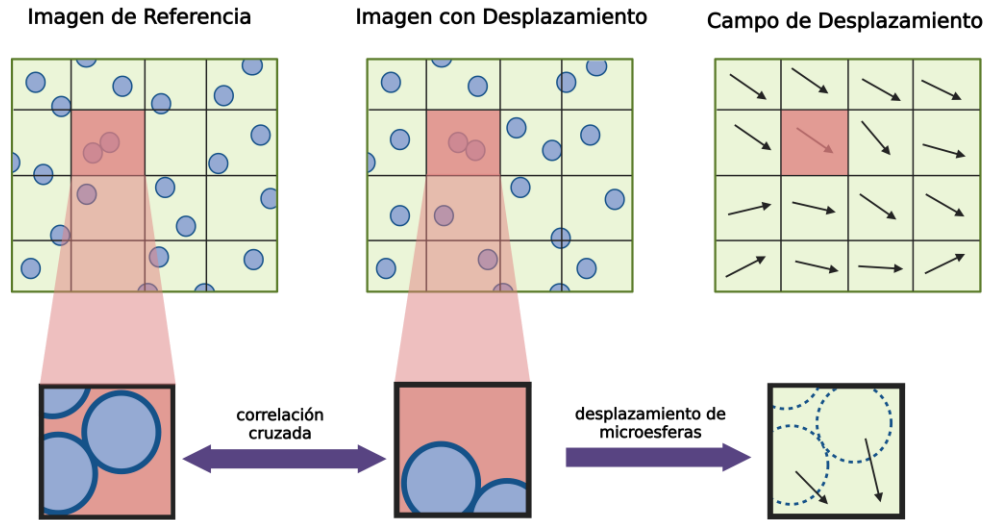
*Figura 23. Ventanas de Interrogación Sucesivas*



*Fuente: Adaptado de Theunissen et al., 2008*

Para ello, se utiliza un par de imágenes: una del sustrato deformado por la célula adherida (estado previo o pre) y otra del sustrato sin deformar tras su retiro (estado posterior o post) (Denisin et al., 2024; Giordano, 2023) Figura 24.

Figura 24. Técnica de Correlación Cruzada para PIV



Fuente: Adaptado de S. M. Choi et al., 2011

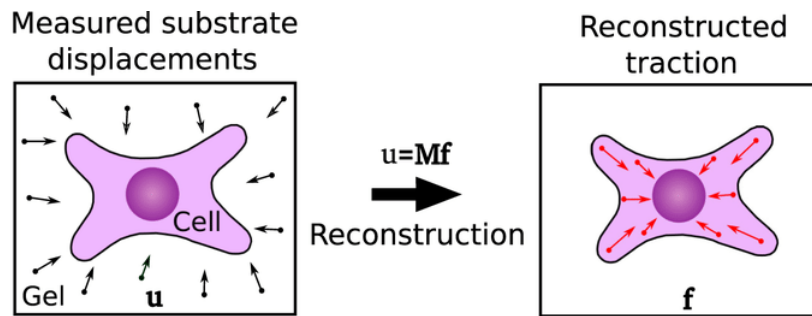
También existe otra técnica para generar el campo de desplazamiento de las microesferas, denominada velocimetría de seguimiento de partículas (PTV). Se basa en el rastreo temporal de las trayectorias de partículas individuales en el espacio tridimensional (Dracos, 1996). En PTV, cada partícula se reconoce e identifica por separado, y se intenta redescubrirla en el segundo fotograma. El desplazamiento de cada partícula se determina eficazmente utilizando la información de la vecindad, proporcionando un vector de desplazamiento para cada partícula, lo cual resulta eficiente en términos de tiempo de procesamiento con un número menor de partículas (Sokoray-Varga & Józsa, 2008).

### 2.6.3 Reconstrucción de la Fuerza de Tracción

La reconstrucción de la fuerza de tracción ejercida por la célula se realiza aplicando conceptos de la teoría de elasticidad, donde se considera que el sustrato es un medio elástico, lineal, isotrópico y homogéneo y sufre sólo pequeñas deformaciones debido a las fuerzas de tracción celular (Giordano, 2023; Mulligan et al., 2018).

Una vez que se determinan las deformaciones del sustrato inducidas por la fuerza de tracción, estos datos se combinan con las propiedades mecánicas conocidas del sustrato para reconstruir las fuerzas de tracción celular (Mulligan et al., 2018) Figura 25.

Figura 25. Reconstrucción de Fuerzas a partir del Desplazamiento de Microesferas



Fuente: Y. Huang et al., 2020

La relación entre el campo de deformación medido  $\mathbf{u}(\mathbf{r})$  y el campo de tracción  $\mathbf{t}(\mathbf{r})$  se puede expresar mediante una integral de Fredholm de primera especie, que hace uso de la función de Green  $\mathbf{G}(\mathbf{r})$  que describe la respuesta a un impulso, la cual contiene información sobre las características del sustrato (Giordano, 2023):

$$u(r) = \int G(r - r')t(r')dr'$$

En casos de sustratos semi-infinitos la función de Green corresponde a la solución de Boussinesq:

$$G(r) = \frac{(1 + \nu)}{\pi E r^3} \begin{bmatrix} (1 + \nu)r^2 + \nu x^2 & \nu xy \\ \nu xy & (1 + \nu)r^2 + \nu y^2 \end{bmatrix}$$

Siendo  $E$  el módulo de Young del sustrato y  $\nu$  (0.5) el coeficiente de Poisson.

Para encontrar la tracción  $t(r)$  se debe resolver el problema inverso, es decir, determinar un campo de tracción que pueda dar lugar a las deformaciones medidas (Giordano, 2023). Uno de los enfoques más extendidos es trabajar en el espacio de Fourier:

$$\hat{u}(k) = \hat{G}(k)\hat{t}(k)$$

## **CAPÍTULO III**

## **CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO**

### **3.1 Diseño de investigación y tipo de estudio**

La presente investigación tiene un enfoque cuantitativo, con un diseño experimental y tipo de estudio descriptivo. Se busca generar geles de poliacrilamida de distinta rigidez, para simular un gradiente de rigidez similar al de los tejidos del cuerpo, como sustrato para futuros estudios de mecánica celular. También cuantificar las fuerzas mecánicas que generan las células sobre un sustrato utilizando distintas herramientas computacionales. Además de esto, generar hidrogeles de origen animal, siendo de matriz extracelular descelularizada y evaluar la efectividad de la descelularización basada en distintos protocolos.

### **3.2 Población o Universo**

Biomateriales para estudios de mecánica celular

#### **Sujetos o grupo de estudio:**

Tejido cerebral porcino descelularizado, geles de poliacrilamida, tejido cerebral porcino descelularizado e hidrogel, imágenes de células para análisis de fuerzas.

#### **Tipo de muestra estadística:**

El tipo de muestra de esta investigación es no probabilística (por conveniencia o intencional por juicio), ya que la muestra no se elige al azar, sino que se selecciona con una base de criterios específicos.

## **3.3 Variables**

### **Descelularización de Matriz Extracelular de Cerebro Porcino**

#### **Variable 1: Descelularización**

**Definición conceptual:** es el proceso de eliminación de células y sus componentes (especialmente ADN y ARN) de la matriz extracelular (MEC) para producir una matriz natural con integridad mecánica preservada (Neishabouri et al., 2022).

**Definición operacional:** se comprobará la efectividad de la descelularización mediante la cuantificación de ADN residual en la muestra al finalizar el protocolo, por medio de electroforesis con gel de agarosa y Picogreen y por medio de la pérdida de masa al final de la descelularización comparada con la masa inicial.

### **Gel de Poliacrilamida**

#### **Variable 1: Módulo de Young ( $E$ )**

**Definición conceptual:** Es una propiedad del material que nos indica con qué facilidad puede estirarse y deformarse (University of Birmingham, s.f.). La rigidez del gel se ajusta cambiando la proporción de acrilamida y bis (Comelles et al., 2020). Geles más rígidos presentan mayor concentración de bis a acrilamida, mientras que más blandos sería lo contrario (Worthen et al., 2017).

**Definición operacional:** Se utilizará una tabla de concentración de reactivos para definir la rigidez del gel basado en la tabla del trabajo de Barber-Pérez (2019)

### **Microscopía de Fuerza de Tracción**

#### **Variable 1: Módulo de Young ( $E$ )**

**Definición conceptual:** Es una propiedad del material que nos indica con qué facilidad puede estirarse y deformarse (University of Birmingham, s.f.).

**Definición operacional:** Se utilizarán imágenes de literatura científicos, donde independientemente o no, me indican el módulo de Young utilizado en su experimento.

#### **Variable 2: Software para Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM)**

**Definición conceptual:** es una técnica por el cual se mide y se cuantifica las fuerzas de tracción generadas por la célula en su sustrato

**Definición operacional:** generación del campo de desplazamiento de las microesferas y las fuerzas de tracción será definido dependiendo de la herramienta computacional utilizado (ImageJ/Fiji, Python, MATLAB).

### **3.4 Insumos, técnicas de recolección de datos y equipos**

#### **Insumos**

Etanol absoluto (Merck, 64-17-5), 3-(trimethoxysilyl) propylmethacrylate (Bind-Silane) (Sigma Aldrich, M6514), Ácido Acético Glacial (Chemboys, 64877122), RainX (ITW Global Brands, 800002242), Acrilamida 40% (Bio-Rad, 1610146), Bis 2% (Bio-Rad, 1610142), PBS 1X (Sigma-Aldrich, P3813), Persulfato de Amonio (APS) (Bio-Rad, 1610700), N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, T9281), Desoxicolato de Sodio (SDC) (Sigma-Aldrich, 30970), DNasa I (Roche, 11284932001), Cloruro de Magnesio MgCl<sub>2</sub> (VWR, VJ364), Antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) (Thermo Scientific, 15140122), Tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, 59418C), Tritón X-100 (VWR, M143), Sacarosa (VWR, M117), Ácido Peracético (Sigma-Aldrich, 269336), Pepsina (Sigma-Aldrich, P6887), Ácido Clorhídrico (HCl), Hidróxido de Sodio (NaOH) (EMD Milipore, 1.06498.1000), PBS 10X (RPI, P32200.1000.0), proteinasa K (Macherey-Nagel, 740396), Quant-iT™ Picogreen® Invitrogen Assay Kit (ThermoScientific, P7589), Agarosa (IBI Scientific, IB70070), TBE 1X Buffer (IBI Scientific, IB11020), Tris-HCl (IBI Scientific, IB70162), EDTA (IBI Scientific, IB70184), Cloruro de Sodio (NaCl) (VWR Life Science, 1726C241), Sodio Dodecil Sulfato (SDS) (Sigma-Aldrich, 436143), Tiocianato de Guanidina (Bioland Scientific, CG03), Marcador Molecular 1kb (Bio-Rad, 1708355), Tampón de Carga de ADN 6X (ACTGene, 1110601), Tinte de Carga SmartGlow™ Concentración 6X (Accuris, E4500-LD).

#### **Técnicas de recolección de datos**

- **Ensayos para cuantificación de material genético:** Se aplicó el método de Picogreen, que permite cuantificar la cantidad de ADN remanente en las muestras nativas y descelularizadas, y se aplicó el método de electroforesis usando un gel de agarosa para observar los fragmentos de ADN según su tamaño molecular entre las muestras nativas y descelularizadas. Posteriormente, las mediciones de Picogreen se analizaron mediante software estadístico (Excel, GraphPad).

- **Ensayo de Pérdida de Porcentaje de Masa:** Se utilizó una balanza analítica para determinar la masa inicial y final de los tejidos cerebrales porcinos tras los distintos protocolos de descelularización utilizados.
- **Evaluación Macroscópico de la Descelularización:** Se documentaron por medio de registros fotográficos, los cambios de color y estructura del tejido.
- **Análisis in silico de microscopía de fuerzas de tracción:** Se emplearon imágenes de literatura científica y se procesaron mediante el uso de herramientas computacionales o software como ImageJ/Fiji, Python mediante el entorno de Anaconda y MATLAB, para realizar el análisis de microscopía de fuerza de tracción.

## **Equipos**

Cabina de Flujo Laminar (Air Science,37834), Sonicador (Branson, M3800), Baño María (JISICO, 1204-7), Incubadora con Agitación (BENCHMARK, 2003T2205BC250), Agitador orbital (Labnique,B079812FK4), Centrifuga (Fristaden Lab,LSC-50H), Homogenizador Tenbroeck (WHEATON®,357426), Liofilizador (Labconco, FreeZone 2.5 Liter -84°C Benchtop Freeze Dryer, 710201050), Agitador magnético (INTLLAB,B072K24X5P), Microcentrifuga (Eppendorf, 541577161), Termobloque (IVYX Scientific,IVYXDB-40), Lector multimodal de Multiplaca (Synergy™ HTX, BioTek Instruments,Inc.), Sistema de electroforesis con visualización (GELATO™, QP-1600-01), Transiluminador UV (VWR, 76407-432), pH metro (PH700, APERA).

## **3.5 Procedimiento**

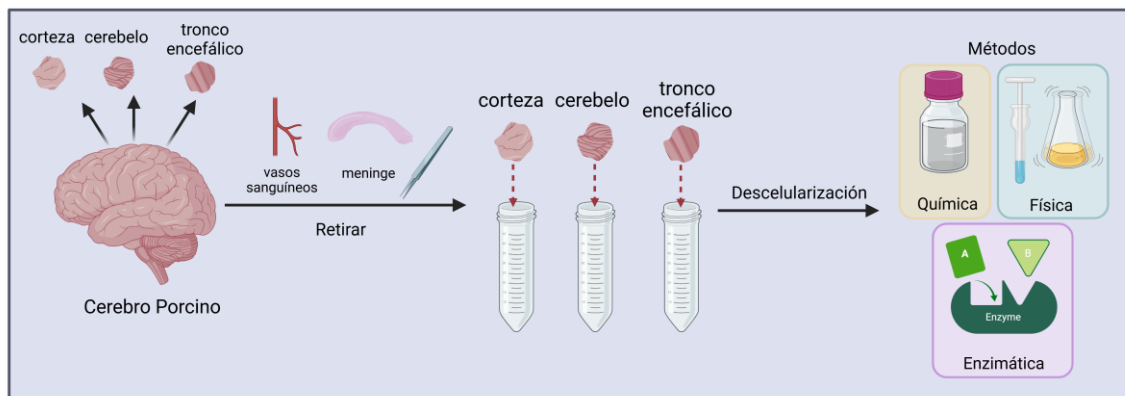
**OBJETIVO ESPECÍFICO N°1: Obtener matriz extracelular descelularizada, como estrategia in vitro para modelar ecosistemas extracelulares**

### 3.5.1 Descelularización de tejido cerebral porcino

- Disección de tejido cerebral

La disección del cerebro porcino se realiza separando el tejido en tres áreas específicas: corteza cerebral, cerebelo y las áreas remanentes, utilizando un bisturí. Una vez obtenidas estas áreas, se procede a retirar cuidadosamente los vasos sanguíneos y la meninge y se ingresan los tejidos en tubos de 50 mL para dar inicio la descelularización Figura 26.

Figura 26. Disección de Cerebro Porcino



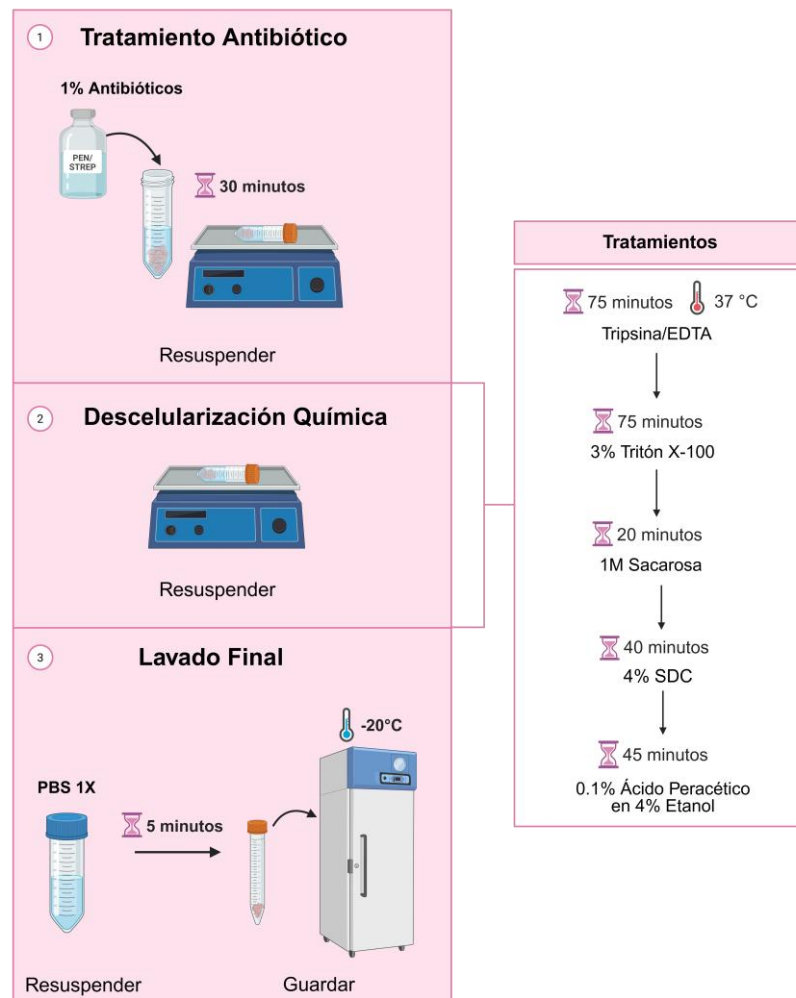
Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

#### 3.5.1.1 Protocolos de Descelularización

- Protocolo A: Crapo et al. 2012

El protocolo es adaptado del trabajo de Crapo et al. (2012). Se realiza un tratamiento de 1% de Antibióticos (Penicilina/Estreptomina) (ThermoScientific, 15140122) por 24 horas a 60 rpm. Después, se agrega, Tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, 59418C) por 75 minutos a 37°C, 3% de Tritón X-100 (VWR, M143) por 75 minutos, 1M de Sacarosa (VWR, M117) por 20 minutos, 4% de Desoxicolato de Sodio (SDC) por 40 minutos y Ácido Peracético (Sigma-Aldrich, 269336) por 45 minutos (Crapo et al., 2012). Posteriormente, se realiza un lavado final con PBS 1X durante 5 minutos Figura 27.

Figura 27. Descelularización utilizando Protocolo A



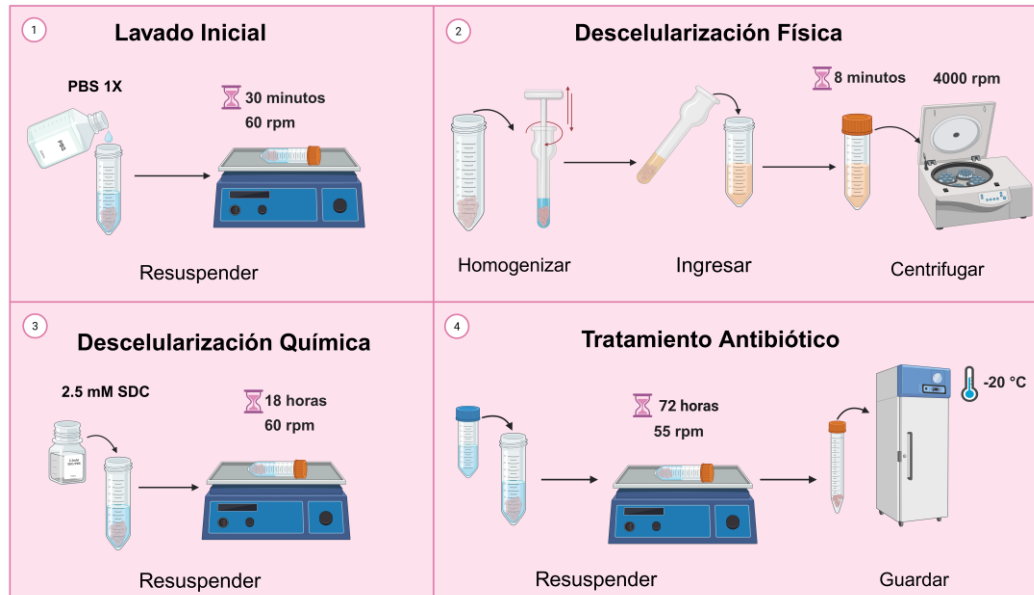
Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

- Protocolo B: Sackett et al., 2018

El protocolo B es adaptado del trabajo de Sackett et al. (2018). Se realiza un enjuague inicial con PBS 1X en un agitador durante 30 minutos a rpm. Se homogeniza utilizando el homogenizador tipo Tenbroeck en agua destilada hasta que quede una textura espesa. Se centrifuga dos veces a 4000 rpm durante 5 minutos. Se resuspende el pellet en 2.5mM de Desoxicolato de Sodio (SDC) preparado en PBS 1X y se agita durante 3 horas a 60 rpm. Pasado las 3 horas, se reemplaza la solución de 2.5 mM de Desoxicolato de Sodio y se agita por 15 horas adicionales (Sackett et al., 2018). Posteriormente, se enjuaga con 1% de

Antibióticos (Penicilina/Estreptomina) en PBS 1X por 72 horas, reemplazando la solución 2 veces diariamente Figura 28.

