

# Caracterización de Membranas de PDMS para el Estudio de Fuerzas de Adhesión Celular.

R. González\*, R. Bernal\*, F. Melo†.

\* *Estudiante de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ciencia de los Materiales, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.*

\* *Tesista de Doctorado en Ciencias con mención en Física, Departamento de Física, Universidad de Santiago de Chile.*

† *Profesor supervisor, Laboratorio de Física no Lineal, Departamento de Física, Universidad de Santiago de Chile.*

*e-mail: igo@esfera.cl, Santiago de Chile, Semestre de Primavera de 2003.*

**Resumen.** Estudios anteriores han propuesto que la migración celular es mediada por adhesión local de las células a un sustrato y que estas fuerzas de adhesión pueden estimarse a partir del patrón de arrugas que se genera en la membrana. Este trabajo tiene como objetivo profundizar en las características de la membrana utilizada como sustrato para ensayos de adhesión celular. Su espesor y módulo de elasticidad fueron determinadas mediante microscopía de efecto fuerza. La manifestación de fuerzas de adhesión celular a estos sustratos se realizó utilizando como células fibroblastos humanos y neuroblastos de ratón, sobre el sustrato de PDMS, observadas en un sistema de microscopio óptico con un interferómetro de Michelson que permite una resolución vertical de  $\sim 0,3 \mu\text{m}$  con una fuente de sodio ( $\lambda_{\text{Na}} \sim 595 \text{ nm}$ ). Este sistema hace posible reconstruir la superficie pudiéndose distinguir sitios de adhesión y patrones de arrugamiento del sustrato. Luego, se modela estos patrones de arrugamiento en un espacio tridimensional utilizando modelos para placas delgadas bajo deformaciones moderadas. Las condiciones de borde del problema respecto de la tensión superficial de membranas de PDMS se han obtenido mediante una experiencia de vasos comunicados.

**Palabras clave:** adhesión, entrecruzamiento (vulcanizado), PDMS, fibroblasto, neuroblasto, wafer de silicio.

## INTRODUCCIÓN

Los fenómenos de adhesión son de gran relevancia para los sistemas biológicos. La dinámica de síntesis y degradación del citoesqueleto y la adhesión de este con proteínas asociadas, juega un rol principal a nivel de sostenimiento de organelos (subcelulares), migración de células <sup>[1]</sup>, anclaje de tejidos (órganos) <sup>[2]</sup> e incluso a nivel de la conformación del organismo completo.

Para estudiar fuerzas de adhesión celular a sustrato <sup>[2]</sup>, se han desarrollado técnicas sorprendentemente simples principalmente durante las últimas décadas del Siglo XX. Por ejemplo, el método de Oliver, *et al.* <sup>[3]</sup>, quienes propusieron estimar estas fuerzas, en función del desplazamiento relativo de partículas de látex, localizadas aleatoriamente, sobre el sustrato de

silicona. Esto corresponde a campos de deformación elástica discretos, lo cual inevitablemente desperdicia y/o modifica la información recogida en las mediciones. Entre estos métodos se encuentra un arreglo periódico bidimensional de micro agujas hechas de PDMS <sup>[4]</sup>, en la cual se montan células y se estiman las fuerzas ejercidas por estas en función de la deflexión de las micro agujas. Este sustrato no parece nada cómodo para las células ya que una distribución tan periódica no se asemeja a su ambiente natural. La migración celular es mediada por adhesión de las células a un sustrato, sobre el cual ejercen fuerzas localizadas (del orden de las decenas de pN), cuya distribución en la membrana celular no manejaremos. Las adhesiones focales son los puntos de aplicación de dichas fuerzas que se manifiestan en forma de pliegues

en un sustrato continuo. Este método fue utilizado por Burton, *et al.*<sup>[5]</sup>, quienes a partir de la estructura de pliegues, largo y longitud de onda (ancho), buscaban la manera de estimar las fuerzas ejercidas por la célula. Según pruebas realizadas, el largo de los pliegues se debe a la fuerza ejercida por las células que depende de la tensión en los bordes de la membrana y no de las propiedades elásticas de la membrana. Además la longitud de onda de los pliegues cambia muy poco con la fuerza, es decir, la medición de  $\lambda_{\text{pliegue}}$  para obtener la fuerza es muy poco sensible para coeficientes de Poisson  $\sim 0,5$ .

