



Tesina de Grado

Licenciatura en Bioquímica

“Caracterización de las propiedades mecánicas y de la estructura celular en una línea celular HaCaT transducida con los oncogenes virales del VPH-18”

Bach. Magdalena Millán

Tutor: Dr. Miguel Arocena

Cotutora: Dra. Jimena Hochmann

Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Junio, 2022

Montevideo, Uruguay

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores: Dr. Miguel Arocena y Dra. Jimena Hochmann. Excelentes científicos y, sobre todo, mejores personas. Es admirable la capacidad que tienen para estar siempre pensando en investigar más y más, a pesar de cualquier adversidad que se presente. Gracias por su apoyo y dedicación durante todo este proceso; también por haber compartido conmigo invaluable conocimientos.

Agradecer, especialmente, al Dpto. de Genómica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y a toda su gente, por haberme abierto las puertas y tratarme como una más.

Al Dpto. de Proteínas y Ácidos Nucleicos (DPAN) por haberme permitido hacer uso de la sala de cultivo y todos sus equipos; imprescindible para llevar a cabo este trabajo.

Al Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología del IIBCE, en particular a Juan Benech y Lihúén Tukić, por su valiosa colaboración, compartir sus conocimientos y prestar el extraordinario Microscopio de Fuerza Atómica.

A la Dra. Cecilia Mathó, por tener la disposición de corregir mi tesina.

A toda mi familia, por su apoyo absoluto y amor, a pesar de la distancia. En particular, a mis abuelas, por estar siempre con sus oraciones y velas, previo a los exámenes.

Mención aparte para mis padres, que son grandes pilares en mi vida; gracias por brindarme la posibilidad de estudiar y por su apoyo incondicional, pero, sobre todo, gracias por no dejarme caer. Esto va dedicado para ellos.

A mi hermano, que a su manera siempre me apoyó.

A mis amigos de toda la vida, por estar siempre, en la medida que sea, y alentarme a seguir. En especial, a mis amigas incondicionales.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, por su gran apoyo en las buenas y en las malas. No sé qué hubiese sido de la carrera sin ustedes, sus resúmenes y horas de estudio (presenciales y virtuales). Me llevo los momentos compartidos para siempre.

Por último, pero no menos importante, a mi gran compañero del día a día: mi perro Kanú.

ÍNDICE

Abreviaturas	4
1. Resumen	5
2. Introducción	6
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. Materiales y métodos	12
4.1. Líneas y cultivos celulares	12
4.2. Estudio de propiedades nanomecánicas de las células por microscopía de fuerza atómica	12
4.3. Estudio de la morfología celular mediante la visualización del citoesqueleto de actina por microscopía confocal	15
4.4. Obtención de imágenes mediante microscopía confocal	16
4.5. Análisis de la circularidad celular utilizando el programa Fiji/ImageJ	16
4.6. Análisis de las uniones célula-célula utilizando el programa Fiji/ImageJ	16
4.7. Análisis estadístico	16
5. Resultados	17
5.1. Análisis de la estructura y nanomecánica celular por medio de AFM	17
5.2. Visualización de la estructura y nanomecánica celular mediante AFM ... 18	
5.3. Visualización de los contactos célula-célula y la rigidez asociada	20
5.4. Visualización del citoesqueleto de actina por microscopía confocal	21
5.5. Análisis de la morfología celular mediante reconstrucción de planos XZ e YZ y medidas de circularidad	21
6. Discusión	24
7. Conclusiones	27
8. Referencias	28

ABREVIATURAS

VPH	Virus del Papiloma Humano
OMS	Organización Mundial de la Salud
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
PF-QNM	Peakforce Quantitative Nanomechanical Mapping
EMT	Transición Epitelio Mesénquima
MEC	Matriz Extracelular
Rb	Retinoblastoma
RE	Retículo Endoplásmico
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
SFB	Suero Fetal Bovino
PBS	Buffer Fosfato Salino
IIBCE	Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
PFA	Paraformaldehído
ROS	Especies reactivas de oxígeno

Los virus del papiloma humano (VPH) son pequeños virus de ADN que muestran un tropismo por el epitelio escamoso. Se han identificado más de 220 tipos de VPH, y aproximadamente un tercio de estos infectan el epitelio escamoso del tracto genital (Villiers, 2004). De los VPH genitales, que se transmiten sexualmente, 15 se clasifican como de alto riesgo y se consideran los agentes causantes de la mayoría de los cánceres de cuello uterino (Walboomers, 1999). Las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH son los principales factores virales responsables del inicio y la progresión del cáncer de cuello uterino, y actúan en gran medida superando la regulación negativa del crecimiento celular, por parte de las proteínas de la célula huésped, e induciendo inestabilidad genómica (Moody, 2010). A su vez, se sabe que los genes E6 y E7 contribuyen de manera más significativa a la oncogénesis, y que se expresan constitutivamente en células cancerosas después de la integración del ADN viral.

Durante la tumorigénesis, las células cancerosas sufren cambios en sus propiedades mecánicas, como pueden ser disminución en la rigidez, morfología más redonda y, a menudo, pueden adoptar un fenotipo más invasivo. No se conoce de forma precisa los cambios que sufren las células cancerosas en los estadios intermedios de la transformación maligna. Para averiguar esto, nos hemos basado en un modelo pretumoral previamente generado transduciendo de forma estable la línea celular HaCaT de queratinocitos humanos inmortalizados, pero no tumorigénicos, con los oncogenes E5, E6 y E7 del VPH-18, una de las principales causantes del cáncer de cuello uterino. Hemos recurrido al uso de microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía confocal para estudiar los cambios mecánicos y morfológicos, respectivamente, en las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18. Por medio de AFM, observamos variaciones en la rigidez celular, midiendo el módulo de Young y, mediante microscopía confocal, observamos la diferencia en la forma celular, ya que en las células HaCaT E5/E6/E7-18 se observó una forma más redondeada, mientras que las células HaCaT control tenían una forma más alargada y "achatada". En particular, a través de AFM, observamos una disminución significativa en el módulo de Young en las células HaCaT E5/E6/E7-18, el cual fue medido por nanoindentación en la región central, así como una disminución de la rigidez celular en las regiones de contacto célula-célula medida por el modo de mapeo nanomecánico cuantitativo "Peakforce Quantitative Nanomechanical Mapping" (PF-QNM). Por lo tanto, en nuestros resultados se logró plasmar una correlación entre la rigidez y la alteración en la morfología celular, usando las células HaCaT E5/E6/E7-18 como un modelo celular de las etapas tempranas de transformación maligna.

El término cáncer se utiliza para aludir a un conjunto de enfermedades que se pueden originar en órganos o tejidos del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo, y/o se propagan a otros órganos (Organización Mundial de la Salud, 2022a). Este último proceso se denomina metástasis, y es una importante causa de defunción por cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2022a). El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo; en 2020 ocasionó aproximadamente 10 millones de fallecimientos (Ferlay et al., 2020; Organización Mundial de la Salud, 2022b).

En el cáncer, las células normales o benignas sufren un proceso de transformación, que implica varios pasos, y las lleva a convertirse en células cancerosas. De esta forma, las células cancerosas pueden promover la formación de tumores e impulsar la progresión tumoral, mediante mutaciones en determinados oncogenes y en genes supresores de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011). El cáncer comprende determinadas características que son adquiridas a lo largo del proceso de transformación maligna. Entre ellas se encuentran: una descontrolada proliferación celular, evasión de la muerte celular por apoptosis, inmortalización celular, angiogénesis, invasión y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000). A su vez, las células tumorales presentan determinadas propiedades nanomecánicas que están asociadas a una menor rigidez celular (Raudenska et al., 2018; Wala & Das, 2020) y a la resistencia a deformarse (Wala & Das, 2020). Dentro de las propiedades mecánicas, están comprendidas el módulo de elasticidad, la rigidez y la adhesión de las células, las cuales son importantes para comprender varios procesos biológicos, incluidos el crecimiento celular, la migración, la diferenciación, la motilidad y la homeostasis tisular para diferenciar las células normales de las cancerosas (Calzado - Martín et al., 2016; Guillou et al., 2016). Además, dentro de las propiedades previamente mencionadas, está incluida la deformabilidad, o la resistencia a la deformación, de una célula en respuesta a una carga aplicada. La deformabilidad es una propiedad que permite caracterizar las células; es una característica integradora de muchos cambios moleculares. Hallazgos recientes han demostrado que la caracterización mecánica es un medio alternativo para diagnosticar el cáncer, detectar células raras y predecir el fenotipo (Revisado por Darling & Di Carlo, 2015). El comportamiento mecánico de las células individuales está fuertemente ligado a sus componentes intracelulares, en particular el citoesqueleto (Revisado por Darling & Di Carlo, 2015). El citoesqueleto es una red tridimensional altamente interconectada compuesta por tres sistemas principales de biopolímeros: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios, junto con sus proteínas asociadas (Ingber, 1998). Los microfilamentos son polímeros lineales de

subunidades de actina que pueden ensamblarse en filamentos helicoidales (Revisado por Darling & Di Carlo, 2015). Estos microfilamentos pueden aparecer solos o asociados a filamentos de miosina. Estas últimas estructuras representan los microfilamentos contráctiles que generan tensión, que se transmite continuamente a través de toda la red de actina interconectada y, por lo tanto, de toda la célula. En las células vivas, los filamentos de actina casi siempre exhiben una forma muy lineal, lo que sugiere que están continuamente bajo tensión (Ingber, 1998). La actina filamentosa (actina-F) se organiza en tres estructuras principales: el citoesqueleto de la membrana plasmática, el anillo de actina cortical, y las fibras de estrés (Prasain & Stevens, 2009). Los microtúbulos son polímeros tubulares huecos compuestos de diferentes isotipos de monómero de tubulina. Estos biopolímeros resisten la flexión y la torsión (Janmey, 1991) y comúnmente exhiben una morfología altamente curvada o pandeada en las células vivas (Ingber, 1998). Los filamentos intermedios están compuestos por diferentes monómeros proteicos, según el tipo de célula específico (Ingber, 1998). Estos filamentos son muy flexibles (Leterrier et al., 1996) y en las células vivas aparecen en una forma muy extendida, estirándose desde el borde del núcleo hasta sitios discretos de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC) en la periferia celular (Ingber, 1998). Los tres tipos de polímeros están organizados en redes que resisten la deformación, pero pueden reorganizarse en respuesta a fuerzas aplicadas desde el exterior, y tienen funciones importantes en la organización y el mantenimiento de la integridad de los compartimentos intracelulares (Fletcher & Mullins, 2010). El citoesqueleto, conformado por los componentes anteriormente mencionados, actúa en conjunto para equilibrar las cargas de tracción y compresión, y contribuye al fenotipo mecánico de una célula. (Heindermann et al., 1999; Mahaffy et al., 2000; Rotsch & Radmacher, 2000).