Figura 28. Descelularización utilizando Protocolo B

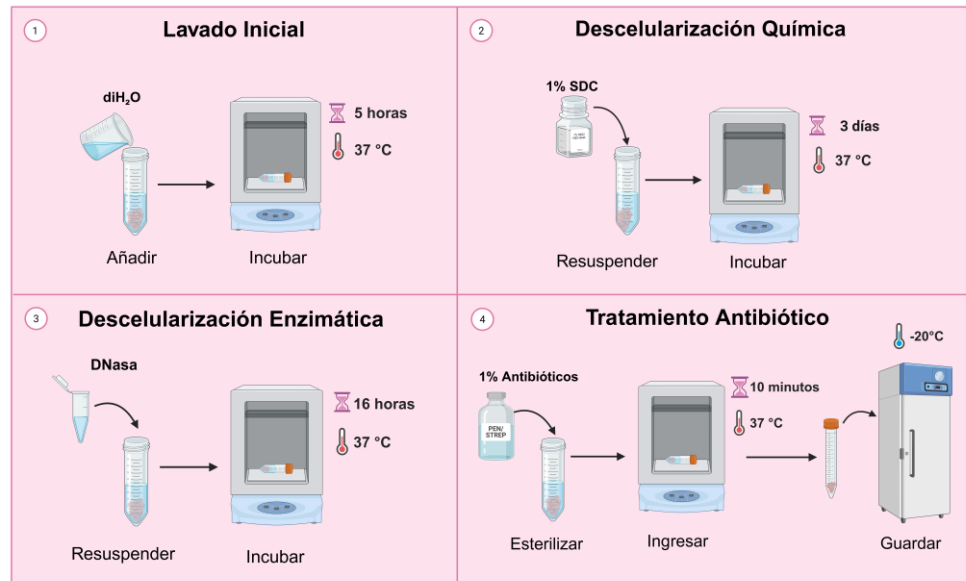


Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

- Protocolo C: Simsa et al., 2021

El protocolo C es adaptado del trabajo de Simsa et al. (2021), que se realiza en su totalidad a 37°C. Se enjuagan los tejidos con agua destilada en un agitador durante 2.5 horas a 60 rpm. Tras este tiempo, se reemplaza el agua destilada y se aumenta a 65 rpm durante 4 horas adicionales. Al finalizar este periodo, se añade 1% de Desoxicolato de Sodio (SDC) (Sigma-Aldrich, 30970) y se agita a 60 rpm por 48 horas, reemplazando la solución 2 veces diariamente. Al tercer día, los tejidos se enjuagan en agua destilada durante 5 horas a 50 rpm. Luego, se añade 40 U/mL de DNasa I (Roche, 11284932001) preparada en 10mM de Cloruro de Magnesio MgCl<sub>2</sub> (VWR, VJ364) y PBS 1X y se incuba durante 16 horas a una agitación de 40 rpm. Al día siguiente, se tratan con 1% de Antibióticos (Penicilina/Estreptomina) por 30 minutos, reemplazando la solución cada 10 minutos Figura 29.

Figura 29. Descelularización utilizando Protocolo C



Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

### 3.5.1.2 Caracterización de dECM

- Extracción de ADN

Para el mismo, después de realizar la liofilización de la matriz descelularizada, se ejecuta un protocolo de extracción de ADN estandarizado del laboratorio Figura 30. Se retira una cantidad de matriz descelularizada hasta que llegue a 0.1 uL del tubo de centrifugación de 1.5 mL y se pulveriza.

Ya pulverizado, se agrega 1 mL de buffer SNET y 5 uL de proteinasa K (Macherey-Nagel,740396), se homogeniza y se incuba a  $56^\circ\text{C}$  en un termobloque (IVYX Scientific,IVYXDB-40) hasta que quede homogéneo. Después de esto, se agrega un volumen igual de buffer de unión en base al volumen de la muestra. Se homogeniza, se carga en una columna y se centrifuga a 14,000 rpm en una ultracentrífuga durante 1 minuto. Pasado el minuto, se descarta el contenido que se encuentra dentro del tubo. Luego, se realizan dos lavados, iniciando con 500 uL del primer buffer de lavado, se centrifuga por 1 minuto y se descarta el contenido del tubo. Luego, se agrega 500 uL del segundo buffer de lavado que

contiene, se centrifuga por 1 minuto, se descarta el contenido del tubo y se centrifuga nuevamente por 2 minutos extra.

Mientras la muestra está centrifugando, se calienta el buffer de elución hasta que tenga una temperatura de 70°C. Pasado los 2 minutos, se descarta el contenido del tubo y se inserta la columna en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5mL y se carga con 100 uL de buffer de elución. Se centrifuga por 2 minutos y se descarta la columna, manteniendo el líquido dentro del tubo que contiene el ADN eluído Figura 30. Se guarda a 4°C hasta su futuro uso.

- Electroforesis con Gel de Agarosa

Se vierte la mezcla de gel de agarosa tibia en la cámara del gel, tratando de obtener un grosor de aproximadamente 5mm. Se deja que el gel polimerice durante 20 a 30 minutos. Ya polimerizado, se retira el peine con cuidado para obtener los pocillos en donde se van a agregar las muestras. Se coloca el gel en el sistema de electroforesis con visualización (GELATO™, QP-1600-01) y se agrega TBE 1X buffer hasta que el gel quede completamente sumergido. Por cada 5 uL de muestra de ADN eluído se agrega 2 uL de buffer de carga (loading dye). Luego, se carga cuidadosamente 7 uL las muestras y el marcador de peso molecular en los pocillos del gel. Ya cargado las muestras, se conecta el sistema a la fuente de poder y se ajusta el voltaje adecuado. Se deja correr el gel durante 1 hora. Pasada la hora, se coloca el gel en el transiluminador UV (VWR, 76407-432) para visualizar las bandas de ADN Figura 30.

- Ensayo de Picogreen

La cuantificación de ADN de las muestras descelularizadas y nativas se realiza utilizando el reactivo fluorescente Quant-iT™ Picogreen® Invitrogen (ThermoScientific,P7589) , siguiendo el protocolo dado por el fabricante. El protocolo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos, y la lectura de estos, en un equipo lector multimodal de Multiplaca (Synergy™ HTX, BioTek Instruments,Inc.).

Primeramente, el reactivo de Quanti-iT Picogreen se descongela progresivamente de -20°C a 4°C y luego 1 hora a temperatura ambiente antes de usarlo. Esta debe estar protegida de la luz utilizando papel de aluminio. Se prepara una curva estándar, mediante diluciones seriadas de un stock original, para generar una relación fluorescencia-concentración utilizando la concentración dada por el fabricante Tabla 1.

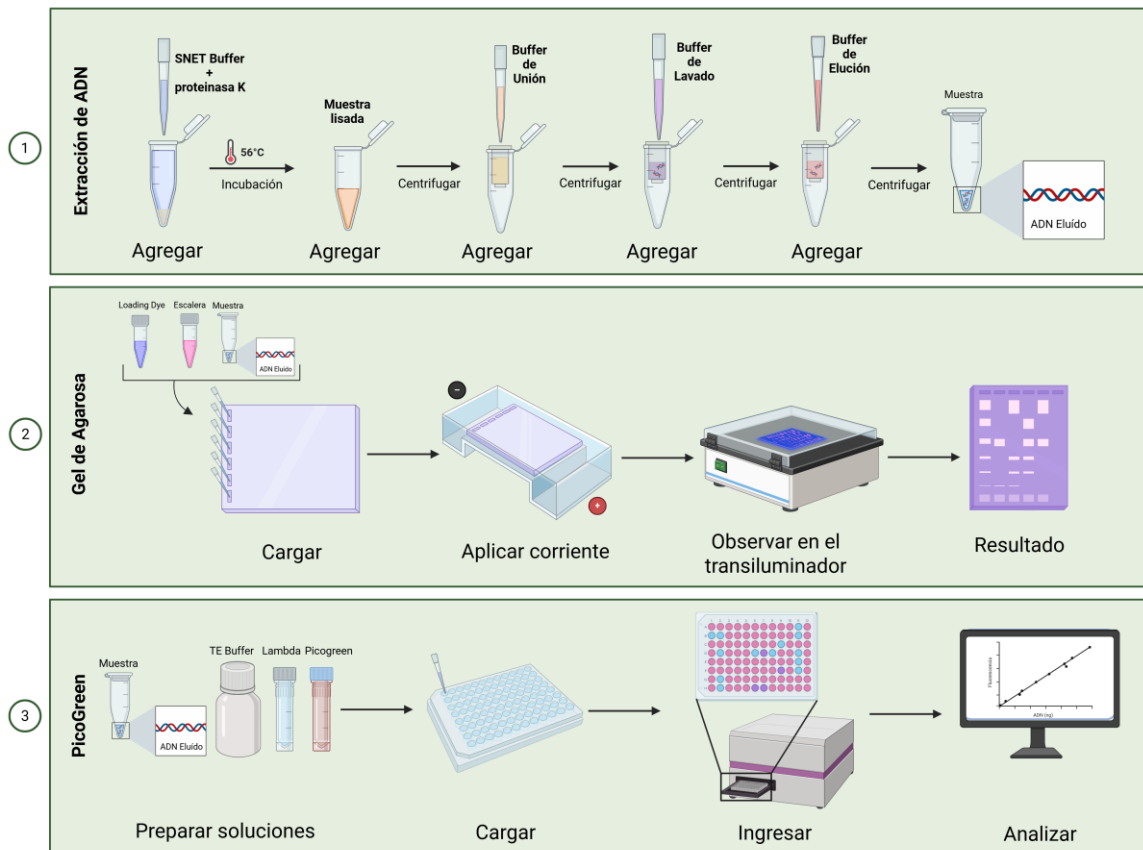
*Tabla 1. Preparación de Curva Estándar para Ensayo de Cuantificación de ADN mediante Picogreen*

| Curva Estándar de Alto Rango |                                 |  |                            |
|------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------|
| Volumen de buffer TE         | Volumen stock de ADN de 2 µg/mL | Volumen reactivo Quant-iT™ PicoGreen diluido | Concentración final de ADN |
| 0 µL                         | 100 µL                          | 100 µL                                       | 1 µg/mL                    |
| 90 µL                        | 10 µL                           | 100 µL                                       | 100 ng/mL                  |
| 99 µL                        | 1 µL                            | 100 µL                                       | 10 ng/mL                   |
| 100 µL                       | 0 µL                            | 100 µL                                       | blanco                     |
| Curva Estándar de Bajo Rango |                                 |  |                            |
| 0 µL                         | 100 µL                          | 100 µL                                       | 25 ng/mL                   |
| 90 µL                        | 10 µL                           | 100 µL                                       | 2.5 ng/mL                  |
| 99 µL                        | 1 µL                            | 100 µL                                       | 250 pg/mL                  |
| 100 µL                       | 0 µL                            | 100 µL                                       | blanco                     |

Fuente: Thermo Fisher Scientific Inc., 2022

Seguido, con una micropipeta de multicanal se agrega el Buffer TE 1X a los pocillos donde estarán las muestras, para luego, agregar el volumen del ADN extraído de las muestras y finalmente, agregar el Picogreen Working Solution a cada una de ellas. Finalmente, se ingresa la placa en el equipo, se agita por 5 minutos y se realiza la lectura de la placa Figura 30. Se exporta la lectura y se cuantifica utilizando hojas de cálculo Excel.

Figura 30. Cuantificación de ADN



Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

**OBJETIVO ESPECÍFICO N°2: Establecer la fabricación de sustratos de poliacrilamida para el análisis de la distribución de fuerzas celulares mediante microscopía de fuerza de tracción in silico, aplicando distintas herramientas computacionales.**

### 3.5.2 Preparación de Sustratos Sintéticos basado en Gel de Poliacrilamida

- Preparación de Superficies de Vidrio

Inicialmente, los cubreobjetos y portaobjetos ambos se le realiza un lavado inicial con agua destilada ( $\text{diH}_2\text{O}$ ). Luego, se sumergen en tubos de 50 mL con etanol al 70% y se sonicar aproximadamente durante 5 minutos en un sonicador (Branson, M3800). Tras este proceso, se enjuagan con etanol absoluto (Merck, 64-17-5) y se dejan secar al aire a temperatura ambiente Figura 31.

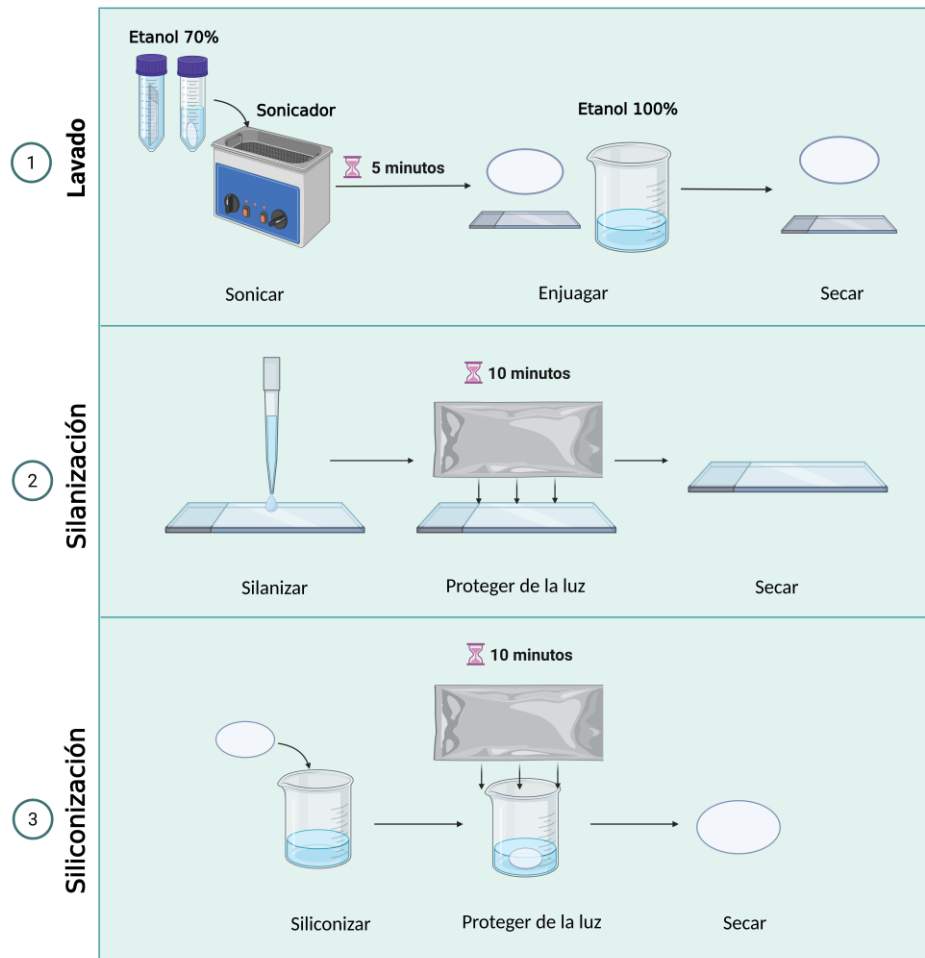
- Silanización de Portaobjetos

Para asegurar la adhesión permanente de los geles de poliacrilamida al portaobjeto se debe tratar con una solución de silanización. El portaobjeto se trata con 200  $\mu$ L de una solución de silanización que contiene: 3  $\mu$ L de 3-(trimethoxysilyl) propylmethacrylate (Bind-Silane) (Sigma Aldrich, M6514), 5  $\mu$ L de Ácido Acético Glacial (Chemboys, 64877122) y 1 mL de Etanol Absoluto (Barber-Pérez, 2019; Kumari et al., 2020; Morillo & Castro, 2011), se distribuye en el portaobjeto, se protege de la luz y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente Figura 31.

- Siliconización de Cubreobjetos

Para proporcionar la propiedad antiadherente, los cubreobjetos se sumergen completamente en una solución de silicón comercial Rain-X® (ITW Global Brands, 800002242) (Wong et al., 2014), se protege de la luz y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente Figura 31.

Figura 31. Tratamiento de Superficies de Vidrio



Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

- Polimerización de Gel de Poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se preparan ajustando las proporciones de acrilamida 40% (Bio-Rad, 1610146) y Bis 2% (Bio-Rad,1610142), lo que determina la rigidez del mismo, y se diluyen en PBS 1X (Sigma-Aldrich,P3813) utilizando las concentraciones indicadas en la Tabla 2.

La polimerización inicia cuando se agrega 5 uL de una solución fresca de persulfato de amonio (APS) al 10% (Bio-Rad, 1610700), que actúa como generador de radicales libres para iniciar la reacción, y 1 uL N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, T9281) que cataliza la reacción Figura 32.

Una vez preparada la solución, se agrega una gota de 20  $\mu\text{L}$  de gel sobre la superficie del portaobjeto silanizado e inmediatamente, se coloca encima un cubreobjeto siliconizado y se ejerce una leve presión sobre el mismo, asegurando una extensión uniforme de la solución de gel (Kumari et al., 2020).

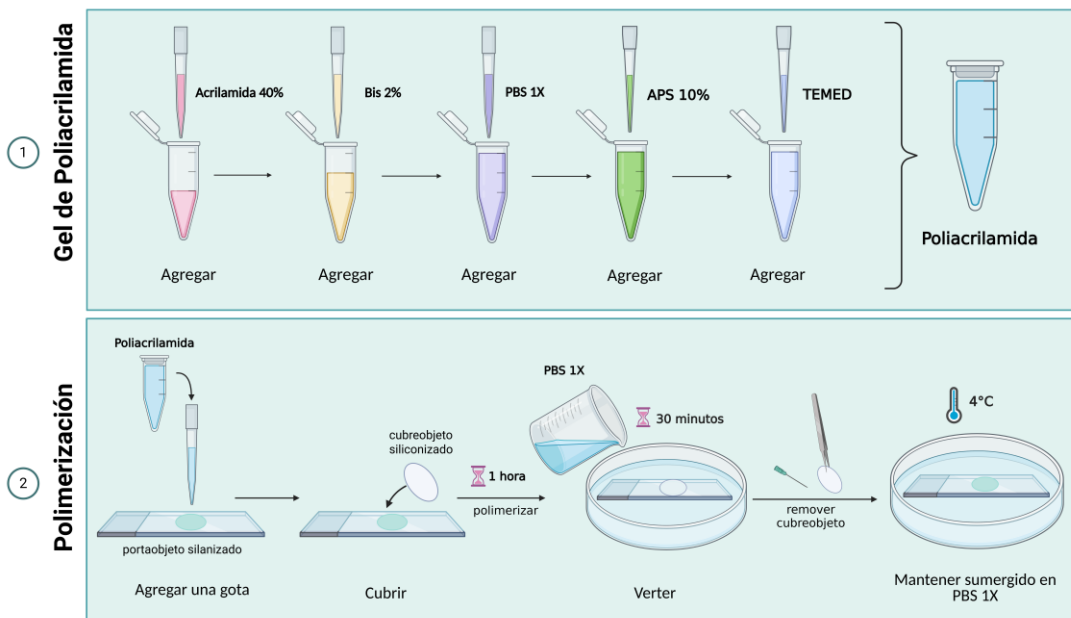
Se dejan polimerizar durante 1 hora a temperatura ambiente y luego, se sumergen en PBS 1X durante 30 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se retiran con cuidado utilizando una aguja estéril y se mantienen sumergidos en PBS 1X a 4°C hasta su uso Figura 32. Pueden permanecer almacenados a 4°C hasta por 2 semanas (Fischer et al., 2012).

**Tabla 2. Concentraciones de Reactivos para preparar Geles de Poli(acrilamida) de Rigidez Variada**

| Acrilamida 40%    | Bis 2%             | PBS 1X            | APS 10%         | TEMED           | Rigidez |
|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------|---------|
| 63 $\mu\text{L}$  | 17.5 $\mu\text{L}$ | 365 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 1 $\mu\text{L}$ | 2 kPa   |
| 150 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$   | 300 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 1 $\mu\text{L}$ | 22 kPa  |
| 225 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$  | 175 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 1 $\mu\text{L}$ | 60 kPa  |

Fuente: Barber-Pérez, 2019

**Figura 32. Polimerización de Solución de Poli(acrilamida) método "Sándwich"**

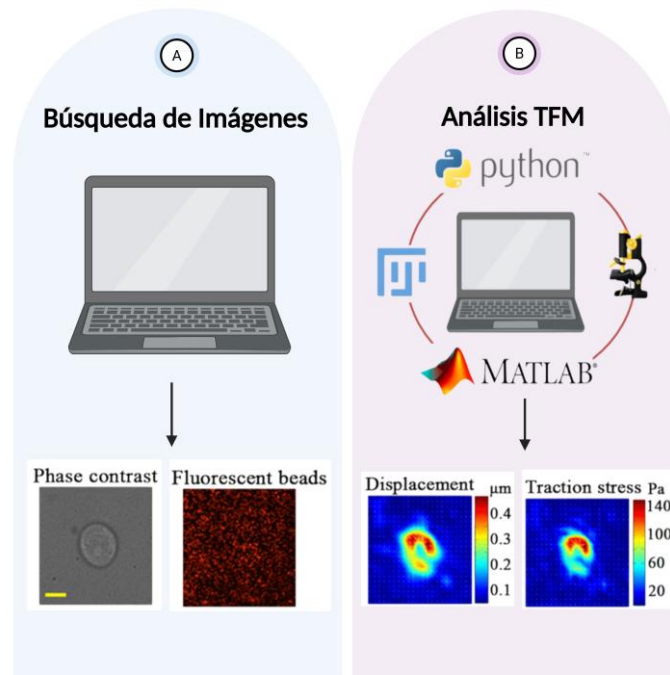


Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

### 3.5.3 Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM) *in silico*

Ejecutamos, una primera fase de Figura 33A, búsqueda de imágenes de experimentos de microscopía de fuerza de tracción, en las que aparezcan las microesferas y las células, obtenidas en literatura o fuentes científicas, y luego Figura 33B, se aplica el análisis de microscopía de fuerza de tracción utilizando códigos basados en diferentes herramientas computacionales, obtenidas de repositorios públicos, lo que nos permite calcular los campos de desplazamiento de las microesferas y los mapas de fuerza de tracción generados.