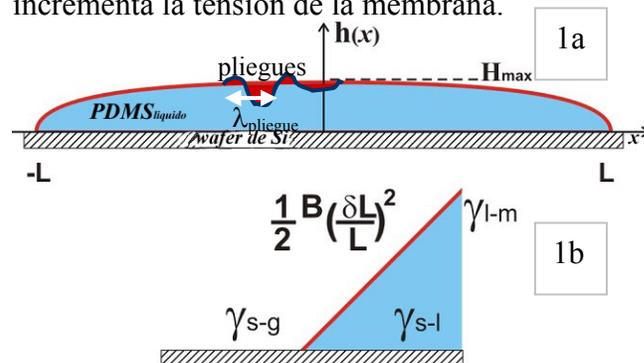
Como objetivo se tiene el diseño de una experiencia que permita determinar cuantitativamente la magnitud de las fuerzas de adhesión de la célula a un sustrato particular, en función de parámetros de la deformación elástica del sustrato. Esto hace primordial conocer las propiedades de la membrana utilizada como sustrato para la célula. En nuestro caso, el sustrato utilizado es *PoliDiMetil Siloxano* (PDMS, Sylgard™ 184), que posee funcionalidades que permiten el entrecruzamiento de cadenas de polímero y con ello la formación de una membrana.

Las células utilizadas como prueba fueron fibroblastos de pulmón humano y neuronas tumorales del sistema nervioso periférico de ratón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La preparación de las membranas se realizó de la siguiente manera: se deja un área rectangular descubierta en el wafer de silicio (utilizado como espejo), en ese lugar se deja caer una gota de PDMS, luego se centrifuga a una velocidad constante para homogenizar el espesor del sustrato. La altura del sustrato de PDMS en fase líquido, depende del tiempo de centrifugación de manera exponencial como  $H[t] = H_0 e^{-t/\tau} + h_0(1 - e^{-t/\tau})$ , donde

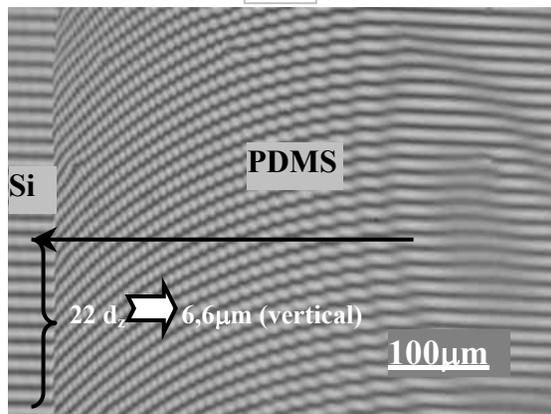
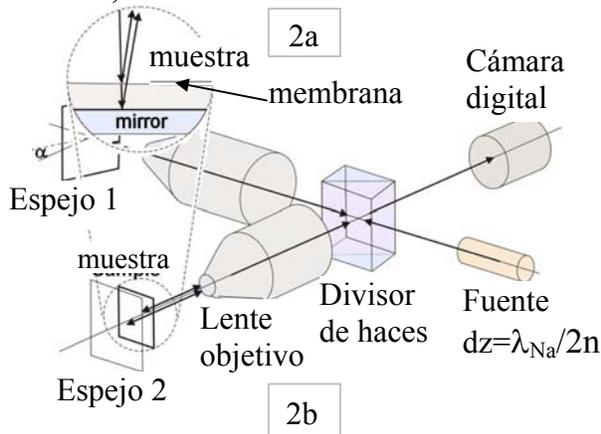
$H_0$  es la altura inicial de la gota,  $h_0$  es el espesor en equilibrio  $\sim 1 \mu\text{m}$  y  $\tau$  es un parámetro de decaimiento, el cual es función de la velocidad de rotación. Se prepararon varios sustratos usando tiempos de centrifugación entre 10 y 240 segundos. Luego se calienta el sustrato a  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$ , por menos de un segundo, produciéndose entrecruzamiento entre cadenas de PDMS (transformación a fase ‘membrana elástica’) a poca profundidad desde la superficie de la gota. Posteriormente, al pasar de  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$  a temperatura ambiente la membrana sufre una contracción  $\delta L$  (ver fig. 1), la cual incrementa la tensión de la membrana.