Por otra parte, los componentes del citoesqueleto pueden sufrir reorganización (Benedetti & Reyes, 2015), mediante un proceso que se conoce como transición epitelio-mesénquima (EMT), el cual es el proceso morfogénico mediante el cual las células epiteliales se transforman en células mesenquimales (Thiery, 2002). Este proceso puede inducir a las células a adoptar un fenotipo más invasivo y migratorio (Kalluri, 2009). Mientras que las células epiteliales están firmemente unidas entre sí y con la matriz extracelular subyacente (MEC), las células mesenquimatosas están poco compactas y son más susceptibles a migrar. Dicho esto, en el cáncer ocurre muchas veces que las células durante el proceso de transformación maligna pierden proteínas de adhesión célula-célula, tales como la E-cadherina, lo cual contribuye a una mayor migración celular, resultando en invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

Durante la tumorigénesis, las propiedades mecánicas de las células cancerosas cambian notablemente, con una disminución de la rigidez que a menudo acompaña a un fenotipo más invasivo (Venkatesh et al., 2008; S. Li et al., 2011; Garteiser et al., 2012). Se

conocen menos los cambios en los parámetros mecánicos en etapas intermedias del proceso de transformación maligna. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo de células pretumorales mediante la transducción estable de la línea celular HaCaT, de queratinocitos humanos inmortalizados, pero no tumorigénicos, con los oncogenes E5, E6 y E7 del VPH-18. El VPH es el agente etiológico del cáncer de cuello de útero, y el principal responsable de otros tipos cánceres, tales como el carcinoma orofaríngeo. Cabe destacar que la preparación de esta línea celular fue llevada a cabo por mi cotutora Jimena Hochmann (Hochmann et al., 2020). En el presente trabajo se utilizó dicha línea celular para estudiar cambios mecánicos en el proceso de transformación maligna, debido a la presencia de los oncogenes virales E5, E6 y E7 del VPH-18. En la sección Materiales y Métodos se explica el método de generación de la línea celular HaCaT E5/E6/E7-18, establemente transducida con los oncogenes E5, E6 y E7 del VPH-18. Las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 de los VPH de alto riesgo oncogénico son los principales factores virales responsables de la transformación maligna y de la progresión a cáncer cervical. (Hochmann et al, 2020). A su vez, se sabe que los genes E6 y E7 contribuyen de manera más significativa a la oncogénesis, y que se expresan constitutivamente en células cancerosas después de la integración del ADN viral. La proteína E6 es capaz de unirse a la proteína supresora de tumores p53 para inducir su ubiquitinación y posterior degradación proteasomal (Scheffner et al., 1990). De manera similar, E7 se une a la proteína retinoblastoma (Rb), también un supresor de tumores, y facilita la degradación proteasomal (Dyson et al., 1989). Como resultado de la proteólisis de dos supresores tumorales fundamentales como p53 y Rb, la célula huésped pierde la capacidad de entrar en apoptosis o senescencia, o de detener el ciclo celular, creando un ambiente ideal para la producción viral y la oncogénesis (Waku et al., 2020). Por lo tanto, esto contribuye a la progresión incontrolada del ciclo celular, la inestabilidad genómica y la inmortalización celular (Munger et al., 1989a; Munger et al., 1989b; Scheffner et al., 1990; Stöppler et al., 1997; Moody & Laimins, 2010). Por otro lado, E5 es una proteína transmembrana pequeña de 8,3 kDa (VPH-18) e hidrofóbica que se localiza principalmente en las membranas intracelulares del retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. Esta proteína es capaz de estimular la proliferación celular formando complejos con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la membrana celular (Venuti et al., 2011; DiMaio & Petti, 2013). Además, interfiere en la comunicación célula-célula, la adherencia y motilidad celular (Venuti et al., 2011).

Considerando las propiedades nanomecánicas de las células, uno de los métodos para estudiarlas ha sido la microscopía de fuerza atómica (AFM). Esta es una técnica de caracterización de superficies de alta resolución y se utiliza para realizar medidas topográficas y estudiar propiedades tales como, elasticidad, adhesión, altura, dureza,

disipación de la energía y deformación plástica (Díaz, 2004; Bianchi et al., 2016). Entre las diferentes técnicas para analizar la mecánica celular, la AFM se destaca por proporcionar mapas de alta resolución de las propiedades mecánicas de las células y la caracterización cuantitativa de estas y, además, es una técnica confiable para correlacionar la mecánica con la morfología celular (Haase & Pelling 2015; Gavara & Chadwick 2017). En los últimos años, la AFM se ha utilizado ampliamente para aplicaciones biológicas y médicas (Fung et al., 2011). Se ha demostrado que las células cancerosas exhiben una rigidez mucho menor que las células benignas y, por lo tanto, un módulo de Young menor (Lekka et al., 1999; Fung et al., 2011; Luo et al., 2016; Alibert et al., 2017), lo que probablemente refleja los cambios en el citoesqueleto asociados con la transformación. (Lekka et al., 1999; Fung et al., 2011). El módulo de Young es una constante que relaciona la deformación con la tensión, que se define como la relación entre la tensión σ , o fuerza por unidad de área, y la deformación, γ ; para deformaciones pequeñas, se cumple la ley de Hooke, que establece que la tensión y la deformación son directamente proporcionales. En esos casos, se cumple por lo tanto que: $E = \sigma/\gamma$ (Gardel et al., 2004). A su vez, el módulo de Young es una medida de la rigidez de los materiales. En el caso de las células, el módulo de Young está determinado principalmente por la resistencia del citoesqueleto a una deformación inducida por una fuerza externa (Fletcher & Mullins, 2010). La rigidez se mide en experimentos de AFM al monitorear la fuerza ejercida por una pequeña punta -parte del cantiléver (ver en Materiales y Métodos, en la sección “Estudio de las propiedades mecánicas de las células por microscopía de fuerza atómica”)-, a medida que se reduce su distancia con respecto a la célula (Calzado-Martín et al., 2016). Una mayor resistencia a la deformación conlleva una fuerza mayor, por lo tanto, implica una mayor deflexión del cantilever (Calzado-Martín et al., 2016).

En varios estudios se demostró que la baja rigidez celular podría servir como marcador de motilidad celular y potencial maligno (Cross et al., 2007; Cross et al., 2011; Luo et al., 2016). Asimismo, la disminución de la rigidez asociada a las células cancerosas se ha relacionado con la deformabilidad del citoesqueleto, que está implicada en la metástasis (Ochalek et al., 1988). Por otra parte, el método de AFM también ha sido utilizado para estudiar los cambios en la morfología celular de los queratinocitos humanos (Rieti et al., 2002, 2004).

Las propiedades mecánicas de las células se definen principalmente por la estructura del citoesqueleto de actina (Radmacher, 2002; Fletcher & Mullins, 2010). En un estudio realizado por Efrenov et al. (2014), se demostró que las células normales presentaban fibras de estrés de actina bien pronunciadas, mientras que la transformación celular conducía a la falta de dichas fibras o, en algunos casos, se observaban haces de actina residuales. A su vez, la disminución del módulo de Young en las células

transformadas fue consistente con los cambios morfológicos y el reordenamiento del citoesqueleto de actina observado por microscopía fluorescente (Efrenov et al., 2014). Esto evidencia el hecho de que las células cancerosas muestran distintas alteraciones en la morfología y la estructura del citoesqueleto de actina en comparación con las células normales y, en consecuencia, el módulo de Young varía.

Por otra parte, la rigidez intrínseca reducida de las células cancerosas se asocia con una mayor redondez celular, a diferencia de las células normales, en las que la morfología celular se vuelve menos redondeada con el aumento de la rigidez (Yeung et al., 2005; Cross, 2007; Chiang et al., 2013). La circularidad o redondez se expresa como: $\text{perímetro}^2/4\pi\text{área}$, donde $\text{área de un círculo} = \pi\text{radio}^2$, y $\text{perímetro} = \pi 2\text{radio}$ (Chiang et al., 2013; Muzzio, 2017). En el caso de un círculo, se puede ver rápidamente que $\text{circularidad} = 1$. Los valores de circularidad o redondez cercanos a 1 indican que las células tienen forma redondeadas, no presentan filapodios largos y, en general, tienen adhesión reducida (Muzzio, 2017).

Tal como mencionamos anteriormente, el comportamiento mecánico de las células individuales depende fundamentalmente de la organización del citoesqueleto, que a su vez determina la morfología celular, siendo esta última un parámetro fácil de medir y que se correlaciona con las propiedades mecánicas celulares. Por lo tanto, en este trabajo estudiaremos, por medio de microscopía de fuerza atómica y microscopía confocal, las propiedades mecánicas celulares y la morfología celular, respectivamente. Nuestro modelo de estudio será la línea celular HaCaT control y la línea HaCaT conteniendo los oncogenes virales del VPH-18 (HaCaT E5/E6/E7-18), la cual representa un estadio intermedio en el desarrollo tumoral. De esta forma, intentaremos determinar los cambios mecánicos y morfológicos que ocurren a medida que las células avanzan en el proceso de transformación maligna.

3.

OBJETIVOS

3.1. **Objetivo general:**

El objetivo de esta tesina es estudiar las propiedades morfológicas y nanomecánicas de las células HaCaT control y las células transducidas con los oncogenes virales E5/E6/E7 del VPH-18 (HaCaT E5/E6/E7-18), con el fin de determinar si existen diferencias en dichas propiedades entre ambos tipos celulares que indiquen un posible rol de los oncogenes del VPH-18 sobre la mecánica y morfología celular.