Figura 33. TFM *in silico*



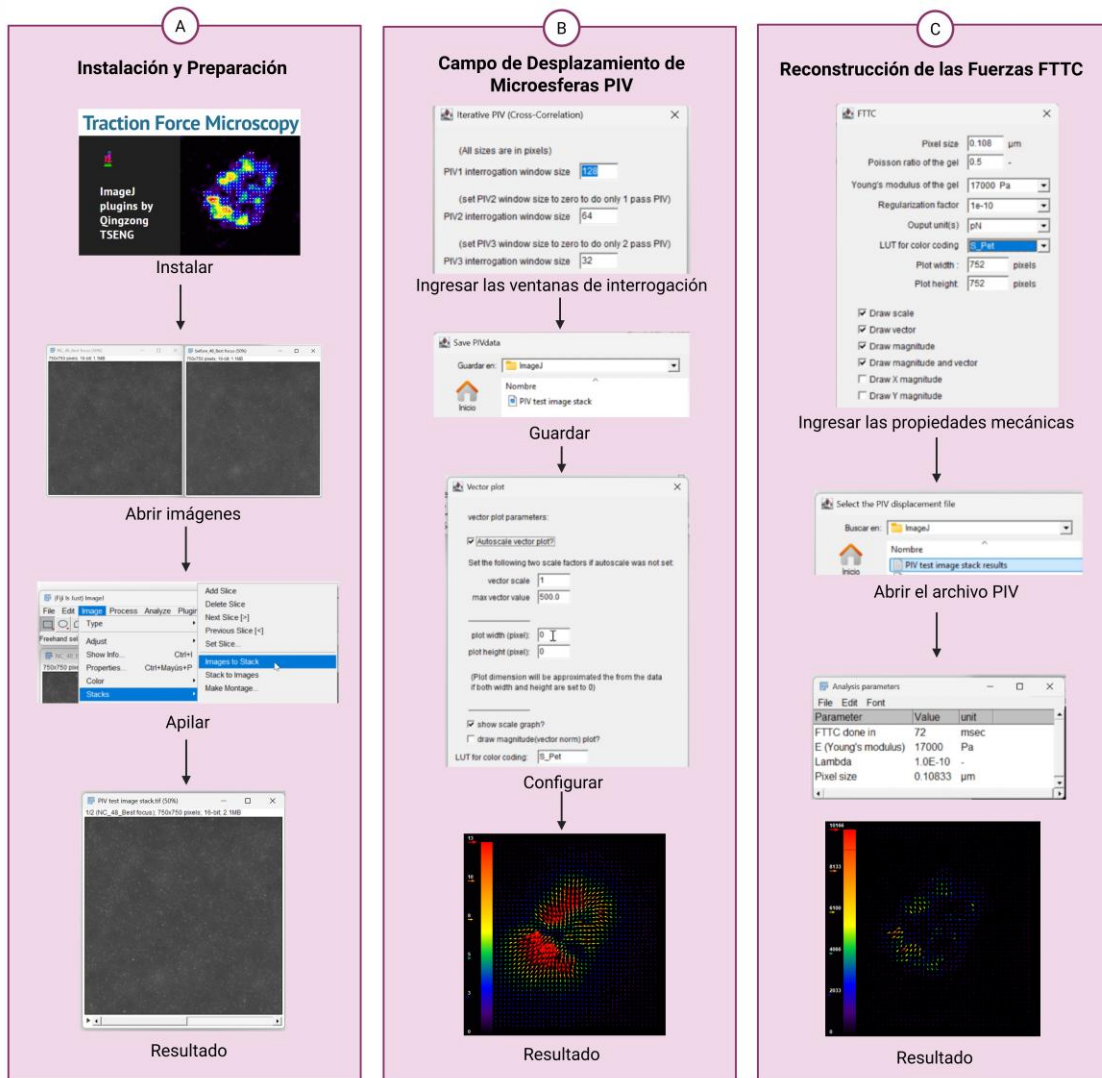
Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

- Software 1: ImageJ Plugins

En la Figura 34A, se descargan en el repositorio público [<https://sites.google.com/site/qingzongtseng/tfm>], las herramientas de PIV y FTTC e instalanlas en ImageJ/Fiji. En esta herramienta solo se pueden analizar dos imágenes, una de referencia "sin célula" y la otra con fuerza ejercida en el sustrato "con célula". Se apilan las imágenes y luego se comienza el análisis seleccionando la herramienta PIV iterativa. Figura 34B, se selecciona el método de correlación

cruzada donde se ingresan los tamaños de las ventanas de interrogación a utilizar. Luego de esto, se guarda el archivo en formato de texto y, adicionalmente, se guarda la imagen del campo de vectores del desplazamiento de las microesferas y la barra de color. Figura 34C, se reconstruye las fuerzas basadas en los desplazamientos medidos utilizando la herramienta FTTC. Se selecciona la opción FTTC Calculation, se abre el archivo de texto generado en el paso anterior y se ingresan las propiedades mecánicas del gel. Al finalizar, se guarda el archivo de texto de FTTC, al igual que el campo de vectores de las fuerzas reconstruidas y la barra de color (Qingzong, 2011).

Figura 34. TFM in silico mediante ImageJ



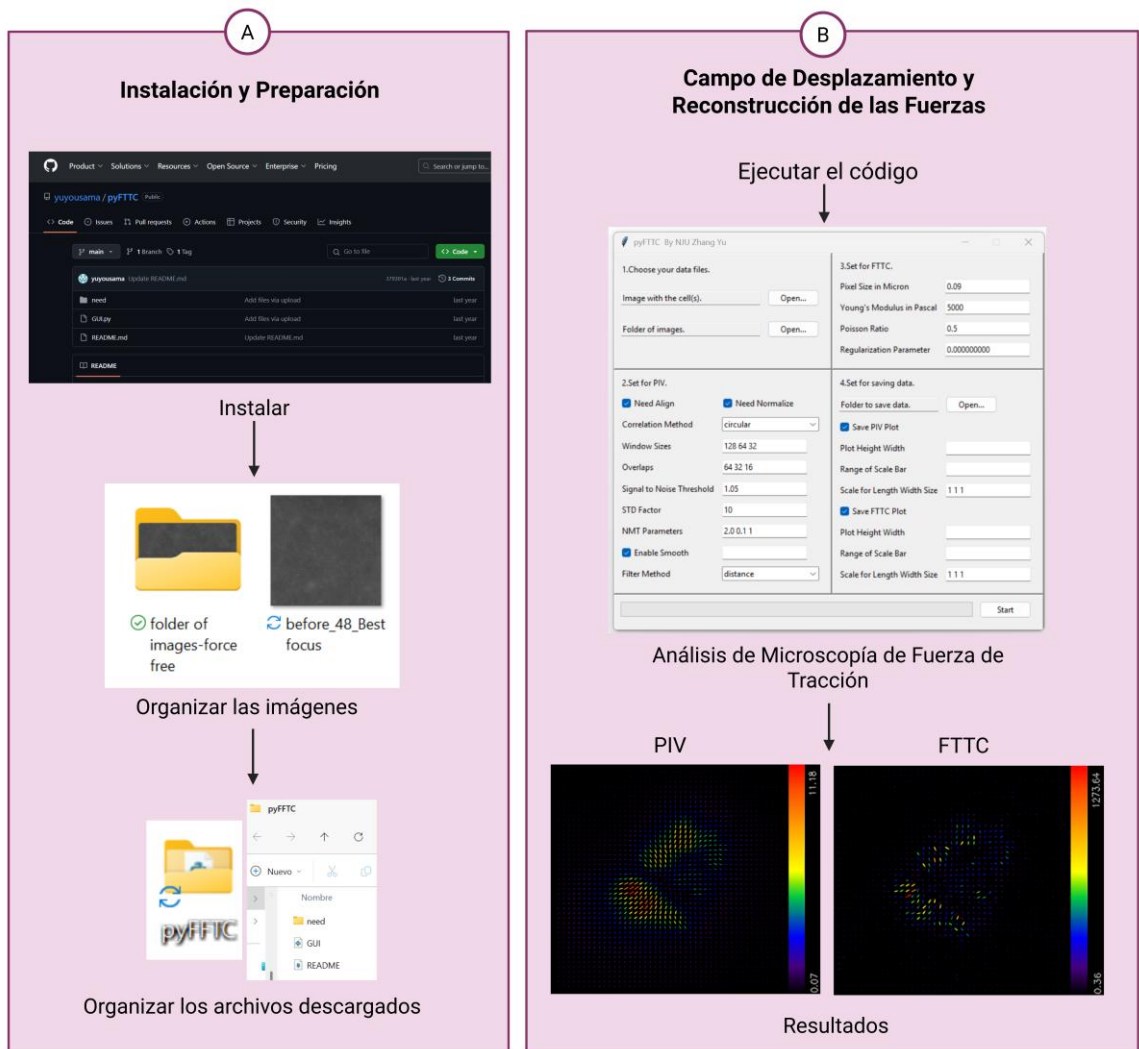
Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

- Software 2: pyFTTC para Python

Para este software se requiere tener la Python (versión 3.8) y descargar el entorno de Anaconda. Figura 35A, El análisis del campo de desplazamiento y la reconstrucción del campo de las fuerzas de tracción se generan utilizando el código pyFTTC que se encuentra en el repositorio público GitHub [<https://github.com/yuyousama/pyFTTC>]. Se descarga y se guarda todos los archivos del repositorio en una carpeta llamada pyFTTC. En este software, se

requiere que las imágenes de referencia se guarden en una carpeta diferente a la imagen con fuerza, además de esto se requiere que las imágenes tengan una profundidad de bits de 8-bit, 16-bit o 32-bit. Se abre en el ordenador “anaconda prompt”, se crea un “environment” y se verifica la versión de Python. Luego de esto, se ingresan los siguientes comandos: `conda install -c conda-forge openpiv, pip install opencv-python`; requeridos para la ejecución del código. Finalmente, se cambia el directorio del entorno al directorio donde se encuentran los archivos descargados previamente. Figura 35B, se ejecuta la interfaz de usuario “GUI.py”. En la interfaz de usuario se ingresan, las imágenes, la configuración para el análisis de PIV, las propiedades mecánicas del gel y la configuración para guardar los datos. Se procede a realizar el análisis y al terminar, el código nos informa que el análisis fue culminado.

Figura 35. TFM mediante Python



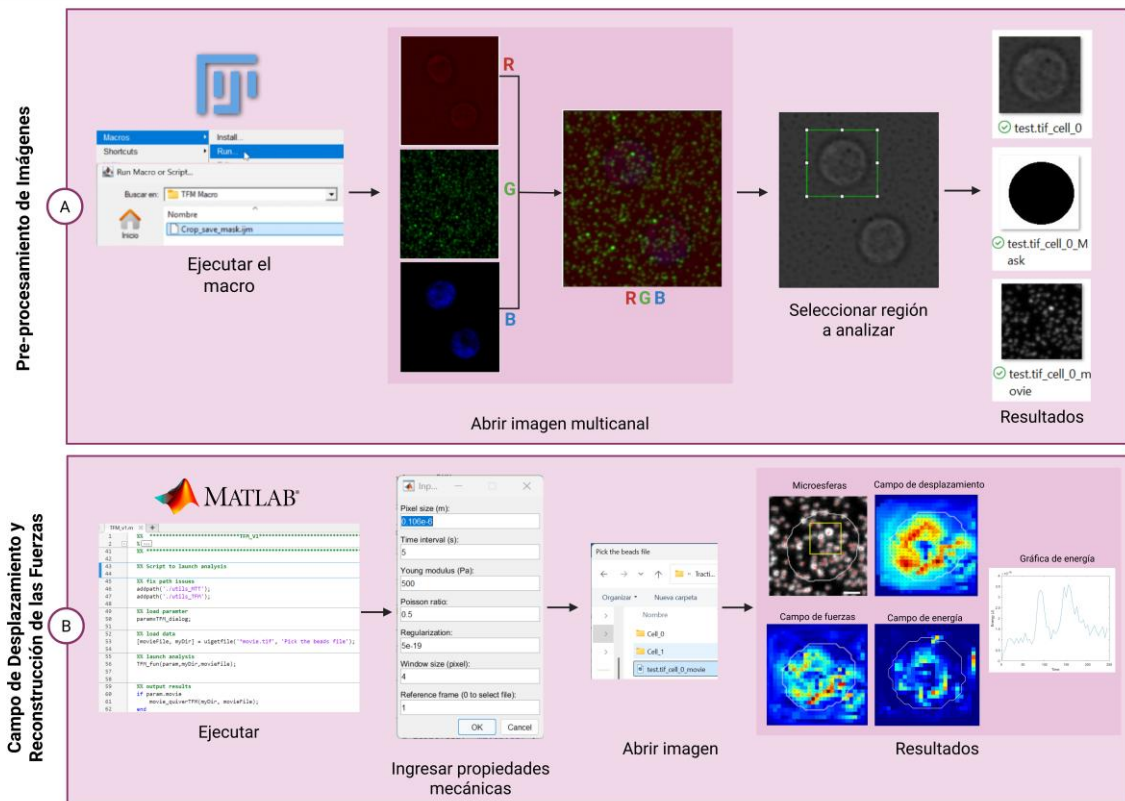
Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

- **Software 3: TFM v1 para MATLAB**

Para realizar el análisis de microscopía de fuerza de tracción en MATLAB, se debe descargar los archivos que se encuentran en el repositorio público de GitHub [[https://github.com/MBPPIlab/TFM\\_v1](https://github.com/MBPPIlab/TFM_v1)]. Figura 36A, las imágenes deben ser multicanal adquiridas en un lapso de tiempo. Primeramente, se procesa la imagen en Fiji/ImageJ utilizando el macro `Crop_Save_Mask.ijm`. Por medio de esta, se selecciona manualmente la región de la imagen que se va a analizar en MATLAB. Figura 36B, se ejecuta el código fuente `TFM_v1.m`, y se abre un cuadro de diálogo

para ingresar los parámetros necesarios para el análisis. Se selecciona el archivo que se genera en ImageJ/Fiji y se procede a realizar el cálculo del desplazamiento de las microesferas y la reconstrucción de las fuerzas de tracción y se guardan automáticamente.

Figura 36. TFM mediante MATLAB



Creado en Biorender. Galarza, A. (2025)

# **CAPÍTULO IV**

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

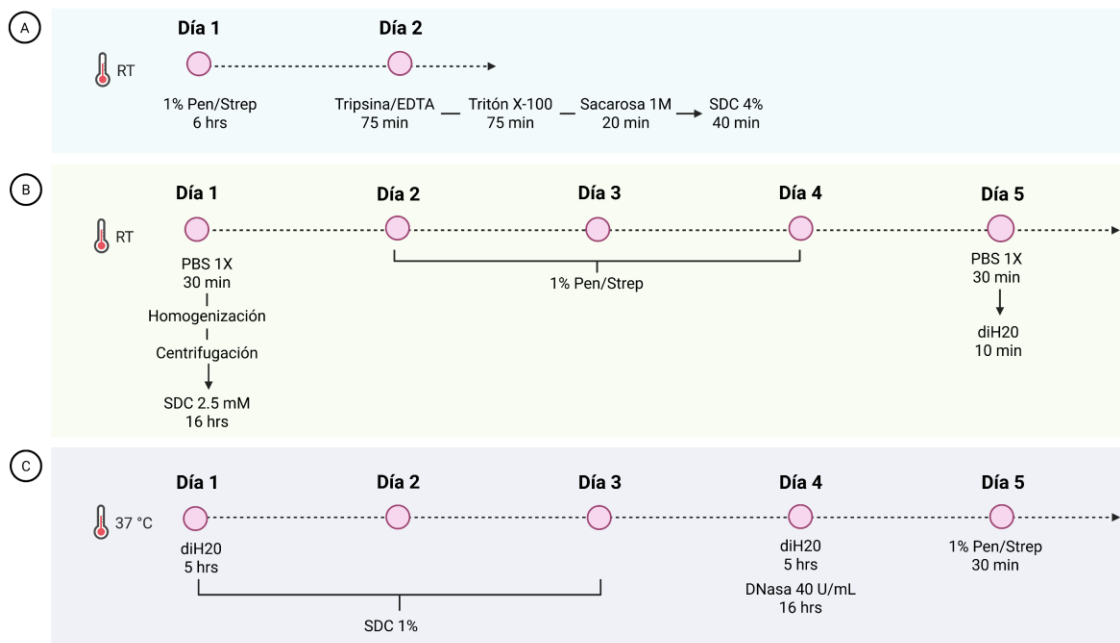
**OBJETIVO ESPECÍFICO N°1: Obtener matriz extracelular descelularizada, como estrategia in vitro para modelar ecosistemas extracelulares.**

### RESULTADOS

#### 5.1 Descelularización de Secciones de Cerebro Porcino

Los protocolos de descelularización empleados en esta investigación varían significativamente en duración, la cual marcó un impacto pronunciado en la pérdida de material al final de la descelularización. Se demuestra en la Figura 37, los tiempos de incubación por protocolo en conjunto con los reactivos y materiales utilizados.

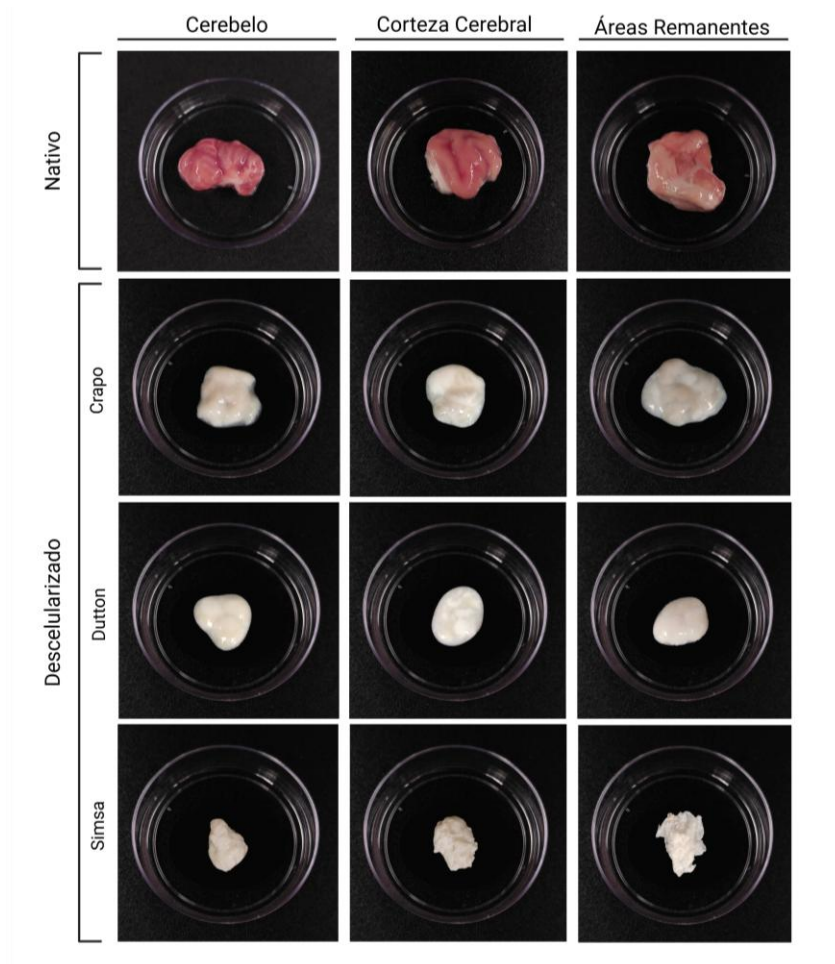
*Figura 37. Duración (en días) de Protocolos de Descelularización*



Se observaron cambios macroscópicos significativos durante la descelularización, con una pérdida de coloración rojiza a blanquecina, una reducción de tamaño, cambio de textura y el cambio de coloración en el líquido en el que estaban

sumergidos de un color crema a transparente, lo cual indica que hubo una remoción de contenido celular. Estos cambios se muestran en la Figura 38, en el cual en la fila superior se muestran los tejidos cerebrales nativos con una coloración rojiza asociada al contenido celular, mientras que en las filas inferiores se presentan los tejidos después de ser sometidos a distintos protocolos de descelularización, evidenciando la pérdida de coloración mostrando una apariencia blanquecina indicando remoción de contenido celular (DeQuach et al., 2011; Reginensi et al., 2025).

*Figura 38. Descelularización de Secciones de Cerebro Porcino*



- Protocolo A: Crapo et al., 2012

El protocolo adaptado de Crapo et al. (2012), con una duración de 2 días, y el uso de diversos agentes químicos y enzimáticos, mostró menor pérdida de masa en comparación con los demás protocolos utilizados en nuestro trabajo. El cerebelo presentó una pérdida de masa de 64.5% en el hemisferio derecho y 71.4% en el izquierdo. En la corteza cerebral, la pérdida fue de 73.5% en el hemisferio derecho y 32.7% en el izquierdo. Finalmente, el tronco encefálico mostró pérdidas menores, de 24.6% en el hemisferio derecho y 17.3% en el izquierdo, mostrado en la Tabla 3.

*Tabla 3. Pérdida de Masa en Protocolo de Descelularización A*

| Sección           | Hemisferio | Peso inicial | Peso final | Porcentaje de pérdida de masa |
|-------------------|------------|--------------|------------|-------------------------------|
| Corteza Cerebral  | Derecho    | 4.37 g       | 1.16 g     | 73.49 %                       |
|                   | Izquierdo  | 5.54 g       | 3.73 g     | 32.68 %                       |
| Cerebelo          | Derecho    | 3.74 g       | 1.33 g     | 64.50 %                       |
|                   | Izquierdo  | 5.37 g       | 1.53 g     | 71.44 %                       |
| Tronco Encefálico | Derecho    | 4.86 g       | 3.35 g     | 24.60 %                       |
|                   | Izquierdo  | 5.37 g       | 4.45 g     | 17.27 %                       |

- Protocolo B: Sackett et al., 2018

El protocolo adaptado de Sackett et al. (2018), incluyó dos tratamientos físicos además de agitación, siendo una homogenización y dos ciclos de centrifugación. Este protocolo de descelularización mostró que el cerebelo mostró la mayor pérdida de masa, con un 91.8% en el hemisferio derecho y 73.1% en el izquierdo. La corteza cerebral presentó pérdidas de 78.9% en el hemisferio derecho y 61.0%

en el izquierdo, mientras que el tronco encefálico mostró reducciones menores, de 63.2% y 60.8%, respectivamente, mostrada en la Tabla 4.