**Figura 1.** (a) Perfil de mojado del PDMS sobre un wafer de silicio. (b) efecto de la contracción de la superficie luego de la vulcanización.

Después de la vulcanización, se deja un par de horas en reposo para que relaje la membrana. Esto ocurre cuando la región horizontal se posiciona en el centro del sustrato (fig.1a), donde preferentemente serán observados los pliegues efectuados por la actividad migratoria de las células. Para poder resolver la altura de pliegues ( $\xi$  de la Ec.1) efectuados por las células sobre el sustrato, se realizan las observaciones del comportamiento celular por medio de una cámara digital, la cual recibe directamente la luz de un microscopio óptico por reflexión con un interferómetro de Michelson en la modalidad de contacto óptico. Esto se traduce en la generación de un patrón de

líneas de interferencia con una diferencia de altura entre dos líneas consecutivas de  $\sim 300$  nm, utilizando una fuente de sodio ( $\lambda_{Na} \sim 595$  nm), donde la distancia según el eje vertical es equivalente a la diferencia de camino óptico de los haces y se calcula como  $d_z = \lambda_{Na}/2n$  (donde  $n$  es un número entero). Por ejemplo en la figura 2b, se observa la curvatura del borde de una membrana de PDMS sobre un wafer de silicio,



**Figura 2.** (a) Esquema del Interferómetro de Michelson. (b) Con la longitud de onda de la luz de sodio se obtienen líneas de  $\sim 300$  nm de ancho (resolución vertical).

con una altura de  $6,6 \mu\text{m}$ . Luego sobre una membrana, tal como la mostrada en la figura 2b, se agrega una alícuota de medio de cultivo que contiene células. La cámara digital, se programa para obtener fotografías cada 30 segundos o un minuto durante una hora. Estas imágenes, son vinculadas secuencialmente, generando un video que

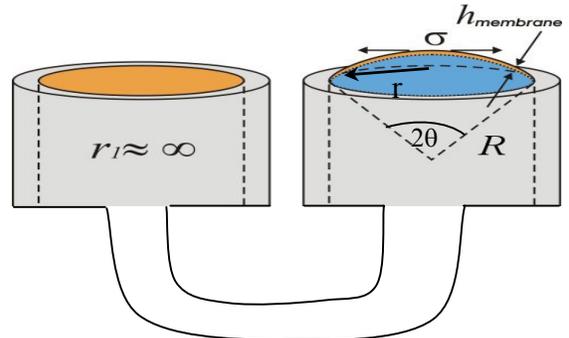
registra la migración celular.

Se puede modelar los pliegues efectuados por las células en la membrana, bajo condiciones de elasticidad de placas, como la ecuación 1:

$$\frac{h^3 E}{12(1-\sigma^2)} \nabla^4 \xi = h \left( \sigma_{xx} \frac{\partial^2 \xi}{\partial x^2} + \sigma_{yy} \frac{\partial^2 \xi}{\partial y^2} - 2\sigma_{xy} \frac{\partial^2 \xi}{\partial x \partial y} \right)$$

Ec.1, Landau & Lifshitz, 'Teoría de la elasticidad'. Siendo  $h$  el espesor del sustrato,  $\xi$  la altura de los pliegues,  $\sigma$  el coeficiente de Poisson de la membrana,  $E$  el módulo de Young de la membrana y  $\sigma_{ij}$  son las tensiones necesarias para realizar los pliegues en la membrana, descritas en coordenadas cartesianas (eje y normal a la fig. 1). Por este motivo, requerimos medir el espesor y el módulo de Young del sustrato. Ambas mediciones serán realizadas en un microscopio de efecto fuerza (AFM, atomic force microscope). Mediante un análisis de sección se obtendrá el espesor  $h$  y una curva de calibración de fuerzas realizada en el modo de contacto nos entregará el valor  $E/(1-\sigma^2)$  del sustrato.