3.2. **Objetivos específicos:**

- Obtener los valores del módulo de Young para evaluar la rigidez celular en células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18
- Estudiar la morfología celular mediante la visualización del citoesqueleto de actina con la sonda faloidina en ambos tipos celulares
- Evaluar si existe un correlato entre las propiedades morfológicas y nanomecánicas de ambos tipos celulares

4.1. Líneas y cultivos celulares

Se utilizó, como modelo de estudio, la línea celular HaCaT, que son queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente. Esta línea celular fue cotransducida con los oncogenes virales del VPH-18 mediante un sistema retroviral, empleando dos retrovirus: uno de ellos contiene el oncogén E5 del VPH-18 y presenta el gen de resistencia al antibiótico Puromicina (MSCV-E5-18), y el otro contiene los oncogenes E6 y E7 del VPH-18 (pLXSN E6/E7-18), el cual presenta un gen de resistencia al antibiótico Geneticina. De esta forma, las células HaCaT E5/E6/E7-18 fueron obtenidas mediante la coinfección de ambos vectores simultáneamente, y luego seleccionados con los respectivos antibióticos.

Para el crecimiento y propagación de las células se utilizó medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium: Capricorn) baja glucosa, al que se le adicionó 10% de SFB (suero fetal bovino) y antibióticos (Penicilina, Estreptomina y Anfotericina). Las células se mantuvieron en estufa a 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂.

Cuando las células adquirieron una confluencia aproximada de 80%, se realizaron pasajes a botellas de cultivo, placas de Petri o placas con fondo de vidrio, dependiendo del ensayo a realizar. Una vez por semana se realizó cambio de medio y pasaje por cada línea celular. En cada pasaje se hizo un lavado con PBS (buffer fosfato salino) 1X y tripsinización; se retiró el medio de cultivo y se añadió Tripsina-EDTA (Lonza) al 0.25% (ya prediluida en PBS 1X), luego fueron incubadas durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Una vez transcurridos los minutos de incubación, se resuspendieron las células en medio de cultivo fresco, y se transfirió la suspensión a nuevas placas de Petri, añadiendo además medio fresco, de acuerdo con la dilución pensada.

4.2. Estudio de propiedades nanomecánicas de las células por microscopía de fuerza atómica

Con el fin de evaluar las diferencias nanomecánicas entre las células HaCaT control y las HaCaT E5/E6/E7-18, se utilizó el Microscopio de Fuerza Atómica (BioScope Catalyst, Bruker, CA, USA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), que tiene acoplado un microscopio invertido de contraste de fase Olympus IX81. Se utilizó AFM en los modos de nanoindentación y Peakforce-Quantitative Nanomechanical Mapping.

Para las medidas con AFM se utilizó una sonda (Bruker, Camarillo, CA, EE. UU.), que consiste en una punta piramidal de nitruro de silicio unida a un cantilever rectangular. El cantiléver se comporta como un resorte y posee una constante de resorte de 0.03 N/m, de

tal forma que la fuerza ejercida sobre la célula por el cantiléver hace que este se desvíe (Spedden & Staii, 2013). La desviación o deflexión del cantiléver es registrada y, en conjunto con la constante de resorte, permite calcular la fuerza (así como la tensión) ejercida sobre la célula (ver *figura 1*).

Mediante el uso del modo de nanoindentación, se obtuvieron curvas de fuerza-indentación para diferentes puntos en la región central de la célula; entre 200 a 400 curvas de fuerzas fueron capturadas para cada célula. En base a esto, se obtuvo el módulo de Young, en el que la fuerza se determina multiplicando la deflexión por la constante del resorte del cantilever, siguiendo la ley de Hooke (Luo et al., 2016), $F = kd$, donde k es la constante de resorte del cantilever y d es la medida de la deflexión del cantilever (Rauschert et al., 2017). Es preciso señalar que la nanoindentación es un método que consiste en someter a deformación controlada un material cuyas propiedades mecánicas, como el módulo de Young, no se conocen; esto se realiza con el uso de un indentador (punta del cantilever) más duro que la célula, hecho de un material del que sí se conocen tales propiedades (Arroyave, 2008). Por otro lado, mediante el modo PF-QNM, se crea una imagen topográfica, imagen de error, a partir del voltaje aplicado al escáner piezoeléctrico Z, de modo que el valor máximo de la fuerza para cada medida se mantenga constante a lo largo del escaneo XY (Calzado-Martín et al., 2016). Además, las imágenes del módulo de Young de alta resolución capturadas por PF-QNM se obtienen por el registro de una gran variedad de curvas de fuerza-indentación, una para cada píxel de la imagen (Calzado-Martín et al., 2016; Hu et al., 2019), y se realiza un ajuste en tiempo real en base al modelo de Sneddon et al. (1965), que se describirá más adelante (Rosso, 2011; Calzado-Martín et al., 2016).

El procedimiento fue el siguiente: en primer lugar, las células fueron cultivadas en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos 4.1 ("Líneas y cultivos celulares"). Las células se sembraron en placas de cultivo de plástico de 60 mm y se mantuvieron en estufa durante 48 horas. Cabe destacar que, para realizar las medidas por AFM, la confluencia celular no debía superar el 50%. A través del microscopio de contraste de fases se eligió la célula a medir y se direccionó el cantiléver hacia ella para tomar las medidas. Se buscó que la punta del cantiléver apunte hacia el centro de la célula. El mapeo de las propiedades mecánicas de las células se midió a través de la deflexión del cantilever, durante el escaneo completo de la superficie de una célula; la fuerza entre la punta y la muestra es lo que provoca la deflexión del cantilever (Rosso, 2011). De forma simultánea, un detector mide dicha deflexión a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la célula (Rosso, 2011). Una vez que la punta se aproxime a la superficie de la célula, se pone en contacto con ella y se retrae de la superficie y, posteriormente, se obtiene la curva fuerza-indentación (Wala & Das, 2020). En este sentido, para la obtención de las curvas

fuerza-indentación, la muestra se comprime por la indentación de la punta de AFM y se analiza la respuesta elástica de la muestra bajo esta fuerza de carga (Domke & Radmacher, 1998).

Los cálculos correspondientes al módulo de Young obtenidos por medio del uso del modo nanoindentación, fueron realizados siguiendo el modelo de Hertz (Hertz, 1882; Sirghi et al., 2008; Rauschert et al., 2017), el cual se aplica a indentadores piramidales o cónicos, y considera que la fuerza de indentación equilibra la fuerza elástica del citoesqueleto celular y la fuerza de adhesión de la membrana celular (Sirghi et al., 2008). La fuerza total ejercida por el indentador piramidal está dada por la siguiente ecuación:

$$F(h) = \frac{4\pi E \tan \alpha}{(1 - \nu^2)\pi^{3/2}} h^2$$

donde, F= fuerza total aplicada; h = profundidad de la indentación; E= módulo de Young; α = semiángulo de la punta piramidal y ν = coeficiente de Poisson de la muestra (Rauschert et al., 2017) (el coeficiente de Poisson correlaciona la compresión que se observa en un material cuando este es estirado).

Por otra parte, los cálculos correspondientes al módulo de Young, por medio de PF-QNM, fueron realizados basándonos en el modelo de Sneddon, el cual se aplica a indentadores piramidales o cónicos para una muestra plana y blanda (Sneddon, 1965; Rotsch et al., 1999; Laurent et al., 2005). Para dicho modelo, la fuerza está dada por la siguiente ecuación:

$$F = \delta^2 \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \tan \alpha$$

donde, F= fuerza aplicada entre la punta y la muestra (en un rango donde se cumple la Ley de Hooke); δ = penetración; E= módulo de Young; α = ángulo de apertura de la punta piramidal y ν = coeficiente de Poisson de la muestra (Rosso, 2011; Calzado-Martín et al., 2016).

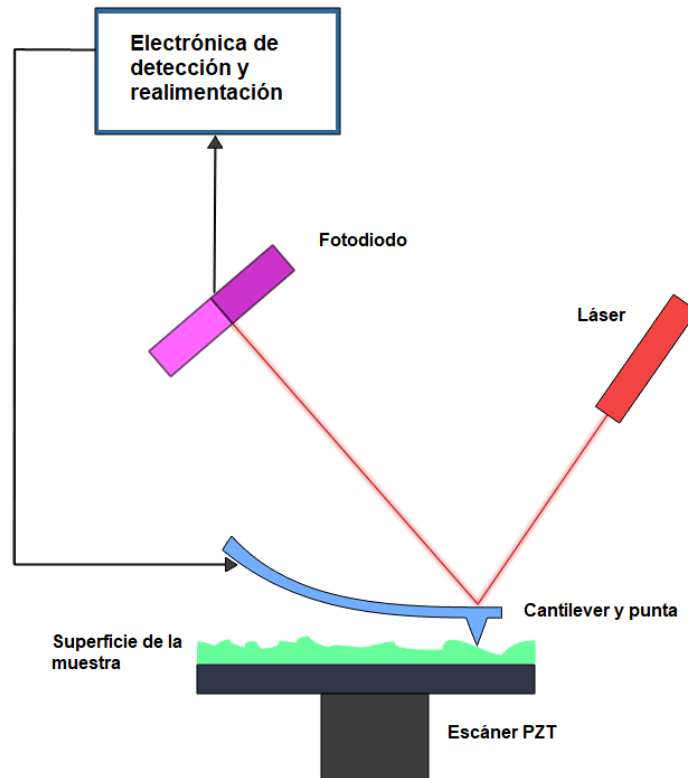


Figura 1: Diagrama de funcionamiento del microscopio de fuerza atómica (AFM). Extraído y modificado desde https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Atomic_force_microscope_block_diagram.png (imagen libre de copyright).

4.3. Estudio de la morfología celular mediante la visualización del citoesqueleto de actina por microscopía confocal

Con el objetivo de visualizar la expresión del citoesqueleto de actina se empleó la sonda de actina filamentosa (actina-F) faloidina, de alta afinidad, la cual se utiliza conjugada a distintas sondas fluorescentes. En nuestro caso, usamos faloidina conjugada a las sondas Alexa Flúor 647 y 488 (Invitrogen, MA, EE. UU).

