

Contractile response of alveolar epithelial cells to biochemical or mechanical stimulation probed by traction microscopy

Núria Gavara i Casas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Estudi de la contracció de cèl·lules epitelials alveolars en resposta a estímuls inflamatoris i de deformació mitjançant microscopia de tracció

Tesi doctoral presentada per
Núria Gavara i Casas

Resum en català

Director: Dr. Ramon Farré i Ventura

Unitat de Biofísica i Bioenginyeria
Dept. de Ciències Fisiològiques I
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

1. Paper de les forces de contracció en la integritat de la monocapa alveolar

L'epiteli alveolar forma una barrera cel·lular semipermeable entre l'espai alveolar i l'interstici del pulmó, permetent l'intercanvi gasós a la vegada que restringeix el pas de líquid, macromolècules i cèl·lules cap a l'alvèol (Levitzky, 1995; Hlastala and Robertson, 1998; Maina and West, 2005). El trencament de la monocapa, degut a la formació de forats entre cèl·lules adjacents, pot donar lloc a l'augment de la permeabilitat i l'entrada de líquid a l'alvèol, característics del dany pulmonar agut (Ware and Matthay, 2000; Geiser, 2003; Matthay and Zimmerman, 2005).

La integritat de la monocapa epitelial es regeix per un equilibri dinàmic de forces als punts d'unió cèl·lula-cèl·lula, i cèl·lula-matriu (Dudek and Garcia, 2001; Fink and Delude, 2005). Les forces en joc es divideixen en una component de tensió centrípeta i una component d'adhesió centrífuga. La component centrípeta es deguda a les forces de contracció generades activament per la maquinària contràctil cel·lular i el retrocés passiu degut a la deformació cíclica a la que es troben sotmeses les cèl·lules alveolars durant la respiració. Per tal de garantir la integritat de la monocapa, les forces d'adhesió han de ser capaces de contrarestar la tensió centrípeta (Dudek and Garcia, 2001). L'equilibri de forces als punts d'unió pot veure's compromès degut a estímuls inflamatoris o bé mecànics (Dudek and Garcia, 2001).

El projecte de tesi es centra en el paper de les forces actives de contracció sobre la integritat de la monocapa alveolar en resposta a estímuls característics del dany pulmonar agut. Per tal d'estudiar aquesta component contràctil, el present projecte ha utilitzat la microscopia de tracció. Aquesta tècnica permet mesurar la força que cèl·lules adherents aïllades realitzen sobre el seu substrat, així com la seva distribució espacial i evolució temporal (Dembo and Wang, 1999; Butler et al., 2002). La tècnica consisteix en cultivar cèl·lules adherents sobre substrats elàstics que contenen microesferes fluorescents. Comparant la posició de les microesferes quan la cèl·lula es troba adherida al substrat i un cop aquesta ha estat desenganxada amb tripsina, podem calcular la força que la cèl·lula

adherent realitzava sobre el substrat (Dembo and Wang, 1999;Butler et al., 2002).

El projecte de tesi inclou dos estudis concrets, dedicats a dos estímuls característics de dany pulmonar agut als qual poden trobar-se sotmeses les cèl·lules epitelials alveolars. El primer estudi (secció 3) es centra en l'efecte que el mediador inflamatori trombina provoca sobre la realització de forces contràctils per part de cèl·lules alveolars epitelials. El segon estudi (secció 4) es centra en la resposta contràctil de cèl·lules alveolars epitelials a l'aplicar deformacions externes, simulant les condicions de respiració mecànica que requereixen molts pacients amb dany pulmonar agut.

2. Objectius de la tesi

1. Estudiar la resposta contràctil de cèl·lules epitelials alveolars en resposta a trombina.
 - 1.1. Mesurar la resposta temporal de contracció després de l'estimulació amb trombina.
 - 1.2. Estudiar la distribució de forces contràctils exercides per les cèl·lules adherides abans i després de l'estimulació amb trombina.
 - 1.3. Mesurar la polimerització i reorganització del citoesquelet d'actina induïda per l'estimulació amb trombina.
 - 1.4. Estudiar el paper del citoesquelet d'actina en la resposta contràctil a trombina mitjançant pre-tractaments amb citocalasina D.
 - 1.5. Estudiar el paper de les vies de senyalització de la fosforilació de la cadena lleugera de la miosina (MLC) en resposta a trombina mitjançant pre-tractaments amb ML7 i Y-27632.
2. Estudiar la resposta contràctil de cèl·lules epitelials alveolars en resposta a deformacions externes.
 - 2.1. Dissenyar, calibrar i validar un dispositiu que permeti aplicar deformacions biaxials controlades (max ~15% deformació lineal) i mesurar simultàniament les forces de tracció exercides per cèl·lules epitelials alveolars.
 - 2.2. Mesurar les forces de tracció exercides per cèl·lules epitelials alveolars abans, durant i després de l'aplicació de deformacions externes (fins a 11.5% deformació lineal).
 - 2.3. Determinar el paper de la polimerització d'actina en la resposta contràctil a

deformació.

- 2.4. Determinar el paper de la creació o trencament de ponts actina-miosina en la resposta contràctil a deformació.
- 2.5. Determinar el canvis temporals en la contractilitat cel·lular després de l'eliminació de la deformació externa.

3. Estudi de l'efecte de la trombina en la contracció de cèl·lules alveolars epitelials

3.1 Introducció

La trombina, una serin-proteasa implicada en la cascada de coagulació, s'ha associat a la pèrdua d'integritat de la monocapa endotelial (Levi M, 2003). El trencament de la barrera endotelial implicaria el pas d'aquest mediador inflamatori a l'espai intersticial, i la subseqüent estimulació de les cèl·lules de la monocapa epitelial (Moffatt et al., 2004). Estudis realitzats en cèl·lules epitelials alveolars estimulades amb trombina suggereixen, però, un comportament oposat a l'observat en la monocapa endotelial. En concret, alguns autors han suggerit que la trombina augmenta la integritat de la monocapa epitelial, reflectint canvis en el balanç de forces de la monocapa (Kawkitinarong et al., 2004). Aquest fet contrasta amb resultats recentment publicats pel nostre laboratori, on s'observa que la trombina provoca l'augment de la rigidesa de cèl·lules epitelials alveolars (Trepal et al., 2005; Trepal et al., 2006). Per altra banda, s'ha descrit que la trombina indueix fosforilació de la MLC i remodela el citoesquelet d'actina (Kawkitinarong et al., 2004). Aquests tres fets poden donar lloc a l'augment de la tensió centrípeta aplicada sobre els llocs d'adhesió. En conseqüència, l'augment de la integritat de la monocapa observat ha de ser explicat per alguns dels següents mecanismes complementaris: o bé la trombina enforteix les unions cel·lulars o bé redueix les forces de contracció actives generades per la maquinària contràctil via la remodelació del citoesquelet d'actina. Per tant, la mesura directa de la resposta contràctil de cèl·lules epitelials alveolars en resposta a trombina permetrà conèixer més àmpliament el paper de la trombina en el balanç de forces que regula la permeabilitat de la barrera alveolar durant inflamació.