*Tabla 4. Pérdida de Masa en Protocolo de Descelularización B*

| Sección           | Hemisferio | Peso inicial | Peso final | Porcentaje de pérdida de masa |
|-------------------|------------|--------------|------------|-------------------------------|
| Corteza Cerebral  | Derecho    | 5.515 g      | 1.162 g    | 78.93 %                       |
|                   | Izquierdo  | 7.356 g      | 2.872 g    | 60.95 %                       |
| Cerebelo          | Derecho    | 5.14 g       | 0.420 g    | 91.82 %                       |
|                   | Izquierdo  | 6.258 g      | 1.683 g    | 73.10 %                       |
| Tronco Encefálico | Derecho    | 5.367 g      | 1.977 g    | 63.16 %                       |
|                   | Izquierdo  | 6.449 g      | 2.529 g    | 60.78 %                       |

- Protocolo C: Simsa et al., 2021

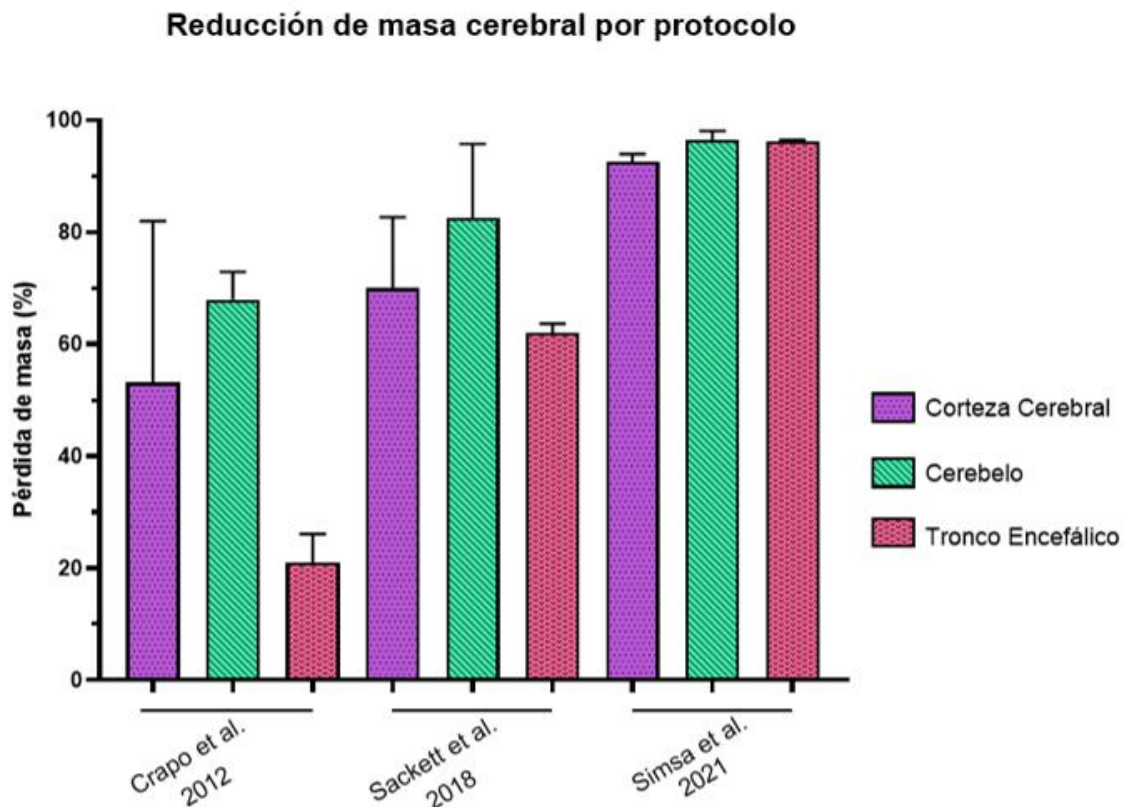
El protocolo adaptado de Simsa et al. (2021), basado en el uso del detergente SDC 1% durante 3 días, condujo a una reducción significativa de la masa total del cerebro nativo, representando aproximadamente superior del 93% de pérdida, con valores específicos por región de 93.47% en cerebelo, 97.59% en corteza cerebral y 95.9% en tronco encefálico, mostrada en la Tabla 5.

*Tabla 5. Pérdida de Masa en Protocolo de Descelularización C*

| Sección           | Hemisferio | Peso inicial | Peso final | Porcentaje de pérdida de masa |
|-------------------|------------|--------------|------------|-------------------------------|
| Cerebelo          | Completo   | 12.206 g     | 0.796 g    | 93.47 %                       |
| Corteza Cerebral  | Completo   | 36.033 g     | 0.867 g    | 97.59 %                       |
| Tronco Encefálico | Completo   | 26.492 g     | 1.082 g    | 95.9 %                        |

En conjunto, los resultados evidencian que los protocolos que utilizan agentes más agresivos como SDC, SDS y que tienen una duración de más tiempo correspondientes al protocolo B y C, producen mayores pérdidas de masa en comparación con protocolos que tienen menor tiempo de descelularización correspondientes al protocolo A, conservando mayor peso al final del procedimiento Gráfica 1.

Gráfica 1. Reducción de Masa Cerebral por Protocolo de Descelularización

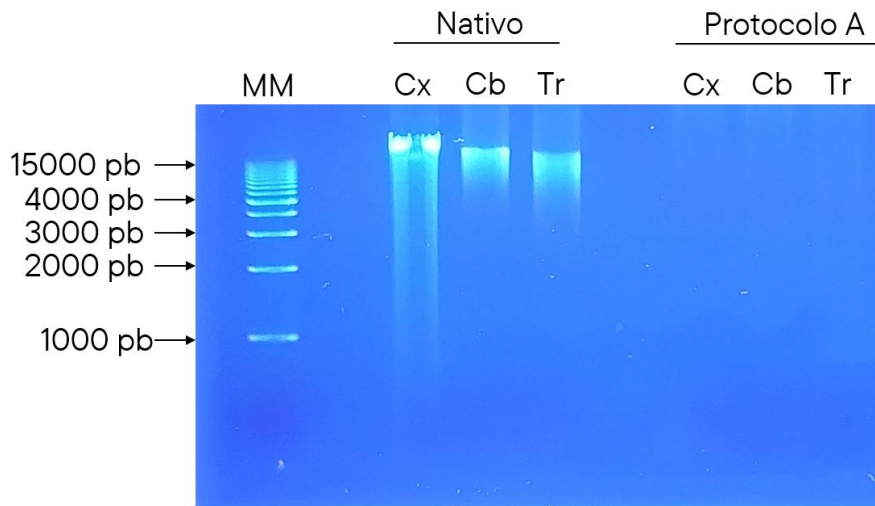


## 5.2 Cuantificación de ADN de dbECM

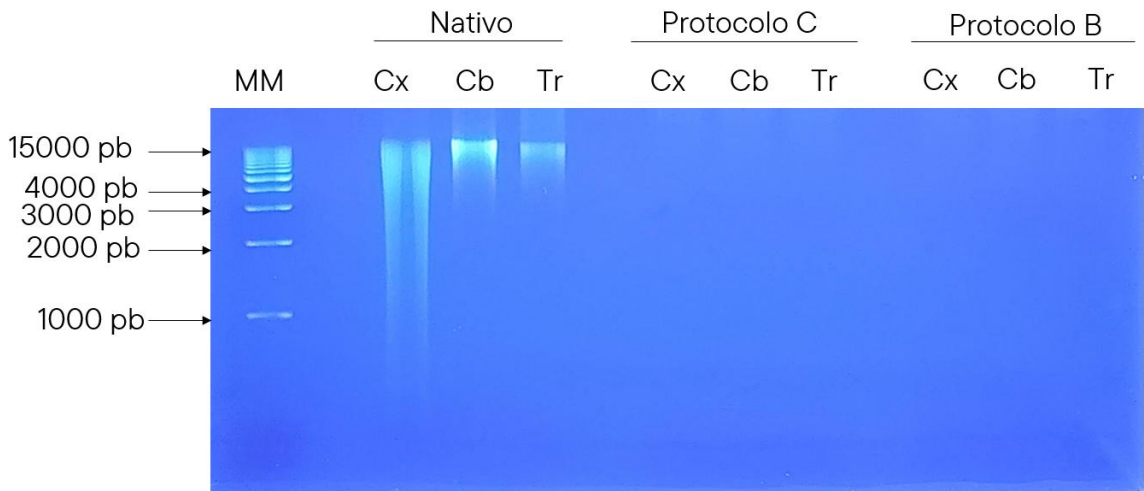
Tras la descelularización, se realizó la cuantificación del ADN residual para evaluar la eficacia del proceso de descelularización por protocolo. Se realizó una electroforesis de gel de agarosa para observar presencia de ADN en las muestras nativas y descelularizadas basadas en distintos protocolos, de distintas regiones

cerebrales: corteza cerebral (Cx), cerebelo (Cb) y tronco encefálico (Tr). Las muestras nativas indican una gran presencia de ADN de alto peso molecular, ya que mantiene el contenido genético original. Mientras que la muestra descelsularizada del protocolo A, encontrados en la Figura 39, y los protocolos B y C, encontrados en la Figura 40, no mostraron bandas en las que indiquen que mantuvieron contenido de ADN, lo que nos sugiere que los protocolos de descelsularización fueron efectivos en la eliminación de contenido celular.

*Figura 39. Gel de Agarosa (Protocolo A)*

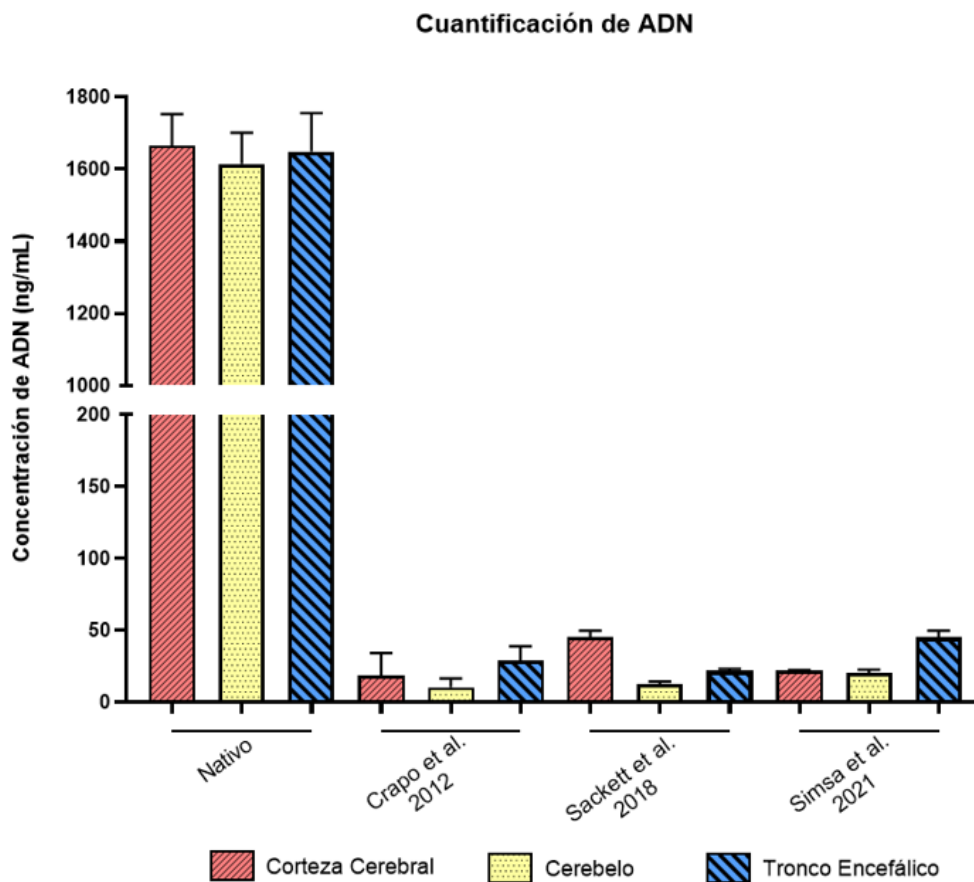


*Figura 40. Gel de Agarosa (Protocolos B y C)*



La cuantificación de ADN mediante el ensayo PicoGreen mostró una disminución significativa del contenido de ADN tras la descelularización en comparación con las muestras nativas ( $\approx 1600$  ng/mL). Los cuatro protocolos evaluados lograron una reducción superior al 95% del ADN total. Entre ellos, los protocolos A y B presentaron las menores concentraciones residuales, lo que sugiere una eliminación más eficiente del material nuclear. Gráfica 2. Las diferencias entre regiones (corteza, cerebelo y tronco encefálico) fueron leves, aunque el tronco mostró valores ligeramente más altos, posiblemente asociados a su estructura tisular más densa. En conjunto, los resultados confirman la efectividad de los procesos de descelularización empleados.

Gráfica 2. Cuantificación de ADN mediante el Ensayo de PicoGreen



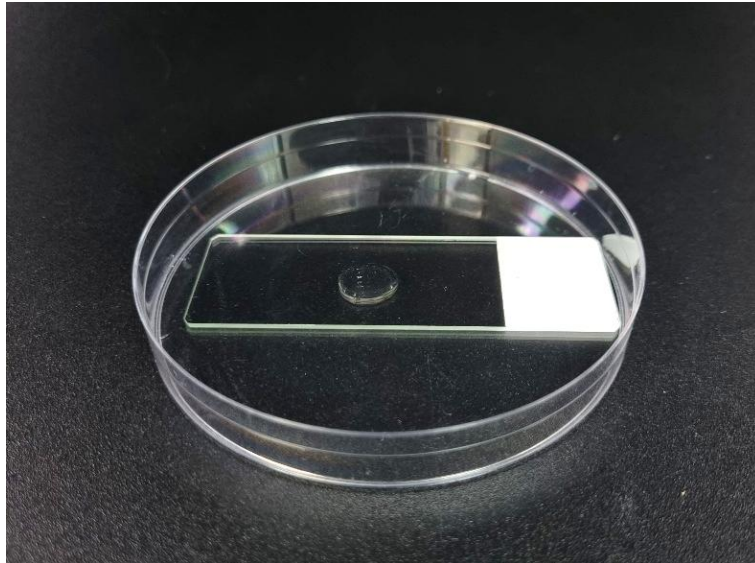
**OBJETIVO ESPECÍFICO N°2: Establecer la fabricación de sustratos de poliacrilamida para el análisis de la distribución de fuerzas celulares mediante microscopía de fuerza de tracción in silico, aplicando distintas herramientas computacionales.**

### **5.3 Gel de Poliacrilamida (PA)**

Los geles de poliacrilamida (PA) fueron preparadas siguiendo las concentraciones de gel de rigidez variada basada en el trabajo de Barber-Pérez (2019). Para el mismo, se mezcló acrilamida al 40% (monómero) con bis al 2% (agente reticulante). Luego, al agregar el persulfato de amonio (APS) al 10% se inició el proceso de polimerización y se aceleró el proceso al agregar tetrametiletilendiamina (TEMED). Esta mezcla fue colocada entre un portaobjeto tratado con una solución silanizante lo que permite la adherencia (Morillo & Castro, 2011), y encima, se colocó un cubreobjeto tratado con silicona comercial Rain-X® (Wong et al., 2014) para aplastar la solución.

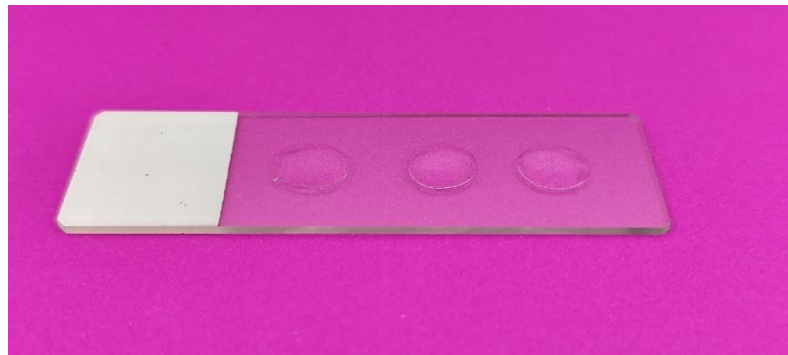
En la Figura 41, se muestra el sistema con la técnica denominada “sándwich”, para la polimerización de los geles de poliacrilamida, donde el gel se encuentra entre el portaobjeto silanizado y el cubreobjeto siliconizado. Este método resulta preferible para asegurar un espesor controlado y una superficie uniforme del hidrogel según Barber-Pérez (2019), Caliarì & Burdick, (2016) y Ribeiro et al., (2016).

*Figura 41. Método "Sándwich" para Polimerización de Gel de Poliacrilamida*



Obtuvimos geles de poliacrilamida con superficies planas y uniformes, las cuales pueden ser utilizadas para cultivo celular y observar la respuesta de las células con respecto a la rigidez de gel. En la Figura 42, se muestran tres geles de poliacrilamida con rigidez variada, siendo blanda ( $\sim 2\text{kPa}$ ), intermedia ( $\sim 22\text{kPa}$ ) y rígida ( $\sim 60\text{kPa}$ ) (izquierda a derecha, respectivamente).

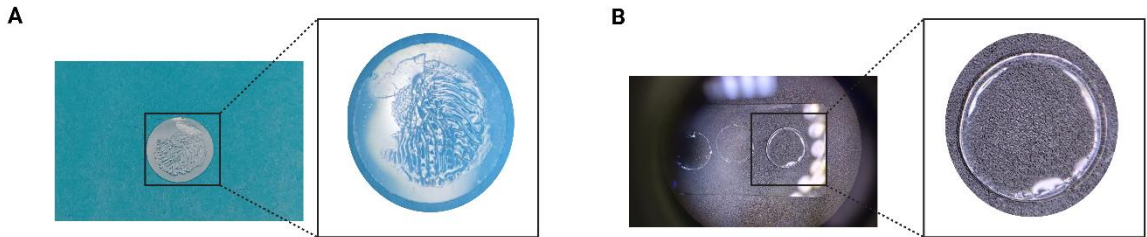
*Figura 42. Gel de Poliacrilamida de Rigidez Variada*



Durante el procedimiento, nos encontramos con ciertas dificultades en donde se observaron desprendimientos parciales del gel de poliacrilamida. Esto es evidente en la Figura 43A, se puede ver el desprendimiento del gel de poliacrilamida, la

cual, quedó adherido tanto en el cubreobjeto siliconizado como en el portaobjeto silanizado, Figura 43B, se puede ver un gel de poliacrilamida completamente polimerizado, con una superficie uniforme y bordes completos.

*Figura 43. Formación de Gel de Poliacrilamida al retiro de Cubreobjeto*

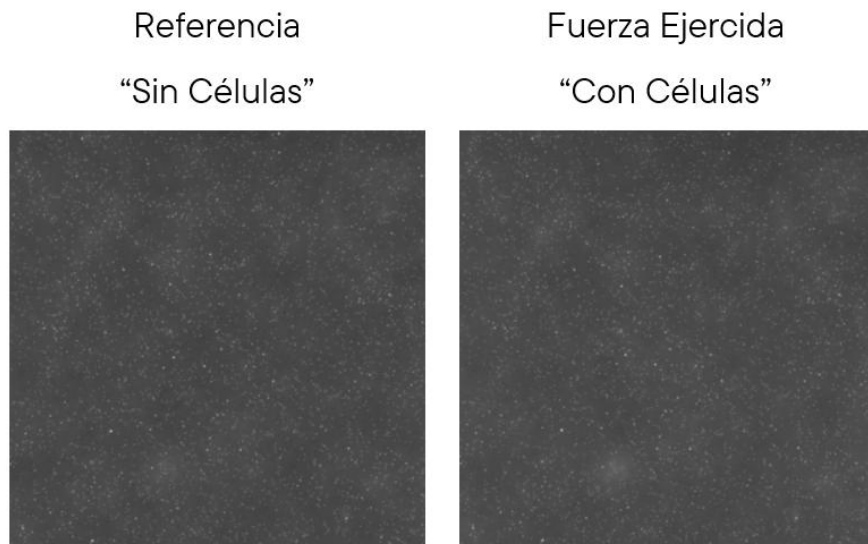


#### **5.4 Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM)**

- Software 1: ImageJ Plugins

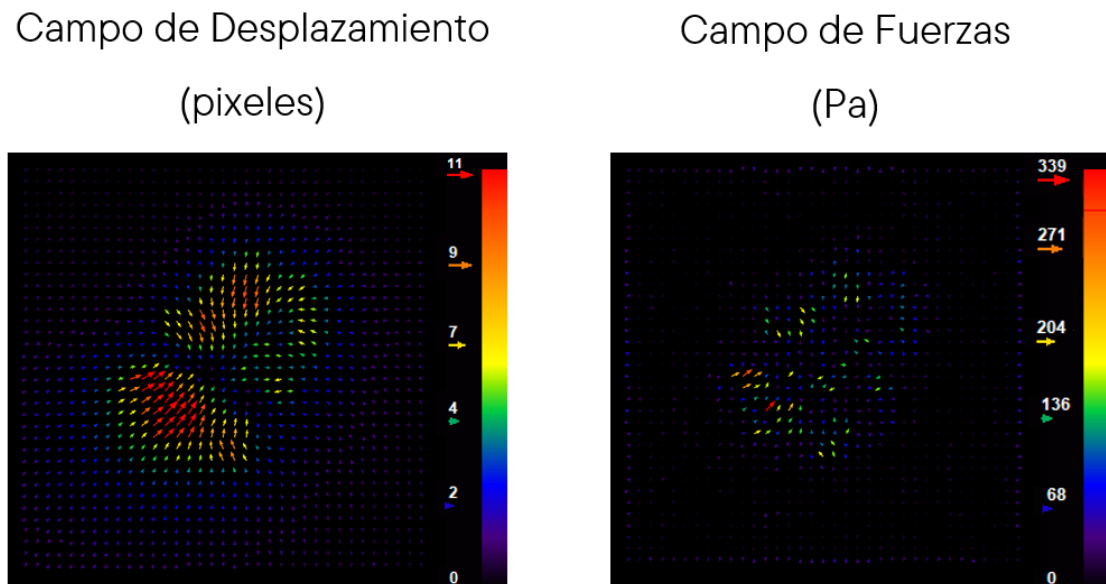
Para el primer software, utilizamos la imagen de prueba dada por Qingzong, 2011, mostrada en la Figura 44. Esta imagen se apila en ImageJ, para luego utilizar el plugin PIV iterative de correlación cruzada para realizar el campo de vectores del desplazamiento de las microesferas, para esto utilizamos múltiples ventanas de interrogación (PIV1: 128 pixeles, PIV2: 64 pixeles y PIV3: 32 pixeles), dando como resultado un desplazamiento mínimo de las microesferas en pixeles con valor a 0 indicado de color negro, y un desplazamiento máximo de las microesferas en pixeles de 11 con un color rojo. A partir de este análisis, se procedió a ejecutar el plugin FTTC para realizar el campo de vectores de la reconstrucción de las fuerzas en Pa, donde la fuerza va desde los 0 Pa hasta una fuerza de 339 Pa Figura 45.