Una vez incubadas las células durante 48 horas en placas con fondo de vidrio (Celvis, CA, EE. UU), y estando en una confluencia aproximada de 50%, se procedió a fijar las mismas con PFA (paraformaldehído) al 4% disuelto en PBS 1X y se incubó por 10 minutos. Se adicionó a cada placa donde se fijaron las células una solución conformada por PBS 1X, faloidina 647 (faloidina conjugada a Alexa flúor 647) dilución 1/200 y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol: Invitrogen) dilución 1/1000 para teñir los núcleos, y se incubó por 15 minutos. Finalmente, visualizamos las células en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 del IIBCE.

4.4. Obtención de imágenes mediante microscopía confocal

Para la visualización de la morfología celular de las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18 marcadas con faloidina conjugada a la sonda Alexa Flúor 647, se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 800 del IIBCE.

Se obtuvieron imágenes en el plano XY a distintas alturas en el eje z de las células, de modo de obtener los así llamados "z-stack". A partir de dichos z-stack, es posible reconstruir los planos XZ e YZ, y de este modo obtener el perímetro de las células. Las células más achatadas tendrán, por ende, un perímetro de forma más alargada, mientras que células redondeadas tendrán un perímetro más circular (para visualizar más claramente esta explicación, ver *figura 6 A-C*).

4.5. Análisis de la circularidad celular utilizando el programa Fiji/ImageJ

Luego de haber obtenido las imágenes mediante el uso del microscopio confocal, estas fueron procesadas en el programa Fiji/ImageJ. Utilizando la herramienta "orthogonal views" se trazaron secciones transversales, a través del centro de la célula, para la reconstrucción de los planos XZ-YZ. A continuación, se trazó el perímetro de la célula a analizar para medir el parámetro de circularidad, y se obtuvo el valor de circularidad correspondiente (*figura 6 D*).

4.6. Análisis de las zonas de contacto célula-célula utilizando el programa Fiji/ImageJ

Partiendo de las imágenes obtenidas con AFM, por medio del modo PF-QNM, se identificaron las zonas de contacto célula-célula y se obtuvieron los valores de módulo de Young en dichas regiones. Para ello, se midió el "mean gray value" con el programa ImageJ señalando, a través del trazado de un rectángulo, las regiones donde se localizaban las zonas de contacto célula-célula.

4.7. Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 para realizar los análisis estadísticos y sus representaciones gráficas correspondientes, para las medidas de circularidad y las distintas medidas de módulo de Young realizadas. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba t de Student.

5.1. Análisis de la estructura y nanomecánica celular por medio de AFM

En la *figura 2 A* se muestran ejemplos típicos de las curvas de fuerzas correspondientes a las líneas celulares HaCaT control (azul) y HaCaT E5/E6/E7-18 (rojo). En el gráfico se representa la primera parte del análisis de curvas de fuerza, que es la carga. La indentación es una medida de altura, que se mide en el eje Z. Cuando los valores de indentación son negativos, la punta no está en contacto con la célula, mientras que, cuando los valores se vuelven positivos, implican qué tanto penetró la punta en la célula. A medida que la indentación aumenta, la fuerza también, ya que la célula ejerce resistencia a que la punta entre. Conforme se visualiza en la *figura 2 A*, en las células HaCaT control, a un mismo valor de indentación, se requiere una fuerza mayor para la indentación, que en las células HaCaT E5/E6/E7-18; mientras que en estas últimas se requiere una fuerza menor. En suma, si bien la indentación es la misma, lo que varía es la fuerza requerida para que la punta penetre la misma distancia, la cual es diferente para cada línea celular. Por lo tanto, esto se asocia con la rigidez de las células, ya que se requiere una fuerza mayor para penetrar y deformar las células más rígidas, que en este caso son las HaCaT control.

En las *figuras 2 B y 2 C*, se representan de forma gráfica los valores de módulo de Young correspondientes a las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT control, obtenidos mediante los modos de AFM nanoindentación y PF-QNM, respectivamente. Por ambos métodos, hay una diferencia significativa entre HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT control, observándose valores mayores de módulo de Young en las células HaCaT control, con respecto a las HaCaT E5/E6/E7-18, reflejando una mayor rigidez en las HaCaT control.

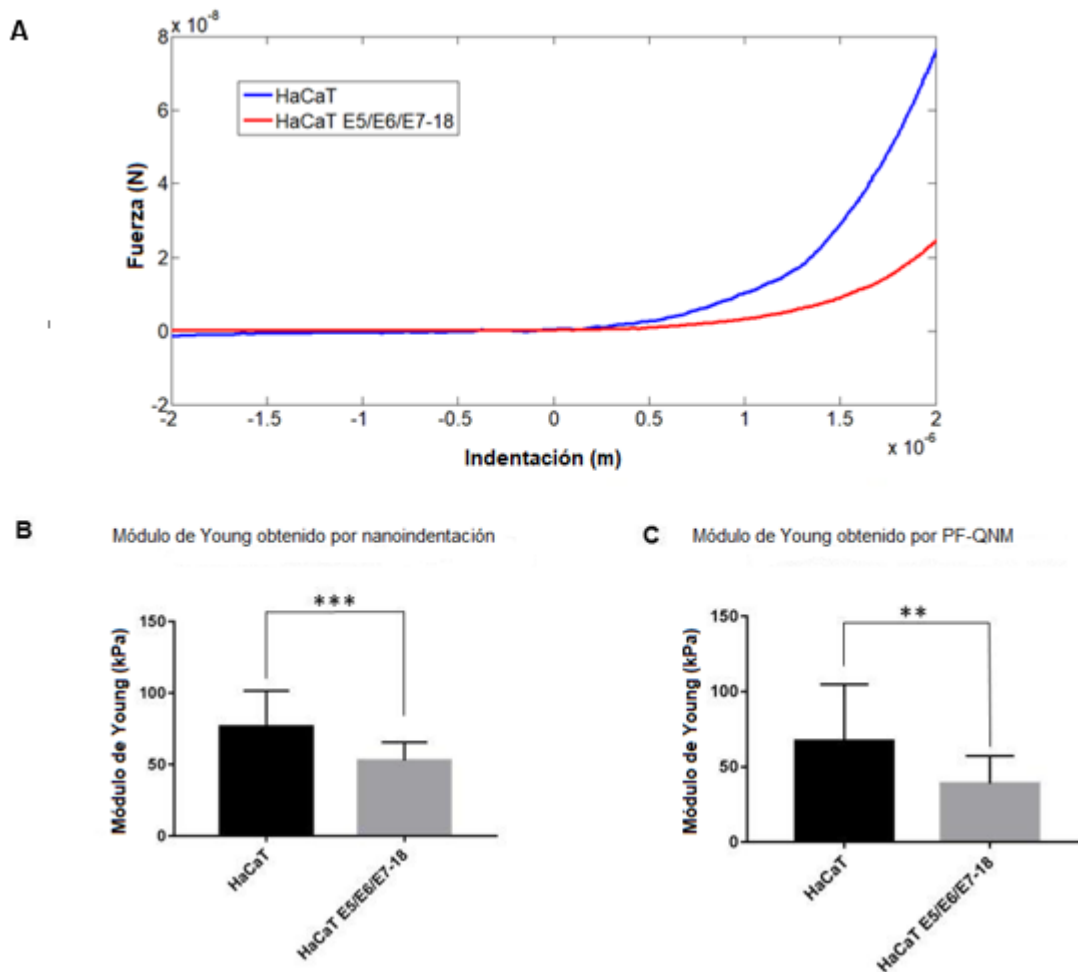


Figura 2: Análisis de las propiedades mecánicas de HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18, por medio de los modos nanoindentación y PF-QNM de AFM. **A)** Curvas de fuerza-indentación para HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18. **B)** Valores del Módulo de Young obtenidos a partir de las curvas de fuerza-indentación. Se midieron 19 células para cada línea celular. Los valores obtenidos fueron 38.9 ± 18.4 kPa y 67.1 ± 37.7 kPa para las células HaCaT E5/E6/E7-18 y las células HaCaT control, respectivamente ($p= 0.006$). **C)** Valores del módulo de Young obtenidos a partir de las mediciones por PF-QNM. Se midieron 28 y 37 células para HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT control, respectivamente. Los valores obtenidos fueron 52.8 ± 12.8 kPa y 76.4 ± 25.3 kPa, respectivamente ($p= 0.00005$).

5.2. Visualización de la estructura y nanomecánica celular mediante AFM

En las *figuras 3 A-B* se representan los mapas topográficos (imágenes de error) y mapas de propiedades nanomecánicas (imágenes del módulo de Young), obtenidos mediante el modo PF-QNM para las células HaCaT control y para las células HaCaT E5/E6/E7-18, respectivamente. En las imágenes de error, se representa la topografía y textura de las células; también se observan los límites y las uniones celulares correspondientes. En relación con las imágenes del módulo de Young, los colores más claros representan los valores más altos de este, es decir, aquellas regiones de mayor rigidez. Por lo tanto, las regiones más oscuras son las menos rígidas.

En las células HaCaT control (*figura 3 A*), en la imagen de error se puede visualizar la estructura celular y las uniones entre las células. En la *figura 3 A*, correspondiente al módulo de Young, se observan regiones con una mayor tendencia hacia color amarillo; esto refleja, dentro de la escala, que son regiones con módulo de Young alto. Por lo tanto, correspondería a regiones más rígidas.

Por otra parte, en cuanto a las células HaCaT E5/E6/E7-18, la imagen de error también permite visualizar la estructura celular, pero las uniones entre las células se observan difusas (*figura 3 B*). Con respecto a la imagen del módulo de Young (*figura 3 A-B*), se observa que predominan los tonos oscuros, que corresponden a los valores más bajos dentro de la escala utilizada. Esto quiere decir que estas células presentan valores de módulo de Young más bajos y serían menos rígidas que las células HaCaT control.