Es coneix que la trombina actua sobre els receptors activats per proteases, estimulant les vies de senyalització que provoquen la fosforilació de la MLC (N.V.Bogatcheva, 2002). La fosforilació de la MLC permet el seu acoblament amb el citoesquelet d'actina i la posterior activació de la maquinària contràctil, donant lloc a l'exerció de forces per part de la cèl·lula (Mehta et al., 2004). Dues d'aquestes vies de senyalització són les regulades per la quinasa de la cadena lleugera de la miosina (MLCK) i la Rho quinasa. Per tal d'estudiar aquestes vies en la resposta contràctil induïda per la trombina, s'han utilitzat pre-tractaments amb els inhibidors corresponents, ML-7 i Y-27632 respectivament.

L'exerció de forces per part de la cèl·lula requereix no només la fosforilació de la MLC, sinó també la presència d'un citoesquelet d'actina organitzat en forma de filaments d'F-actina. Es per això que aquest projecte ha inclòs també l'estudi del paper de la trombina en la remodelació i possible polimerització del citoesquelet d'actina. S'han utilitzat tincions immunofluorescents per visualitzar simultàniament el citoesquelet d'actina filamentosa (F-actina) i l'actina no polimeritzada que es troba en forma globular (G-actina). D'aquesta manera s'ha pogut quantificar la polimerització d'actina induïda per la trombina (Hirshman et al., 1998).

3.2 Mètodes

Cultiu cel·lular

Com a model de cèl·lules epitelials alveolars s'ha utilitzat la línia comercial immortalitzada A549, derivada d'un carcinoma humà broncoalveolar. Les cèl·lules A549 van ser plantades dos dies abans de l'experiment sobre gels de poliacrilamida recoberts de col·lagen (2500 cèl·lules per gel) o sobre cobreobjectes (300,000 cèl·lules), per les mesures de microscopia de tracció i immunofluorescència, respectivament. 24 hores abans de l'experiment, el medi de cultiu va ser substituït per medi sense sèrum.

Microscopia de tracció.

Les concentracions de poliacrilamida i BIS van ser ajustades per tal d'optimitzar la mesura de la deformació provocada per la cèl·lula sobre el substrat. La composició escollida dels gels de poliacrilamida va ser de 2% acrilamida, 0.3% BIS i 1/125 vol/vol de

microesferes fluorescent. La rigidesa resultant dels gels de poliacrilamida, va ser mesurada mitjançant microscopia de força atòmica. Els gels van presentar una rigidesa de $398 \text{ Pa} \pm 114 \text{ Pa}$. A partir de la mesura de les deformacions provocades per la cèl·lula sobre el substrat, i coneguts tant la rigidesa del gel com el contorn cel·lular, es pot calcular la força que la cèl·lula exercia sobre el substrat (Butler et al., 2002). Els experiments de microscopia de tracció van ser duts a terme en un microscopi de fluorescència invertit. Les imatges de camp brillant i fluorescència van ser adquirides amb una camera CCD refredada. La magnificació utilitzada va ser de 40x.

Tinció d'actina

El procés de fixació i permeabilització de les cèl·lules es va realitzar amb formaldehid 3.7% i Tritó X-100 0.1%. Posteriorment, es va marcar simultàniament la F- i G-actina cel·lular mitjançant fal·loidina rodaminada i DNasa I conjugada amb Alexa 488, respectivament. Per a cada mostra, es van adquirir 5 imatges de diferents camps per a cada un dels senyals de fluorescència, mantenint tots els paràmetres d'adquisició constants. Per a cada camp, es va calcular el quocient d'intensitats totals de F- i G-actina (F/G). L'augment en la relació F/G indicava polimerització d'actina (Hirshman et al., 1998).

Protocol de mesures

Les mesures de microscopia de tracció es van iniciar amb l'adquisició d'una imatge de camp brillant de la cèl·lula a estudiar. A continuació, les imatges de fluorescència de la superfície del gel van ser adquirides a una freqüència d'una imatge per minut. Inicialment es van enregistrar 5 minuts d'imatges, corresponents a la línia de base, i posteriorment es va estimular la cèl·lula amb trombina (1 U/ml; n=12) o vehicle (n=12), continuant l'enregistrament d'imatges durant 10 minuts addicionals. També es van utilitzar pre-tractaments de 30 minuts amb citocalasina D (5 μM ; n=12), ML-7 (10 μM ; n=12), o Y-27632 (10 μM ; n=12) per estudiar tant el paper del citoesquelet d'actina com la fosforilació de la MLC en la resposta contràctil. En les mesures d'immunofluorescència, el procés de fixació es va iniciar 10 minuts després de l'estimulació amb trombina (1 U/ml; n=15) o vehicle (n=15). Addicionalment, es van realitzar pre-tractaments utilitzant les drogues i concentracions anteriorment citades (n=15 per a cada cas).

3.3 Resultats

En condicions basals, les cèl·lules A549 exerceixen forces contràctils predominantment a la perifèria i dirigides cap al centre de la cèl·lula. L'addició de trombina provoca un augment en la magnitud de les forces però no canvis en la seva distribució o direcció (Fig 1). La trombina provoca un augment significatiu d'unes 2.5 vegades respecte les forces contràctils realitzades per la cèl·lula en el nivell basal (Fig 2). La resposta temporal va ser ràpida i marcada, arribant a un plateau 8 minuts després de l'estímul (Fig 2). La disminució significativa de la força degut als pre-tractaments, tant en condicions bassals com especialment després de l'estímul amb trombina, indica el paper fonamental del citoesquelet d'actina i de la fosforilació de la MLC en la realització de forces contràctils per part de cèl·lules epitelials alveolar (Fig 4).

Les mesures de F/G-actina mostren com l'estímul amb trombina indueix un augment significatiu de la quantitat d'actina polimeritzada respecte el nivell estimulat amb vehicle (Fig 3). De la mateixa manera que en les mesures de resposta contràctil, els pre-tractaments amb citocalasina D i Y-27632 van reduir la resposta induïda per la trombina (Fig 3). Per altra banda, el pre-tractament amb ML-7 no va provocar cap reducció significativa de la resposta a trombina (Fig 3). Aquests resultats són coherents amb el rol conegut de la Rho quinasa, que regula no només la fosforilació de la MLC sinó també la polimerització del citoesquelet d'actina (Fig 3).

