



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LAS
PROPIEDADES ELÁSTICAS Y DE CURVATURA EN
LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE
MECANOTRANSDUCCIÓN EN FIBROBLASTOS
HUMANOS DE CórNEA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALEXANDRA DESIRÉE REYES MOLINA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

1.- Datos del Alumno

Reyes

Molina

Alexandra Desirée

5548812659

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

313307940

2. Datos del tutor

Dr.

Genaro

Vázquez

Victorio

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Aliesha Araceli

González

Arenas

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Yair

Romero

López

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la regulación de las propiedades elásticas y de curvatura en la activación de las vías de mecanotransducción en fibroblastos humanos de córnea

87p

2023

RESUMEN

La mecanotransducción es una rama de la mecanobiología que estudia los procesos que las células utilizan para transducir señales mecánicas, del microambiente, en mecanismos bioquímicos que regulan diferentes procesos biológicos. Para mimetizar las condiciones mecánicas del microambiente, se han desarrollado diferentes materiales con propiedades físicas específicas así como técnicas de microfabricación para estructurar o para regular sus propiedades. Los fibroblastos son las células responsables de la fibrogénesis de la matriz extracelular (MEC) en la gran mayoría de los tejidos, su función depende de la comunicación con la MEC a través de la expresión de moléculas de adhesión, principalmente de las integrinas y del citoesqueleto. Entre sus funciones están establecer las propiedades fisicoquímicas de la MEC, la generación de factores de crecimiento y la reparación del estroma en los tejidos dañados. En órganos como el ojo donde el estroma es el 90% del espesor corneal, las colágenas y los proteoglicanos son fabricados por fibroblastos, conocidos como queratocitos, con forma plana, y ubicados paralelamente al depósito de MEC. En la córnea, cualquier evento que modifique esta organización de fibras paralelas produce un proceso de fibrosis, lo que conlleva a pérdida de la visión. Adicionalmente, los fibroblastos de córnea están sujetos a efectos de curvatura. Se ha reportado que células bajo un estrés por curvatura activa sus vías de mecanotransducción, teniendo como efecto el depósito de MEC fibrilar, un aumento en la rigidez extracelular así como un aumento en la contractilidad de las células, lo que no ocurre en los queratocitos en estado de quiescencia. Las células responden a estímulos mecánicos como la rigidez de la MEC a través de factores transcripcionales que regulan la respuesta a los cambios a la rigidez a través de la tensión generada por el citoesqueleto. Las proteínas YAP/TAZ están relacionadas con eventos de mecanotransducción regulando en el núcleo la actividad transcripcional de sus genes blanco (Díaz et al., 2015).

El objetivo del presente proyecto de investigación consistió en estudiar la respuesta de los fibroblastos humanos de córnea cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de diferente rigidez (1, 5, 20 y 40 kPa) y los efectos de curvatura a través de un dispositivo microfluídico con una membrana deformable. Adicionalmente, se evaluó la respuesta de fibroblastos humanos de piel (línea celular BJ) cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de diferente rigidez (1,5 y 20 kPa) para comparar la respuesta de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ. En este trabajo se observó que tanto los fibroblastos de córnea como en las células BJ, responden a los cambios en la rigidez del sustrato de cultivo con la formación de fibras de estrés. En el cultivo en sustratos suaves se ve la marca de fibras de estrés más difusa con el tiempo de cultivo. Por otra parte, los fibroblastos de córnea y las células BJ muestran diferencias en el esparcimiento celular o *spreading* (área), en el área nuclear y la excentricidad. Sin embargo, en ambos tipos celulares la señal de YAP/TAZ se encuentra nuclear en sustratos rígidos y, por el contrario, citoplasmática en sustratos suaves. También se logró obtener un dispositivo microfluídico que simula las características fisiológicas de curvatura de la córnea. Estos resultados son de relevancia debido a que nos permite entender los eventos que alteren o modifiquen la córnea a largo plazo que pueden dar como resultado alguna patología, o bien, la pérdida parcial o total de la visión.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	5
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.....	5
ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Córnea como modelo de estudio.....	7
1.2. Estructura de la córnea	9
Epitelio.....	9
Membrana de Bowman.....	11
Estroma.....	11
Membrana de Descemet.....	12
Endotelio.....	13
1.3. Factores que afectan la córnea.....	13
1.4. Propiedades mecánicas de la córnea	14
1.5. Rigidez.....	15
1.6. Curvatura.....	17
1.7. Vías de mecanotransducción.....	18
Vía Hippo YAP/TAZ.....	20

	Página
2. ANTECEDENTES	22
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS.....	29
5.1. Objetivo general	29
5.1.1. Objetivos específicos.....	29
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	30
7. MÉTODOS	35
7.1. Hidrogeles de poliacrilamida (HG PAA)	35
7.2. Cultivo celular.....	38
7.3. Marcaje por fluorescencia/ Inmunomarcaje	39
7.4. Diseño de fabricación	40
8. RESULTADOS	42
9. DISCUSIÓN	65
10. CONCLUSIONES	72
11. PERSPECTIVAS.....	73
12. REFERENCIAS.....	74
13. ANEXO.....	80

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mis padres y a mi hermano por su confianza, motivación, paciencia, comprensión y consejos, sobre todo, por su valioso e incondicional apoyo durante este camino.

A mis abuelos, tíos y primos por haberme acompañado en este proceso.

A mis amigos y amigas de la facultad, CCH y del laboratorio por estar presentes en la mayor parte de mi formación y del desarrollo de este proyecto, además de brindarme su ayuda y apoyo en los momentos que lo necesité.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio por el apoyo, la asesoría y el conocimiento transmitido durante este proyecto.

Al Dr. Yonathan Omar Garfías Becerra por la donación de los fibroblastos de córnea humanos y al Dr. Alejandro Cabrera Wrooman por la donación de los fibroblastos inmortalizados BJ.

A la MCIM Fernanda López García y al MCIM Yasab Ruiz Hernández, por la experiencia transmitida en uso de PDMS, en fabricación por spin coating y en manejo de las bombas microfluídicas fluigent, así como en fabricación de chips.

A la MC Adriana Rodríguez Hernández por la experiencia transmitida en el uso de hidrogeles e inmunofluorescencia.

A la Dra. Nathalia Serna Márquez por la experiencia transmitida en cultivo celular.

A los proyectos CONACYT 272894, 304023 y PAPIIT 219721 por los apoyos en la realización de este trabajo de tesis.

Al Laboratorio Nacional LaNSBioDyT por su ayuda técnica.

A mi jurado: Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dra. Aliesha Araceli González Arenas, Dr. Luis Felipe Jiménez García y el Dr. Yair Romero López por la revisión y los comentarios para enriquecer el proyecto.

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
AFM	microscopía de fuerza atómica (del inglés <i>Atomic Force Microscope</i>)
α -SMA	proteína actina de músculo liso alfa (del inglés <i>alpha-smooth muscle actin</i>)
Col I	colágena tipo I
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCDMS	diclorodimetilsilano
dH ₂ O	agua desionizada
ECM	matriz extracelular (del inglés <i>extracellular matrix</i>)
EMT	transición epitelio-mesénquima (del inglés <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
FA	adhesiones focales (del inglés <i>Focal adhesions</i>)
HGPAA	hidrogel de poliacrilamida
IPS	<i>obducat Intermediate Polymer Stamp</i>
LATS	<i>large Tumor Suppressors</i>
LINC	<i>linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Pa, kPa	pascal, kilopascal
PAA	poliacrilamida
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDMS	polidimetilsiloxano (del inglés <i>polydimethylsiloxane</i>)
PMMA	polimetilmetacrilato (del inglés <i>polymethylmethacrylate</i>)
Sulfo-SANPAH	sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate
TA	temperatura ambiente
TAZ	<i>transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif</i>
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>transforming growth factor beta</i>)
UV	ultravioleta
YAP	<i>yes-associated protein</i>

1. INTRODUCCIÓN

El ojo es el órgano propio de la visión, es muy sofisticado ya que está formado por globo ocular con su nervio óptico, dispositivos auxiliares en forma de párpados, aparato lagrimal y músculos externos que trabajan juntos para formar una imagen y transmitirla al cerebro.