Figura 44. Imagen de Microesferas



Fuente: Qingzong, 2011

Figura 45. Campo de Desplazamiento (píxeles) y Campo de Fuerzas (Pa) mediante ImageJ

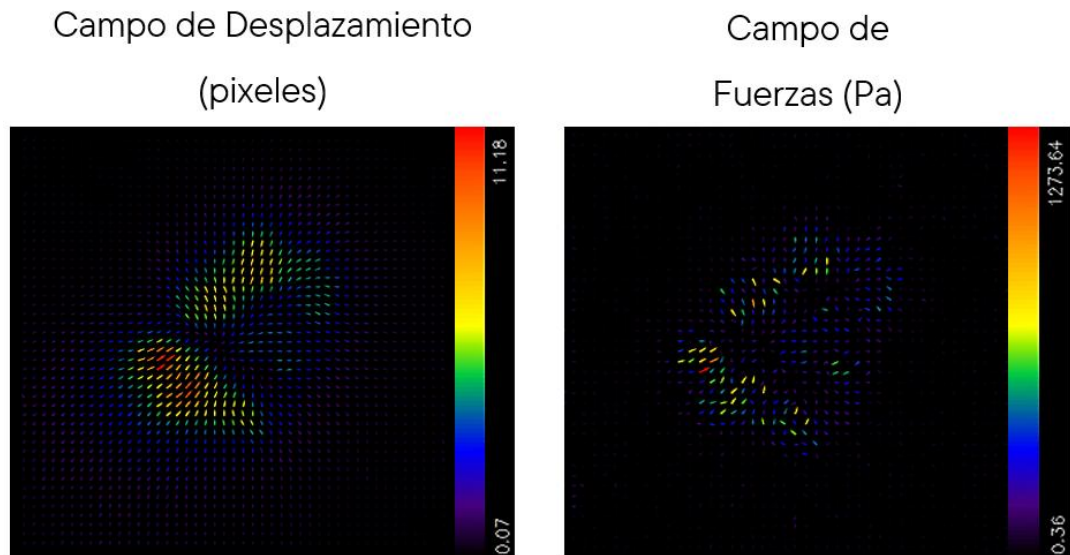


- Software 2: pyFTTC para Python

Para el segundo software, realizamos una prueba inicial utilizando igualmente con las imágenes de las microesferas utilizada para el software de ImageJ/Fiji

(Qingzong, 2011). Esta medida fue realizada por el artículo fuente del código, M. Zhang et al. (2024), como control. Se ingresó la ubicación de la carpeta donde se encuentra la imagen sin célula, se ingresó la imagen con fuerza ejercida por separado y se ejecutó el código. Pasado unos segundos, se guardaron los resultados en una carpeta, como se muestra en la , se generó un campo de vectores del desplazamiento de las microesferas en pixeles en donde el desplazamiento menor es del 0.07 pixel, mientras que el mayor desplazamiento fue de 11.18 pixeles mostrado de color rojo. Adicionalmente, se generó el campo de fuerzas en Pa, donde la fuerza menor registrada fue de 0.36 Pa mientras que la fuerza máxima fue de 1273.64 Pa Figura 46.

*Figura 46. Campo de Desplazamiento (pixeles) y Campo de Fuerzas (Pa) mediante Python*

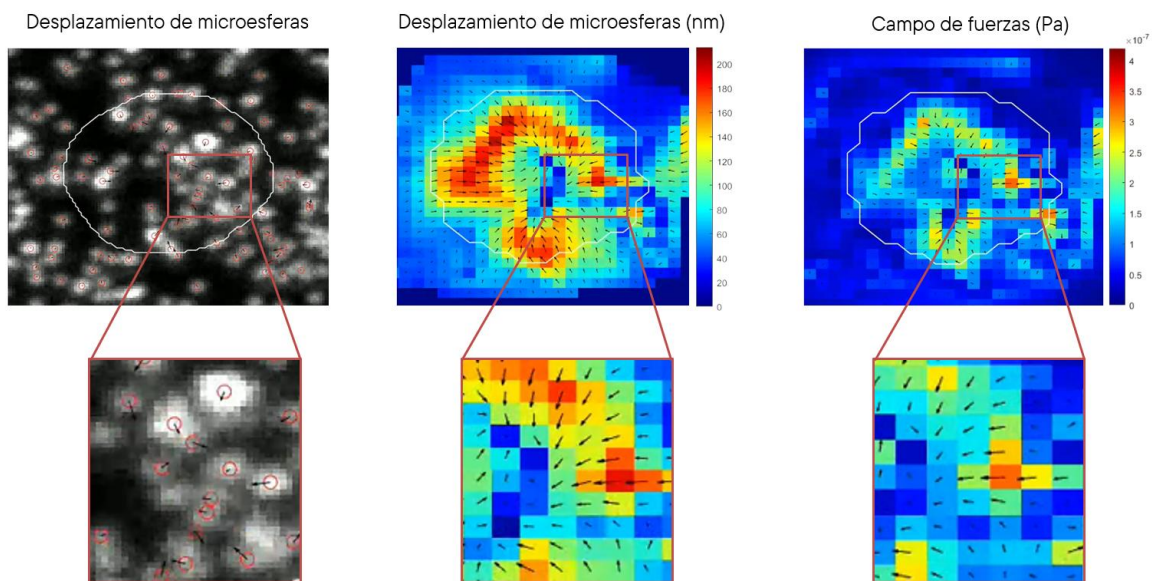


- Software 3: TFM v1 para MATLAB

Para el tercer software se utilizó la imagen de prueba dada por Kumari et al. (2020). Esta imagen es multicanal que contiene imagen de las células, las microesferas y de la máscara de las células, tomadas en intervalos de tiempo (frames). Primeramente, se procesó esta imagen por ImageJ/Fiji para delimitar la región a analizar en MATLAB. Después, se ejecutó el código fuente en MATLAB

y nos generó “películas” basadas en el movimiento de la célula en los tiempos en las que se adquirieron las imágenes y en cada una de ellas, se delimita la región de la célula. En la Figura 47, se observa que se generó el campo de desplazamiento de las microesferas indicando las microesferas identificadas por el código al igual que la dirección en las cuales fueron desplazadas. Estas flechas se van alargando o achicando en base a qué tanto se movió la microesfera. También se generó el desplazamiento de microesferas como un campo de vectores, en donde se aprecia un “heatmap”, la cual nos muestra en nanómetros el desplazamiento total de las microesferas, siendo el mayor desplazamiento de 200nm, indicado de color rojo oscuro y, finalmente el campo de vectores de las fuerzas en Pa, donde nos delimita las fuerzas generadas por cada microesfera; es debido a esto que se aprecian valores tan pequeños de fuerzas. A diferencia del primer archivo generado, en estos dos últimos solo se observa una flecha indicando el desplazamiento de la microesfera, sin alargarse o achicarse dependiendo del desplazamiento.

**Figura 47. Campo de Desplazamiento (nm) y Campo de Fuerzas (Pa) mediante MATLAB**



## **DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

**OJETIVO ESPECÍFICO N°1: Obtener matriz extracelular descelularizada, como estrategia in vitro para modelar ecosistemas extracelulares.**

### **5.1 Descelularización de Cerebro Porcino**

La descelularización es un proceso esencial para el campo de ingeniería de tejidos, diseñado para eliminar contenido celular de un tejido u órgano específico, manteniendo la integridad de la matriz extracelular. Dado que la matriz extracelular descelularizada conserva componentes y estructura específica del tejido u órgano, se ha convertido en un foco de investigación clave en el campo de ingeniería tisular y biomedicina, como organoides, modelos de enfermedades y de transporte de fármacos, electrospinning, bioimpresión, reconstrucción y rehabilitación de tejidos y trasplante por medio de cultivo celular (Aguilera-Márquez et al., 2022; Axpe et al., 2020; Badylak, 2005; Geckil et al., 2010; Ghuman et al., 2018; Guo et al., 2024b; Heath, 2019; Hussey et al., 2018; Q. Li et al., 2022; T. Lin et al., 2018; Mase et al., 2010; Modo, 2019; Nelson et al., 2024; Politrón-Zepeda et al., 2024; Simsa et al., 2021; Vorotnikova et al., 2010; Xia et al., 2025; J. Yang et al., 2022; Yin et al., 2016; Zamponi et al., 2023).

Por lo tanto, resulta de suma importancia elegir técnicas de descelularización que logren: mantener la estructura de la matriz y remover suficiente material genético de la matriz, lo que nos asegura una efectiva descelularización del tejido. La selección de métodos de descelularización dependerá del tejido u órgano a trabajar y la aplicabilidad de este (Crapo et al., 2011).

Adicional a lo mencionado anteriormente, para la generación de un hidrogel a partir de una matriz extracelular descelularizada, es necesario mantener proteínas de la matriz para lograr la reconstitución de la matriz en forma de hidrogel (Turan Sorhun et al., 2023).

El cerebro porcino usualmente es seleccionado para realizar estudios en el campo de la neurociencia, debido a su similitud en tamaño, composición y desarrollo en comparación al cerebro humano (Sauleau et al., 2009). Aunque la utilización de tejido cerebral ha sido poco explorada, recientemente su aplicación a aumentado para estudios de regeneración y degeneración cerebral (Crapo et al., 2012; DeQuach et al., 2011; Diamond, 2021; Hong et al., 2020; Le et al., 2024; T. Lin et al., 2018; Reginensi et al., 2025; Simsa et al., 2021; Xia et al., 2025)

En nuestro trabajo utilizamos cuatro protocolos de descelularización para cerebro porcino, las cuales integran diversas técnicas y reactivos de descelularización para asegurar una remoción de contenido celular al igual que mantener la integridad de este.

- Protocolo A: Crapo et al., 2012

Observamos que para el protocolo adaptado de Crapo et al. (2012), tiene una duración de dos días, en el cual el primer día se basa solo en un lavado inicial y en el último día se agregan diferentes detergentes químicos. Este método nos permitió mayor conservación de material al final del protocolo, beneficioso para aplicaciones que requieren mantener mayor material. Estos resultados se alinean al trabajo de Reginensi et al. (2020), en el cual comparó un protocolo de descelularización de 4 días con el de Crapo et al. (2012), donde hubo menor pérdida de material en el protocolo de poca duración (2 días) en comparación con el protocolo de mayor duración (4 días) (Reginensi et al., 2020).

- Protocolo B: Sackett et al., 2018

El protocolo adaptado de Sackett et al. (2018) se distingue por realizar técnicas físicas de homogenización y centrifugación, la cual ha sido utilizado en estudios de tejido adiposo (Choi et al., 2012), páncreas (Sackett et al., 2018) y cerebro (Turan Sorhun et al., 2023). Estas aproximaciones, aunque eficaces para la disrupción celular, se han asociado con la pérdida significativa de

glucosaminoglicanos (GAGs) y proteínas estructurales, lo que puede afectar la masa residual (Choi et al., 2012; Mendibil et al., 2020).

La arquitectura de la matriz extracelular utilizando la técnica de homogenización dependerá de la intensidad y la duración de la homogenización. Según Sackett et al. (2018), reportan que la inclusión de la homogenización mejoró significativamente la eliminación de lípidos, al igual que Y. C. Choi et al. (2012). En nuestro trabajo, no se realizó una prueba histológica para determinar si hubo efectivamente una eliminación de lípidos, por lo tanto, resulta complicado poder comparar nuestros resultados con trabajos que han realizado este paso. El porcentaje residual del cerebelo perteneciente al hemisferio derecho fue de 8.18%, siendo similar a los resultados reportados por Y. C. Choi et al. (2012), obteniendo un porcentaje residual del 8% y 10% de la masa tisular original, dependiendo de la fuente tisular específica (Y. C. Choi et al., 2012). Mientras que las otras regiones presentaron un porcentaje residual superior, comprendiendo un 21% a 39%, lo que nos demuestra que la intensidad, duración de homogenización y el tejido utilizado, puede variar el porcentaje residual final.

- Protocolo C: Simsa et al., 2021

El protocolo adaptado de Simsa et al. (2021), mostró una reducción significativa de la masa total del cerebro nativo, similarmente en el trabajo de Simsa et al. (2021), donde realizaron una descelularización comenzando con 400 g de cerebro porcino, y reportaron una disminución aproximada del 98.7% del peso total del cerebro nativo después de la descelularización, resultando con un peso final de  $6.21 \pm 1.59$  g. Este protocolo de descelularización se basa en el uso del detergente químico SDC al 1%; este es un detergente iónico fuerte que si está a una concentración superior al 4% puede destruir la integridad estructural del tejido a trabajar (Akbari Zahmati et al., 2017). Adicionalmente, los protocolos que involucren el uso de este detergente deben ser seguido con agentes como DNasa para reducir la aglutinación de ADN en la superficie del tejido (Moffat et al., 2022b),

por lo tanto, se trató con DNasa I durante 24 horas para remover fragmentos de ADN residuales.

## **5.2 Cuantificación de ADN**

Nuestros resultados en la electroforesis en gel de agarosa mostraron una efectiva remoción del ADN en tejidos cerebrales porcinos descelularizados independientemente de los protocolos utilizados. Los tejidos nativos exhibieron bandas evidentes correspondientes a fragmentos de ADN de alto peso molecular, mientras que en los tejidos descelularizados no se observaron bandas visibles, indicando una fragmentación significativa y una reducción en el tamaño del ADN residual.

Estos resultados concuerdan con reportes previos, Crapo et al. (2012) no observaron bandas en los geles de agarosa de muestras de sistema nervioso central porcino descelularizadas, indicando que el tamaño máximo de los fragmentos de ADN residual no superó los 200 pares de bases (pb), lo que es un indicador aceptado para la seguridad y biocompatibilidad del andamio.

De manera similar, Reginensi et al. (2025) confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa que, en las secciones de corteza cerebral, cerebelo y áreas remanentes descelularizadas, las bandas de ADN no están presentes en el gel, demostrando que el ADN se encontraba fragmentado con tamaños inferiores a 200 pb, mientras que los tejidos nativos mantenían un ADN de alta longitud.

Además, Turan Sorhun et al. (2023) reportó que en sus estudios de diferentes protocolos de descelularización aplicados a tejido porcino, el protocolo adaptado de Simsa et al. (2021) no mostraron bandas detectables de ADN en el gel, mientras que el protocolo adaptado de Sackett et al. (2018) sí tuvo una presencia visible en el gel de agarosa, evaluado posteriormente mediante un ensayo cuantitativo (Picogreen) que aún quedaba ADN residual en este último.

El tejido nativo mostró, como era esperado, concentraciones muy elevadas de ADN en todas las regiones evaluadas (corteza, cerebelo y tronco encefálico), superando ampliamente los 1600 ng/mL. Esto refleja la integridad y abundancia de ADN en muestras frescas.

En contraste, las muestras descelularizadas presentaron concentraciones residuales de ADN inferiores a 50 ng/mL en la mayoría de los casos, evidenciando la eficacia de los métodos utilizados para eliminar material nuclear. Estos resultados son consistentes con observaciones reportadas en la literatura, como el estudio de Turan Sorhun (2023), donde también se documentó que ciertos protocolos de descelularización pueden dejar cantidades residuales de ADN más elevadas, detectadas mediante PicoGreen, incluso cuando el gel de agarosa no mostró bandas evidentes. Esto subraya la importancia de combinar métodos cualitativos (gel de agarosa) y cuantitativos (PicoGreen) para una evaluación precisa de la descelularización.

Según Crapo et al., 2011, existen tres criterios mínimos que garantiza que la descelularización ha sido efectiva: 1) Menos de 50 ng de ADN bicatenario residual por mg de peso seco de ECM en el caso de Picogreen, 2) < longitud del fragmento de ADN de 200 pares de bases (bp) en el caso de gel de Agarosa (Crapo et al., 2011).

**OBJETIVO ESPECÍFICO N°2: Establecer la fabricación de sustratos de poliacrilamida para el análisis de la distribución de fuerzas celulares mediante microscopía de fuerza de tracción in silico, aplicando distintas herramientas computacionales.**

### **5.3 Gel de Poliacrilamida**

La rigidez de gel de poliacrilamida es determinada por la concentración relativa de la acrilamida y bis-acrilamida, donde se forman enlaces cruzados y genera una red polimérica. Si aumentamos la concentración de bis-acrilamida, se incrementa

el grado de reticulación, obteniendo una mayor rigidez del gel (Barber-Pérez, 2019; Kumai et al., 2021; Tse & Engler, 2010).

Usualmente, para determinar el módulo de elasticidad o rigidez de los geles de poliacrilamida fabricados, se emplean técnicas como la microscopía de fuerza atómica (AFM). Esto se debe a que los geles de poliacrilamida son ampliamente utilizados como sustratos en estudios celulares por ser biocompatibles, con una rigidez ajustable de manera precisa y poseer propiedades mecánicas que imitan el ambiente fisiológico celular (Kumai, 2021). La AFM es especialmente valiosa en este contexto por su alta resolución nanométrica y su capacidad para medir de forma directa y localizada el módulo de elasticidad de materiales blandos, como los geles de poliacrilamida (Gadegaard 2006, Lee 2018, Garcia Herrera 2023, Reserva 2023, Ahmine, 2024).

En este trabajo, nos basamos en una tabla de concentraciones de acrilamida y bis acrilamida para obtener una rigidez específica de gel, establecida en el trabajo de Barber-Pérez (2019), la cual utilizó la técnica de microscopía de fuerza atómica, para determinar la rigidez del gel generado. Aunque no realizamos una medición directa de la rigidez del gel, hicimos una prueba de indentación utilizando una aguja en los tubos donde se realizaron las distintas mezclas de gel y notamos que la solución perteneciente al gel más rígido (~60kPa) mostró mayor resistencia al momento de pinchar el gel, mientras que el gel más blando (~2kPa) presentó el efecto contrario.

El desprendimiento parcial del gel de poliacrilamida puede deberse a una polimerización incompleta o parcial del gel, afectando la estabilidad del gel al momento de retirar el cubreobjeto siliconizado. Otra razón involucra el paso de los tratamientos de las superficies de vidrio. Tratamientos incorrectos, pueden generar discontinuidades en la funcionalización, facilitando el despegue del gel (Barber-Pérez, 2019; Morillo & Castro, 2011). Mientras que en el paso de la

limpieza previa de los cubreobjetos si hay alguna presencia de residuos o contaminantes puede comprometer la adhesión del gel durante la polimerización (Wong et al., 2014). Pudimos observar que el tratamiento de siliconización no estaba realizando la función de repeler el gel, por lo tanto, el gel quedaba adherido tanto en el portaobjeto como en el cubreobjeto. Según las recomendaciones del fabricante del silicón Rain-X®, garantiza su efectividad en un plazo de 1 a 2 años, siempre y cuando esté almacenado en un lugar bien ventilado, fresco, protegido de la luz solar y el calor. Al inicio, el silicón estaba cumpliendo con la función de repeler, pero al momento de sobrepasar el plazo recomendado por el fabricante al igual que al estar expuesto a condiciones de calor, comprometió el desempeño y funcionalidad de este.

Hay que señalar que, en este trabajo, no se llevaron a cabo experimentos de cultivo celular, debido a la limitante de no contar con las microesferas fluorescentes, insumo esencial para cumplir con el propósito del trabajo de investigación. No obstante, se realizó la estandarización del protocolo para la generación de los sustratos basados en gel de poliacrilamida de rigidez variada establecida.

#### **5.4 Microscopía de Fuerza de Tracción**

- Software 1: ImageJ Plugins

En la Figura 48, se presentan los resultados obtenidos del análisis de microscopía de fuerza de tracción utilizando el plugin desarrollado por Qingzong, 2011 por medio del software ImageJ/Fiji. En Figura 48A, se muestran los resultados obtenidos por el autor (Qingzong, 2011) disponible en su repositorio, y en Figura 48B, el análisis realizado en este trabajo.

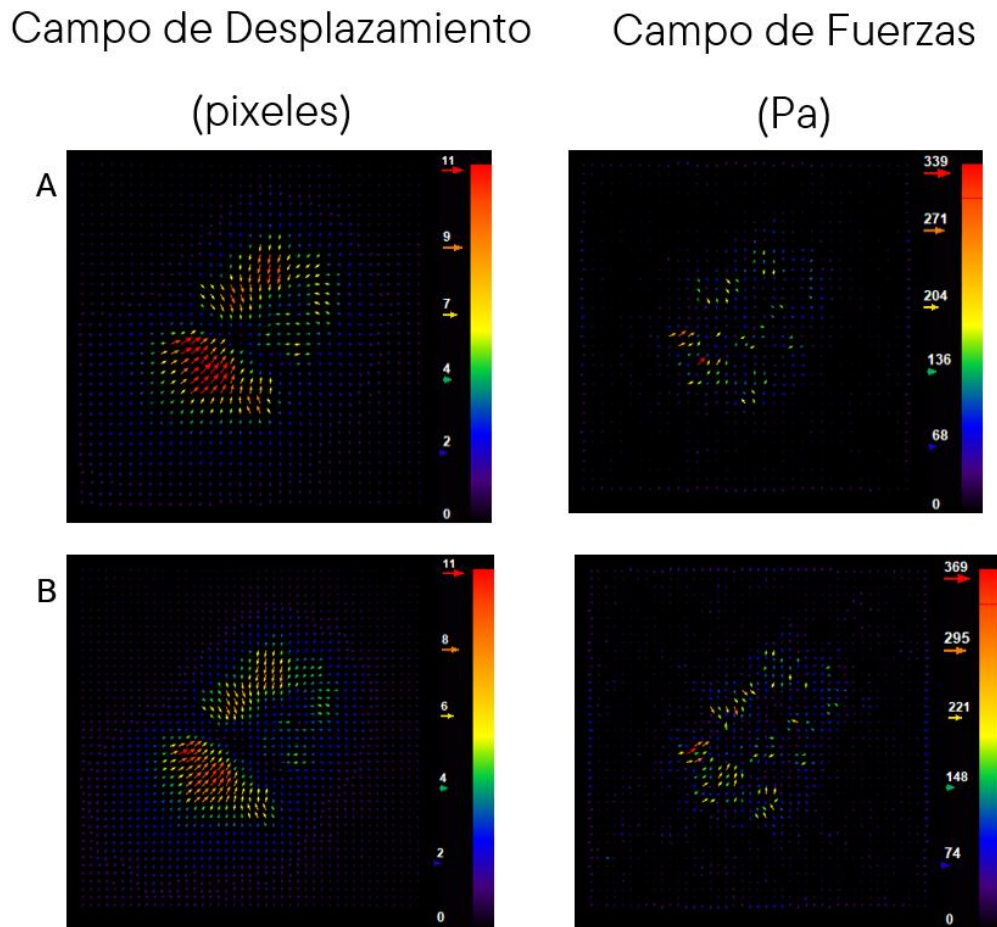
En ambas imágenes, se observa un patrón de desplazamiento de microesferas y distribución de las fuerzas similares, donde las zonas con mayores magnitudes - representados con colores cálidos- se concentran en áreas específicas donde hay presencia de mayor tracción celular ejercida sobre el sustrato. Esto confirma que

el procesamiento del plugin se ejecutó correctamente y que el método de correlación cruzada permitió identificar las regiones de deformación de manera consistente.