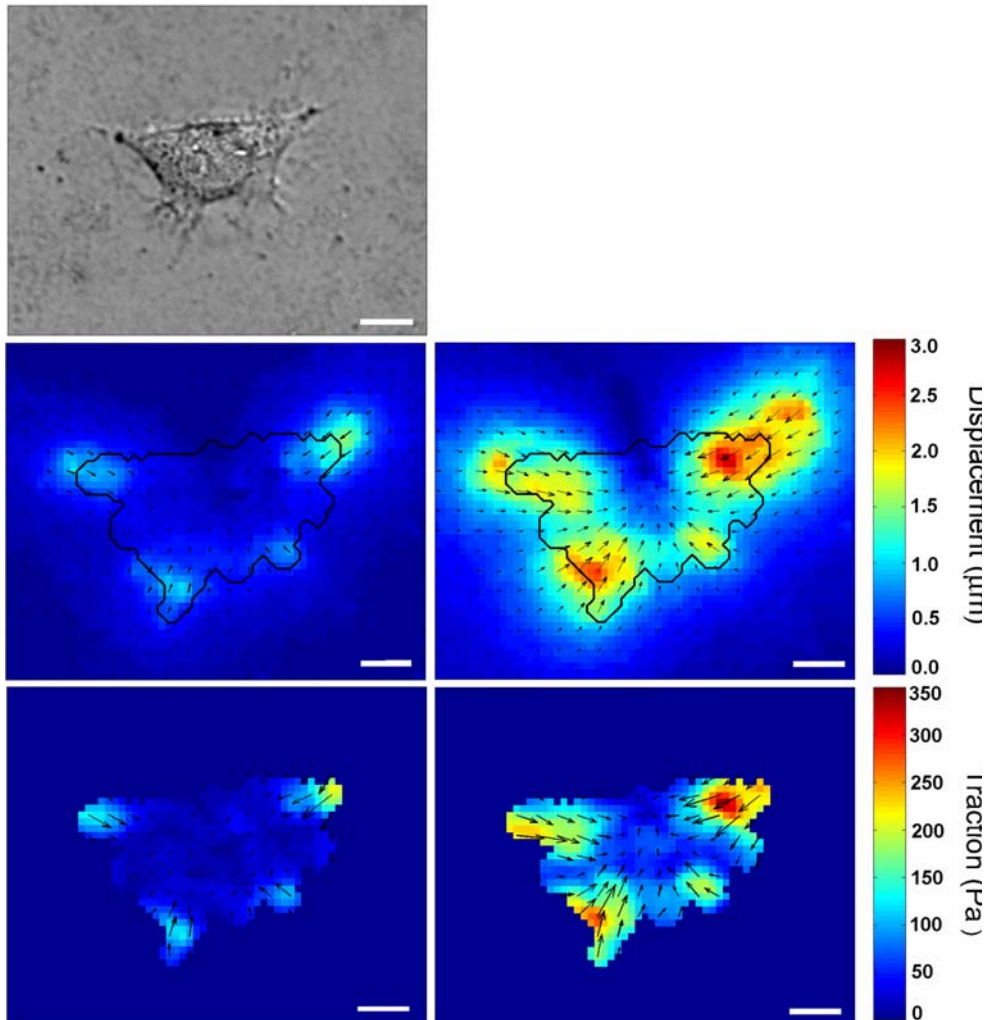


Fig 1. Contracció produïda per la trombina en una cèl·lula A549. Imatge de camp brillant abans de l'estimulació amb trombina (superior). Camps de desplaçament (mig) i corresponents camp de tracció (inferior) abans (esquerra) i després (dreta) de l'estimulació Durant 10 minuts amb trombina (1U/ml). El contorn cel·lular dibuixat a partir de la imatge de camp brillant es mostra com una línia negra. L'escala de colors indica la magnitud de desplaçament o tracció. Les fletxes mostren la direcció i la magnitud relativa de desplaçaments i traccions. Els desplaçaments i les traccions van ser calculades amb una resolució espacial de $1.3 \mu\text{m}$. Per claredat, les fletxes es mostren amb un espaiat de $3.9 \mu\text{m}$. La barra d'escala correspon a $10 \mu\text{m}$.

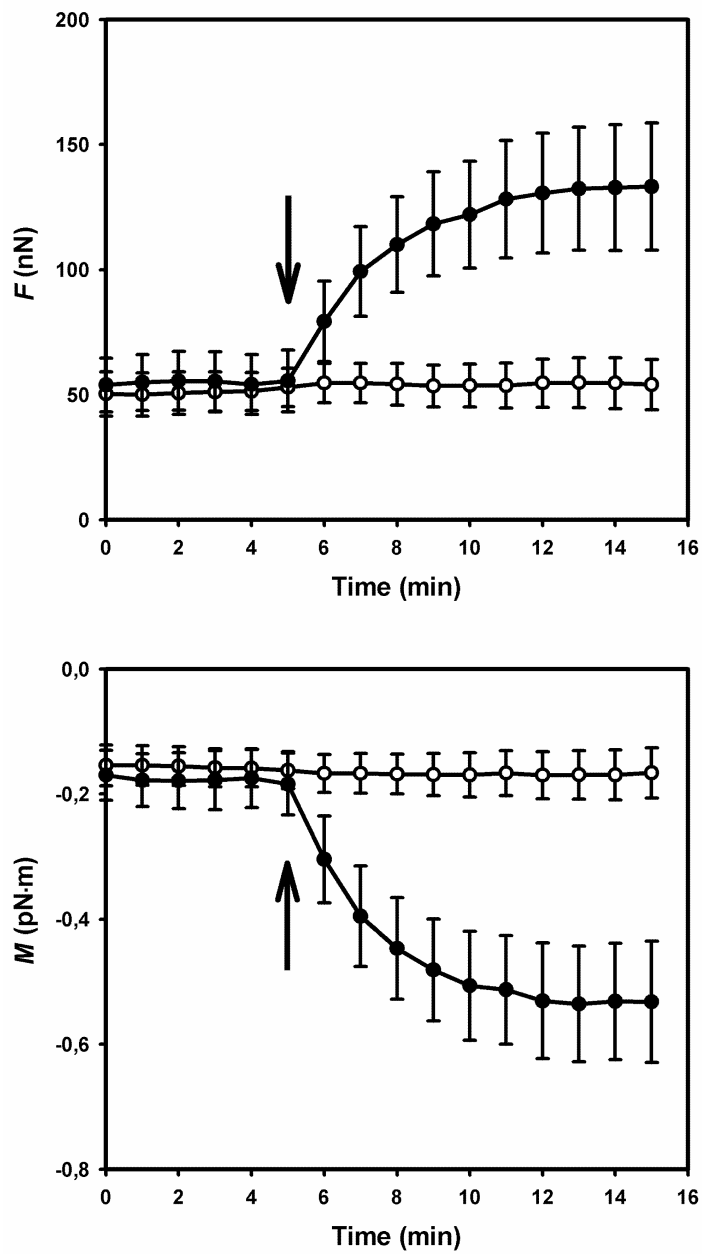


Fig 2 Resposta temporal de la contracció de cèl·lules epitelials alveolars en resposta a trombina (símbols negres) o vehicle (símbols blancs). Superior: Magnitud total de força (F). Inferior: Moment contràctil (M). Les fletxes indiquen l'addició de trombina (concentració final 1 U/ml n=12) o vehicle (n=12). Les dades es mostren com mitjana \pm SE.

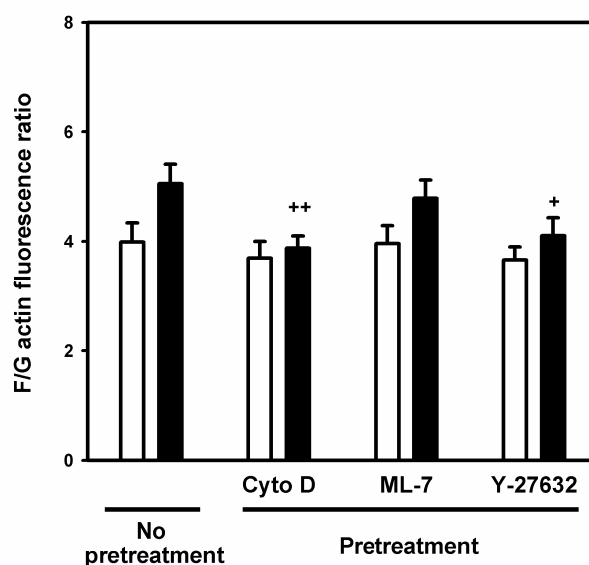


Fig 4 Efecte de la disrupció del citoesquelet d'actina i la inhibició de les vies de senyalització de la MLCK i la RoK en la conversió de G-actina a F-actina induïda per la trombina. Quocient de F/G-actina en cèl·lules estimulades amb vehicle (barres blanques) o trombina (barres negres), no pre-tractades o pre-tractades (30 min) amb citocalasina D (5 μ M), ML-7 (10 μ M) i Y-27632 (10 μ M). Les dades es mostren com mitjana \pm SE (n = 15). + i ++ indiquen P < 0.05 i P < 0.01, respectivament, comparat amb cèl·lules no pretractades amb trombina. Les diferències entre cèl·lules pretractades i no pretractades estimulades amb vehicle no va ser significativa..