El ojo humano se encuentra en una cavidad del cráneo denominada cuenca orbitaria, tiene una forma esférica debido a que posee fluidos en su interior (Boy, S. et.al., 2012) como el fluido vítreo el cual cumple con la función de mantener la transparencia, dar volumen al ojo y sostener la retina (Montefusco, C. y Matos, L. 2016). Anatómicamente el ojo está formado por un nervio óptico, fovea, retina, coroides, esclerótica, humor vítreo, cristalino, pupila, humor acuoso y córnea (Fig 1.).

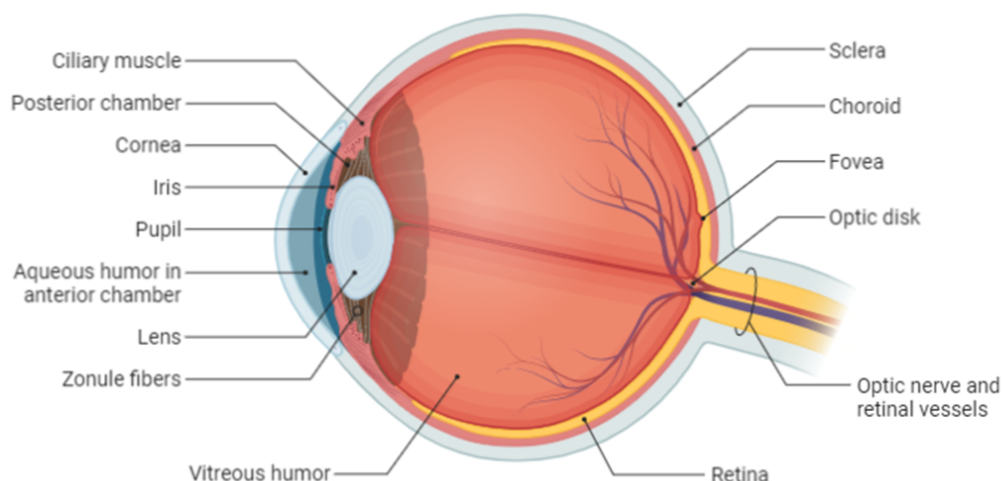


Figura 1. Anatomía del ojo humano. El ojo humano se compone de un nervio óptico, fovea, retina, coroides, esclerótica, humor vítreo, cristalino, pupila, humor acuoso y córnea, siendo esta última donde se albergan los queratocitos (fibroblastos de córnea). Imagen modificada con Biorender.

1.1 Córnea como modelo de estudio

La córnea es un tejido de gran importancia para la salud visual, cuenta con estructuras especializadas cuyas funciones dan funcionamiento y estabilidad al ojo,

y gracias a sus funciones de protección, evita las posibles infecciones del medio ambiente.

La córnea es un tejido avascular cuya irrigación se deriva principalmente de los vasos conjuntivales, episclerales y esclerales. En este sentido, la conjuntiva es una membrana que va desde la superficie interior del globo ocular hasta la parte limbal, tiene como función la formación de la mucosa como una barrera de protección ante agentes patógenos (Saornil, M., et. al., 2009) , la episclera es una capa fibrovascular que promueve la respuesta inflamatoria en caso de que exista un agente externo y es la capa más superficial de la esclera, esta última se encarga de darle la forma al ojo y lo protege de daños. También, la córnea es el primer elemento refractivo del ojo y esto se debe a la curvatura, normalmente es transparente, abarca 1/6 de la superficie total del ojo. Su cara anterior es elíptica y la posterior es circular. Asimismo, la cara anterior convexa está en contacto con el exterior y la posterior cóncava está recubierta de humor acuoso y constituye el límite anterior de la cámara anterior, su borde periférico encaja en el agujero escleral anterior, a nivel del denominado limbo esclerocorneal, esta zona particular se ubica entre la córnea y la esclerótica, en esta transición están las células troncales por lo que tiene un papel relevante en la renovación del tejido (Alonso, S., et. al., 1993).

Algún ligero cambio en la hidratación de la córnea puede darse por múltiples factores, por ejemplo, la edad. Sin embargo, algún cambio o deformidad en ella puede dar lugar a algún error de refracción. La transparencia corneal es un mecanismo óptico que se logra a través del factor físico que hace referencia a la disposición física de las lamelas corneales que son formadas por fibras de colágena tipo I, IV, V y VI que van de limbo a limbo de forma paralela con algunas ligeramente horizontales, las cuales forman una estructura tipo enrejada que elimina la dispersión de la luz por interferencia mutua a partir de fibras individuales (Teoría de Maurice) (Malacara, D.,2015).

1.2 Estructura de la córnea

La organización de sus distintas capas y otros factores contribuyen a mantener la transparencia. Histológicamente se han descrito cinco capas (Fig. 2) : epitelio basal, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio.

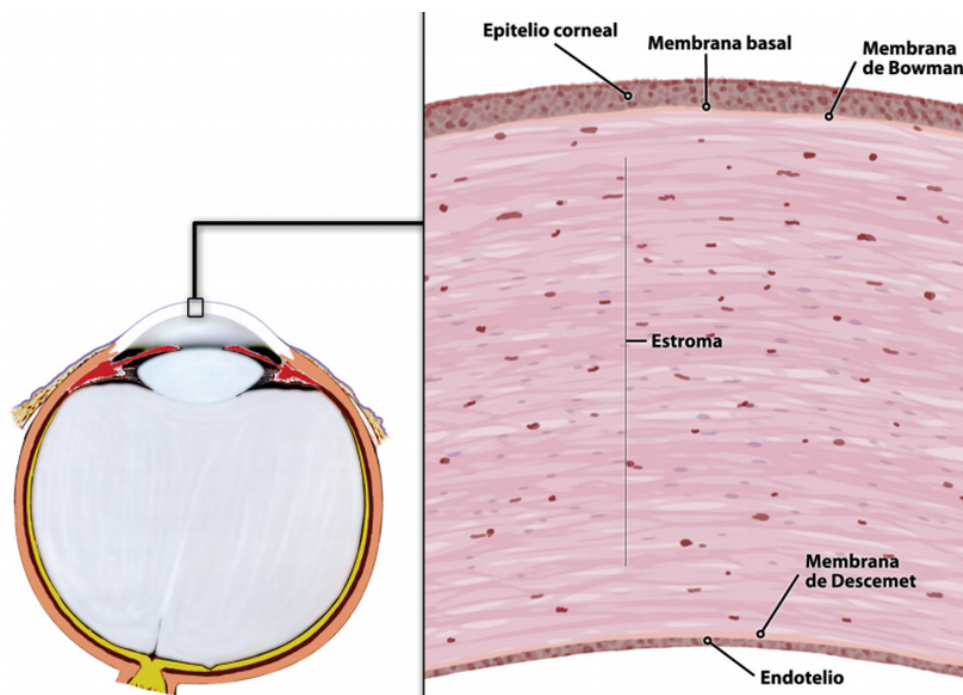


Figura 2. Imagen histológica de córnea humana (200 x). Imágen tomada de Fernández, A. et. al., 2008. La córnea se compone de 5 capas, en la parte superior se encuentra el epitelio corneal seguido de la membrana basal o membrana de Bowman. En el centro en mayor proporción se muestra al estroma y en la parte inferior se encuentra la membrana de Descemet y finalmente el Endotelio.