Se hará un análisis de energía para establecer las condiciones de borde de la membrana. Para ello se requiere modelar el comportamiento de la tensión superficial ( $\gamma$ ) con y sin vulcanizado. El procedimiento que se utilizó fue un experimento de vasos comunicados, tal como se muestra en la figura 3. La variación de presión  $\Delta P$ , generada por la diferencia de altura entre los vasos, debe ser contrarrestada por la curvatura de la

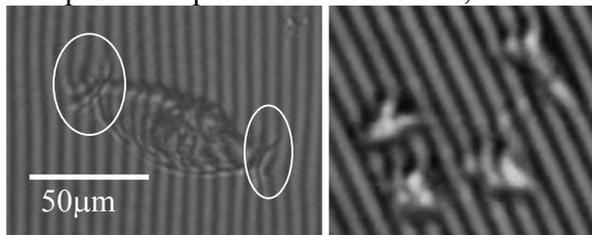


**Figura 3.** Esquema de experimento de vasos comunicados para estimar la energía superficial,  $\gamma = \sigma h_{membrana}$ .

superficie. Esta debe soportar una tensión de superficie  $\sigma$  en la membrana de espesor  $h_{\text{membrana}}$  obteniéndose la tensión superficial como  $\gamma = \sigma h_{\text{membrana}}$ . Introduciendo estas condiciones en el modelo de la ecuación 1 podremos obtener los campos de esfuerzos que generan tales pliegues en la membrana (efectuados por las células). Tanto los fibroblastos como las neuronas fueron cultivados, por separado, con medio esencial mínimo (MEM) y suero fetal bovino (SFB), a una temperatura de 37 °C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

## **RESULTADOS**

Se observó el patrón de arrugas realizado en el sustrato de PDMS, por el fibroblasto mostrado en la figura 4 a la izquierda. En esta figura es posible observar pliegues, los cuales se ven como deformaciones en el patrón de líneas, fuera del contorno del fibroblasto, a ambos extremos de la célula. Como puede observarse en la figura 4 de la derecha, los pliegues, producidos por los neuroblastos sobre el sustrato de PDMS, no son lo suficientemente grandes para ser detectados directamente con microscopía óptica por reflexión en interferencia de Michelson con luz de sodio, sin embargo, con mayor aumento, como el usado para el fibroblasto, será posible reconstruir computacionalmente la superficie a partir de estos videos,



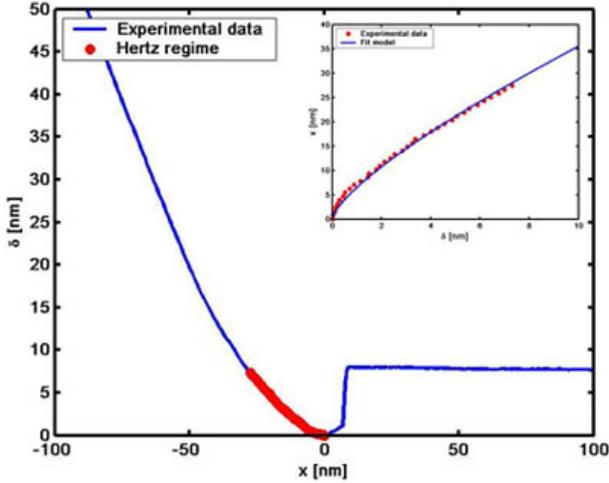
**Figura 4.** (izq) fibroblasto, se distinguen pliegues a ambos extremos de la célula. (der) Cuatro neuroblastos adheridos a un sustrato de PDMS, no se observan pliegues. Microfotografía óptica con patrón de interferencia de Michelson.

ya que en presencia de pequeñas deformaciones, la membrana puede modelarse utilizando la teoría elástica de placas (Ec. 1). La reconstrucción de estas superficies ha permitido visualizar los pliegues debidos a fuerzas de adhesión y el movimiento de masa celular en células adheridas. Con el fin de conocer el espesor de la membrana se realizó un análisis de contacto superficial en AFM. Este consiste en palpar la superficie de la muestra con la punta o tip. Su constante de restitución a la deflexión es conocida y la llamaremos  $k_1$ . Esta deflexión es medida con la desviación que sufre la reflexión de un haz láser en el tip. Al utilizar el modo de contacto para realizar un análisis de sección se obtuvo una medida del espesor del sustrato de ~ 63,31 nanómetros. Este valor fue estimado como 100 nm a partir de la imagen obtenida por interferencia óptica. Además, con el fin de obtener el módulo de Young y utilizando nuevamente el modo de contacto en AFM se obtuvo el diagrama de la figura 5 para un wafer de silicio con sustrato vulcanizado. La situación de la medición en AFM se modela como el problema de Hertz en que las superficies en contacto son la membrana y el tip. Considerando como muy grandes los valores de la curvatura del sustrato y el módulo de Young del tip se obtiene,

$$F = k_1 \delta = \frac{4E\sqrt{R}}{3[1-\sigma^2]} e^{3/2}, \text{ donde } k_1 = 0,58$$