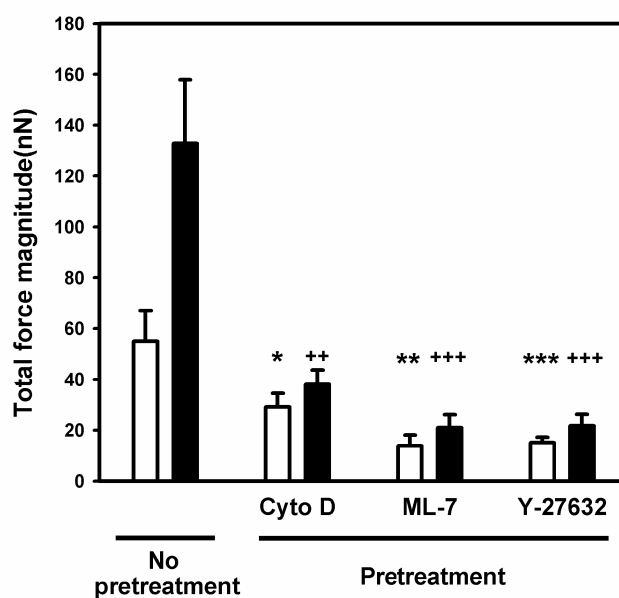


Fig 3 Efecte de la disrupció del citoesquelet d'actina i la inhibició de les vies de senyalització de la MLCK i la RoK en la contracció induïda per la trombina. Magnitud total de força en cèl·lules estimulades amb vehicle (barres blanques) o trombina (barres negres), no pre-tractades o pre-tractades (30 min) amb citocalasina D (5 μ M), ML-7 (10 μ M) i Y-27632 (10 μ M). Les dades es mostren com mitjana \pm SE (n = 12). *, ** and *** indiquen P < 0.05, P < 0.01 i P < 0.001, respectivament, comparat amb la força basal de cèl·lules no pretractades. ++ i +++ indiquen P < 0.01 and P < 0.001, respectivament, comparat amb cèl·lules no pretractades amb trombina.

3.4 Conclusions

Els resultats del present estudi mostren que les cèl·lules epitelials alveolars presenten un nivell basal de forces contràctils. El mediador inflamatori trombina augmenta el nivell contràctil de les cèl·lules epitelials alveolars. Aquest augment és regulat tant per la polimerització i remodelació del citoesquelet d'F-actina, com per l'activació de la maquinària contràctil a través de les vies de senyalització de MLCK i Rho quinasa. En el pulmó sa, l'augment de forces centrípètes observat pot ser compensat per les forces d'adhesió cel·lular. Tot i això, en condicions de dany pulmonar, l'augment de forces induït per la trombina pot empitjorar la integritat de la barrera epitelial alveolar.

Els resultats d'aquest estudi han estat publicats a la revista *Journal of Applied Physiology* (Gavara et al., 2006).

4. Estudi de la contracció de cèl·lules alveolars epitelials en resposta a deformacions externes

4.1 Introducció

Les cèl·lules epitelials alveolars es troben constantment sotmeses a deformacions cícliques durant la respiració. Alguns estudis afirmen que l'amplitud de les deformacions correspon a un 4% durant la respiració normal i pot arribar a 25% en inspiracions profundes o exercici intens (Tschumperlin and Margulies, 1999; Vlahakis and Hubmayr, 2005). Estudis previs realitzats al nostre laboratori han mostrat que l'aplicació de deformacions externes sobre cèl·lules epitelials alveolars causa l'augment de la seva rigidesa (Trepats et al., 2004). En condicions dinàmiques, aquest augment de rigidesa pot donar lloc a l'augment de forces centrípètes aplicades sobre els punts d'adhesió cel·lular, implicant la pèrdua d'integritat de la barrera alveolar (Trepats et al., 2004). Per garantir la integritat de la monocapa alveolar, aquest augment de forces ha de ser compensat amb un augment de les forces adhesives, o bé una disminució de les forces de contracció actives. Per tant, la mesura directa de la resposta contràctil de cèl·lules epitelials alveolars en resposta a deformacions externes ens permetrà conèixer més àmpliament el balanç de forces que regula la permeabilitat de la barrera alveolar en condicions dinàmiques

Les tècniques actuals no permeten l'aplicació de deformacions externes sobre les cèl·lules simultàniament amb la mesura de les forces que aquestes exerceixen sobre el seu substrat (Munevar et al., 2004). És per això que part d'aquest estudi es centra en el disseny, construcció i validació d'un sistema que permeti aplicar deformacions externes i mesurar simultàniament les forces de tracció. El sistema dissenyat permet combinar dues tècniques presents en el nostre laboratori, la microscopia de tracció (Gavara et al., 2006) i l'aplicació de deformacions controlades sobre cultius cel·lulars (Trepats et al., 2004). El sistema està constituït per una membrana flexible, deformable mitjançant un sistema de buit, sobre la

qual es construeix un gel de col·lagen (Trepap et al., 2004). Les deformacions a les quals es sotmet la membrana flexible es transmeten a través del gel de col·lagen fins a les cèl·lules adherides. El gel de col·lagen conté microesferes fluorescents, permetent així la mesura de les deformacions provocades per la cèl·lula adherida sobre aquest substrat (Tolic-Norrelykke et al., 2002).

4.2 Mètodes

Cultiu cel·lular.

Com a model de cèl·lules epitelials alveolars es va utilitzar la línia comercial immortalitzada A549, derivada d'un carcinoma humà broncoalveolar. Pels experiments de microscopia de tracció, les cèl·lules es van plantar 1 dia abans de l'experiment sobre gels de col·lagen I construïts sobre membranes flexibles (2500 cèl·lules per gel). Pels experiments d'immunofluorescència, les cèl·lules es van plantar 4 dies abans de l'experiment directament sobre membranes flexibles recobertes de col·lagen tipus I (300,000 cèl·lules per membrana).

Aplicació de deformacions externes.

El dispositiu de mesura es mostra esquemàticament a la Fig 5. Les deformacions externes s'apliquen a través d'una membrana flexible transparent sota la qual es genera buit de manera controlada. Sobre la membrana es construeix el gel de col·lagen, que permet la realització de les mesures de microscopia de tracció. Per obtenir deformacions biaxials en la regió central, es col·loca un suport cilíndric sota la membrana i s'apliquen pressions negatives a la part anular externa de la membrana. El sistema pot ser col·locat sobre la platina d'un microscopi de fluorescència invertit i permet l'utilització simultània d'un microscopi de força atòmica

Microscopia de tracció.