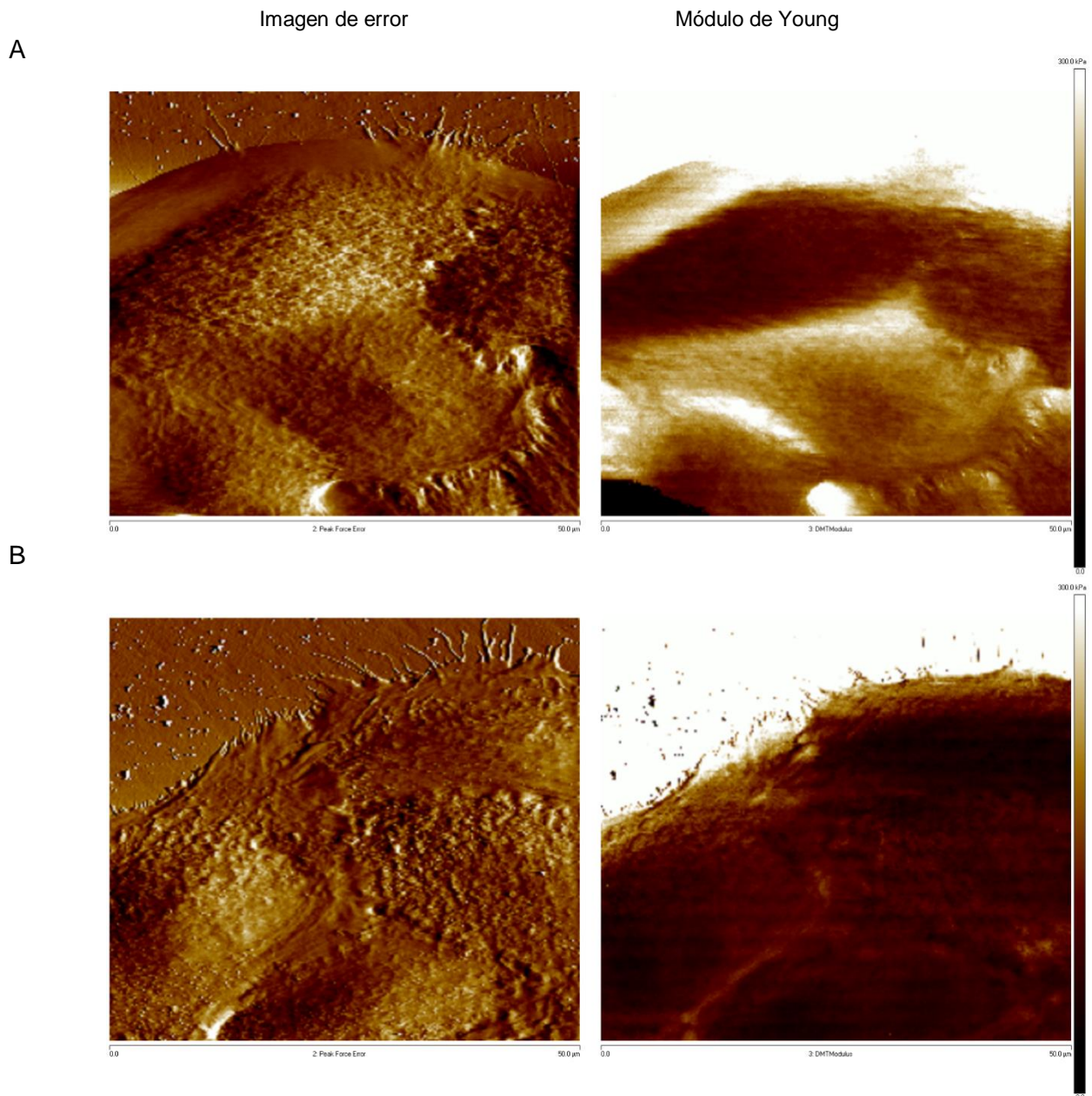


Figura 3: Imágenes de error y de módulo de Young, obtenidas mediante PF-QNM. Escala de 0 a 300 kPa. **A)** HaCaT control y **B)** HaCaT E5/E6/E7-18.

5.3. Visualización de los contactos célula-célula y la rigidez asociada

En la *figura 4 A* también se observan imágenes obtenidas mediante el modo PF-QNM de AFM, para las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18. Por un lado, se observan las imágenes de error, donde se aprecia la estructura celular y, por otro, las imágenes correspondientes al módulo de Young. Además, se señalan algunas de las regiones de contacto célula-célula. Dichas regiones fueron recuadradas para medir la intensidad promedio del color en la región, siguiendo una escala secuencial de color gris (de

0 a 300 kPa), lo cual fue llevado a cabo mediante el uso del programa ImageJ. Una vez obtenidos los valores promedio del módulo de Young en las regiones de contacto célula-célula, se realizó una prueba t de Student, que arrojó un resultado significativo. En la *figura 4 B*, se muestra que en las células HaCaT control las regiones de contacto célula-células presentan valores altos de rigidez. En cambio, en las células HaCaT E5/E6/E7-18, los valores de rigidez en los contactos célula-célula son más bajos, por lo tanto, la rigidez en las zonas de contacto célula-célula es menor que en las células HaCaT control.

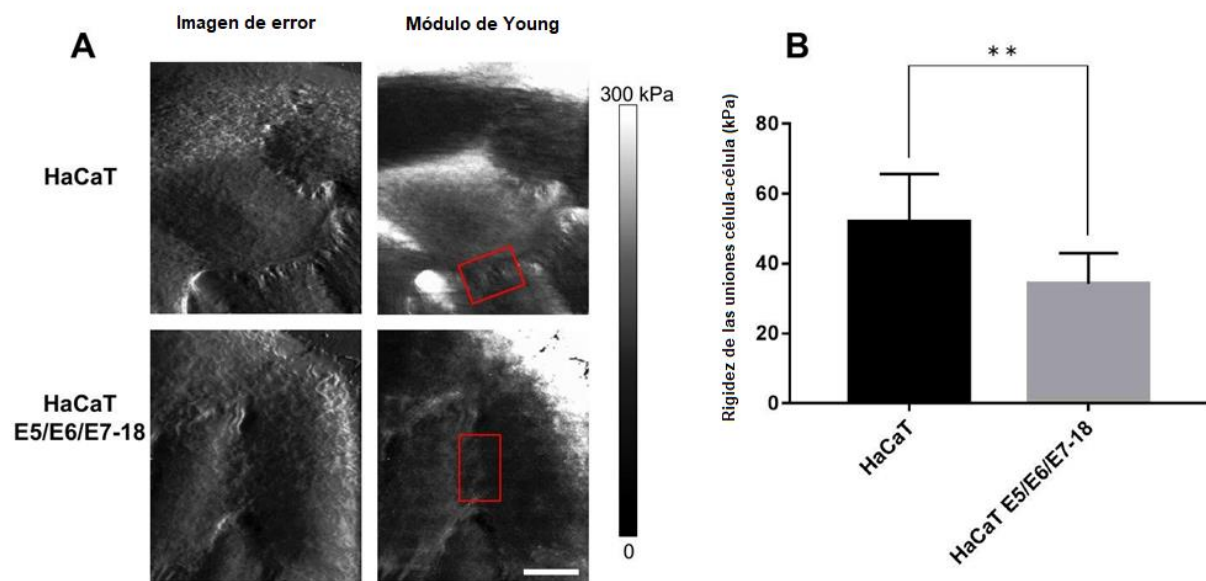
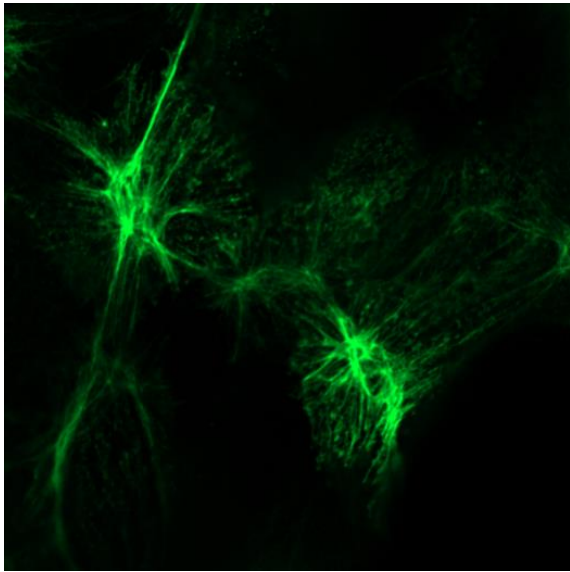


Figura 4: Mapeo mecánico y visualización de las uniones célula-célula en células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18 por PF-QNM. **A)** Mapeo mecánico y topográfico para ambas líneas celulares. Se resaltan las zonas de contacto célula-célula. Se utilizó una escala de intensidad de color gris equivalente a un rango desde 0 a 300 kPa. **B)** Análisis estadístico de las medidas del módulo de Young en las regiones de contacto célula-célula, las cuales fueron obtenidas a partir de los mapas mecánicos, tal como se muestra en A), utilizando el programa ImageJ. Fueron medidas 7 y 10 células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT control, respectivamente ($p= 0.0054$). Barra de error: 10 μm .

5.4. Visualización del citoesqueleto de actina por microscopía confocal

En la *figura 5*, se visualiza en color verde la presencia de actina filamentosa en ambos tipos celulares, mediante el uso de la sonda faloidina conjugada con la sonda fluorescente Alexa Flúor 488. Tanto la línea celular HaCaT control, como HaCaT E5/E6/E7-18, presentan citoesqueleto de actina prominente.

A



B

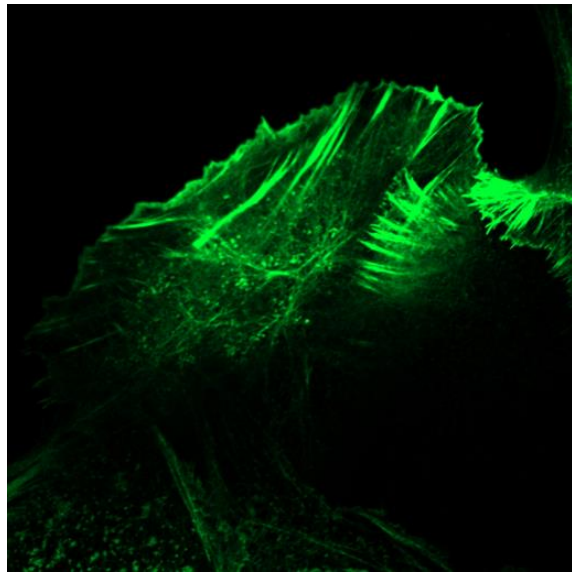


Figura 5: Visualización de actina filamentosa en células **A)** HaCaT control y **B)** HaCaT E5/E6/E7-18. Se utilizó la sonda fluorescente de actina-F faloidina conjugada con la sonda fluorescente Alexa Fluóor 488.