Epitelio

Es la capa más externa de la córnea, es un epitelio plano, estratificado no queratinizado, constituye al 10 % del grosor total de la córnea (50 micras de espesor en la parte central) (Fernández, A. et. al., 2008) y formado por 5-7 capas de células de 3 diferentes tipos.

El epitelio tiene diferentes funciones, en cuestión óptica da transparencia y fuerte poder refractivo, la refracción óptica es cuando los rayos de luz se reflejan en los

objetos y viaja en el ojo; primero en la córnea donde el índice de refracción es de 1.3771, después, pasan por el cristalino cuyo índice de refracción es de 1.36 a 1.41 para la formación de imágenes en la retina. El estado refractivo ideal es denominado emetropía, esto se da cuando en estado de acomodación relajada tiene su foco de imagen como se mencionó anteriormente, en la retina, es decir, cuando sin realizar algún tipo de esfuerzo convergen los rayos de luz en la retina. Las constantes ópticas promedio del ojo humano; como el índice de refracción mencionado anteriormente y el radio de curvatura, tanto de la córnea, retina, cristalino, humor acuoso y vítreo se pueden observar en la Tabla 1. (primer cuadro).

Esto es importante porque las lesiones de la córnea pueden desarrollarse en cualquiera de estos niveles. Existen distrofias corneales que pueden presentarse de cuatro formas: epitelial, membrana de Bowman, estromales y endoteliales, algunas son hereditarias, otras aparecen en la primera década de vida como las distrofias de tipo estromal (Tamayo, L. y Bernal, J., 1998) aunque no son tan comunes como los efectos que se dan por el cristalino donde la variación en el estado refractivo del ojo ideal se conoce como ametropía, que se puede clasificar en ametropías esféricas (miopía e hipermetropía) y astigmatismo (Fig.3).

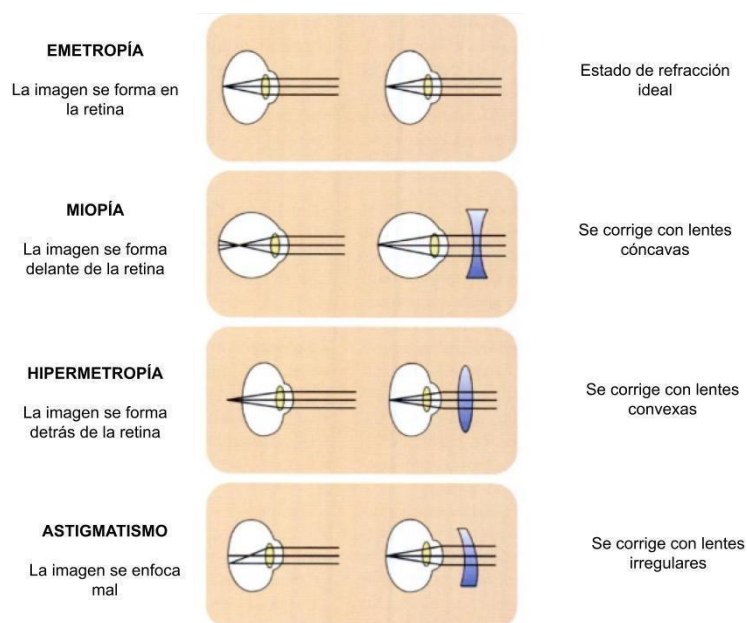


Figura 3. Refracción ocular y sus variaciones. Imágen modificada de Cardinali P. et al., 2007. La formación de la imagen en la retina considerada como ideal es denominada emetropía, sin embargo existen defectos en la refracción denominados miopía, hipermetropía y astigmatismo que afectan visión enfocada a objetos lejanos, cercanos y ambos, respectivamente.

El epitelio también es una barrera a los fluidos externos y los microorganismos, es estabilizador de la lágrima a través de microvellosidades, que son prolongaciones membranosas digitiformes propias de las células epiteliales (Villa, C. y Santodomingo, J., 2010).

Membrana de Bowman

La membrana de Bowman es una capa acelular y fibrilar que mide aproximadamente 17 micrómetros y no puede regenerarse, su papel fisiológico no se conoce con exactitud pero se cree que contribuye a la estabilidad biomecánica de la córnea (Azar, D., 2008), se puede considerar como una región especializada del estroma anterior que modera las interacciones con el epitelio corneal (Fernández, A. et. al., 2008), es decir, actúa como barrera física; su función alternativa es la separación del epitelio de la córnea de los queratocitos estromales, cabe destacar que en mamíferos sólo está presente en primates (Villa, C. y Santodomingo, J., 2010). Se compone de fibras de colágena tipo I orientadas en todas las direcciones y entrecruzadas, además, se adhiere a la membrana basolateral epitelial mediante fibras de colágena tipo VII, lo que la hace única y difiere a la del estroma tanto en contenido de colágena como en estructura de fibrillas .

Estroma

Es la parte más gruesa de la córnea, está compuesta por agua en un 75-80%, abarca el 90% del espesor corneal total que son aproximadamente 500 micrómetros, está formado por fibras de colágena densamente empaquetadas (láminas corneales) dispuestas en haces paralelos entre sí en cada laminilla y dispuestas formando un ángulo recto (Velázquez, G., 2015) con las fibras de las laminillas adyacentes, formando una red ordenada (Fig. 2) (Fernández, A. et. al., 2008). La colágena es fundamentalmente de tipo I. El tipo II se encuentra en la córnea embrionaria y los tipos V y VI se encuentran en menor proporción. Las fibras

de colágena son de calibre similar, (22-35 nm) y están espaciadas uniformemente (41 nm) (Villa, C. y Santodomingo, J., 2010).

El estroma está constituido por colágena y proteoglicanos (glicoproteínas), tales como dermatán sulfato, queratán sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico que son los que mantienen las uniones entre las fibras de colágena estromales y mucopolisacáridos. La parte posterior del estroma es la que presenta mayor concentración de queratán sulfato lo que le da un carácter hidrofílico mientras que en la parte anterior es mayor la concentración de dermatán sulfato que le ayuda también a su hidratación y propiedades estructurales (Villa, C. y Santodomingo, J., 2010).

Estos dos componentes (colágena y proteoglicanos) son fabricados por fibroblastos que también se les conoce como **queratocitos**, son de forma plana y al igual que las fibras se encuentran paralelos a la superficie y sus extensiones se entrelazan entre sí mediante uniones tipo comunicantes o *GAP* (Boy, S. et.al., 2012). La importancia de los queratocitos está en que son los responsables del mantenimiento del estroma. Estos queratocitos cuando existe alguna lesión, a manera de respuesta adoptan la forma de fibroblastos activados que migran hacia la herida, secretan colágena y glucoproteínas.

Esta organización particular de la estructura tisular es responsable del carácter anisotrópico de la córnea por el cual ésta muestra propiedades físicas distintas cuando se le aplican fuerzas en diferentes direcciones.