La concentració de col·lagen I es va ajustar per tal d'optimitzar la mesura de la deformació provocada per la cèl·lula sobre els substrat. La concentració escollida del gel de col·lagen va ser de 1.5 mg/ml i 1/500 vol/vol de microesferes fluorescents. La rigidesa resultant dels gels de col·lagen va ser mesurada mitjançant microscopia de força atòmica tant en condicions de relax com en condicions de deformació externa. A partir de la mesura de les deformacions provocades per la cèl·lula sobre el substrat, i coneguts tant la rigidesa del gel com el contorn cel·lular, es va calcular la força que la cèl·lula exercia sobre el substrat. A partir de la mesura de les deformacions sobre el gel provocades per la deformació externa es va calcular el nivell de deformació externa al qual estava sotmès el gel, i per tant la cèl·lula. Els experiments de microscopia de tracció van ser duts a terme en un microscopi de fluorescència invertit. Les imatges de camp brillant i fluorescència van ser adquirides amb una camera CCD refredada. La magnificació utilitzada va ser de 20x.

Tinció d'actina.

El procés de tinció d'actina va ser realitzat íntegrament en el dispositiu d'aplicació de deformacions, situat sobre la platina del microscopi, mantenint així el nivell de

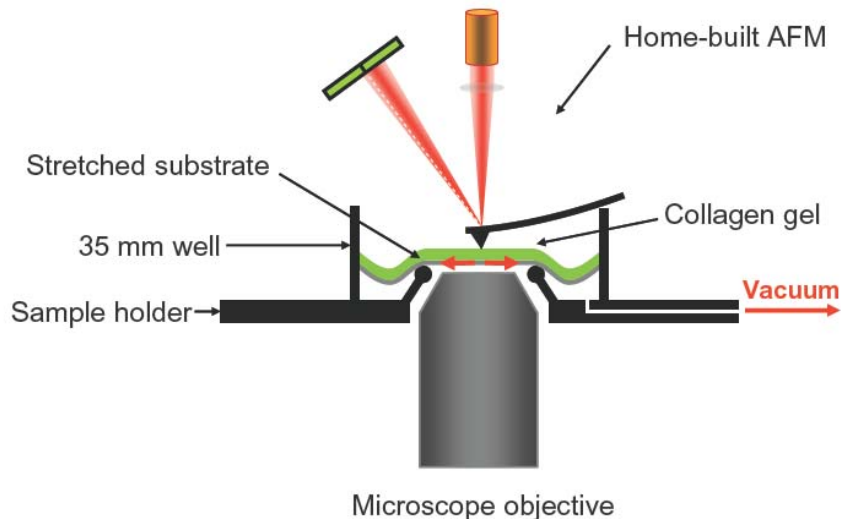


Fig 5 Esquema del dispositiu de deformació. El gel de collagen amb les microesferes inserides va ser polimeritzat en les membranes flexibles d'un pou de cultiu. El pou es col·loca sobre d'un anell concèntric amb l'objectiu d'un microscopi d'epifluorescència. Al aplicar buit sota la part exterior de la membrana, la part interior d'ella es deforma de manera homogènia i biaxial, així com el gel de col·lagen. El dispositiu de deformació pot ser utilitzat simultàniament amb un microscopi de força atòmica.

deformació externa constant. El procés de fixació i permeabilització de les cèl·lules va ser realitzat amb formaldehid 3.7% i Tritó X-100 0.1%. Posteriorment, es va marcar simultàniament la F- i G- actina cel·lular mitjançant fal·loidina rodaminada i DNasa I conjugada amb Alexa 488, respectivament. Per a cada mostra, es van adquirir 5 imatges de diferents camps per a cada un dels senyals de fluorescència, mantenint tots els paràmetres d'adquisició constants. Per a cada camp, es va calcular el quocient d'intensitats totals de F- i G-actina (F/G).

Protocol de mesures.

El protocol de mesura es mostra esquemàticament a la figura adjunta. Per a cada un dels punts I a III es va adquirir una imatge de camp brillant i una imatge de fluorescència de la superfície del gel. Per als punts IV a VII es va adquirir únicament una imatge de fluorescència del gel. Entre cada un dels punts I a VII es va deixar transcorre 2 minuts. Aparellant les imatges de la manera indicada a continuació es van poder calcular els següents valors:

- | |
|---|
| I vs IV: força basal |
| II vs V: força durant deformació |
| III vs IV: força post-deformació |
| V vs IV: nivell de deformació externa |
| VII vs V: repetitivitat de la deformació externa |
| VI vs IV: soroll de la mesura |

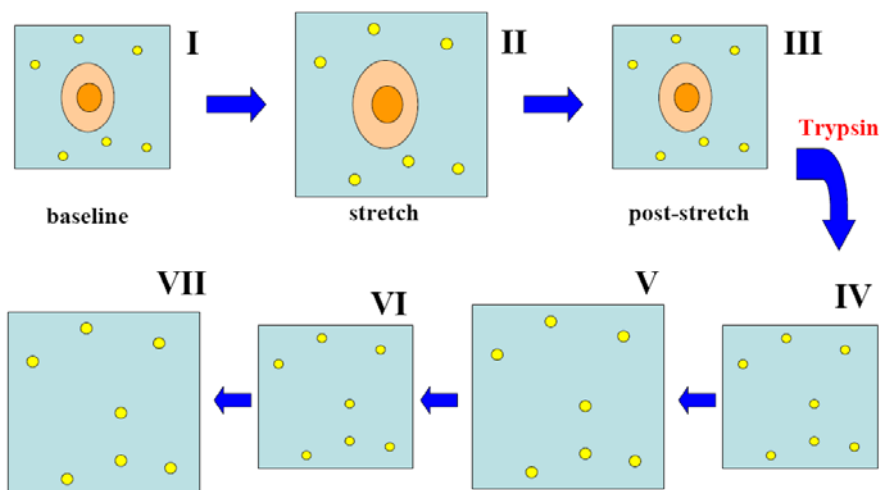


Fig 6 Esquema del protocol de mesures. I: Una imatge de camp brillant i una de fluorescència d'una cèl·lula sola van ser adquirides. II: El gel va ser deformat i es van adquirir dues imatges més. III: La deformació es va relaxar i es van adquirir dues imatges més IV: Després de desenganxar la cèl·lula, es va adquirir una imatge de fluorescència del gel relaxat. V: El gel va ser deformat i es va adquirir una altra imatge de fluorescència. VI-VII: El procés de deformació-relaxació es va repetir intantament amb l'adquisició d'imatges de fluorescència..

Paràmetres de control

Per tal de validar el sistema i assegurar-ne el correcte funcionament, es van establir certs paràmetres de control. Els paràmetres escollits són la repetitivitat de la deformació externa i la seva biaxialitat. Per a cada un dels experiments es va calcular els seus nivells de qualitat. Si els valors eren per sota del nivell de qualitat llindar, l'experiment era rebutjat.