5.5. Análisis de la morfología celular mediante reconstrucción de planos XZ e YZ y medidas de circularidad

En la *figura 6 A-B* se observa la visualización de la morfología celular a través de la marcación del citoesqueleto de actina en las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18, y la reconstrucción de los planos XZ-ZY en las secciones indicadas (líneas amarillas). Se observan diferencias morfológicas entre las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18. Las células HaCaT E5/E6/E7-18 presentan una forma más redondeada, mientras que las células HaCaT control son menos redondeadas; estas presentan una forma más irregular y “achatadas”. A partir de las reconstrucciones de planos XZ e YZ, pudimos observar una tendencia a contornos celulares más achatados en las células HaCaT control, y más redondeados en HaCaT E5/E6/E7-18.

Con el objetivo de verificar estos resultados, se cuantificó la circularidad de ambas líneas celulares, delimitando el contorno celular mediante la herramienta “free hand selection” (selección a mano alzada) del programa ImageJ. En la *figura 6 C* se muestra un ejemplo de trazado del contorno celular. Para cada contorno celular así trazado, se midió el parámetro de circularidad. Se compararon los datos medidos de circularidad entre ambas líneas celulares mediante la prueba t de Student, y se representaron gráficamente las medias comparativas (*figura 6 D*). Para las medidas de las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18 se realizaron 24 y 23 medidas, respectivamente. El resultado fue

estadísticamente significativo ($p= 0.000007$). En células HaCaT control los valores de circularidad son más bajos que en las células HaCaT E5/E6/E7-18. Cabe destacar que las células redondeadas son las que presentan menor rigidez, las cuales son HaCaT E5/E6/E7-18; mientras que las HaCaT control son las células más "achatadas" y rígidas. Esta relación entre menor rigidez y mayor redondeamiento ya había sido demostrada en otros estudios (Stroka & Aranda-Espinoza, 2011; Chiang et al., 2013).

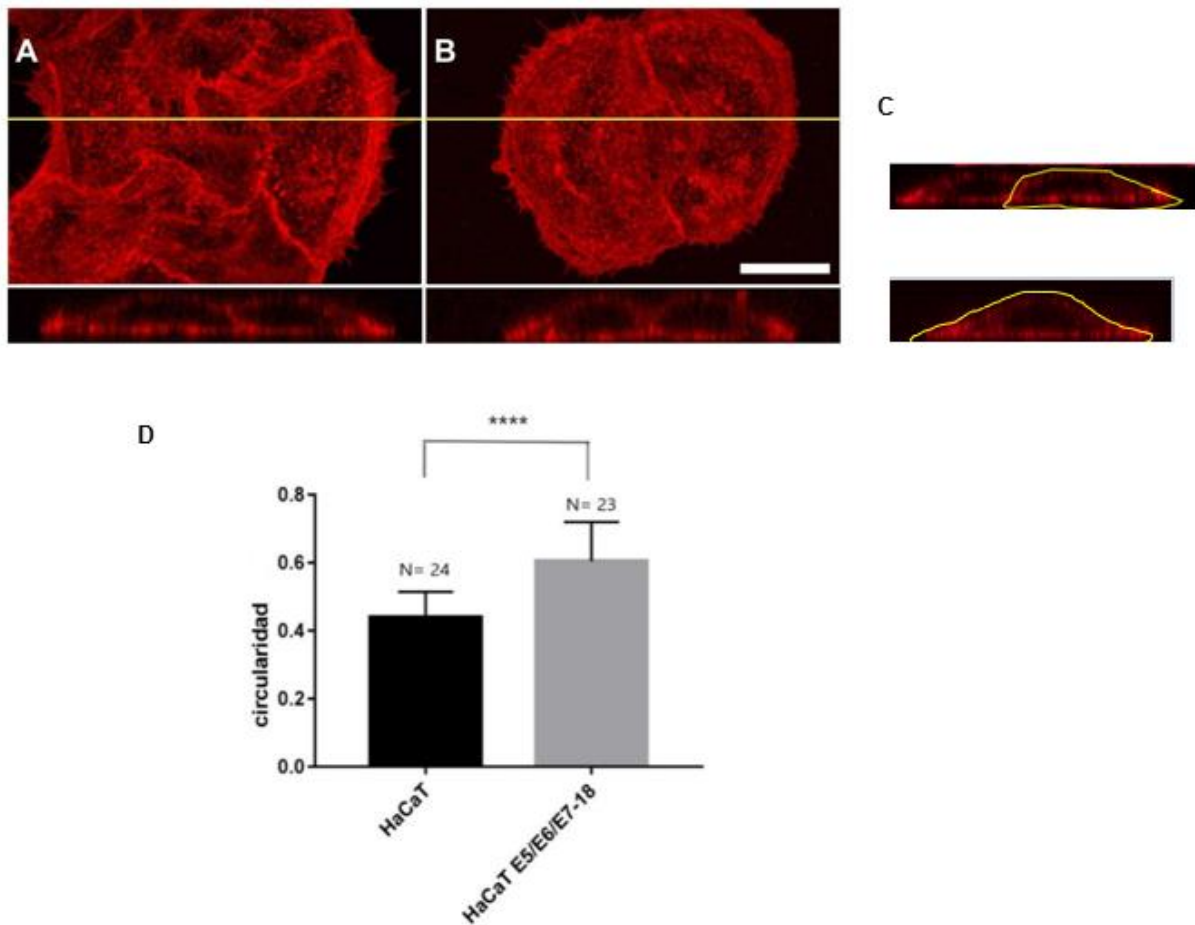


Figura 6: Medidas de circularidad en **A)** HaCaT control y **B)** HaCaT E5/E6/E7-18. Se utilizó la sonda de actina-Faloidina conjugada con la sonda fluorescente Alexa Fluor 647. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal para visualizar toda la superficie celular y las reconstrucciones XZ-ZY fueron hechas en los planos indicados (líneas amarillas). **C)** Trazado del contorno celular para obtener los valores de circularidad. El análisis de las células y las medidas de circularidad fueron realizadas con el programa ImageJ, utilizando el comando "measure". Se seleccionó una célula, trazando su contorno, para tomar la medida. **D)** Análisis estadístico de las medidas de circularidad. Para las medidas de circularidad de las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18 se utilizó el programa ImageJ; se realizaron 24 y 23 medidas, respectivamente. Se realizó una prueba t de Student para evaluar la significancia estadística.

En este trabajo, demostramos que las células HaCaT E5/E6/E7-18 presentan una menor rigidez que las HaCaT control, tanto en las regiones centrales de la célula como en las zonas de contacto célula-célula. Llegamos a esta conclusión a partir de los valores de módulo de Young obtenidos, ya que, para las células HaCaT E5/E6/E7-18, se obtuvieron valores más bajos de módulo de Young que para las HaCaT control. A su vez, se observó mediante microscopía confocal que las células HaCaT E5/E6/E7-18 presentan una morfología más redondeada que la de su contraparte control; estas últimas poseen una forma más alargada y “achatada”. Esto ya había sido demostrado en trabajos anteriores (Yeung et al., 2005; Cross et al., 2007; Chiang et al., 2013), donde se señalaba que la rigidez intrínseca reducida de las células cancerosas se asocia con una mayor redondez celular, a diferencia de las células normales, en las que la morfología celular se vuelve menos redondeada con el aumento de la rigidez. En estudios previos realizados por mi cotutora Jimena Hochmann (Hochmann et al., 2020) se demostró que la expresión de los oncogenes E5/E6/E7 del VPH-18 en queratinocitos humanos inmortalizados conducía a un incremento de la invasión, proliferación y de los niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) endógenas. Por consiguiente, en el presente trabajo buscamos estudiar los efectos que podrían causar la acción coordinada de los tres oncogenes del VPH-18 sobre la mecánica celular y la morfología. De esta manera, logramos relacionar la presencia de estos oncogenes con alteraciones en las propiedades mecánicas y morfológicas en las células HaCaT E5/E6/E7-18.

Los virus del papiloma humano (VPH) son pequeños virus de ADN que muestran un tropismo por el epitelio escamoso. Se han identificado actualmente más de 220 tipos de VPH, y aproximadamente un tercio de estos infectan el epitelio escamoso del tracto genital (de Villiers et al., 2004). De los VPH genitales, que se transmiten sexualmente, 15 se clasifican como de alto riesgo y se consideran los agentes causantes de la mayoría de los cánceres de cuello uterino (Walboomers et al., 1999). Las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH son los principales factores virales responsables del inicio y de la progresión del cáncer de cuello uterino, y actúan en gran medida suprimiendo la función de factores reguladores del ciclo celular de la célula hospedera, desencadenando de esta forma una proliferación desmedida (Moody & Laimins, 2010). Ha sido reportado que estas oncoproteínas virales poseen la capacidad de transformar ciertas células humanas *in vitro*, y se considera que están asociadas con la carcinogénesis cervical humana *in vivo* (Hawley-Nelson et al., 1989; Leechanachai et al., 1992) □ La expresión de proteínas E7 de alto riesgo por sí solas puede inmortalizar queratinocitos humanos, pero la expresión única de

E6 no tiene esta actividad. Sin embargo, la combinación de E6 y E7 es muy eficaz para inmortalizar la mayoría de los tipos de células primarias (Hawley-Nelson et al., 1989; Munger et al., 1989a). Las oncoproteínas E6 y E7 están asociadas a la unión y degradación de supresores tumorales p53 y pRb, respectivamente (Dyson et al., 1989; Scheffner et al., 1990). Por otra parte, la proteína E5 de alto riesgo coopera con E6 y E7 para promover la hiperproliferación de células infectadas y es probable que facilite la progresión maligna (DiMaio & Mattoon, 2001).