En el campo de fuerzas, los análisis obtenidos en este trabajo resultaron en una magnitud de fuerzas máxima de 339 Pa, mientras que las obtenidas por el autor mostraron una magnitud de 369 Pa, evidenciando una diferencia entre magnitudes mínima de aproximadamente 8.8%. Esto sugiere una alta precisión en la estimación de fuerzas mediante el procedimiento automatizado del plugin FTTC.

Cabe resaltar que los valores en la barra de color se ajustan automáticamente al rango de las fuerzas detectadas, aunque puede ser ajustadas manualmente para mantener correspondencia con el autor. Finalmente, se observó una limitación en la configuración del módulo Young, donde solo nos permite ingresar tres valores predeterminados (460 Pa, 1500 Pa y 17 000 Pa). Esto limita la representación de la rigidez real del sustrato empleado.

Figura 48. Análisis de TFM obtenidos por ImageJ con los reportados por Qingzong, 2011



- Software 2: pyFTTC para Python

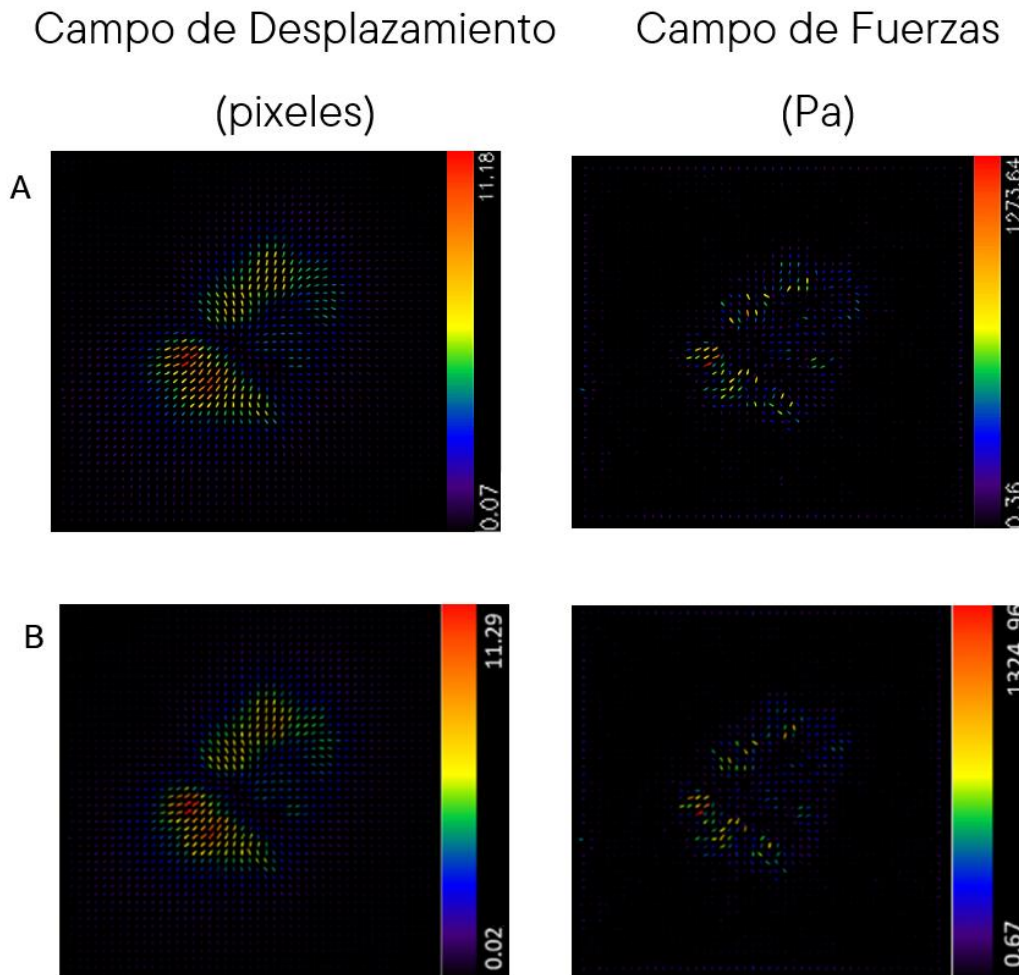
En la Figura 49, se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de microscopía de fuerza de tracción mediante la utilización de código Python desarrollado por M. Zhang et al. (2024). En la Figura 49A se muestran los resultados de referencia obtenidos por el autor M. Zhang et al. (2024), mientras que en la Figura 49B, se presentan los resultados obtenidos en este trabajo. En ambos casos, se observan patrones comparables de desplazamiento de microesferas y distribución de las fuerzas, evidenciando que la herramienta empleada también logra identificar correctamente las regiones de deformación inducidas por la tracción celular sobre el sustrato.

En el campo de desplazamiento, los vectores muestran una orientación y magnitud similar entre ambos análisis, donde las zonas con mayor desplazamiento (representadas por tonos cálidos) se concentran en áreas localizadas, lo que indica la presencia de una deformación direccional asociada a la contracción celular. Las magnitudes máximas registradas fueron de 11.18 píxeles en nuestros resultados, mientras que en literatura obtuvieron 11.29 píxeles, lo que representa una variación inferior al 1%, evidenciando una alta reproducibilidad del algoritmo de correlación cruzada empleado.

En el campo de fuerzas, las magnitudes máximas fueron de 1273.64 Pa en nuestros resultados y 1324.96 Pa en literatura. Mostrando una diferencia aproximada de ~3.9%, siendo un resultado directo de la diferencia de 0.11 píxeles en el desplazamiento máximo.

Al igual que en la herramienta basada en el uso de ImageJ/Fiji, en esta se puede realizar ajustes manuales en los valores en la barra de color, tanto para el campo de desplazamientos al igual que para el campo de las fuerzas ejercidas.

Figura 49. Análisis de TFM obtenidos por Python con los reportados por Zhang et al., 2024

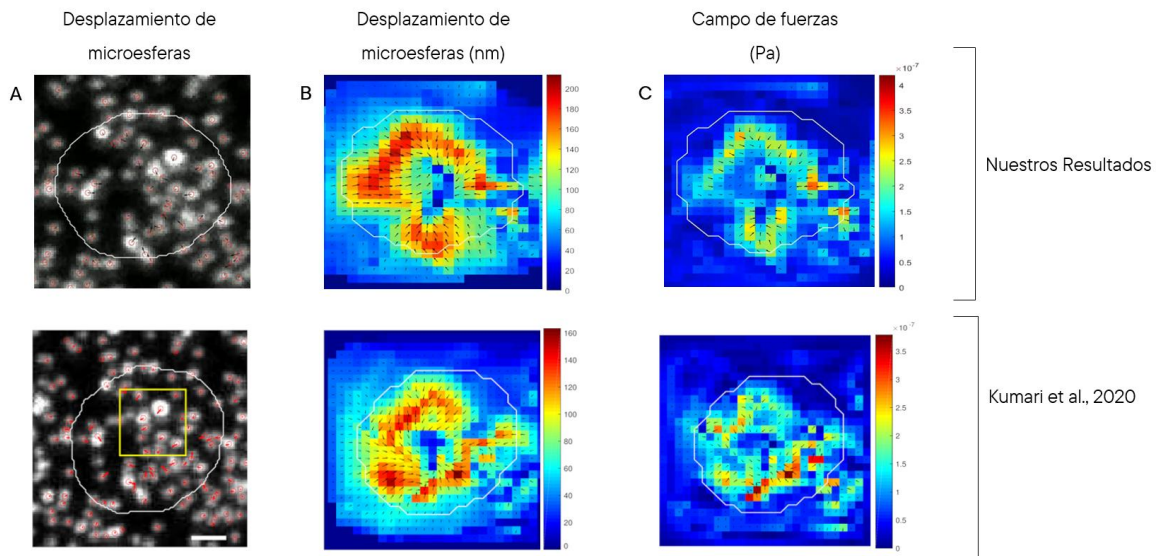


- Software 3: TFM v1 para MATLAB

Los resultados obtenidos se asemejan al análisis de TFM de Kumari et al. (2020). En la Figura 50, se comparan los campos de desplazamientos de las microesferas al igual que el campo de las fuerzas generadas. El patrón del desplazamiento de las microesferas en la Figura 50A es similar en ambos resultados, mostrando una tracción direccional ejercida en el sustrato. Sin embargo, en los mapas de desplazamientos en la Figura 50B, se observa que el máximo desplazamiento en nuestros resultados es de 200 nm, mientras que en el trabajo de (Kumari et al., 2020), el desplazamiento máximo es de 160 nm, mostrando en el “heatmap”

variaciones de intensidad de color que van de acuerdo con la barra de color. Lo mismo sucede para el campo de fuerzas en la Figura 50C, donde observamos una fuerza máxima de  $4 \times 10^{-7}$  Pa mientras que en el trabajo de (Kumari et al., 2020), es de  $3.5 \times 10^{-7}$  Pa. Obtuvimos pequeñas diferencias en nuestros resultados, sin embargo, los patrones son aproximados con el trabajo original demostrando la validez del análisis computacional implementado.

*Figura 50. Análisis de TFM obtenidos por MATLAB con los reportados por Kumari et al., 2020*



Como se muestra en la Tabla 6, los tres softwares empleados para el análisis de TFM presentan diferencias importantes en su enfoque metodológico, nivel de automatización y capacidades de procesamiento, lo que influye directamente en la reproducibilidad y precisión de los resultados obtenidos in silico. En términos generales, tanto ImageJ como pyFTTC se basan en métodos de correlación cruzada para el cálculo de desplazamientos, mientras que TFM\_v1 emplea PTV, lo que puede explicar algunas de las variaciones observadas en las magnitudes finales. Asimismo, los softwares difieren en el tipo de entrada aceptada y en su flexibilidad: ImageJ es más accesible para análisis rápidos, mientras que pyFTTC

y MATLAB permiten un mayor control sobre los parámetros numéricos y la posibilidad de automatizar el flujo de trabajo.

*Tabla 6. Comparación de Softwares para TFM (in silico)*

| Elementos                  | Software 1 TFM<br>Plugins  | Software 2<br>py_FTTC   | Software 3<br>TFM_v1                                |
|----------------------------|--|---|---|
| Software                   | ImageJ/Fiji  | Anaconda  | MATLAB  |
| Lenguaje                   | Java   | Python  | MATLAB  |
| Input                      | Dos imágenes apiladas (8-bits, 16-bits, 32-bits)                                       | Secuencia de Imágenes (8-bits, 16-bits, 32-bits)  | Secuencia de Imágenes multicanal (hyperstack)       |
| Alineamiento de Imágenes   | Plugin Template Matching   | Subpíxel (librería scikit-image)  | Alineación desde referencia                         |
| Análisis de Desplazamiento | PIV (correlación-cruzada)  | PIV (correlación-cruzada)   | PTV   |
| Análisis de Fuerzas        | Transformada de Fourier  | Transformada de Fourier   | Transformada de Fourier                             |
| Regularización             | $\lambda$ manual   | $\lambda$ manual (L2)   | $\lambda$ manual (Tikhonov)                         |
| Ventajas                   | Rápido, simple, accesible  | Análisis por batch de imágenes, GUI, filtros avanzados                                  | Análisis dinámico real, calcula energía             |
| Limitaciones               | Solo 2 imágenes, sin batch, configuración de regularización y módulo de Young limitada | Alta carga de parametrización, lo que puede ser abrumador para usuarios sin experiencia | Requiere de licencia de MATLAB, Imágenes multicanal |

Los resultados obtenidos en los diferentes softwares para TFM *in silico*, mostraron diferencias menores al 10% en magnitud máxima de fuerzas respecto al trabajo original, lo que evidencia la robustez y reproducibilidad de los métodos aplicados. Aunque este estudio se desarrolló en un entorno *in silico*, la concordancia entre los valores obtenidos y los reportados en literatura sugiere que las metodologías implementadas son suficientemente robustas para ser utilizadas en aplicaciones experimentales futuras.

Las magnitudes de fuerza observadas en nuestros resultados son coherentes con fuerzas típicas generadas por diversas líneas celulares como fibroblastos, células madre mesenquimales, células tumorales, entre otras (Betz et al., 2011; Dembo & Wang, 1999; Lekka et al., 2021; Mulligan et al., 2018; Munevar et al., 2001). Por lo tanto, aun tratándose de un estudio *in silico*, los valores reproducidos corresponden a comportamientos celulares típicos descritos experimentalmente.

En nuestro trabajo utilizamos el mismo módulo de elasticidad reportado en los protocolos del trabajo original con el fin de comparar directamente nuestros resultados con los descritos en la literatura. Tras implementar los softwares de análisis de TFM, nuestro siguiente paso es incorporar la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) para medir experimentalmente la rigidez de los geles de poliacrilamida generados en el laboratorio, basado en el trabajo de Barber-Pérez, 2019). Esto permitirá ingresar en el software valores reales de elasticidad obtenidos de nuestras propias muestras y, por lo tanto, calcular fuerzas celulares de forma más precisa. La medición directa de la rigidez mediante AFM es esencial para garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de los mapas de fuerza obtenidos en TFM (Joshi et al., 2022; Kumai et al., 2021; Lee et al., 2018; Reserva et al., 2023; Zachary Gautreau et al., 2006). Además, puede ser integrado para medir la elasticidad y la reología celular (Moeendarbary & Harris, 2014).

Además de AFM, resulta relevante considerar las pinzas ópticas como técnica complementaria para caracterizar mecánicamente los sustratos utilizados en TFM. Este método permite cuantificar fuerzas en el rango pico- a nanonewton mediante el uso de trampas ópticas que manipulan partículas micro- o nanométricas sobre el gel o unidas a componentes celulares (Neuman & Block, 2004). La combinación de estas técnicas, fortalece la precisión en la determinación de las propiedades mecánicas del sustrato y mejora la interpretación de las fuerzas generadas por las células, proporcionando un marco más completo para comprender los procesos de mecanotransducción (Bustamante et al., 2021; Català-Castro et al., 2021; Hu et al., 2022; Rodenburg et al., 2025; Stilgoe et al., 2024; H. Wang et al., 2022; Wu, 2023).

Como ya hemos visto, la microscopía de fuerza de tracción (TFM) es una técnica poderosa y ampliamente utilizada que nos permite cuantificar las fuerzas al registrar las deformaciones inducidas por las células sobre sustratos elásticos (De La Pena et al., 2021; Denisin et al., 2024; Gil-Redondo et al., 2023; Hur et al., 2020; Lekka et al., 2021; Mulligan et al., 2018; Style et al., 2014; Zanca et al., 2022). Su aplicación abarca sistemas 2D, 2.5D y 3D. En TFM 2D, las células se cultivan sobre geles elásticos y se cuantifican las fuerzas en el plano XY mediante el desplazamiento de marcadores incorporados en el sustrato. Este método, ampliamente estandarizado y apoyado por software robusto, presenta como principal limitación la imposibilidad de medir componentes de fuerza en el eje Z, restringiendo así el análisis a entornos bidimensionales (Apolinar-Fernández et al., 2025; del Álamo et al., 2013; Denisin et al., 2024; Gil-Redondo et al., 2023; Mustapha et al., 2022; Nguyen & Kilian, 2020; Polacheck & Chen, 2016; Ribeiro et al., 2016; Zanca et al., 2022; Y. Zhu et al., 2023).

Para resolver esta limitación surge la TFM 2.5D, en la cual se registran desplazamientos tanto en el plano como fuera de él, permitiendo estimar fuerzas normales ejercidas hacia arriba o hacia el interior del sustrato. Esta modalidad

ofrece un punto intermedio entre la simplicidad del análisis 2D y la complejidad mecánica del 3D (Apolinar-Fernández et al., 2025; Blumberg & Schwarz, 2022; H. Chen et al., 2024; Joshi et al., 2022; Krishnan et al., 2009; Mustapha et al., 2022; Nerger et al., 2017; Polacheck & Chen, 2016; Zanca et al., 2022). No obstante, en condiciones fisiológicas, las células existen inmersas en una MEC tridimensional, adoptando formas y comportamientos muy distintos a los observados en cultivos 2D. Esto ha impulsado el interés por medir fuerzas en sistemas verdaderamente tridimensionales, donde las células se encapsulan en hidrogeles para estudiar su comportamiento en un entorno más fisiológico, sin embargo, esta técnica presenta retos significativos debido al seguimiento volumétrico de marcadores, la complejidad mecánica inherente de las matrices biológicas y el elevado costo computacional (Apolinar-Fernández et al., 2025; Denisin et al., 2024; Joshi et al., 2022; Mustapha et al., 2022; Polacheck & Chen, 2016; Ribeiro et al., 2016).

Estudios recientes, como Yuan et al. (2023), en el cual utilizan un hidrogel sintético, pero altamente biomimético, basado en polímeros de poliisocianopéptidos (PIC), para investigar los efectos de la arquitectura fibrosa y la mecánica no lineal en las interacciones célula-matriz. En este trabajo, mostraron que las células pueden deformar y endurecer matrices fibrosas a diferentes escalas de tiempo a través de mecanismos independientes, siendo una respuesta rápida asociada al endurecimiento por deformación y una remodelación más lenta que modifica de manera duradera la arquitectura de la matriz (Yuan et al., 2023). Además, emplearon la técnica de TFM, mediante la cual las mediciones de desplazamiento en la matriz mostraron cómo las células fueron remodelando su entorno a lo largo del tiempo (Yuan et al., 2023). Mientras que en trabajos como la de Gershlak et al. (2013), demostraron que combinar geles sintéticos como poli(acrilamida) con distintas concentraciones de ECM descelularizada de corazón de rata en distintas etapas de desarrollo, nos permite estudiar simultáneamente la

influencia de la rigidez y la composición bioquímica en las tracciones celulares y la expresión de marcadores de diferenciación (Gershlak et al., 2013).

## CONCLUSIONES

Este trabajo permitió implementar estrategias iniciales integradas para el estudio del ecosistema extracelular desde distintas aproximaciones experimentales y computacionales. Se lograron implementar herramientas computacionales accesibles para la caracterización de la biomecánica celular, demostrando su potencial como biomarcador en estudios de la homeostasis celular.

Además, se obtuvieron geles de poliacrilamida de distinta rigidez, lo que demuestra la capacidad de variar y simular condiciones específicas, tanto normales como patológicas, para realizar estudios focalizados y relevantes al tejido biológico. Los protocolos establecidos para la descelularización de tejido cerebral fueron exitosos, alcanzando cantidades de material genético inferiores a los límites recomendados para procesos de regeneración celular, asegurando la calidad del andamiaje biológico.

Aunque la fabricación del hidrogel basado en matriz extracelular descelularizada aún está en proceso, este desafío refuerza la importancia de contar con un enfoque híbrido que combine técnicas experimentales con análisis computacionales, ampliando las posibilidades para futuras investigaciones y aplicaciones biomédicas.

## RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES

### Recomendaciones

- Para trabajos futuros, se sugiere incorporar técnicas de caracterización mecánica que nos permite validar de manera directa la rigidez del gel de poliacrilamida.
- Se recomienda asegurar la disponibilidad constante de insumos críticos, como microesferas fluorescentes y cerebros porcinos, de manera que se garantice la continuidad de los experimentos y se logre una base de datos más amplia y confiable. Para ello, sería conveniente establecer vínculos con proveedores o instituciones que faciliten el acceso regular a dichos materiales.
- Se recomienda adicionalmente, realizar pruebas histológicas para conocer los componentes de matriz extracelular restantes en las muestras de tejido cerebral nativo y posterior a la descelularización.

### Limitaciones

Durante el desarrollo de la presente investigación se presentaron diversas limitaciones que influyeron en el alcance de los resultados.

- La falta de disponibilidad de microesferas fluorescentes impidió llevar a cabo la microscopía de fuerza de tracción en condiciones experimentales propias. Por esta razón, fue necesario recurrir a imágenes previamente reportadas en la literatura científica, lo cual restringió el análisis a condiciones ajenas a nuestro laboratorio.
- Otra limitación importante estuvo relacionada en cuanto a la verificación de la rigidez de los geles de poliacrilamida, si bien, se prepararon geles de distinta rigidez utilizando diferentes concentraciones de los reactivos, no fue posible confirmar experimentalmente la rigidez exacta de los geles. Esto se debió a la falta de equipos especializados, como microscopía de

fuerza atómica (AFM) o sistemas de reometría, comúnmente empleados para caracterizar la rigidez mecánica de geles.

- Además de esto, una limitación importante fue el acceso reducido a cerebros porcinos, que constituyen la materia prima fundamental para el proceso de descelularización. La dificultad para obtener este material biológico limitó la cantidad de ensayos realizados y, en consecuencia, redujo la posibilidad de replicar los experimentos de forma sistemática.