N/m es característica del tip,  $\delta$  es la deflexión del cantilever (ordenadas en la figura 5),  $E$  es el módulo de Young,  $R$  es el radio de curvatura del tip (5nm),  $e$  es el espesor de penetración del tip en la muestra. El ajuste del régimen de Hertz se realiza sólo en la parte baja de la curva experimental de la figura 5 puesto que para una mayor penetración del tip la pendiente se acerca a la del wafer de silicio limpio. Tomando  $e$  como 1 nm, se obtiene  $E/(1-\sigma^2) = 10,996 \pm 0,002 \text{ Mpa} =$

$E^*$ , que es la razón entre el módulo de Young y uno menos el coeficiente de Poisson al cuadrado del sustrato de PDMS vulcanizado.



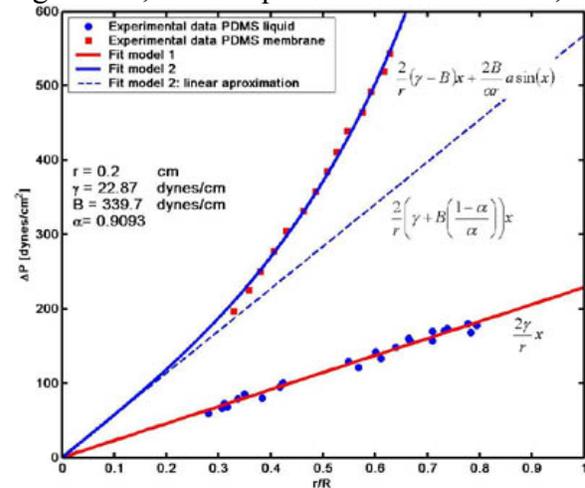
**Figura 5.** Datos experimentales obtenidos por contacto de la superficie de un sustrato de PDMS vulcanizado, en AFM. En el recuadro se observa que es análogo al problema de contacto de Hertz.

Este valor es razonable para un elastómero relativamente rígido. Se sabe que el módulo de Young de los fibroblastos está en el rango de los 2 hasta los 50 kPa. Recordemos que  $E^*$  se requiere para el modelo de la ecuación 1.

Antes de comenzar a probar fuerzas sobre el sustrato se deben conocer las condiciones iniciales de tensión superficial del PDMS. Esto se cuantificó con la técnica de vasos comunicados mostrada en la figura 3. En fase líquido es  $\gamma = \gamma_{\text{PDMS}(\text{liq}/\text{aire})} = 22,87 \text{ dinas}/\text{cm}$  y se puede calcular como  $\Delta p = \rho g h = 2 \gamma/R$ , donde  $R$  es el radio de curvatura de la gota. Esto aparece como lineal en el gráfico de la figura 6. Se ha supuesto que al vulcanizar el sustrato la tensión en la interfase membrana-aire permanece con el mismo valor que cuando era sólo líquido-aire, a pesar de generarse una nueva interfase líquido-membrana. Si se ha considerado la aparición de una contribución asociada a la contracción por enfriamiento (figura 1b), así la nueva tensión superficial de la

interfase PDMS-vapor luego de la vulcanización queda como

$\gamma_{\text{PDMS}/\text{vapor}} = \gamma' = \gamma + B \left( \frac{\delta^L}{\alpha 2r} \right)$ , utilizando este  $\gamma'$  en  $\Delta p = 2 \gamma'/R$  y teniendo en cuenta la geometría dada en la situación de la figura 3, en que  $R \text{ sen}\theta = r$ ,