4.3 Resultats

Es va mesurar el mòdul de young dels gels per diferents nivells de deformació (Fig 7). Els valors obtinguts van ser utilitzats per calcular el camp de traccions realitzat per les cèl·lules. La figura Fig 8 mostra la calibració del sistema. La deformació del gel va ser lineal i equibiaxial. En condicions bassals, les cèl·lules A549 exerceixen forces contràctils predominantment a la perifèria i dirigides cap al centre de la cèl·lula. L'aplicació de deformació va provocar un augment en la magnitud de les forces però no va canviar la seva distribució o direcció (Fig 9). L'augment relatiu en les forces exercides en condicions de deformació (11%) va ser de un 100% respecte els nivells basals (Fig 10). L'eliminació de la deformació va provocar una reducció en la magnitud de les forces però no va canviar la seva distribució o direcció (Fig 9). La disminució relativa en les forces exercides en condicions de post-deformació va ser de un 33% respecte els valors bassals.

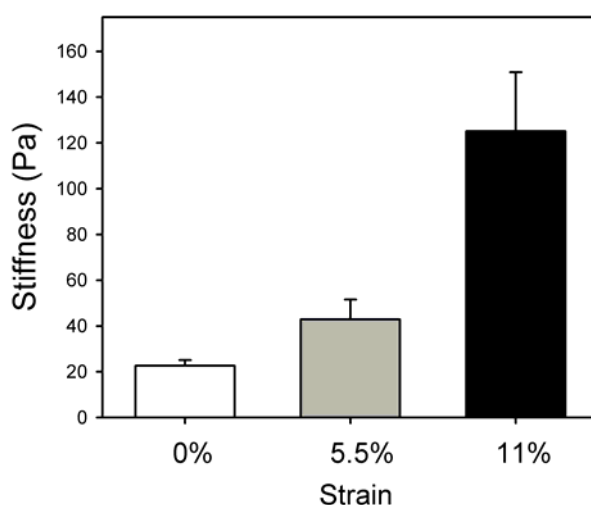


Fig 7 Mòdul de Young dels gels de col·lagen (n=5) sotmesos a deformacions de 0% (barra blanca), 5.5% (barra grisa) i 11% (barra negra). Les dades es mostren com a mitjana \pm SE.

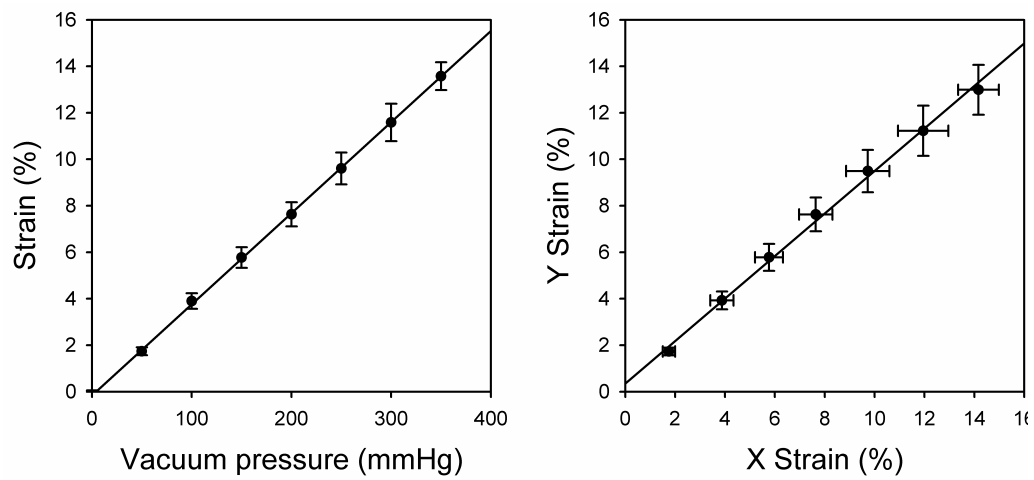


Fig 8 Calibració del dispositiu de deformació. La deformació va ser calculada a partir de imatges de fluorescència de la superfície del gel de collagen (n=5). La corba pressió-deformació és lineal (esquerra) i biaxial (dreta) fins a deformacions de 13.5%. Les dades es mostren com a mitjana \pm SE.

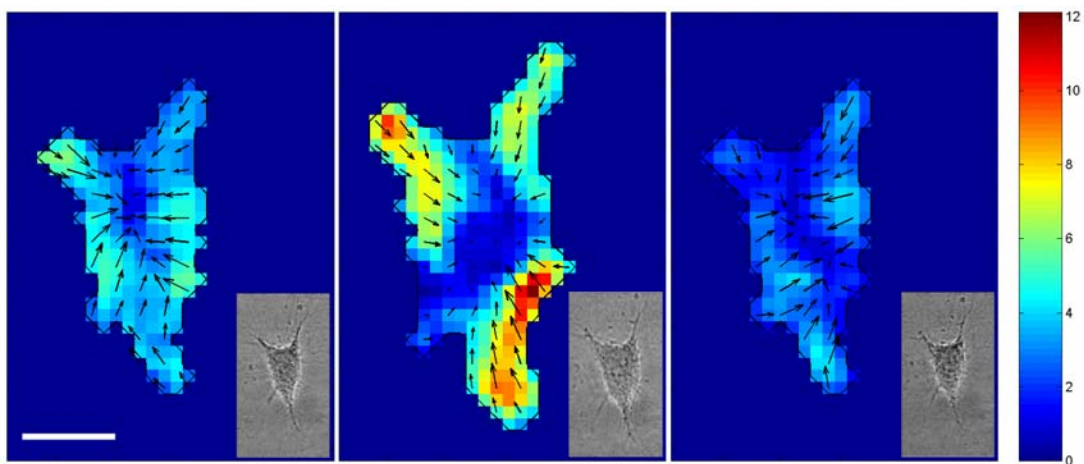


Fig 9 Contracció induïda per l'aplicació de deformacions externs en una cèl·lula epitelial alveolar. Camps de tracció d'una cèl·lula A549 abans (esquerra), durant (mig) i després (dreta) de l'aplicació de deformació. Les vinyetes mostren les imatges de camp brillant en les configuracions de deformació corresponents. El contorn cel·lular, dibuixat a partir de les imatges de camp brillant, es mostra com una línia negra. L'escala de color indica la magnitud de forces de tracció (Pa). Les fletxes mostren la direcció i magnitud relativa de les forces de tracció. Les traccions van ser calculades amb una resolució espacial de 2.6 μm . Per claredat, les fletxes en la figura es mostren amb un espaiat de 7.8 μm . La barra d'escala correspon a 20 μm .

Les mesures de F/G-actina mostren com la deformació no produeix canvis significatius en el nivell d'actina polimeritzada (Fig 11).

Quan les cèl·lules van ser pretractades amb ML7, l'augment de forces produït per la deformació va ser major que en condicions control (Fig 12). Aquesta diferència significativa en l'augment de forces degut a la deformació indica el paper fonamental de la maquinària contràctil en els canvis de contracció produïts per la deformació. Les nostres dades suggereixen que la deformació trenca els ponts actina-miosina. Per tant, l'augment de forces contràctils degut a la recuperació passiva del citoesquelet d'actina va acompanyada per una reducció de forces deguda al trencament de la maquinària actina-miosina.