Considerando las consecuencias que conlleva la presencia de los oncogenes E5/E6/E7 del VPH-18, se podría decir que estos contribuyen a un incremento en la alteración morfológica y mecánica de las células HaCaT E5/E6/E7-18, ya sea variando su rigidez o redondez celular.

Hay evidencia de que estos oncogenes también son importantes reguladores de la adhesión celular y la dinámica del citoesqueleto. Por ejemplo, E6 del VPH-16 incide en la modulación de la formación de adhesiones focales y, al provocar la degradación del activador transcripcional p63, lleva a desestabilizar la formación de adhesiones focales (Khalifa et al., 2011); mientras que E7 del VPH-16 y VPH-38 disminuye el nivel del factor regulador del citoesqueleto RhoA, lo que conduce a la desorganización y disminución de la actina-F en la célula infectada y a una mayor migración en queratinocitos humanos (Charette & McCance, 2007; Todorovic et al., 2014). Además, en otros estudios se ha demostrado que, tanto E6/E7 como E5 de HPV-16, promueven la transición epitelio mesénquima (EMT) a través de las vías de señalización del receptor EGF (Kim et al., 2006; Jung et al., 2013). En esta misma línea, otro estudio ha demostrado que E5 del VPH-16 y VPH-18 promueve la EMT y la invasividad a través de la regulación negativa de E-cadherina (Liao et al., 2013). Por otra parte, la EMT se asocia con una disminución de la rigidez celular (Zou et al., 2022).

En consecuencia, múltiples funciones de los oncogenes del VPH-18 podrían contribuir a una menor rigidez celular, y a una forma celular más redondeada, tal como hemos observado en las células HaCaT E5/E6/E7-18.

El hecho de que hayamos demostrado que los valores de módulo de Young medidos en células HaCaT E5/E6/E7-18 fueron menores en comparación a las células HaCaT control (denotando una menor rigidez, tanto a nivel central, como en las uniones entre las células), podría estar asociado a una mayor invasividad por parte de las células HaCaT E5/E6/E7-18 (Hochmann et al., 2020), debido a alteraciones en las propiedades mecánicas. Tal como ya se mencionó, durante la tumorigénesis las propiedades mecánicas de las células cancerosas cambian notablemente, con una disminución de la rigidez, que a menudo acompaña a un fenotipo más invasivo (Venkatesh et al., 2008; Li et al., 2011; Garteiser et al., 2012).

Cabe destacar que las células HaCaT E5/E6/E7-18 no son tumorigénicas y representan una etapa intermedia en la oncogénesis viral (Hochmann et al., 2020). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la rigidez celular disminuida y una forma celular más redondeada, son cambios mecánicos y morfológicos que acompañarían los pasos iniciales en el proceso de transformación maligna impulsado por los oncogenes de VPH-18. Estos resultados concuerdan con estudios que muestran que la expresión de oncogenes virales en células normales conduce a una disminución de la rigidez, ya que los módulos de Young de las células transformadas fueron significativamente menores que los de las células control (Efremov et al., 2014). La disminución del módulo de Young fue relacionada con cambios en la morfología y citoesqueleto de actina (Efremov et al., 2014). Asimismo, la variación en la rigidez entre las células control y en células en etapa pre-tumoral probablemente refleja los cambios en el citoesqueleto asociados con la transformación (Lekka et al., 1999; Fung et al., 2011).

Los resultados obtenidos en esta tesina contribuyen a comprender los cambios mecánicos y morfológicos que ocurren desde etapas tempranas del proceso de transformación maligna celular. En un futuro podríamos estudiar más profundamente la relación que pueda existir entre la morfología, rigidez celular y el hecho de que las células transducidas con oncogenes sean más invasivas, considerando los resultados obtenidos en esta tesina y los obtenidos previamente respecto a las propiedades migratorias e invasivas de estas células (Hochmann et al., 2020).

Nuestros estudios realizados mediante la AFM mostraron una disminución en la rigidez en células HaCaT E5/E6/E7-18, con respecto a las HaCaT control. Esta disminución fue observada tanto a nivel central de la célula como en las regiones de contacto célula-célula. Por otra parte, logramos visualizar diferencias morfológicas entre HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18 a través de microscopía confocal, observando una forma más redondeada en células HaCaT E5/E6/E7-18 y más alargada en HaCaT control. Esto podría estar vinculado con modificaciones a nivel del citoesqueleto en las células HaCaT E5/E6/E7-18, que podrían ocurrir durante la transición hacia la transformación maligna. Para corroborar esta hipótesis, será necesario realizar a futuro estudios más detallados del citoesqueleto en estas células.

En suma, se logró demostrar diferencias mecánicas y morfológicas entre las células HaCaT control y HaCaT E5/E6/E7-18. Además, pudimos encontrar una correlación entre la menor rigidez y la mayor redondez celular en las células más avanzadas en la progresión tumoral, lo cual corrobora hallazgos previos sobre cambios mecánicos y morfológicos en células tumorales.

- Alibert, C., Goud, B., & Manneville, J. B. (2017). Are cancer cells really softer than normal cells? *Biology of the Cell*, 109(5), 167-189. <https://doi.org/10.1111/boc.201600078>
- Arroyave Franco, M. (2008). Nanoindentación basada en espectroscopia de fuerzas con un microscopio de fuerza atómica. *Ingeniería y Ciencia*, 4(8), 85-98.
- Benedetti, I., & Reyes, N. (2015). Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia*, 28(4), 420-433. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n4a07>
- Ben Khalifa, Y., Teissier, S., Tan, M. K. M., Phan, Q. T., Daynac, M., Wong, W. Q., & Thierry, F. (2011). The human papillomavirus E6 oncogene represses a cell adhesion pathway and disrupts focal adhesion through degradation of TAp63 β upon transformation. *PLoS pathogens*, 7(9), e1002256. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002256>
- Bianchi, M., Diaz, C., Miñan, A., Pissinis, D., Schilardi, P., & Pietrasanta, L. Caracterización de las propiedades nanomecánicas de las membranas bacterianas con alta resolución espacial mediante Peak Force QNM. (2016). Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC). *Acta microscópica*, 25(A). <http://samicargentina.org>
- Calzado-Martín, A., Encinar, M., Tamayo, J., Calleja, M., & San Paulo, A. (2016). Effect of actin organization on the stiffness of living breast cancer cells revealed by peak-force modulation atomic force microscopy. *ACS nano*, 10(3), 3365-3374. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07162>
- Charette, S., McCance, D. The E7 protein from human papillomavirus type 16 enhances keratinocyte migration in an Akt-dependent manner. *Oncogene* 26, 7386–7390 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210541>
- Chiang, M. Y., Yangben, Y., Lin, N. J., Zhong, J. L., & Yang, L. (2013). Relationships among cell morphology, intrinsic cell stiffness and cell–substrate interactions. *Biomaterials*, 34(38), 9754-9762. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.014>
- Cross, S. E., Jin, Y. S., Lu, Q. Y., Rao, J., & Gimzewski, J. K. (2011). Green tea extract selectively targets nanomechanics of live metastatic cancer cells. *Nanotechnology*, 22(21), 215101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/21/215101>
- Cross, S. E., Jin, Y. S., Rao, J., & Gimzewski, J. K. (2007). Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature nanotechnology*, 2(12), 780-783. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.388>
- Darling, E. M., & Di Carlo, D. (2015). High-throughput assessment of cellular mechanical properties. *Annual review of biomedical engineering*, 17, 35. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040545>

- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*(1), 17-27.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Díaz Marcos, J. (2004). *Aplicaciones de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) cómo método de caracterización de polímeros*. [Trabajo final de carrera, Universidad Politécnica de Cataluña] Portal de acceso abierto al conocimiento de la UPC.
<https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/3209>
- DiMaio, D., & Mattoon, D. (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, *20*(54), 7866-7873. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204915>
- DiMaio, D., & Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, *445*(1-2), 99-114.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.006>
- Domke, J., & Radmacher, M. (1998). Measuring the elastic properties of thin polymer films with the atomic force microscope. *Langmuir*, *14*(12), 3320-3325.
<https://doi.org/10.1021/la9713006>
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., & Harlow, E. D. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, *243*(4893), 934-937. DOI: 10.1126/science.2537532
- Efremov, Y. M., Lomakina, M. E., Bagrov, D. V., Makhnovskiy, P. I., Alexandrova, A. Y., Kirpichnikov, M. P., & Shaitan, K. V. (2014). Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1843*(5), 1013-1019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.032>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L.,... & Piñeros M. (2020) *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer. Recuperado en febrero de 2021. <https://gco.iarc.fr/today>
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, *463*(7280), 485-492. <https://doi.org/10.1038/nature08908>
- Francis, D. A., Schmid, S. I., & Howley, P. M. (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *Journal of virology*, *74*(6), 2679-2686. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.6.2679-2686.2000>
- Fung, C. K. M., Xi, N., Yang, R., Seiffert-Sinha, K., Lai, K. W. C., & Sinha, A. A. (2011). Quantitative analysis of human keratinocyte cell elasticity using atomic force microscopy (AFM). *IEEE transactions on nanobioscience*, *10*(1), 9-15.
 DOI: 10.1109/TNB.2011.2113397
- Gardel, M. L., Shin, J. H., MacKintosh, F. C., Mahadevan, L., Matsudaira, P., & Weitz, D. A. (2004). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science*, *304*(5675), 1301-1305 DOI: 10.1126/science.1095087