Membrana de Descemet

Es una membrana elástica ya que está formada por fibras de colágena, también es resistente y de escaso espesor, esto le sirve porque tiende a ceder a la presión intraocular (Peate, I. y Macleod, J. 2021). Sobre esta membrana se encuentra el endotelio corneal. Tiene un grosor de entre 10-15 micrómetros. En los recién nacidos, la membrana tiene aproximadamente 3 micrómetros de espesor y crece aproximadamente 1 micrómetro por cada década (Villa, C. y Santodomingo, J.,

2010). Las células endoteliales son las responsables del aumento de grosor progresivo durante toda la vida.

Endotelio

Es una monocapa de células poligonales la mayoría hexagonales, tiene un espesor de 5 micrómetros (Villa, C. y Santodomingo, J., 2010). Su función es regular el fluido que entra a la córnea desde la cámara anterior, por lo tanto se encarga de la regulación de la hidratación y nutrición por imbibición, y paso de electrolitos a través de un bombeo iónico de enzimas dependientes de la temperatura como la Na⁺/K⁺-ATPasa que los devuelve a la cámara anterior del ojo.

Su densidad celular (cantidad de células) va disminuyendo con la edad, y las lesiones corneales; se pierde aproximadamente el 0.7% de células endoteliales cada año (Boy, S, et al., 2012). Se cree que el número mínimo de células endoteliales necesarias para mantener la transparencia corneal es de 700 a 1000 por milímetro cuadrado.

1.3 Factores que afectan a la córnea.

La córnea tiene que mantener un equilibrio hídrico para mantenerse transparente, si se deshidrata pierde transparencia y se opaca (Malacara, D., 2015). Además, el daño mecánico o quirúrgico, por ejemplo, cuando la estructura se rasguña, es operada, sufre lesiones o quemaduras con ácidos, la capa epitelial se daña lo que provoca distrofias corneales.

Las distrofias corneales presentan acumulación de sustancias, por ejemplo, en opacidades focales hay acumulación intracelular y extracelular de glicosaminoglicanos. Asimismo, la acumulación de líquido anormal puede formar hidropesía en donde hay una ruptura de la membrana de Descemet y el humor acuoso invade el interior de la córnea, también los microquistes son formados por la acumulación de agua (Saona, C. 2006). Esta acumulación de sustancias puede

presentarse en el epitelio, endotelio, estroma y membrana de Bowman por lo tanto esto provoca que se altere el funcionamiento normal de la córnea.

1.4 Propiedades mecánicas de la córnea

Diversos estudios sobre las propiedades mecánicas de la córnea, relacionaban el comportamiento de la córnea con su grosor, lo cual indica que es un factor importante. Actualmente existen diferentes aparatos que permiten evaluar el comportamiento corneal en función de la deformación de la curvatura.

La geometría que tienen los tejidos es el resultado de tensiones internas, propias de su composición celular o acelular, y también de factores externos a los cuales se ven comprometidos por la relación con el ambiente. De esta forma los factores que influyen en la biomecánica son (Alcocer, P., 2016) :

- Factores intracorneales: están asociados a las características del tejido, como, por ejemplo, composición, la hidratación, el grosor de la córnea y el cruzamiento de las fibras de colágena; características que pueden ser moduladas principalmente por factores como la rigidez y curvatura a la que son sometidos las células de la córnea (Junko, Y. et al., 2014) como se describe más adelante.
- Factores extracorneales: como la presión atmosférica e intraocular, la compresión de los párpados y la tracción de los músculos.
- Factores ambientales: genera enfermedades oculares, por ejemplo, la luz, el flujo intenso de fotones puede generar lesiones que pueden llegar a ser irreversibles en la córnea, también traumatismos o cirugías pueden desencadenar problemas.

1.5 Rigidez

La homeostasis corneal está influenciada por propiedades biomecánicas: la forma y la curvatura están gobernadas por su estructura mecánica, en particular, la rigidez (del inglés *stiffness*) del estroma es relevante para mantener la estructura de la córnea.

Como se mencionó anteriormente, se necesitan dispositivos microfluídicos y materiales biocompatibles para estudiar los queratocitos en un ambiente biomimético, por lo que el conocer las propiedades mecánicas de los tejidos y los materiales es relevante. Estas propiedades determinan la capacidad de un material a deformarse mediante un esfuerzo (rigidez), su deformación en el tiempo (viscosidad), su incorporación de agua o sales (porosidad) y la conversión a sus propiedades originales (elasticidad) (Boy, S. et.al., 2012). Estas propiedades se pueden medir a través de la generación de un esfuerzo sobre el material (estrés) y la observación del grado de deformación sobre éste a través del tiempo.

Experimentalmente (el estudio de los materiales se refiere a cómo se deforma un material en respuesta a un esfuerzo, que se define como la fuerza sobre un área determinada, y su comportamiento a través del tiempo) para medir la relación entre la aplicación de un esfuerzo externo y la deformación de un material se utiliza el módulo elástico o módulo de Young (E) que, como su nombre lo indica, es una propiedad de los sólidos que determina su resistencia a la deformación y su elasticidad en ciertas magnitudes (capacidad de sufrir deformaciones reversibles cuando se aplica una fuerza externa) por lo que es un referente de la rigidez de los materiales (capacidad de resistencia a la deformación bajo un estrés mecánico) y su unidad de medida son los Pascales (Pa) que deriva de la fuerza sobre una unidad de área. La relación esfuerzo-deformación se calcula mediante la relación entre el valor de la fuerza sobre área y su valor de deformación, lo cual nos dará una constante de proporcionalidad (Fig.4) a lo que se le denomina módulo de elasticidad (E) o Young (Farsi, A., et.al., 2017). En este sentido, un material rígido tendrá un módulo de Young alto, por el contrario un material flexible tendrá un módulo de elasticidad bajo (mayor grado de deformación con un menor esfuerzo). Un material elástico, cuando se le aplica fuerza tiene la capacidad de deformarse y regresar a su forma original cuando se elimina la fuerza (Moeendarbary E. y Harris A. 2014).

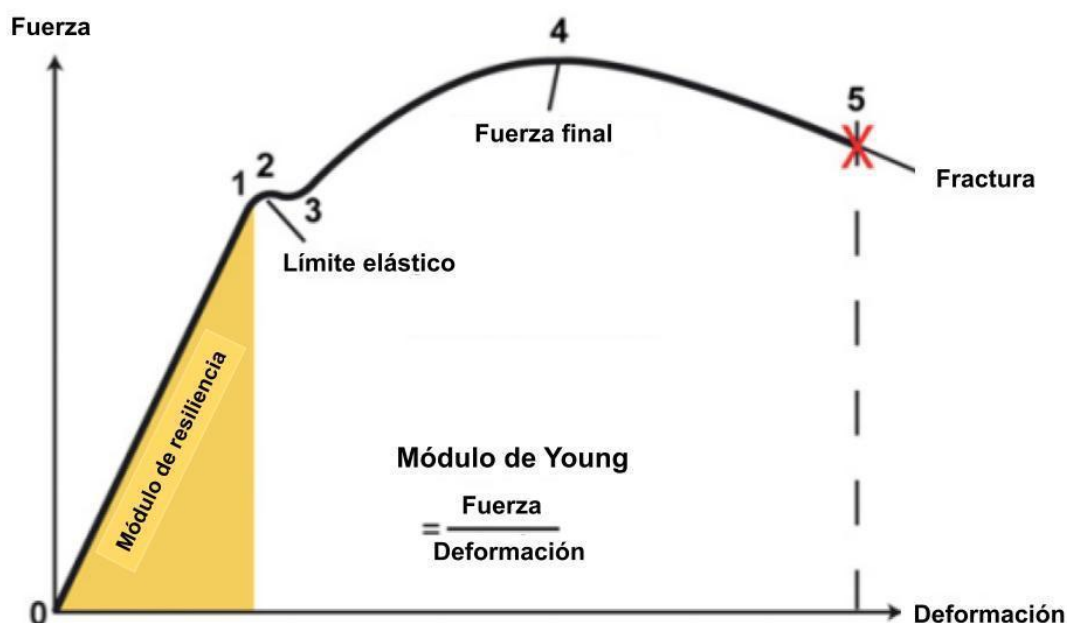


Figura 4. Curva de fuerza contra deformación y ecuación de módulo de Young. Modificada de Caplan N. y Banaszkiwicz P., 2019. La pendiente resultante de la relación esfuerzo-deformación nos permite saber las propiedades del material. El punto 1, 2 y 3 representan a la deformación del material donde puede ser revertida completamente, por el contrario, en el punto 4 la deformación del material es irreversible, en cambio el punto 5 es cuando el material es irreversible y puede llegar a una ruptura.