Després de l'eliminació de la deformació, les cèl·lules van anar recuperant lentament la seva contractilitat basal (Fig 13). Aquest nivell es va aconseguir 8 minuts després de la relaxació de la deformació. Aquests resultats indiquen que la deformació estimula vies de senyalització de la contracció, recuperant de manera activa la contractilitat perduda degut a la deformació.

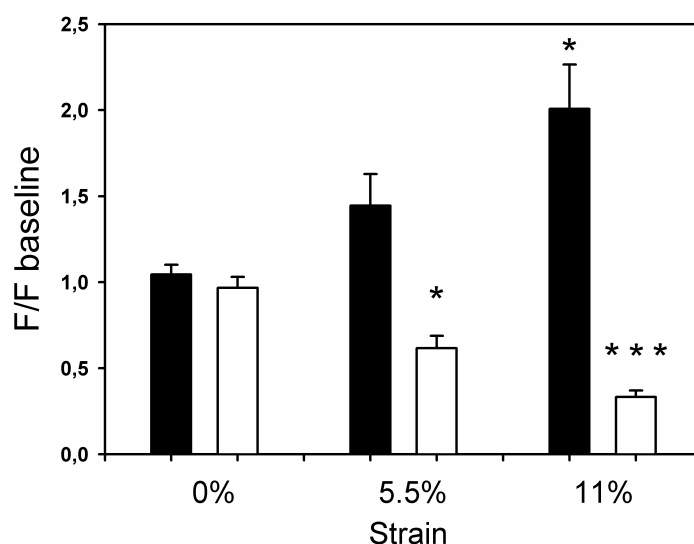


Fig 10 Contracció induïda per l'aplicació de deformacions externs en cèl·lules A549. Els valors de F es presenten com a canvis relatius respecte el valor basal. Les cèl·lules van ser sotmeses a deformacions de 0% (n=6, barres esquerra), 5.5% (n=6, barres mig) o 11% (n=6, barres dreta). Les barres negres corresponen a la configuració de deformació i les barres blanques corresponen a la configuració post-deformació. * i *** indiquen $p < 0.05$ i $p < 0.001$ vs condicions basals, respectivament.

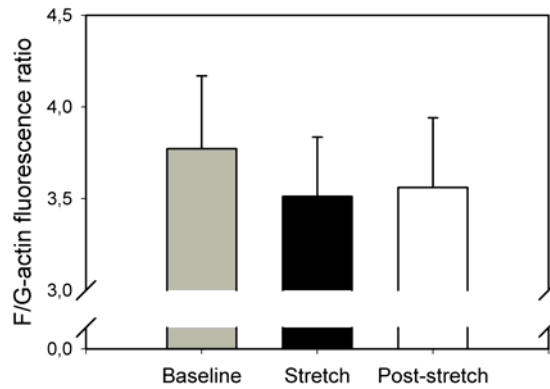


Fig 11 Canvis en el quocient F/G-actina induïts per deformació en cèl·lules A549s. La tinció va ser duta a terme abans (barra grisa, n=5), durant 11% de deformació (barra negra, n=5) or després de la relaxació de la deformació (barra blanca, n=5).

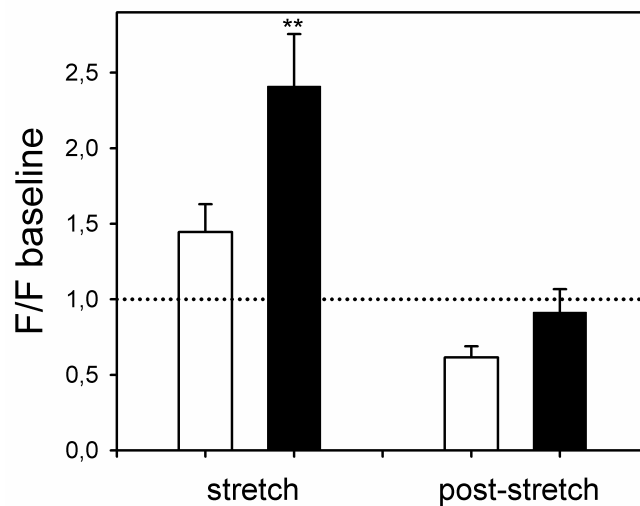


Fig 12 Efecte of inhibició de MLCK en la resposta contràctil induïda per deformacions externes. Els valors de F es presenten com a canvis relatius respecte el basal. Les cèl·lules van ser subjectes a nivells de deformació del 5.5% (barres esquerra) i després la deformació va ser eliminada (barres dreta). Les barres blanques corresponen a les cèl·lules no pretractades (n=6) i les barres negres corresponen a les cèl·lules pre-tractades amb ML-7 (n=6). La línia de punts correspon al nivell de força basal. ** indica $p < 0.01$ vs l'augment relatiu provocat per la deformació en les condicions control (no pretractament barra blanca de l'esquerra).

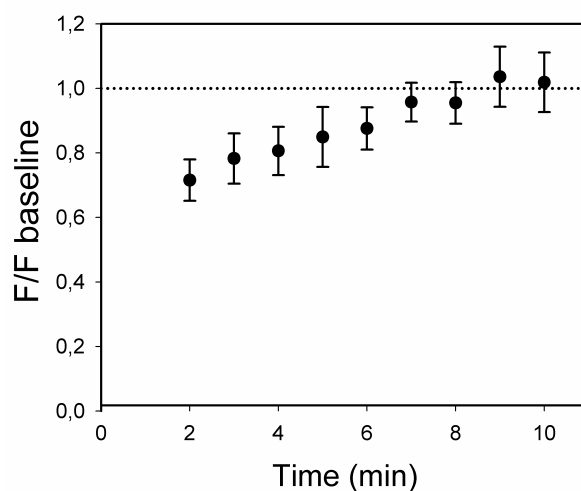


Fig 13 Resposta temporal de la recuperació de F després de eliminar la deformació. Els valors de F es presenten com a canvis relatius respecte el basal. Les cèl·lules ($n=6$) van ser sotmeses a 5.5% de deformació i la deformació va ser posteriorment eliminada. El temps inicial correspon a l'instant d'eliminació de la deformació. La línia de punts correspon al nivell de força basal.

4.4 Conclusions

Els resultats del present estudi mostren que la deformació del substrat induïx la contracció de cèl·lules epitelials alveolars. Per altra banda, la relaxació de la deformació té com a resultat la disminució de les forces contràctils respecte els nivells basals. Els resultats mostren que l'augment de força no es degut a la polimerització del citoesquelet d'actina. Per altra banda, els nostres resultats suggereixen que la deformació trenca els ponts actina-miosina, disminuint la generació activa de forces contràctils. Per tant, l'augment de forces en condicions de deformació es deu a la recuperació passiva del citoesquelet d'actina. La deformació també activa vies de senyalització de la contracció, possiblement a través de canals de calci. L'augment de forces centrípètes observat en condicions de deformació pot posar en perill l'equilibri de forces en la barrera alveolo-capil·lar, resultant en el trencament de la barrera i edema pulmonar.