**Figura 6.** Ajuste de datos experimentales para estimar la tensión de superficie. Se observa un comportamiento lineal para PDMS líquido, en cambio el modelamiento de los sustratos vulcanizados es algo más complicado. La línea punteada corresponde a la aproximación de primer orden.

se obtiene que una diferencia de presión, de la fuerza ejercida por la diferencia de altura entre las columnas de PDMS líquido sobre la membrana, con la otra cara a presión atmosférica se modela con la ecuación:

$\Delta p = (2/r)[\gamma - B] x + (2B/\alpha r) \arcsen(x)$ , donde  $r$  es el radio de la base del sustrato que tiene el valor fijo de 0,2 cm,  $B$  es la tensión (elástica) de la membrana debida a la contracción por enfriamiento (parámetro),  $x = r/R$  ( $R$ , radio de curvatura) y  $\alpha$  corresponde al coeficiente de contracción-dilatación activo de la membrana (parámetro). Del ajuste se obtiene el coeficiente  $\alpha = 0,9093$ , entre cero y uno, con lo que podemos hacer notar la ocurrencia de una contracción del perfil del sustrato cercano al 90% de su longitud inicial. El resultado para  $B$  fue de  $339,7 \text{ dinas}/\text{cm}$ . Para corroborar estos

resultados usamos el hecho que  $B = E h$ , esto con un coeficiente de Poisson de 0,5  $E = (1-\sigma^2) E^* = 8,247 \text{ MPa}$ , nos entrega un espesor promedio de 41 nm. Este valor es consistentemente menor que el medido en AFM, puesto que se trata de un promedio sobre todo el sustrato asumiendo propiedades elásticas uniformes. La medición en AFM se realizó en el borde de la membrana y el sustrato relajado suele ser más delgado en la zona central.

## **DISCUSIÓN**

El tamaño de las arrugas o pliegues en la membrana de PDMS, está dado por la separación y desplazamiento relativo de puntos de adhesión de la célula al sustrato. El cálculo indirecto realizado para el módulo de elasticidad, con el fin de caracterizar la rigidez de la membrana, podría ser reemplazado por un ensayo de microdureza por indentaciones, el cual proporciona el módulo de Young directamente y por lo tanto con menos probabilidades de error.

En el caso mostrado en la figura 4 el aumento, dado por el lente objetivo y el de la cámara, es bajo. Esto permite que pocas líneas de interferencia pasen sobre cada célula, obteniéndose una resolución insuficiente para generar la reconstrucción matemática de la superficie. Al usar lentes con mayor aumento, se acorta la distancia focal. Esta distancia está restringida por la altura de la muestra (1 mm aprox.).

## **CONCLUSIONES**

El patrón de arrugas depende de las condiciones de tensión en los bordes de la membrana. La tensión de la membrana de PDMS es mayor mientras menor sea el tiempo de centrifugación del sustrato. Un sustrato más tenso será menos deformable. Ya que las fuerzas en cuestión son del orden de los pico Newton, las

deformaciones de la membrana de PDMS son lo suficientemente pequeñas para aplicar la teoría de elasticidad para placas delgadas.

El experimento se realiza en forma análoga para los dos tipos de células utilizados, siendo en el caso de los neuroblastos cuando las fuerzas de adhesión están más localizadas y son más débiles.

## **REFERENCIAS**

- [1] Ingber DE, Dike L, Hansen L, Karp S, Liley H, et al., *Int. Review Cytol.*, 'Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration and tissue pattern during morphogenesis', **150**(1994)173.
- [2] D. Wirtz & E. Evans, *MRS Bulletin*, 'Materials Science of the Cell', **24**(1999)19.
- [3] Oliver, T., M. Dembo, and K. Jacobson, *Cell Motility Cytoskelet.* 'Traction forces in locomotion cells', **31**(1995)225.
- [4] John L. Tan, Joe Tien, Dana M. Pirone, Darren S. Gray, Kiran Bhadriraju & Christopher S. Chen, *PNAS*, 'Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force', **100**(2003)1484.
- [5] Kevin Burton, Jung H. Park & D. Lansing Taylor, *Molecular Biology of the Cell*, 'Keratocytes Generate Traction Forces in Two Phases', **10**(1999)3745.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Dr. Jorge Pavez, por su dedicación y gran ayuda en los análisis realizados en AFM.