### Referencias Bibliográficas e Infografía

- Aguilera-Márquez, J. D. R., de Dios-Figueroa, G. T., Reza-Saldivar, E. E., Camacho-Villegas, T. A., Canales-Aguirre, A. A., & Lugo-Fabres, P. H. (2022). Biomaterials: Emerging systems for study and treatment of glioblastoma. In *Neurology Perspectives* (Vol. 2, pp. S31–S42). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.neurop.2021.12.001>
- Aina Albajar Sigalés. (2021). *Final Degree Project Biomedical Engineering Degree*.
- Akbari Zahmati, A. H., Alipoor, R., Rezaei Shahmirzadi, A., Khorri, V., & Abolhasani, M. M. (2017). Chemical Decellularization Methods and Its Effects on Extracellular Matrix. *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*, 2(3), 76. <https://doi.org/10.24200/imminv.v2i3.63>
- Anderson, D. G., Markova, D., Adams, S. L., Pacifici, M., An, H. S., & Zhang, Y. (2010). Fibronectin Splicing Variants in Human Intervertebral Disc and Association With Disc Degeneration. *Spine*, 35(17), 1581–1588. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181c6ef1a>
- Apolinar-Fernández, A., Barrasa-Fano, J., Van Oosterwyck, H., & Sanz-Herrera, J. A. (2025). Multiphysics modeling of 3D traction force microscopy with application to cancer cell-induced degradation of the extracellular matrix. *Engineering with Computers*, 41(1), 403–422. <https://doi.org/10.1007/s00366-024-02017-8>

- Arshad Muhammad Iqbal, & Syed F. Jamal. (2023). Essential Hypertension. *StatPearls*.
- Aumailley, M. (2013). The laminin family. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 48–55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>
- Axpe, E., Orive, G., Franze, K., & Appel, E. A. (2020). Towards brain-tissue-like biomaterials. *Nature Communications*, 11(1), 3423. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17245-x>
- Badylak, S. F. (2005). Regenerative medicine and developmental biology: The role of the extracellular matrix. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*, 287B(1), 36–41. <https://doi.org/10.1002/ar.b.20081>
- Badylak, S. F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28(25), 3587–3593. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.043>
- Badylak, S. F., Tullius, R., Kokini, K., Shelbourne, K. D., Klootwyk, T., Voytik, S. L., Kraine, M. R., & Simmons, C. (1995). The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achille's tendon repair in a dog model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(8), 977–985. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290809>
- Bajpai, A., Li, R., & Chen, W. (2021). The cellular mechanobiology of aging: from biology to mechanics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1491(1), 3–24. <https://doi.org/10.1111/nyas.14529>
- Barber-Pérez, N. (2019). *Polyacrylamide Stiffness-gradient Hydrogels: A 2D Culture System to Study Cell Mechano-responsiveness to Substrate Stiffness Faculty of Science and Engineering NURIA BARBER-PÉREZ Polyacrylamide Stiffness-gradient Hydrogels: A 2D Culture System to Study Cell Mechano-responsiveness to Substrate Stiffness*.
- Bauer, A., Prechová, M., Fischer, L., Thievessen, I., Gregor, M., & Fabry, B. (2021). pyTFM: A tool for traction force and monolayer stress microscopy. *PLOS Computational Biology*, 17(6), e1008364. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008364>

- Bergs, J., Morr, A. S., Silva, R. V., Infante-Duarte, C., & Sack, I. (2024). The Networking Brain: How Extracellular Matrix, Cellular Networks, and Vasculature Shape the In Vivo Mechanical Properties of the Brain. *Advanced Science*, 11(31). <https://doi.org/10.1002/adv.202402338>
- Betz, T., Koch, D., Lu, Y.-B., Franze, K., & Käs, J. A. (2011). Growth cones as soft and weak force generators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13420–13425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106145108>
- Blumberg, J. W., & Schwarz, U. S. (2022). Comparison of direct and inverse methods for 2.5D traction force microscopy. *PLoS ONE*, 17(1 January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262773>
- Bronzino, J. (2005). BIOMEDICAL ENGINEERING: A HISTORICAL PERSPECTIVE. In *Introduction to Biomedical Engineering* (pp. 1–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-238662-6.50003-3>
- Bustamante, C. J., Chemla, Y. R., Liu, S., & Wang, M. D. (2021). Optical tweezers in single-molecule biophysics. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), 25. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00021-6>
- Butcher, D. T., Alliston, T., & Weaver, V. M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 9(2), 108–122. <https://doi.org/10.1038/nrc2544>
- Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). *A practical guide to hydrogels for cell culture*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
- Cao, R., Tian, H., Tian, Y., & Fu, X. (2024). A Hierarchical Mechanotransduction System: From Macro to Micro. In *Advanced Science* (Vol. 11, Issue 11). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adv.202302327>
- Català-Castro, F., Venturini, V., Ortiz-Vásquez, S., Ruprecht, V., & Krieg, M. (2021). Direct Force Measurements of Subcellular Mechanics in Confinement using Optical Tweezers. *Journal of Visualized Experiments*, 174. <https://doi.org/10.3791/62865>
- Chang, Y.-C., Wu, J.-W., Wang, C.-W., & Jang, A. C.-C. (2020). Hippo Signaling-Mediated Mechanotransduction in Cell Movement and Cancer Metastasis.

*Frontiers in Molecular Biosciences*, 6.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00157>

- Charrier, E. E., Pogoda, K., Li, R., Park, C. Y., Fredberg, J. J., & Janmey, P. A. (2020). A novel method to make viscoelastic polyacrylamide gels for cell culture and traction force microscopy. *APL Bioengineering*, 4(3). <https://doi.org/10.1063/5.0002750>
- Chen, H., Wang, S., Cao, Y., & Lei, H. (2024). Molecular Force Sensors for Biological Application. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25116198>
- Chen, Y., Sonnaert, M., Roberts, S. J., Luyten, F. P., & Schrooten, J. (2012). Validation of a PicoGreen-Based DNA Quantification Integrated in an RNA Extraction Method for Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Cultures. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18(6), 444–452. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0304>
- Chen, Z., Du, C., Liu, S., Liu, J., Yang, Y., Dong, L., Zhao, W., Huang, W., & Lei, Y. (2024). Progress in biomaterials inspired by the extracellular matrix. *Giant*, 19, 100323. <https://doi.org/10.1016/j.giant.2024.100323>
- Choi, S. M., Kim, W. H., Côté, D., Park, C.-W., & Lee, H. (2011). Blood cell assisted in vivo Particle Image Velocimetry using the confocal laser scanning microscope. *Optics Express*, 19(5), 4357. <https://doi.org/10.1364/OE.19.004357>
- Choi, Y. C., Choi, J. S., Kim, B. S., Kim, J. D., Yoon, H. I., & Cho, Y. W. (2012). Decellularized extracellular matrix derived from porcine adipose tissue as a xenogeneic biomaterial for tissue engineering. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 18(11), 866–876. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0009>
- Comelles, J., Fernández-Majada, V., Berlanga-Navarro, N., Acevedo, V., Paszkowska, K., & Martínez, E. (2020). Microfabrication of poly(acrylamide) hydrogels with independently controlled topography and stiffness. *Biofabrication*, 12(2), 025023. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab7552>

- Courbot, O., & Elosegui-Artola, A. (2025). The role of extracellular matrix viscoelasticity in development and disease. *Npj Biological Physics and Mechanics*, 2(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s44341-025-00014-6>
- Cox, T. R., & Ertler, J. T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 4(2), 165–178. <https://doi.org/10.1242/dmm.004077>
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), 3233–3243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
- Crapo, P. M., Medberry, C. J., Reing, J. E., Tottey, S., van der Merwe, Y., Jones, K. E., & Badylak, S. F. (2012). Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(13), 3539–3547. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.044>
- Dalton, C. J., & Lemmon, C. A. (2021). Fibronectin: Molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling. In *Cells* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10092443>
- De La Pena, A., Mukhtar, M., Yokosawa, R., Carrasquilla, S., & Simmons, C. S. (2021). Quantifying cellular forces: Practical considerations of traction force microscopy for dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology*, 30(1), 74–83. <https://doi.org/10.1111/exd.14166>
- del Álamo, J. C., Meili, R., Álvarez-González, B., Alonso-Latorre, B., Bastounis, E., Firtel, R., & Lasheras, J. C. (2013). Three-Dimensional Quantification of Cellular Traction Forces and Mechanosensing of Thin Substrata by Fourier Traction Force Microscopy. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069850>
- Dembo, M., & Wang, Y. L. (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical Journal*, 76(4), 2307–2316. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77386-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77386-8)

- Denisin, A. K., Kim, H., Riedel-Kruse, I. H., & Pruitt, B. L. (2024). Field Guide to Traction Force Microscopy. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 17(2), 87–106. <https://doi.org/10.1007/s12195-024-00801-6>
- Denisin, A. K., & Pruitt, B. L. (2016). Tuning the Range of Polyacrylamide Gel Stiffness for Mechanobiology Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(34), 21893–21902. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09344>
- DeQuach, J. A., Yuan, S. H., Goldstein, L. S. B., & Christman, K. L. (2011). Decellularized Porcine Brain Matrix for Cell Culture and Tissue Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 17(21–22), 2583–2592. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0724>
- Diamond, E. M. (2021). *Decellularized Porcine Brain Matrix for Neural Tissue Engineering* [Master's Thesis]. North Carolina A&T State University.
- Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.1116995>
- Dracos, Th. (1996). *Particle Tracking Velocimetry (PTV)* (pp. 155–160). [https://doi.org/10.1007/978-94-015-8727-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-015-8727-3_7)
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179–183. <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Dzobo, K., & Dandara, C. (2023). The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis. *Biomimetics*, 8(2), 146. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8020146>
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview.

- International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fischer, R. S., Myers, K. A., Gardel, M. L., & Waterman, C. M. (2012). Stiffness-controlled three-dimensional extracellular matrices for high-resolution imaging of cell behavior. *Nature Protocols*, 7(11), 2056–2066.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.127>
- Flanagan, L. A., Ju, Y.-E., Marg, B., Osterfield, M., & Janmey, P. A. (2002). Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport*, 13(18), 2411–2415.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-200212200-00007>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 24), 4195–4200.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- Funaki, M., & Janmey, P. A. (2017a). Technologies to Engineer Cell Substrate Mechanics in Hydrogels. In *BIOLOGY AND ENGINEERING OF STEM CELL NICHES* (1st ed., p. 369). ELSEVIER.
- Funaki, M., & Janmey, P. A. (2017b). Technologies to Engineer Cell Substrate Mechanics in Hydrogels. In *Biology and Engineering of Stem Cell Niches* (pp. 363–373). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802734-9.00023-8>
- Gadegaard, N. (2006). Atomic force microscopy in biology: Technology and techniques. In *Biotechnic and Histochemistry* (Vol. 81, Issues 2–3, pp. 87–97). <https://doi.org/10.1080/10520290600783143>
- Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S., & Demirci, U. (2010). Engineering Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics. *Nanomedicine*, 5(3), 469–484.  
<https://doi.org/10.2217/nnm.10.12>
- Gehwolf, R., Tempfer, H., Cesur, N. P., Wagner, A., Traweger, A., & Lehner, C. (2025). Tendinopathy: The Interplay between Mechanical Stress, Inflammation, and Vascularity. *Advanced Science*, 12(36).  
<https://doi.org/10.1002/advs.202506440>
- Gershlak, J. R., Resnikoff, J. IN., Sullivan, K. E., Williams, C., Wang, R. M., & Black, L. D. (2013). Mesenchymal stem cells ability to generate traction stress

- in response to substrate stiffness is modulated by the changing extracellular matrix composition of the heart during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(2), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.074>
- Ghuman, H., Mauney, C., Donnelly, J., Massensini, A. R., Badylak, S. F., & Modo, M. (2018). Biodegradation of ECM hydrogel promotes endogenous brain tissue restoration in a rat model of stroke. *Acta Biomaterialia*, 80, 66–84. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.020>
- Gilpin, A., & Yang, Y. (2017). Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed Research International*, 2017, 9831534. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>
- Gil-Redondo, J. C., Weber, A., Vivanco, M. d. M., & Toca-Herrera, J. L. (2023). Measuring (biological) materials mechanics with atomic force microscopy. 5. Traction force microscopy (cell traction forces). *Microscopy Research and Technique*, 86(9), 1069–1078. <https://doi.org/10.1002/jemt.24368>
- Giordano, G. (2023). *Tesis: Mapeo de fuerzas de tracción de células de epitelio mamario humano normal y tumoral.*
- Golebiowska, A. A., Intravaia, J. T., Sathe, V. M., Kumbar, S. G., & Nukavarapu, S. P. (2024). Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects. *Bioactive Materials*, 32, 98–123. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.09.017>
- Guimarães, C. F., Gasperini, L., Marques, A. P., & Reis, R. L. (2020). The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 5, Issue 5, pp. 351–370). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0169-1>
- Guo, X., Liu, B., Zhang, Y., Cheong, S., Xu, T., Lu, F., & He, Y. (2024a). Decellularized extracellular matrix for organoid and engineered organ culture. *Journal of Tissue Engineering*, 15. <https://doi.org/10.1177/20417314241300386>

- Guo, X., Liu, B., Zhang, Y., Cheong, S., Xu, T., Lu, F., & He, Y. (2024b). Decellularized extracellular matrix for organoid and engineered organ culture. *Journal of Tissue Engineering*, 15. <https://doi.org/10.1177/20417314241300386>
- Hamill, K. J., Kligys, K., Hopkinson, S. B., & Jones, J. C. R. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *Journal of Cell Science*, 122(24), 4409–4417. <https://doi.org/10.1242/jcs.041095>
- Handorf, A. M., Zhou, Y., Halanski, M. A., & Li, W.-J. (2015). Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1019687>
- Harvey, A., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2015). Vascular biology of ageing—Implications in hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 83, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.011>
- Hay, E. D. (1981). Extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), 205s–223s. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.205s>
- Heath, D. E. (2019). A Review of Decellularized Extracellular Matrix Biomaterials for Regenerative Engineering Applications. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 5(2), 155–166. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0080-0>
- Heino, J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays*, 29(10), 1001–1010. <https://doi.org/10.1002/bies.20636>
- Hoffman, B. D., Grashoff, C., & Schwartz, M. A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature*, 475(7356), 316–323. <https://doi.org/10.1038/nature10316>
- Hong, J. Y., Seo, Y., Davaa, G., Kim, H.-W., Kim, S. H., & Hyun, J. K. (2020). Decellularized brain matrix enhances macrophage polarization and functional improvements in rat spinal cord injury. *Acta Biomaterialia*, 101, 357–371. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.012>

- Hoshiaba, T., Lu, H., Kawazoe, N., & Chen, G. (2010). Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(12), 1717–1728. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.534079>
- Hu, S., Ye, J., Zhao, Y., & Zhu, C. (2022). Advanced optical tweezers on cell manipulation and analysis. *The European Physical Journal Plus*, 137(9), 1024. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-022-03190-9>
- Huang, H., Kamm, R. D., & Lee, R. T. (2004). Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(1), C1–C11. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00559.2003>
- Huang, J., Deng, H., Peng, X., Li, S., Xiong, C., & Fang, J. (2012). Cellular Traction Force Reconstruction Based on a Self-adaptive Filtering Scheme. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 5(2), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s12195-012-0224-0>
- Huang, J., Zhang, L., Wan, D., Zhou, L., Zheng, S., Lin, S., & Qiao, Y. (2021). Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 153. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00544-0>
- Huang, Y., Gompper, G., & Sabass, B. (2020). A Bayesian traction force microscopy method with automated denoising in a user-friendly software package. *Computer Physics Communications*, 256, 107313. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2020.107313>
- Huang, Y., Schell, C., Huber, T. B., Şimşek, A. N., Hersch, N., Merkel, R., Gompper, G., & Sabass, B. (2019). Traction force microscopy with optimized regularization and automated Bayesian parameter selection for comparing cells. *Scientific Reports*, 9(1), 539. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36896-x>
- Hur, S. S., Jeong, J. H., Ban, M. J., Park, J. H., Yoon, J. K., & Hwang, Y. (2020). Traction Force Microscopy for Understanding Cellular Mechanotransduction. *BMB Reports*, 53(2), 74–81. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.2.308>

- Hussey, G. S., Dziki, J. L., & Badylak, S. F. (2018). Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 3, Issue 7, pp. 159–173). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0023-x>
- Ibrahim, A. I. K., Alhmad, M. Y. A., Ali, O. M. A., & Kareem, I. A. A. (2024). *Biomedical Engineering: Bridging Medicine and Technology*. Bright Sky Publications. <https://doi.org/10.62906/bs.book.183>
- Jaalouk, D. E., & Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(1), 63–73. <https://doi.org/10.1038/nrm2597>
- Jang, J., Park, H.-J., Kim, S.-W., Kim, H., Park, J. Y., Na, S. J., Kim, H. J., Park, M. N., Choi, S. H., Park, S. H., Kim, S. W., Kwon, S.-M., Kim, P.-J., & Cho, D.-W. (2017). 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials*, 112, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.026>
- Joshi, R., Han, S.-B., Cho, W.-K., & Kim, D.-H. (2022). The role of cellular traction forces in deciphering nuclear mechanics. *Biomaterials Research*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00289-z>
- Khoonkari, M., Liang, D., Kamperman, M., Kruyt, F. A. E., & van Rijn, P. (2022). Physics of Brain Cancer: Multiscale Alterations of Glioblastoma Cells under Extracellular Matrix Stiffening. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051031>
- Klak, M., Łojczyk, I., Berman, A., Tymicki, G., Adamiok-Ostrowska, A., Sierakowski, M., Olkowski, R., Szczepankiewicz, A. A., Kamiński, A., Dobrzyń, A., & Wszola, M. (2021). Impact of Porcine Pancreas Decellularization Conditions on the Quality of Obtained dECM. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7005. <https://doi.org/10.3390/ijms22137005>
- Knoll, S. G., Ali, M. Y., & Saif, M. T. A. (2014). A Novel Method for Localizing Reporter Fluorescent Beads Near the Cell Culture Surface for Traction Force

- Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 91. <https://doi.org/10.3791/51873>
- Kolb, P., Schundner, A., Frick, M., & Gottschalk, K.-E. (2021). In Vitro Measurements of Cellular Forces and their Importance in the Lung—From the Sub- to the Multicellular Scale. *Life*, 11(7), 691. <https://doi.org/10.3390/life11070691>
- Krishnan, R., Park, C. Y., Lin, Y.-C., Mead, J., Jaspers, R. T., Trepate, X., Lenormand, G., Tambe, D., Smolensky, A. V., Knoll, A. H., Butler, J. P., & Fredberg, J. J. (2009). Reinforcement versus Fluidization in Cytoskeletal Mechanoresponsiveness. *PLoS ONE*, 4(5), e5486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005486>
- Kumai, J., Sasagawa, S., Horie, M., & Yui, Y. (2021). A Novel Method for Polyacrylamide Gel Preparation Using N-hydroxysuccinimide-acrylamide Ester to Study Cell-Extracellular Matrix Mechanical Interactions. *Frontiers in Materials*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.637278>
- Kumari, A., Pineau, J., Lennon-Duménil, A.-M., Balland, M., & Pierobon, P. (2020). Traction Force Microscopy to Study B Lymphocyte Activation. *Journal of Visualized Experiments*, 161. <https://doi.org/10.3791/60947>
- Lacueva-Aparicio, A., Lindoso, R. S., Mihăilă, S. M., & Giménez, I. (2022). Role of extracellular matrix components and structure in new renal models in vitro. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1048738>
- Lampi, M. C., & Reinhart-King, C. A. (2018). Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 10). <http://stm.sciencemag.org/>
- Le, L. T. T., Pham, N. C., Trinh, X.-T., Nguyen, N. G., Nguyen, V. L., Nam, S.-Y., & Heo, C.-Y. (2024). Supercritical Carbon Dioxide Decellularization of Porcine Nerve Matrix for Regenerative Medicine. *Tissue Engineering Part A*, 30(15–16), 447–459. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2023.0228>

- Lee, D., Zhang, H., & Ryu, S. (2018). *Elastic Modulus Measurement of Hydrogels* (pp. 1–21). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0\\_60-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_60-1)
- Lehoux, S., Castier, Y., & Tedgui, A. (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *Journal of Internal Medicine*, *259*(4), 381–392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01624.x>
- Lekka, M., Gnanachandran, K., Kubiak, A., Zieliński, T., & Zemła, J. (2021). Traction force microscopy – Measuring the forces exerted by cells. In *Micron* (Vol. 150). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103138>
- Li, H., Ghorbani, S., Ling, C.-C., Yong, V. W., & Xue, M. (2023). The extracellular matrix as modifier of neuroinflammation and recovery in ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Neurobiology of Disease*, *186*, 106282. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106282>
- Li, Q., Shao, X., Dai, X., Guo, Q., Yuan, B., Liu, Y., & Jiang, W. (2022). Recent trends in the development of hydrogel therapeutics for the treatment of central nervous system disorders. *NPG Asia Materials*, *14*(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00362-y>
- Lin, Q., Wong, H. L., Tian, F.-R., Huang, Y.-D., Xu, J., Yang, J.-J., Chen, P.-P., Fan, Z.-L., Lu, C.-T., & Zhao, Y.-Z. (2017). Enhanced neuroprotection with decellularized brain extracellular matrix containing bFGF after intracerebral transplantation in Parkinson's disease rat model. *International Journal of Pharmaceutics*, *517*(1–2), 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.028>
- Lin, T., Liu, S., Chen, S., Qiu, S., Rao, Z., Liu, J., Zhu, S., Yan, L., Mao, H., Zhu, Q., Quan, D., & Liu, X. (2018). Hydrogel derived from porcine decellularized nerve tissue as a promising biomaterial for repairing peripheral nerve defects. *Acta Biomaterialia*, *73*, 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.001>
- Liu, J., Song, Q., Yin, W., Li, C., An, N., Le, Y., Wang, Q., Feng, Y., Hu, Y., & Wang, Y. (2025). Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations. *Exploration*, *5*(1). <https://doi.org/10.1002/EXP.20230078>