Desde hace más de 20 años ya se han realizado estudios de deformación en la córnea tanto en humanos, como en animales bovinos y conejos, donde se ha visto que la córnea no tiene un módulo elástico y varía de acuerdo la dirección y la región (anisotropía) debido a que la elasticidad es una propiedad intrínseca. Incluso, ya se han reportado los valores del módulo elástico para cada capa de la córnea, la membrana basal anterior tiene un valor de 7.5 ± 4.2 kPa, la membrana de Bowman tiene una rigidez de 109.8 ± 13.2 kPa, por otro lado, el estroma anterior tiene un valor de 33.1 ± 6.1 kPa y por último, el valor de la membrana de Descemet es de 50 ± 17.8 kPa (Last, J. et.al, 2012). La diferencia entre estas mediciones pudiera deberse a que el valor de 33.1 ± 6.1 kPa del estroma anterior, fue medido a través de microscopía de fuerza atómica y pruebas de indentación, por lo que la profundidad de medición pudo ser un factor, considerando la interconectividad de las fibras de colágena tiene un aumento en el estroma anterior ya que está debajo de la

capa de Bowman, lo cual puede incrementar el módulo elástico (Miyagi, H. et.al., 2018). Otros estudios demuestran que la rigidez del estroma corneal normal en conejos (que es equivalente a la de los humanos) es de aproximadamente 25 kPa (Miyagi, H. et.al., 2018).

Es relevante resaltar que la rigidez es importante y necesaria para generar esfuerzos dentro de la célula y conducir al esparcimiento celular, por lo que los valores del módulo elástico tienen un papel importante en la homeóstasis de la córnea.

1.6 Curvatura

El tercio central de la córnea, también conocido como zona óptica, en el humano es casi esférico y tiene un radio de curvatura de 7,8 mm (Tabla 1). En cambio, la córnea periférica tiene una curvatura menor, su radio también varía y la superficie posterior es casi esférica teniendo un radio de curvatura de 6,5 mm, ambos radios son superiores a los del cristalino y retina, como se puede observar en el Tabla 1. En un recién nacido la córnea es relativamente grande y su curvatura es más pronunciada, sin embargo, la córnea continúa creciendo en diámetro, y se va aplanando con el paso del tiempo, de modo que en el primer año de vida casi alcanza las medidas adultas.

Es importante mencionar que las propiedades biomecánicas de la córnea afectan la curvatura y su conformación, por ejemplo, la baja presión intraocular se asocia con cambios en la curvatura de la córnea central e incluso se relaciona con la rigidez. Las córneas delgadas tienen menor rigidez aún cuando la concentración de colágena es normal (Wallace, H. et.al., 2019).

Tabla 1. Constantes ópticas del ojo humano promedio.

Córnea	Radios de curvatura	Superficie anterior Superficie posterior	7.8 mm 6.5 mm
	Potencia óptica		43 D
	Grosor		3.05 mm
	Índice de refracción		1.3771
Humor acuoso	índice de refracción		1.3374
Cristalino	Radios de curvatura	Superficie anterior Superficie posterior	0.2 mm - 6.0mm
	Potencia óptica		19.0 D
	Grosor		4.00 mm
	Índice de refracción		1.36 a 1.41
Humor vítreo	Grosor		4.00 mm
	Índice de refracción central		1.36 a 1.41
	índice de refracción externo		1.386
Retina	Radio de curvatura		-13.4

Modificada de Malacara, D., 2015. El ojo humano tiene una longitud de 24.75 mm.

1.7 Vías de mecanotransducción

La mecanotransducción es la transmisión y la conversión de estímulos mecánicos, principalmente extracelulares, a señales intracelulares que producen una respuesta; es decir, un estímulo mecánico extracelular es sentido y a su vez convertido en señales bioquímicas mediante los complejos de proteínas de unión, éstas son las encargadas de transducir ese estímulo al interior de la célula por ejemplo, con el reacomodo del citoesqueleto de actina, que son transmitidos hasta el núcleo activando factores transcripcionales, los resultados de estos estímulos van desde el cambio en la forma de las células hasta la expresión de nuevas proteínas (Díaz, D. et.al., 2015).

Las células son sistemas dinámicos que han desarrollado mecanismos adaptativos para mantenerse viables, por ejemplo, el citoesqueleto tiene diversas funciones, como el conferir forma y polaridad a la célula así como comunicarse con su medio extracelular. Esta estructura, le permite a la célula ser capaz de identificar el grado de rigidez que tiene el sustrato.

Por lo tanto, las células al detectar estímulos como la rigidez y curvatura, responden convirtiendo esos estímulos en una respuesta celular a través de mecanismo bioquímicos (Fig.5). A modo de ejemplo, en la matriz extracelular (MEC) los cambios en la rigidez provocan un reacomodo en el citoesqueleto de actina (fibras de estrés).

Estas fibras de estrés, son estructuras contráctiles por el acoplamiento que tienen con el aparato de actomiosina, donde la activación del mismo genera una fuerza contráctil y va formando nuevos filamentos denominados fibras de estrés, las cuales son las encargadas de llevar la señal mecánica hasta el núcleo donde habrán complejos proteicos denominados LINC (del inglés *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) conformados principalmente por las proteínas SUN (proteína de la membrana interna) y Nespirina (proteína localizada en la membrana externa), las cuales, unen a la envoltura nuclear con el citoesqueleto y tienen la capacidad de deformarlo generando cambios en la forma de la célula, esto debido a que el núcleo puede ser desplazado la acción de proteínas motoras, procesos de polimerización, despolimerización, etc. (Sosa B.A et al., 2012). Asimismo, se ha visto que puede presentar cambios en la proliferación celular, en su polaridad, migración, cambios fenotípicos como la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Speight P. et al., 2016) o excentricidad (nos dice que tan circular es una célula ya que es considerada como una elipse y se obtiene dividiendo el eje menor entre el mayor, de esta forma una célula circular es aquella cuyo valor sea igual a 1) y área de las células (esparcimiento). En este proceso participan las adhesiones focales, las cuales a través de una cascada de eventos donde reclutan y acoplan proteínas van formando complejos intracelulares que se ensamblan con el citoesqueleto de actina acoplado al aparato de actomiosina que le confiere a la célula el potencial de generar esfuerzos al identificar los cambios en las propiedades mecánicas extracelulares (rigidez o suavidad del sustrato) y dependiendo de estas propiedades será la fuerza

de tracción que la célula ejerza y por lo tanto, la cantidad de adhesiones focales formadas es la que determina el grado de área celular (Zhou J. et al., 2015).

Asociado a ello se han estudiado los factores transcripcionales YAP/TAZ que están relacionados con las fibras de estrés, regulando la actividad transcripcional del núcleo relacionada a la tensión sobre el citoesqueleto (Díaz, D. et.al., 2015).