5. Conclusions de la tesi

1. S'ha mesurat la resposta contràctil de cèl·lules epitelials alveolars després de l'estímul amb trombina. La trombina (1 U/ml) va provocar una ràpida resposta de 2.5 vegades en la magnitud total de força. L'augment de forces provocat per la trombina va arribar a un valor plateau al cap de 8 minuts després de l'estímul (objectiu 1.1).
2. Es va estudiar la distribució de forces contràctils exercides per les cèl·lules adherides abans i després de l'estimulació amb trombina. Les forces contràctils van ser exercides principalment a la perifèria i dirigides cap al nucli. L'estímul amb trombina no va fer canviar la distribució de forces però va incrementar la direcció centrípeta de les forces (objectiu 1.2).
3. Es va observar la polimerització i reorganització d'actina induïda per la trombina. La trombina va induir la polimerització d'actina i la formació d'un anell perifèric d'actina (objectiu 1.3).
4. S'ha estudiat el paper del citoesquelet d'actina en la resposta contràctil a trombina. La depolimerització del citoesquelet d'actina amb citocalasina D va inhibir la resposta contràctil i la polimerització d'actina (objectiu 1.4).
5. S'ha estudiat el paper de les vies de senyalització de la MLC en la resposta contràctil induïda per la trombina. La inhibició de la MLCK i amb ML7 va inhibir la resposta contràctil però no la polimerització d'actina. La inhibició de la Rho-quinasa amb Y-27632 va inhibir la resposta contràctil i va reduir la polimerització d'actina (objectiu 1.5).
6. S'ha dissenyat, validat i calibrat un dispositiu per aplicar deformacions controlades biaxials i simultàniament mesurar les forces de tracció exercides per cèl·lules epitelials alveolars (objectiu 2.1).
7. S'han mesurat les forces de tracció exercides per cèl·lules epitelials alveolars abans, durant i després de ser estimulades amb una deformació externa. La deformació va provocar un augment en les forces de tracció de fins a 2 vegades per a deformacions lineals de 11%. Aquest augment va dependre del nivell de deformació aplicada (objectiu 2.2).
8. L'eliminació de la deformació va resultar en la relaxació cel·lular, arribant a nivells

-
- de 33% del valor basal per a deformacions del 11%. La relaxació cel·lular també va dependre del nivell de deformació prèviament aplicat (objectiu 2.2).
9. S'ha estudiat el paper de la polimerització d'actina en la resposta contràctil a deformació. No s'han observat canvis significatius en la quantitat d'actina polimeritzada abans, durant o després de l'aplicació de deformació (objectiu 2.3).
 10. S'ha estudiat el paper del trencament dels ponts d'actina-miosina en la resposta contràctil a deformació. Quan la generació activa de forces va ser reduïda mitjançant la inhibició de la MLCK, l'augment relatiu en les forces de tracció degut va deformació va ser major (140% vs basal) que en condicions control (45% vs basal) (objectiu 2.4).
 11. La disminució relativa de forces de tracció respecte el nivell basal després de l'eliminació de la deformació va ser menor en cèl·lules on s'havia inhibit la MLCK que en condicions control (objectiu 2.4).
 12. Les conclusions 10 i 11 suggereixen que la deformació indueix el trencament dels ponts actina-miosina (objectiu 2.4).
 13. S'han estudiat els canvis temporals en la contractilitat cel·lular després de l'eliminació de la deformació. Després de l'eliminació de la deformació, les forces contràctils es van anar recuperant progressivament fins arribar a nivells basals al cap de 8 minuts (objectius 2.5).
 14. La trombina i la deformació, que són estímuls característics de dany pulmonar agut, indueixen l'augment de forces contràctils en cèl·lules epitelials alveolars.
 15. L'augment en la contracció cel·lular observat pot descompensar el balanç de forces de la barrera epitelial alveolar. L'aparició potencial de forats paracel·lulars pot iniciar dany de nou en pulmons sans o empitjorar el dany pulmonar pre-existent.

6. Referències

1. Butler, J.P., I.M. Tolic-Norrelykke, B. Fabry, and J.J. Fredberg. 2002. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C595-C605.
2. Dembo, M. and Y.I. Wang. 1999. Stresses at the Cell-to-Substrate Interface during Locomotion of Fibroblasts. *Biophys. J.* 76:2307-2316.
3. Dudek, S.M. and J.G. Garcia. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol* 91:1487-1500.
4. Fink, M.P. and R.L. Delude. 2005. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin.* 21:177-196.
5. Gavara, N., R. Sunyer, P. Roca-Cusachs, R. Farre, M. Rotger, and D. Navajas. 2006. Thrombin-induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy. *J Appl Physiol* 101:512-520.
6. Geiser, T. 2003. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss Med. Wkly.* 133:586-590.
7. Hirshman, C.A., H. Togashi, D. Shao, and C.W. Emala. 1998. Galpha i-2 is required for carbachol-induced stress fiber formation in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275:L911-L916.

-
8. Hlastala, M. and H. Robertson. 1998. Complexities in structure and function of the lung. Marcel Decker, New York.
 9. Kawkitinarong, K., L. Linz-McGillem, K. G. Birukov, and J. G. Garcia. 2004. Differential regulation of human lung epithelial and endothelial barrier function by thrombin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31:517-527.
 10. Levi, M., S. M. R. A. v. d. P. T. 2003. **Bronchoalveolar coagulation and fibrinolysis in endotoxemia and pneumonia.** *Crit Care Med.*
 11. Levitzky, M. 1995. Pulmonary physiology. McGraw-Hill, New York.
 12. Maina, J. N. and J. B. West. 2005. Thin and Strong! The Bioengineering Dilemma in the Structural and Functional Design of the Blood-Gas Barrier. *Physiol. Rev.* 85:811-844.
 13. Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman. 2005. Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome: Four Decades of Inquiry into Pathogenesis and Rational Management. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33:319-327.
 14. Mehta, D., J. Bhattacharya, M. A. MATTHAY, and A. B. Malik. 2004. Integrated control of lung fluid balance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L1081-L1090.
 15. Moffatt, J. D., C. P. Page, and G. J. Laurent. 2004. Shooting for PARs in lung diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 4:221-229.
 16. Munevar, S., Y. L. Wang, and M. Dembo. 2004. Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated Ca²⁺ entry. *J Cell Sci* 117:85-92.
 17. N. V. Bogatcheva, J. G. N. G. a. A. D. V. 2002. Molecular Mechanisms of Thrombin-

Induced Endothelial Cell Permeability. *Biochemistry*.

18. Tolic-Norrelykke, I.M., J.P. Butler, J. Chen, and N. Wang. 2002. Spatial and temporal traction response in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1254-C1266.
19. Trepap, X., M. Grabulosa, L. Buscemi, F. Rico, R. Farre, and D. Navajas. 2005. Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells. *J. Appl. Physiol* 98:1567-1574.
20. Trepap, X., M. Grabulosa, F. Puig, G.N. Maksym, D. Navajas, and R. Farre. 2004. Viscoelasticity of human alveolar epithelial cells subjected to stretch. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*
21. Trepap, X., F. Puig, N. Gavara, J.J. Fredberg, R. Farre, and D. Navajas. 2006. Effect of stretch on structural integrity and micromechanics of human alveolar epithelial cell monolayers exposed to thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L1104-L1110.
22. Tschumperlin, D.J. and S.S. Margulies. 1999. Alveolar epithelial surface area-volume relationship in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 86:2026-2033.
23. Vlahakis, N.E. and R.D. Hubmayr. 2005. Cellular Stress Failure in Ventilator-injured Lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171:1328-1342.
24. Ware, L.B. and M.A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342:1334-1349.