- Liu, T., Yu, S., Zhang, L., Ji, W., Wang, G., Wang, N., Li, M., Hu, T., & Shi, Z. (2025). Yes-associated protein 1 in cancer: bridging mechanical transduction and epigenetic regulation. *Cancer Biology & Therapy*, 26(1). <https://doi.org/10.1080/15384047.2025.2562726>
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196(4), 395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>
- Macri-Pellizzeri, L., De-Juan-Pardo, E. M., Prosper, F., & Pelacho, B. (2018). Role of substrate biomechanics in controlling (stem) cell fate implications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(4), 1012–1019. <https://doi.org/10.1002/term.2586>
- Magno, V., & Werner, C. (2023). Tissue-Derived Decellularized Materials for Biomedical Applications. In *Handbook of the Extracellular Matrix* (pp. 1–33). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-92090-6\\_42-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-92090-6_42-1)
- Mahdian, M., Tabatabai, T. S., Abpeikar, Z., Rezakhani, L., & Khazaei, M. (2023). Nerve regeneration using decellularized tissues: challenges and opportunities. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1295563>
- Mangani, S., Vetoulas, M., Mineschou, K., Spanopoulos, K., Vivanco, M. dM., Piperigkou, Z., & Karamanos, N. K. (2025). Design and Applications of Extracellular Matrix Scaffolds in Tissue Engineering and Regeneration. *Cells*, 14(14), 1076. <https://doi.org/10.3390/cells14141076>
- Marjoram, R. J., Lessey, E. C., & Burridge, K. (2014). Regulation of RhoA Activity by Adhesion Molecules and Mechanotransduction. *Current Molecular Medicine*, 14(2), 199–208. <https://doi.org/10.2174/1566524014666140128104541>

- Mase, V. J., Hsu, J. R., Wolf, S. E., Wenke, J. C., Baer, D. G., Owens, J., Badylak, S. F., & Walters, T. J. (2010). Clinical Application of an Acellular Biologic Scaffold for Surgical Repair of a Large, Traumatic Quadriceps Femoris Muscle Defect. *Orthopedics*, *33*(7). <https://doi.org/10.3928/01477447-20100526-24>
- Mayer, J. E., Iatridis, J. C., Chan, D., Qureshi, S. A., Gottesman, O., & Hecht, A. C. (2013). Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration. In *Spine Journal* (Vol. 13, Issue 3, pp. 299–317). <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.01.041>
- Mechanobiology Institute, N. U. of S. (2023, November 30). *What is Mechanobiology?* <https://www.mbi.nus.edu.sg/mbinfo/what-is-mechanobiology/>
- Mendibil, U., Ruiz-Hernandez, R., Retegi-Carrion, S., Garcia-Urquia, N., Olalde-Graells, B., & Abarategi, A. (2020). Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155447>
- Mierke, C. T. (2022). Viscoelasticity, Like Forces, Plays a Role in Mechanotransduction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.789841>
- MILAB. (2025). *Atomic Force Microscope (AFM)*. MID Sweden University.
- Modo, M. (2019). Bioscaffold-Induced Brain Tissue Regeneration. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01156>
- Moeendarbary, E., & Harris, A. R. (2014). Cell mechanics: principles, practices, and prospects. *WIREs Systems Biology and Medicine*, *6*(5), 371–388. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1275>
- Moffat, D., Ye, K., & Jin, S. (2022a). Decellularization for the retention of tissue niches. *Journal of Tissue Engineering*, *13*. <https://doi.org/10.1177/20417314221101151>

- Moffat, D., Ye, K., & Jin, S. (2022b). Decellularization for the retention of tissue niches. *Journal of Tissue Engineering*, 13. <https://doi.org/10.1177/20417314221101151>
- Moreno-Flores, S. (2020). Hallmarks of Life in Single Cell Contact Mechanics: Outstanding Challenges and Perspectives. *Frontiers in Mechanical Engineering*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmech.2020.00058>
- Morillo, E., & Castro, G. M. (2011). *MANUAL Biología Molecular INIAP*. <https://www.researchgate.net/publication/258803041>
- Mulligan, J. A., Bordeleau, F., Reinhart-King, C. A., & Adie, S. G. (2018). Traction force microscopy for noninvasive imaging of cell forces. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1092, pp. 319–349). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9_15)
- Munevar, S., Wang, Y., & Dembo, M. (2001). Traction Force Microscopy of Migrating Normal and H-ras Transformed 3T3 Fibroblasts. *Biophysical Journal*, 80(4), 1744–1757. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76145-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76145-0)
- Mustapha, F., Sengupta, K., & Puech, P.-H. (2022). May the force be with your (immune) cells: an introduction to traction force microscopy in Immunology. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.898558>
- Neishabouri, A., Soltani Khaboushan, A., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A.-M., & Majidi Zolbin, M. (2022). Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299>
- Nelson, C. M., Xiao, B., Wickström, S. A., Dufrêne, Y. F., Cosgrove, D. J., Heisenberg, C.-P., Dupont, S., Shyer, A. E., Rodrigues, A. R., Trepate, X., & Diz-Muñoz, A. (2024). Mechanobiology: Shaping the future of cellular form and function. *Cell*, 187(11), 2652–2656. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.04.006>
- Nerger, B. A., Siedlik, M. J., & Nelson, C. M. (2017). Microfabricated tissues for investigating traction forces involved in cell migration and tissue

- morphogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(10), 1819–1834. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2439-z>
- Neuman, K. C., & Block, S. M. (2004). Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, 75(9), 2787–2809. <https://doi.org/10.1063/1.1785844>
- Nguyen, A. K., & Kilian, K. A. (2020). Physicochemical Tools for Visualizing and Quantifying Cell-Generated Forces. *ACS Chemical Biology*, 15(7), 1731–1746. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00304>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nm1684>
- Ozbek, S., Balasubramanian, P. G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R. P., & Adams, J. C. (2010). The evolution of extracellular matrix. *Molecular Biology of the Cell*, 21(24), 4300–4305. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0251>
- Pelham, R. J., & Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13661–13665. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13661>
- Petzold, J., & Gentleman, E. (2021). Intrinsic Mechanical Cues and Their Impact on Stem Cells and Embryogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.761871>
- Philips, C., Campos, F., Roosens, A., Sánchez-Quevedo, M. del C., Declercq, H., & Carriel, V. (2018). Qualitative and Quantitative Evaluation of a Novel Detergent-Based Method for Decellularization of Peripheral Nerves. *Annals of Biomedical Engineering*, 46(11), 1921–1937. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-2082-y>
- Polacheck, W. J., & Chen, C. S. (2016). Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools. *Nature Methods*, 13(5), 415–423. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3834>

- Politrón-Zepeda, G. A., Fletes-Vargas, G., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2024). Injectable Hydrogels for Nervous Tissue Repair—A Brief Review. *Gels*, *10*(3), 190. <https://doi.org/10.3390/gels10030190>
- Princen, K., Marien, N., Guedens, W., Graulus, G., & Adriaensens, P. (2023). Hydrogels with Reversible Crosslinks for Improved Localised Stem Cell Retention: A Review. *ChemBioChem*, *24*(20). <https://doi.org/10.1002/cbic.202300149>
- Qingzong, T. (2011). *Study of multicellular architecture with controlled microenvironment*.
- Rabbani, M., Zakian, N., & Alimoradi, N. (2021). Contribution of Physical Methods in Decellularization of Animal Tissues. *Journal of Medical Signals & Sensors*, *11*(1), 1–11. [https://doi.org/10.4103/jmss.JMSS\\_2\\_20](https://doi.org/10.4103/jmss.JMSS_2_20)
- Reginensi, D., Ortiz, D. A., Denis, B., Castillo, S., Burillo, A., Khoury, N., Xu, J., Dam, M. L., Escobar, A. A. H., Dave, K. R., Perez-Pinzon, M. A., & Gittens, R. A. (2025). Region-specific brain decellularized extracellular matrix promotes cell recovery in an in vitro model of stroke. *Scientific Reports*, *15*(1), 11921. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95656-w>
- Reginensi, D., Ortiz, D., Pravia, A., Burillo, A., Morales, F., Morgan, C., Jimenez, L., Dave, K. R., Perez-Pinzon, M. A., & Gittens, R. A. (2020). Role of Region-Specific Brain Decellularized Extracellular Matrix on *In Vitro* Neuronal Maturation. *Tissue Engineering Part A*, *26*(17–18), 964–978. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0277>
- Rehfeldt, F., Engler, A., Eckhardt, A., Ahmed, F., & Discher, D. (2007). Cell responses to the mechanochemical microenvironment—Implications for regenerative medicine and drug delivery☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *59*(13), 1329–1339. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.007>
- Rehfeldt, F., & Schmidt, C. F. (2017). Physical probing of cells. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *50*(46), 463001. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa8aa6>

- Reserva, R. L., Ohura, S., Miyashiro, D., Umemura, K., & Confesor, M. N. P. (2023). Atomic Force Microscopy Characterization of Polyacrylamide Substrate for Traction Force Application. *Solid State Phenomena*, 352, 15–23. <https://doi.org/10.4028/p-4bJclJ>
- Ribeiro, A. J. S., Denisin, A. K., Wilson, R. E., & Pruitt, B. L. (2016). For whom the cells pull: Hydrogel and micropost devices for measuring traction forces. In *Methods* (Vol. 94, pp. 51–64). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.08.005>
- Rodenburg, W. S., Ebben, S. F. A., & Eeftens, J. M. (2025). Robust quantification of cellular mechanics using optical tweezers. *Biophysical Reports*, 5(1), 100199. <https://doi.org/10.1016/j.bpr.2025.100199>
- Rosadas, M., Silva, I. V., Costa, J. B., Ribeiro, V. P., & Oliveira, A. L. (2024). Decellularized dermal matrices: unleashing the potential in tissue engineering and regenerative medicine. *Frontiers in Materials*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmats.2023.1285948>
- Sackett, S. D., Tremmel, D. M., Ma, F., Feeney, A. K., Maguire, R. M., Brown, M. E., Zhou, Y., Li, X., O'Brien, C., Li, L., Burlingham, W. J., & Odorico, J. S. (2018). Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Scientific Reports*, 8(1), 10452. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28857-1>
- Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., & Badylak, S. F. (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 49, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068>
- Salgado García, M. G., Díaz, N. F., García López, G., Álvarez Maya, I., Hernández Jimenez, C., Roman Maldonado, Y., Mendoza Aguayo, D. J., & Díaz Martínez, N. E. (2025). Evaluation methods for decellularized tissues: A focus on human amniotic membrane. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 139(2), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2024.10.009>

- Sauleau, P., Lapouble, E., Val-Laillet, D., & Malbert, C.-H. (2009). The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal*, 3(8), 1138–1151. <https://doi.org/10.1017/S1751731109004649>
- Simsa, R., Rothenbücher, T., Gürbüz, H., Ghosheh, N., Emneus, J., Jenndahl, L., Kaplan, D. L., Bergh, N., Serrano, A. M., & Fogelstrand, P. (2021). Brain organoid formation on decellularized porcine brain ECM hydrogels. *PLOS ONE*, 16(1), e0245685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245685>
- Sokoray-Varga, B., & Józsa, J. (2008). Particle tracking velocimetry (PTV) and its application to analyse free surface flows in laboratory scale models. *Periodica Polytechnica Civil Engineering*, 52(2), 63. <https://doi.org/10.3311/pp.ci.2008-2.02>
- Soles, A., Selimovic, A., Sbrocco, K., Ghannoum, F., Hamel, K., Moncada, E. L., Gilliat, S., & Cvetanovic, M. (2023). Extracellular Matrix Regulation in Physiology and in Brain Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7049. <https://doi.org/10.3390/ijms24087049>
- Song, J., Zhang, Y., Pan, H., Xu, X., Deng, C.-C., & Yang, B. (2023). Isolation, Culture, and Characterization of Primary Dermal Fibroblasts from Human Keloid Tissue. *Journal of Visualized Experiments*, 197. <https://doi.org/10.3791/65153>
- Stańczak, M. (2024). Tendon Cell Biology: Effect of Mechanical Loading. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 58(6), 677–701. <https://doi.org/10.33594/000000743>
- Stilgoe, A. B., Favre-Bulle, I. A., Watson, M. L., Gomez-Godinez, V., Berns, M. W., Preece, D., & Rubinsztein-Dunlop, H. (2024). Shining Light in Mechanobiology: Optical Tweezers, Scissors, and Beyond. *ACS Photonics*, 11(3), 917–940. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.4c00064>
- Style, R. W., Boltyanskiy, R., German, G. K., Hyland, C., MacMinn, C. W., Mertz, A. F., Wilen, L. A., Xu, Y., & Dufresne, E. R. (2014). Traction force microscopy in physics and biology. *Soft Matter*, 10(23), 4047. <https://doi.org/10.1039/c4sm00264d>

- Sun, B. (2021). The mechanics of fibrillar collagen extracellular matrix. In *Cell Reports Physical Science* (Vol. 2, Issue 8). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2021.100515>
- Sun, W., Gao, X., Lei, H., Wang, W., & Cao, Y. (2022). Biophysical Approaches for Applying and Measuring Biological Forces. *Advanced Science*, 9(5). <https://doi.org/10.1002/advs.202105254>
- Suñé-Auñón, A., Jorge-Peñas, A., Aguilar-Cuenca, R., Vicente-Manzanares, M., Van Oosterwyck, H., & Muñoz-Barrutia, A. (2017). Full L1-regularized Traction Force Microscopy over whole cells. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 365. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1771-0>
- Tapias, L. F., & Ott, H. C. (2014). Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 19(2), 145–152. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000051>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2022). *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent and Kit* (Patent MAN0001931).
- Theunissen, R., Stitou, A., & Riethmuller, M. L. (2008). *A novel approach to improve the accuracy of PTV methods*.
- Tian, B. R., Lin, W. F., & Zhang, Y. (2021). Effects of biomechanical forces on the biological behavior of cancer stem cells. *Journal of Cancer*, 12(19), 5895–5902. <https://doi.org/10.7150/jca.60893>
- Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 655–663. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>
- Torres, A. (2018). *Estudio de liberación controlada de amoxicilina, basado en sistemas de redes semi-interpenetradas formadas por poliacrilamida/almidón*. Universidad de Sonora.
- Trepat, X., Wasserman, M. R., Angelini, T. E., Millet, E., Weitz, D. A., Butler, J. P., & Fredberg, J. J. (2009). Physical forces during collective cell migration. *Nature Physics*, 5(6), 426–430. <https://doi.org/10.1038/nphys1269>

- Tse, J. R., & Engler, A. J. (2010). Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Current Protocols in Cell Biology*, 47(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1016s47>
- Turan Sorhun, D., Kuşoğlu, A., & Öztürk, E. (2023). Developing Bovine Brain-Derived Extracellular Matrix Hydrogels: a Screen of Decellularization Methods for Their Impact on Biochemical and Mechanical Properties. *ACS Omega*, 8(40), 36933–36947. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04064>
- University of Birmingham. (n.d.). *Physics A level revision resource: Introduction to Young's Modulus*. Retrieved November 16, 2025, from <https://www.birmingham.ac.uk/study/undergraduate/schools-and-colleges/post-16/a-level-stem-resources/youngs-modulus>
- Viji Babu, P. K., Rianna, C., Mirastschijski, U., & Radmacher, M. (2019). Nano-mechanical mapping of interdependent cell and ECM mechanics by AFM force spectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1), 12317. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48566-7>
- Vining, K. H., & Mooney, D. J. (2017). Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(12), 728–742. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108>
- Vogel, V., & Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(4), 265–275. <https://doi.org/10.1038/nrm1890>
- Vorotnikova, E., McIntosh, D., Dewilde, A., Zhang, J., Reing, J. E., Zhang, L., Cordero, K., Bedelbaeva, K., Gourevitch, D., Heber-Katz, E., Badylak, S. F., & Braunhut, S. J. (2010). Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biology*, 29(8), 690–700. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.08.007>
- Wang, B., Qinglai, T., Yang, Q., Li, M., Zeng, S., Yang, X., Xiao, Z., Tong, X., Lei, L., & Li, S. (2023). Functional acellular matrix for tissue repair. *Materials Today Bio*, 18, 100530. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100530>

- Wang, H., Guo, Y., Zou, R., Hu, H., Wang, Y., Wang, F., & Ju, L. A. (2022). Recent Advances of Optical Tweezers–Based Dynamic Force Spectroscopy and Mechanical Measurement Assays for Live-Cell Mechanobiology. *Frontiers in Physics*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fphy.2022.771111>
- Watt, F. M., & Huck, W. T. S. (2013). Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(8), 467–473. <https://doi.org/10.1038/nrm3620>
- Wong, S., Guo, W., Hoffecker, I., & Wang, Y. (2014). *Preparation of a Micropatterned Rigid-Soft Composite Substrate for Probing Cellular Rigidity Sensing* (pp. 3–15). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800281-0.00001-4>
- Worthen, C. A., Rittié, L., & Fisher, G. J. (2017). *Mechanical Deformation of Cultured Cells with Hydrogels* (pp. 245–251). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_17)
- Wu, S. (2023). Comprehensive study of optical tweezers. In *Highlights in Science, Engineering and Technology EMCEME* (Vol. 2023).
- Xia, J., Gao, X., Yao, J., Fei, Y., Song, D., Gu, Z., Zheng, G., Gu, Y., & Tu, C. (2025). Injectable Brain Extracellular Matrix Hydrogels Enhance Neuronal Migration and Functional Recovery After Intracerebral Hemorrhage. *Biomaterials Research*, *29*. <https://doi.org/10.34133/bmr.0192>
- Xiao, P., Zhang, Y., Zeng, Y., Yang, D., Mo, J., Zheng, Z., Wang, J., Zhang, Y., Zhou, Z., Zhong, X., & Yan, W. (2023). Impaired angiogenesis in ageing: the central role of the extracellular matrix. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04315-z>
- Xu, P., Kankala, R. K., Wang, S., & Chen, A. (2024). Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Regenerative Biomaterials*, *11*. <https://doi.org/10.1093/rb/rbad107>
- Yang, J., Dang, H., & Xu, Y. (2022). Recent advancement of decellularization extracellular matrix for tissue engineering and biomedical application. *Artificial Organs*, *46*(4), 549–567. <https://doi.org/10.1111/aor.14126>

- Yang, Z., Lin, J. S., Chen, J., & Wang, J. H. C. (2006). Determining substrate displacement and cell traction fields—a new approach. *Journal of Theoretical Biology*, 242(3), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.05.005>
- Yin, X., Mead, B. E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J. M., & Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell*, 18(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>
- Yuan, H., Liu, K., Córdor, M., Barrasa-Fano, J., Louis, B., Vandaele, J., de Almeida, P., Coucke, Q., Chen, W., Oosterwijk, E., Xing, C., Van Oosterwyck, H., Kouwer, P. H. J., & Rocha, S. (2023). Synthetic fibrous hydrogels as a platform to decipher cell–matrix mechanical interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.2216934120>
- Yue, B. (2014). Biology of the Extracellular Matrix. *Journal of Glaucoma*, 23, S20–S23. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000108>
- Zachary Gautreau, B., Griffin, J., Peterson, T., Thongpradit, P., Billiar, K., Advisor, M., & culture Nancy Burnham, C. (2006). *Characterizing Viscoelastic Properties of Polyacrylamide Gels*.
- Zamponi, M., Mollica, P. A., Khodour, Y., Bjerring, J. S., Bruno, R. D., & Sachs, P. C. (2023). Combined 3D bioprinting and tissue-specific ECM system reveals the influence of brain matrix on stem cell differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1258993>
- Zancla, A., Mozetic, P., Orsini, M., Forte, G., & Rainer, A. (2022). A primer to traction force microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 298(5), 101867. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101867>
- Zhang, H., Wang, Y., Zheng, Z., Wei, X., Chen, L., Wu, Y., Huang, W., & Yang, L. (2023). Strategies for improving the 3D printability of decellularized extracellular matrix bioink. *Theranostics*, 13(8), 2562–2587. <https://doi.org/10.7150/thno.81785>
- Zhang, M., Zhang, Y., Wang, P., Sun, Q., Wang, X., Cao, Y., & Wei, Q. (2024). A detailed protocol for cell force measurement by traction force microscopy.

- Smart Materials in Medicine*, 5(1), 106–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.smaim.2023.08.002>
- Zhou, H., Li, W., Pan, L., Zhu, T., Zhou, T., Xiao, E., & Wei, Q. (2024). Human extracellular matrix (ECM)-like collagen and its bioactivity. *Regenerative Biomaterials*, 11. <https://doi.org/10.1093/rb/rbae008>
- Zhu, L., Yuhan, J., Yu, H., Zhang, B., Huang, K., & Zhu, L. (2023). Decellularized Extracellular Matrix for Remodeling Bioengineering Organoid's Microenvironment. *Small*, 19(25). <https://doi.org/10.1002/sml.202207752>
- Zhu, Y., Zhang, M., Sun, Q., Wang, X., Li, X., & Li, Q. (2023). Advanced Mechanical Testing Technologies at the Cellular Level: The Mechanisms and Application in Tissue Engineering. In *Polymers* (Vol. 15, Issue 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/polym15153255>
- Ziopoulos, P., & Currey, J. D. (1998). Changes in the stiffness, strength, and toughness of human cortical bone with age. *Bone*, 22(1), 57–66. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(97\)00228-7](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(97)00228-7)



# **ANEXOS**

### ÍNDICE DE TABLAS

| Tablas  | Descripción   | Página |
|---------|---|--------|
| Tabla 1 | Preparación de Curva Estándar para Ensayo de Cuantificación de ADN mediante Picogreen | 68     |
| Tabla 2 | <b>¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.</b>                            | 72     |
| Tabla 3 | Pérdida de Masa en Protocolo de Descelularización A                                   | 82     |
| Tabla 4 | Pérdida de Masa en Protocolo de Descelularización B                                   | 83     |
| Tabla 5 | Pérdida de Masa en Protocolo de Descelularización C                                   | 83     |
| Tabla 6 | Comparación de Softwares para TFM ( <i>in silico</i> )                                | 105    |

### ÍNDICE DE GRÁFICAS

| Gráficas | Descripción | Página |
|----------|-------------|--------|
|----------|-------------|--------|

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Gráfica 1 | Reducción de Masa Cerebral por Protocolo de Descelularización | 84 |
| Gráfica 2 | Cuantificación de ADN mediante el Ensayo de Picogreen         | 86 |