- Garteiser, P., Doblaz, S., Daire, J. L., Wagner, M., Leitao, H., Vilgrain, V., Sinkus, R., & Van Beers, B. E. (2012). MR elastography of liver tumours: value of viscoelastic properties for tumour characterisation. *European radiology*, 22(10), 2169-2177. DOI 10.1007/s00330-012-2474-6
- Gavara, N. (2017). A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microscopy research and technique*, 80(1), 75-84. DOI: 10.1038/NNANO.2012.163
- Guillou, L., Babataheri, A., Puech, P. H., Barakat, A. I., & Husson, J. (2016). Dynamic monitoring of cell mechanical properties using profile microindentation. *Scientific reports*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep21529>
- Haase, K., & Pelling, A. E. (2015). Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, 12(104), 20140970. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0970>
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal*, 8(12), 3905-3910. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08570.x>
- Heidemann, S. R., Kaech, S., Buxbaum, R. E., & Matus, A. (1999). Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 145(1), 109-122. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.109>
- Hertz, H. (1882). Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Mathematik*. 92:156 –171. <https://doi.org/10.1515/crll.1882.92.156>
- Hochmann, J., Parietti, F., Martínez, J., Lopez, A. C., Carreño, M., Quijano, C., E., Sichero, L., Möller, M. N., Mirazo, S., & Arbiza, J. (2020). Human papillomavirus type 18 E5 oncoprotein cooperates with E6 and E7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190405>
- Hu, J., Chen, S., Hu, W., Lü, S., & Long, M. (2019). Mechanical point loading induces cortex stiffening and actin reorganization. *Biophysical journal*, 117(8), 1405-1418. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.09.012>

- Ingber, D. E. (1998). The architecture of life. *Scientific American*, 278(1), 48-57.
<https://www.jstor.org/stable/26057622>
- Janmey, P. A. (1991). Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Current opinion in cell biology*, 3(1), 4-11. doi:10.1016/0955-0674(91)90159-v
- Jung, Y. S., Kato, I., & Kim, H. R. C. (2013). A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial–mesenchymal transition. *Biochemical and biophysical research communications*, 435(3), 339-344. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.060>
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1417-1419. DOI:10.1172/JCI39675.
- Kim, S. H., Juhn, Y. S., Kang, S., Park, S. W., Sung, M. W., Bang, Y. J., & Song, Y. S. (2006). Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ERK1, 2 and PI3K/Akt. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(7), 930-938.
<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5561-x>
- Laurent, V. M., Kasas, S., Yersin, A., Schäffer, T. E., Catsicas, S., Dietler, G., Verkhovskiy, A. B., & Meister, J. J. (2005). Gradient of rigidity in the lamellipodia of migrating cells revealed by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 89(1), 667-675.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.052316>
- Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F., & Matlashewski, G. (1992). The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*, 7(1), 19-25.
- Lekka, M., Laidler, P., Gil, D., Lekki, J., Stachura, Z., & Hryniewicz, A. Z. (1999). Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *European Biophysics Journal*, 28(4), 312-316. <https://doi.org/10.1007/s002490050213>
- Letierrier, J. F., Käs, J., Hartwig, J., Vegners, R., & Janmey, P. A. (1996). Mechanical effects of neurofilament cross-bridges: modulation by phosphorylation, lipids, and interactions with F-actin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(26), 15687-15694. DOI: 10.1074/jbc.271.26.15687
- Liao, S., Deng, D., Zhang, W., Hu, X., Wang, W., Wang, H., Lu, Y., Wang, S., Meng, L., Ma, D. (2013). Human papillomavirus 16/18 E5 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro and accelerates tumor growth in vivo. *Oncology Reports*. 29(1), 95–102. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2106>
- Li, S., Chen, M., Wang, W., Zhao, W., Wang, J., Zhao, X., & Zhou, C. (2011). A feasibility study of MR elastography in the diagnosis of prostate cancer at 3.0 T. *Acta Radiológica*, 52(3), 354-358. DOI:10.1258/ar.2010.100276

- Luo, Q., Kuang, D., Zhang, B., & Song, G. (2016). Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(9), 1953-1960. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.06.010
- Mahaffy, R. E., Shih, C. K., MacKintosh, F. C., & Käs, J. (2000). Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Physical review letters*, 85(4), 880. DOI:10.1103/physrevlett.85.880
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550-560. DOI:10.1038/nrc2886
- Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., & Schlegel, R. (1989a). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of virology*, 63(10), 4417-4421. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.10.4417-4421.1989>
- Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., & Howley, P. M. (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO journal*, 8(13), 4099-4105. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08594.x>
- Muzzio, N. E. (2017). *Aspectos fenomenológicos del crecimiento y expansión de sistemas celulares: efecto de la modificación del medio y el substrato en el fenotipo celular*. [Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas]. Repositorio Institucional CONICET <http://dx.doi.org/10.35537/10915/65580>
- Ochalek, T., Nordt, F. J., Tullberg, K., & Burger, M. M. (1988). Correlation between cell deformability and metastatic potential in B16-F1 melanoma cell variants. *Cancer research*, 48(18), 5124-5128.
- Organización Mundial de la Salud. (2022a) *Cáncer*. World Health Organization. Recuperado el 12 de junio de 2022. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Organización Mundial de la Salud. (2 de febrero de 2022b) *Cáncer*. World Health Organization. Recuperado el 12 de junio de 2022. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Prasain, N., & Stevens, T. (2009). The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular research*, 77(1), 53-63. DOI: 10.1016/j.mvr.2008.09.012
- Radmacher, M. (2002). 4.-Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. En B. P. Jena & J. K. Heinrich Horber (Ed.), *Atomic Force Microscopy in Cell Biology* (pp. 67-90). Elsevier Science (USA). <https://books.google.com.uy/>
- Raudenska, M., Kratochvilova, M., Vicar, T., Gumulec, J., Balvan, J., Polanska, H., Pribyl, J., & Masarik, M. (2019). Cisplatin enhances cell stiffness and decreases invasiveness rate in

- prostate cancer cells by actin accumulation. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38199-7>
- Rauschert, I., Aldunate, F., Preussner, J., Arocena-Sutz, M., Peraza, V., Looso, M., Benech, J.C., & Agrelo, R. (2017) Promoter hypermethylation as a mechanism for Lamin A/C silencing in a subset of neuroblastoma cells. *PLoS One* 12(4), e0175953.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175953>
- Rieti, S., Manni, V., Lisi, A., Grimaldi, S., Generosi, R., Luce, M., Perffeti, P., Cricenti, A., Pozzi, A., & Giuliani, L. (2002). Morphological and biochemical analysis by atomic force microscopy and scanning near-field optical microscopy techniques of human keratinocytes (HaCaT) exposed to extremely low frequency 50 Hz magnetic field. *Applied physics letters*, 81(15), 2890-2892. DOI: 10.1063/1.1506011
- Rieti, S., Manni, V., Lisi, A., Giuliani, L., Sacco, D., D'Emilia, E., Cricenti, A., Generosi, R., Luce, M., & Grimaldi, S. (2004). SNOM and AFM microscopy techniques to study the effect of non-ionizing radiation on the morphological and biochemical properties of human keratinocytes cell line (HaCaT). *Journal of microscopy*, 213(1), 20-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2004.01279.x>
- Rosso, G. (2011). *Análisis topográfico, mecánico y molecular de fibras nerviosas periféricas de ratones Tember J (modelo animal de la neuropatía humana CMT1A) por Microscopía de Fuerza Atómica y Confocal*. [Tesis de Maestría. Universidad de la República, Facultad de Ciencias; Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable] Conocimiento Libre Repositorio Institucional.
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/3909>
- Rotsch, C., Jacobson, K., & Radmacher, M. (1999). Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3), 921-926.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.921>
- Rotsch, C., & Radmacher, M. (2000). Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophysical journal*, 78(1), 520-535. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76614-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76614-8)
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63(6), 1129-1136. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90409-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8)
- Sirghi, L., Ponti, J., Broggi, F., & Rossi, F. (2008). Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *European Biophysics Journal*, 37(6), 935-945.
<https://doi.org/10.1007/s00249-008-0311-2>

- Sneddon, I. N. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International journal of engineering science*, 3(1), 47-57. DOI:10.1016/0020-7225(65)90019-4
- Spedden, E., & Stali, C. (2013). Neuron biomechanics probed by atomic force microscopy. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16124-16140. DOI:10.3390/ijms140816124
- Stöppler, H., Hartmann, D. P., Sherman, L., & Schlegel, R. (1997). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13332-13337. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13332>
- Stroka, K. M., & Aranda-Espinoza, H. (2011). Effects of morphology vs. cell–cell interactions on endothelial cell stiffness. *Cellular and molecular bioengineering*, 4(1), 9-27. DOI:10.1007/s12195-010-0142-y
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews cancer*, 2(6), 442-454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Todorovic, B., Nichols, A. C., Chitilian, J. M., Myers, M. P., Shepherd, T. G., Parsons, S. J., Barrett, J. W., Banks, L., & Mymryk, J. S. (2014). The human papillomavirus E7 proteins associate with p190RhoGAP and alter its function. *Journal of virology*, 88(7), 3653–3663. <https://doi.org/10.1128/JVI.03263-13>
- Venkatesh, S. K., Yin, M., Glockner, J. F., Takahashi, N., Araoz, P. A., Talwalkar, J. A., & Ehman, R. L. (2008). Magnetic resonance elastography of liver tumors-preliminary results. *AJR. American journal of roentgenology*, 190(6), 1534. DOI:10.2214/AJR.07.3123
- Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S., & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular cancer*, 10(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-140>
- Waku, T., Nakamura, N., Koji, M., Watanabe, H., Katoh, H., Tatsumi, C., Tamura N., Hatanaka A., Hirose S., Katayama H., Tani M., Kubo Y., Hamazaki J., Hamakubo T., Watanabe A., Murata S., & Kobayashi, A. (2020). NRF3-POMP-20S proteasome assembly axis promotes cancer development via ubiquitin-independent proteolysis of p53 and retinoblastoma protein. *Molecular and cellular biology*, 40(10), e00597-19. <https://doi.org/10.1128/MCB.00597-19>.
- Wala, J., & Das, S. (2020). Mapping of biomechanical properties of cell lines on altered matrix stiffness using atomic force microscopy. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 19(5), 1523-1536. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01285-4>
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., & Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, 189(1),

12-19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)

- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., & Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, 60(1), 24-34. DOI: 10.1002/cm.20041
- Zou, H., Yang, Z., Chan, Y. S., Yeung, S. K. A., Alam, M. K., Si, T., Xu, T., & Yang, M. (2022). Single cell analysis of mechanical properties and EMT-related gene expression profiles in cancer fingers. *Iscience*, 25(3), 103917. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103917>