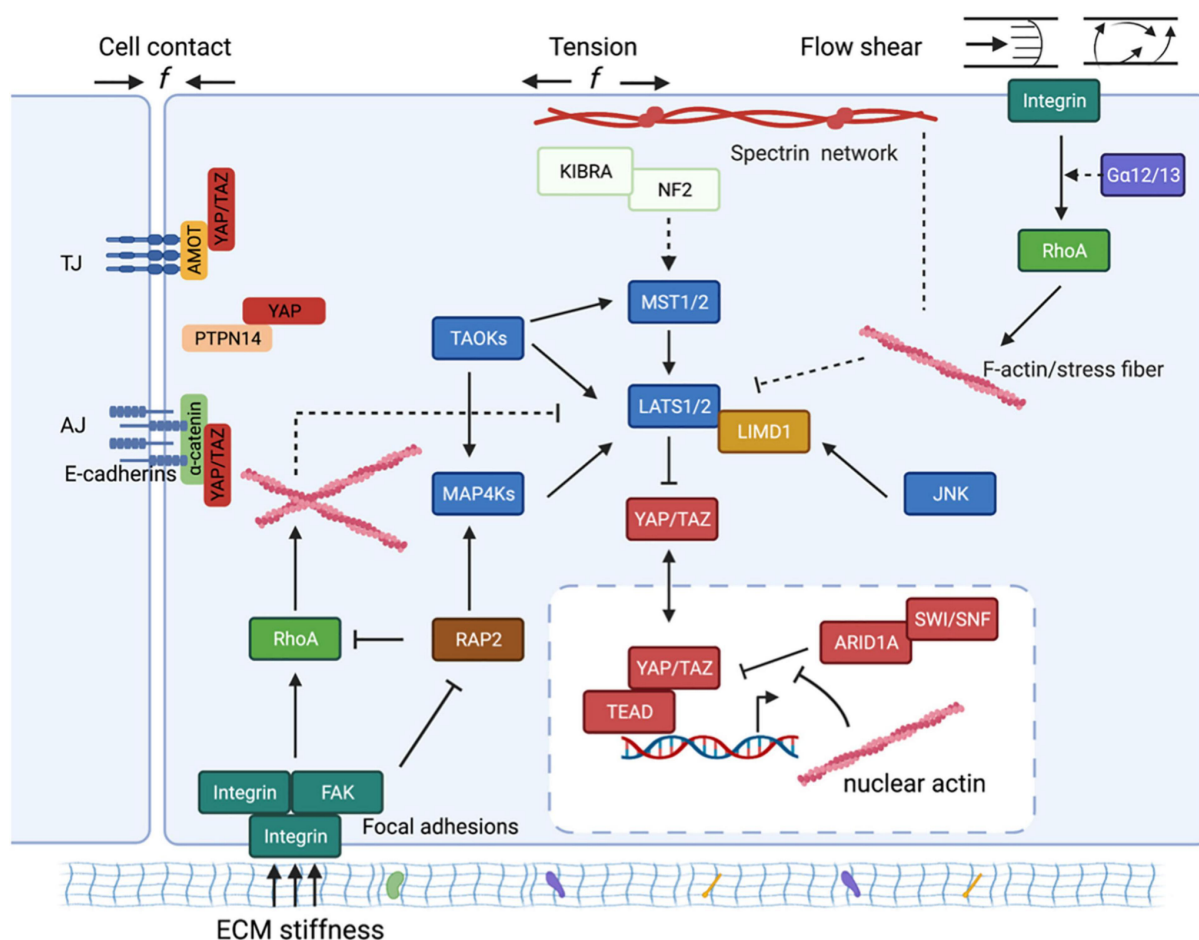


Figura 5. Diagrama de mecanismos que regulan YAP/TAZ. Tomada de Cai,X., Wang, K. y Meng, Z., 2021. La actividad de YAP/TAZ es dependiente de señales mecánicas como la rigidez de la matriz, el contacto célula-célula, la rigidez de la matriz extracelular y el cizallamiento del flujo (esfuerzo cortante). Cuando la ruta está en su estado apagado las cinasas están inactivas lo cual permite que las proteínas YAP/TAZ transloquen al núcleo y se unan a TEAD que es el factor transcripcional; por el contrario, cuando la ruta Hippo está encendida, las cinasas se encuentran activas, YAP/TAZ está fosforilado lo cual evita su entrada a núcleo.

Via Hippo YAP/TAZ

La ruta Hippo es una cascada de cinasas, cuando la vía se encuentra inactiva, las cinasas MST 1 y 2 (del inglés *Mammalian Ste20-like*) fosforilan a las proteínas LATS

1 y 2 (del inglés *Large Tumor Suppressors*) (que a su vez son cinasas) las cuales también fosforilan e inactivan a la proteína conocida como YAP (del inglés *Yes-associated protein*), y al coactivador transcripcional conocido como TAZ (del inglés *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*). Al estar fosforilados estos cofactores transcripcionales, a través de la proteína 14-3-3, son arrestados en el citoplasma y, en algunos casos, son sujetos a degradación vía proteasoma. Por otro lado, cuando estos cofactores (YAP/TAZ) se encuentran desfosforilados se translocan al núcleo y se unen a la familia de factores transcripcionales TEAD (del inglés *The transcriptional enhanced associated domain*) (Cai, X., Wang, K. y Meng, Z., 2021). Este complejo promueve la proliferación celular, migración y movilidad, gracias a los genes blanco de este complejo que son, por ejemplo las proteínas CYR61 (del inglés *Cysteine-rich angiogenic inducer 61*) , BIRC5 (del inglés *Baculoviral IAP Repeat Containing 5*), CTGF (del inglés *Connective tissue growth factor*), etc (Zhao B. et al., 2008).

En enfermedades como la fibrosis, estos cofactores transcripcionales se encuentran desregulados, generalmente de manera positiva. Debido al aumento de la rigidez en la MEC se genera un depósito excesivo de sus componentes y como consecuencia, se da un endurecimiento del tejido como una retroalimentación positiva. Asimismo, el tener una MEC fibrótica promueve la proliferación celular y cambia la polaridad de las células generando la pérdida de las funciones y el desarrollo de tumores (Noguchi et al., 2018). Por esta razón se ha propuesto que la inhibición de YAP/TAZ sea una estrategia para prevenir la fibrosis.

2. ANTECEDENTES

La córnea es la estructura con mayor poder refractivo del ojo humano (Torres, M., et al., 2005) debido a que permite la transmisión de la luz y mediante la refracción ayuda a la focalización, además de proteger las estructuras intraoculares. Para que la córnea sea transparente es importante la distribución regular de las células del estroma y también de las macromoléculas. Histológicamente los queratocitos se disponen a lo largo del estroma con diferentes tamaños y densidades, formando una red tridimensional en espiral a través de la córnea, su aspecto es el de fibroblastos aplanados entre las lamelas de colágena (Fig.6) (Rada, J. et al., 2005)

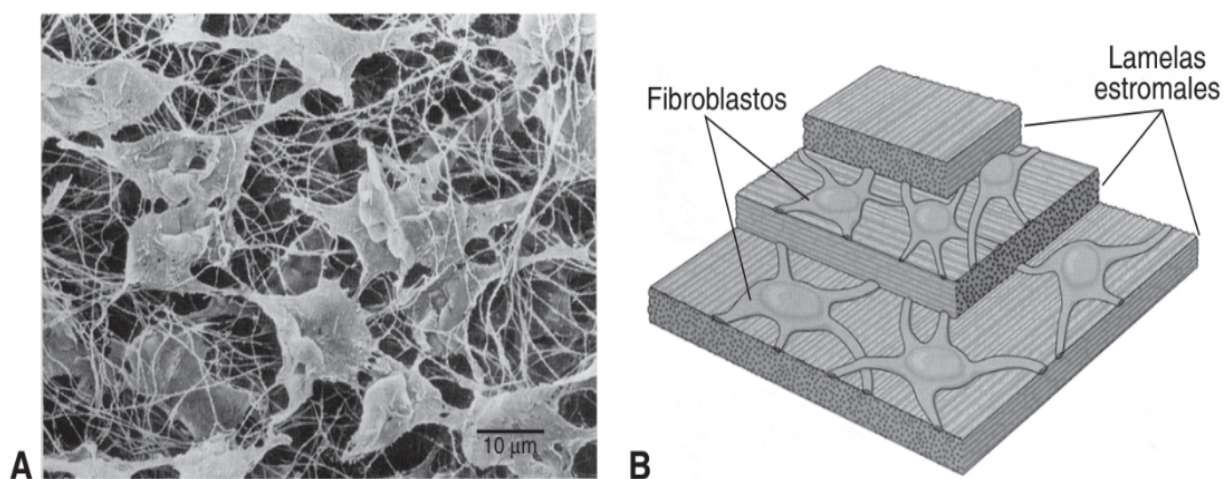


Figura 6. Distribución de queratocitos en el estroma corneal. Tomada de Rada, J. et al., 2005. A) Micrografía de queratocitos donde se observan fibroblastos aplanados en forma de red. B) Esquema de fibroblastos aplanados entre las lamelas corneales.

Por consiguiente, dos de los factores importantes para el buen funcionamiento del ojo y sobre todo para tener una buena visión, son el mantenimiento de las condiciones de la córnea tales como la rigidez y curvatura. Sin embargo, estos dos factores se pueden ver afectados por diferentes condiciones, una de ellas son las hormonas, como se ha observado en el embarazo, y la retención hídrica que parecen modificar las condiciones de la córnea bajo efectos de los cambios en la presión haciendo que las córneas sean fácilmente deformables, modificando su rigidez y curvatura (Alcocer, P., 2016).

Otro factor importante que modifica las condiciones biológicas en la córnea es la obesidad y la diabetes. Un estudio reciente elaborado por el equipo de Xu, P. et al.,

2020 muestra a ratones que fueron inducidos mediante dieta a la enfermedad de diabetes tipo 2 donde encontraron que sus córneas era más suaves debido a cambios en la localización de las proteínas epiteliales Crb3 y PKC ζ (PKC zeta), así como la disminución de fibronectina; sus resultados sugirieron que la edad y el medio ambiente también afectan la integridad de la córnea.

Asimismo, ya se ha investigado el papel de la rigidez en la homeostasis de la córnea a través de materiales como los que se proponen en este proyecto, por ejemplo, hidrogeles y precursores como la colágena. También se han realizado estudios empleando compuestos de diferente rigidez que van desde geles suaves 10 kPa hasta los 250 kPa, abarcando los valores fisiológicos y los fibróticos (Thomasy, S. et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de estos estudios están enfocados en bioimpresiones (Tabla 2) esto nos muestra la importancia y el avance que han tenido ciertas disciplinas como la ingeniería de tejidos para realizar la imitación de una, dos e incluso todas las capas del tejido corneal con materiales naturales como colágena, gelatina, quitosano, ácido poliglicólico (PGA) entre otros, en andamios tipo fibras, películas, espumas, por mencionar algunos. En esta revisión de estudios (Tabla 2), observaron una baja transmisión de luz, así como menor población celular, aunque en algunos si se lograba la organización físicoquímica del estroma, cabe destacar que fueron muy pocos los que lograron la fase 1 en ensayos clínicos. Sin embargo, aún no existe un tejido corneal disponible para uso clínico ya que reconstruir al estroma es una tarea compleja, es difícil integrar estabilidad biomecánica, interacciones célula-célula y transmisión de luz (Fuest, et al., 2020).

Tabla 2. Resumen de estudios originales realizados en 2018-2020 sobre bioimpresión corneal.

Corneal Layer	Bioprinting Method	Materials for Bioink	Cell Type	Cell Elongation	Mechanical Properties	Transparency Evaluation
Native cornea						
Stroma		CSKs/LSSCs		Dendritic up to 100 µm	100-250 kPa	80% at 380 nm and
Epithelium		CEpCs/LECs		Round/polygonal tight monolayer	Fragile	>90% at 500-1300 nm
Endothelium			CECs	Hexagonal tight monolayer	Fragile	
Stroma	Laser	Matrigel-COL I bioink // LN-COL IV support sheet	Human LECs+ ADSCs	Filopodial elongation up to 50 µm	n.a.	Qualitative: slightly opaque
	Extrusion	1.3% ALG-2.7% COL I bioink // FRESH support	Human CSKs	Round cells	n.a.	Qualitative: see through gel
	Drop-on-demand	0.2% COL I-0.5% AG bioink // no support	Human CSKs	Filopodial elongation up to 100 µm	15-20 kPa	Qualitative: see through gel
	Extrusion	15% GelMa bioink // reinforced with PEG-PCL fibers	Rat LSSCs	Filopodial elongation up to 50 µm	60-120 kPa	Qualitative: see through gel
	Extrusion	15% GelMa bioink // no support	Human CSKs	Round cells	10-20 kPa	Quantitative: 80% at 700 nm 5% at UVB
Epithelium	Extrusion	Cornea-derived dECM bioink // no support	Human TDMSCs with keratocyte induction	Filopodial elongation up to 50 µm	70-100 kPa	Quantitative: 80% at 700 nm 70% at UVB
	Extrusion	15% GelMa bioink // 15% GelMa dome-shaped mold	Human CEpCs line	Round cells	50 kPa	Qualitative: see through gel
Endothelium	Extrusion	Gelatin-RGD bioink // amniotic membrane dECM support	Human CECs	Round cells	n.a.	n.a.

Tomada y modificada de Fuest et al. 2020. El estudio de las células de córnea se ha realizado en diferentes condiciones mecánicas, desde los 10 kPa hasta los 250 kPa en diferentes materiales donde se ha evaluado la transparencia.

Por lo mencionado anteriormente, es de importancia el estudio de la influencia de las propiedades mecánicas, particularmente la curvatura y la rigidez en la córnea que impactan de manera directa el comportamiento de las células que la componen así como su organización con la MEC. Existen diversos estudios o investigaciones que ya han evaluado de manera individual cada uno de estos parámetros.

En lo que respecta a la rigidez, se ha estudiado la expansión de células endoteliales de córnea bovina en un sustrato biomimético con PDMS recubierto de colágena tipo IV a una rigidez de 50 kPa donde vieron que las células crecieron en monocapas de mayor densidad. También las células presentaron una morfología poligonal (similar a la presentada en tejido); cabe mencionar que no presentó el fenómeno de la transición endotelio a mesénquima (Palchesko, R. et al , 2015). Además, en fibroblastos corneales de conejo, se ha estudiado el efecto de la rigidez mediante el uso de hidrogeles de poliacrilamida (PAA), recubiertos con colágena tipo I y III, a valores de rigidez de 1.5 kPa (suave), 22 kPa (condición fisiológica) y 71 kPa (fibrótica). Además, se investigó el efecto de latrunculina B, influenciado por la rigidez del sustrato, sobre la transformación de los queratocitos (fibroblastos) a miofibroblastos. Los resultados arrojaron que latrunculina B modula (disminuye) la expresión del mRNA y proteína de la actina de músculo liso alfa (alfa-SMA), un marcador del fenotipo de miofibroblastos en hidrogeles rígidos versus blandos después del tratamiento con Lat-B, asimismo, disminuye la transformación de queratocitos a miofibroblastos en sustratos más rígidos (71 kPa) que el estroma normal de conejo (22 kPa). Por tanto, se sugiere que la rigidez influye de manera positiva en la transformación de los miofibroblastos (Thomasy, S. et al., 2018).

De igual forma, ya se ha realizado el cultivo de queratocitos, células epiteliales corneales y conjuntivales humanas en un microdispositivo con microcanales de PDMS que simula la estructura 3D del ojo humano. Dicho dispositivo es un andamio poroso con curvatura de 5 mm para aproximar la curvatura de la córnea humana, le depositaron queratocitos humanos en un gel de colágena para imitar el estroma, en la superficie del andamio sembraron células epiteliales de córnea humana y células epiteliales conjuntivales que se mantuvieron viables durante 3 semanas, abarcando así la parte mecánica y fisiológica. Sus resultados fueron favorables, lograron la generación de los epitelios, con fenotipos diferenciados, también se generó la

formación de uniones estrechas y vieron un aumento de expresión de citoqueratina y mucina. Igualmente, simulaban características patológicas del ojo seco y mostraron el fluido de una lágrima artificial (Jeongyun, S. et al., 2016).

En cuanto a curvatura, ya se han realizado investigaciones con diferentes células del modelo de la córnea (epiteliales, endoteliales, fibroblastos, etc.), como se mencionó previamente, en el chip también conocido como dispositivo microfluídico (es una alternativa para el estudio de las células, puede generar estímulos mecánicos controlados, por ejemplo, a través de canales puede haber un flujo laminar que ayuda a llevar a cabo diversos análisis de complejos sistemas celulares en un microentorno controlado), utilizaron una curvatura de 5 mm aproximada a la fisiológica de la córnea que es de 7.8 mm.

Otros estudios enfocados en realizar injertos de células endoteliales de córnea, han creado una membrana de atelocolágeno porcino (se obtiene tras la eliminación del telopéptido de la colágena) irradiada con UV, dicha membrana presenta un radio de curvatura de 8 mm y una profundidad de 2 mm, en ella evaluaron transparencia, permeabilidad y distribución de las células. Observaron que la membrana curva mantuvo su transparencia hasta 4 meses, la absorbancia de luz también fue evaluada ya que la córnea desempeña un papel importante al cortar la luz ultravioleta que ingresa al ojo y el hecho de que la membrana actúe de manera similar a la córnea en términos de absorbancia de rayos ultravioleta es muy importante. Por otra parte, en la evaluación in vivo (implantaron la membrana en ojos de conejo) no mostró toxicidad ni causó inflamación, además, se obtuvo una alta permeabilidad proteica; esto fue evaluado a través de un dispositivo de prueba de permeabilidad y posteriormente con tinción de plata detectaron albúmina, lo que sugiere una buena permeabilidad. Sin embargo, hacen mucho énfasis en que la curvatura es importante para que las células endoteliales corneales se adhieran logrando una distribución uniforme y regular de las mismas (Junko, Y. et al., 2014).

Además, se ha visto que la curvatura influye en la alineación de las células, se ha demostrado que un tejido curvo favorece el crecimiento, estratificación y diferenciación de células epiteliales de la córnea, manteniendo su integridad, ya que al tener 7,9 mm de radio de curvatura mostraron mayor expresión de marcadores como ALDH3, decorina, CHST6 que son específicos del estroma de la córnea, así

como la expresión de CK3, ZO-1, colágena tipo VII y laminina lo que indica la activación de fibroblastos y con ello un alto grado de anisotropía. Esto se logró con plantillas de agarosa funcionalizadas (proceso en el que se adicionan grupos funcionales para promover la incorporación de otras moléculas brindándole otras propiedades al material) con matrigel o péptido anfifílico (PA) (Gouveia, R. et al., 2017).

Existe otro dispositivo microfluídico tipo *chip* de PDMS para tener un modelo celular en 3D que permite estudiar las condiciones fisiológicas y patológicas de la córnea que también permite el estudio de fármacos oftalmológicos en la cámara anterior. Este dispositivo consta de tres canales (de 160 μm de alto y 400 μm de ancho) simulando la arquitectura de la córnea, el canal de en medio estaba relleno de colágena tipo I (simulando la membrana de Bowman), cultivaron células endoteliales y epiteliales de ratón. Las células formaron capas a las 48 horas y llegaron a ser 7 capas de células epiteliales, en la parte superior de la membrana de Bowman, igualmente encontraron la expresión de ZO-1 lo que indica la formación de uniones estrechas y citoqueratina que es una proteína específica de células epiteliales lo que demuestra la viabilidad del dispositivo (Bai, J. et al., 2020).

En un estudio elaborado por *Connon, C. et al* en 2013 utilizando células epiteliales del limbo y de la córnea central, investigaron la ubicación celular del factor de transcripción nuclear YAP/TAZ y su relación con la rigidez, los autores vieron que en una córnea normal YAP/TAZ se encuentra predominantemente localizados en el citoplasma al igual que en los geles suaves y, por el contrario, en los geles más rígidos YAP/TAZ se encontraban en el núcleo.

Por tanto, en este trabajo se plantea estudiar la respuesta de los fibroblastos humanos de córnea a distintos valores de rigidez y a las propiedades de curvatura, tomando en cuenta la polimerización de actina, la deformación nuclear, el esparcimiento celular (cambio en el área que tiene la célula sobre la superficie) y la activación de los cofactores YAP/TAZ.

3. JUSTIFICACIÓN

Los fibroblastos son las células responsables de la fibrogénesis de la matriz extracelular en la gran mayoría de los tejidos y no son la excepción los queratocitos de la córnea. Asimismo, cambios en la curvatura tiene como efecto el depósito de MEC fibrilar y un aumento en la rigidez extracelular lo cual induce un proceso de fibrosis en donde cualquier cuestión que modifique la organización de fibras paralelas puede desencadenarlo.

La pérdida de la visión por problemas en la córnea como opacidad corneal (causada por afecciones degenerativas, infecciosas, nutricionales, congénitas, etc) representa el 3,46% de la ceguera mundial y el 1,65% de la ceguera y la discapacidad visual en todo el mundo (IAPB Vision Atlas, s.f.), en algunos casos como, por ejemplo, las distrofias corneales y el queratocono (afección que adelgaza la córnea y cambia su forma como un cono) su único tratamiento es el trasplante de córnea. Sin embargo, las infecciones, los traumatismos y las inflamaciones corneales pueden prevenirse y tratarse.

Por lo que el conocimiento de las propiedades elásticas y de curvatura en la activación de vías de mecanotransducción permite el entendimiento de procesos fisiopatológicos de la córnea así como el desarrollo de estrategias a problemas estromales ya que cualquier evento que altere o modifique la córnea a largo plazo puede dar como resultado alguna enfermedad o bien, pérdida parcial o total de la visión.

4. HIPÓTESIS

Los fibroblastos de córnea se localizan inmersos en el tejido conjuntivo fibrilar y bajo efectos de curvatura sin tener un fenotipo fibrogénico. Por tanto, si cultivamos los fibroblastos de córnea en sustratos de rigidez mayor o grados de curvatura diferentes a los reportados fisiológicamente, los fibroblastos adquirirán un fenotipo de activación polimerizando su citoesqueleto de actina y activando a las proteínas YAP/TAZ.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

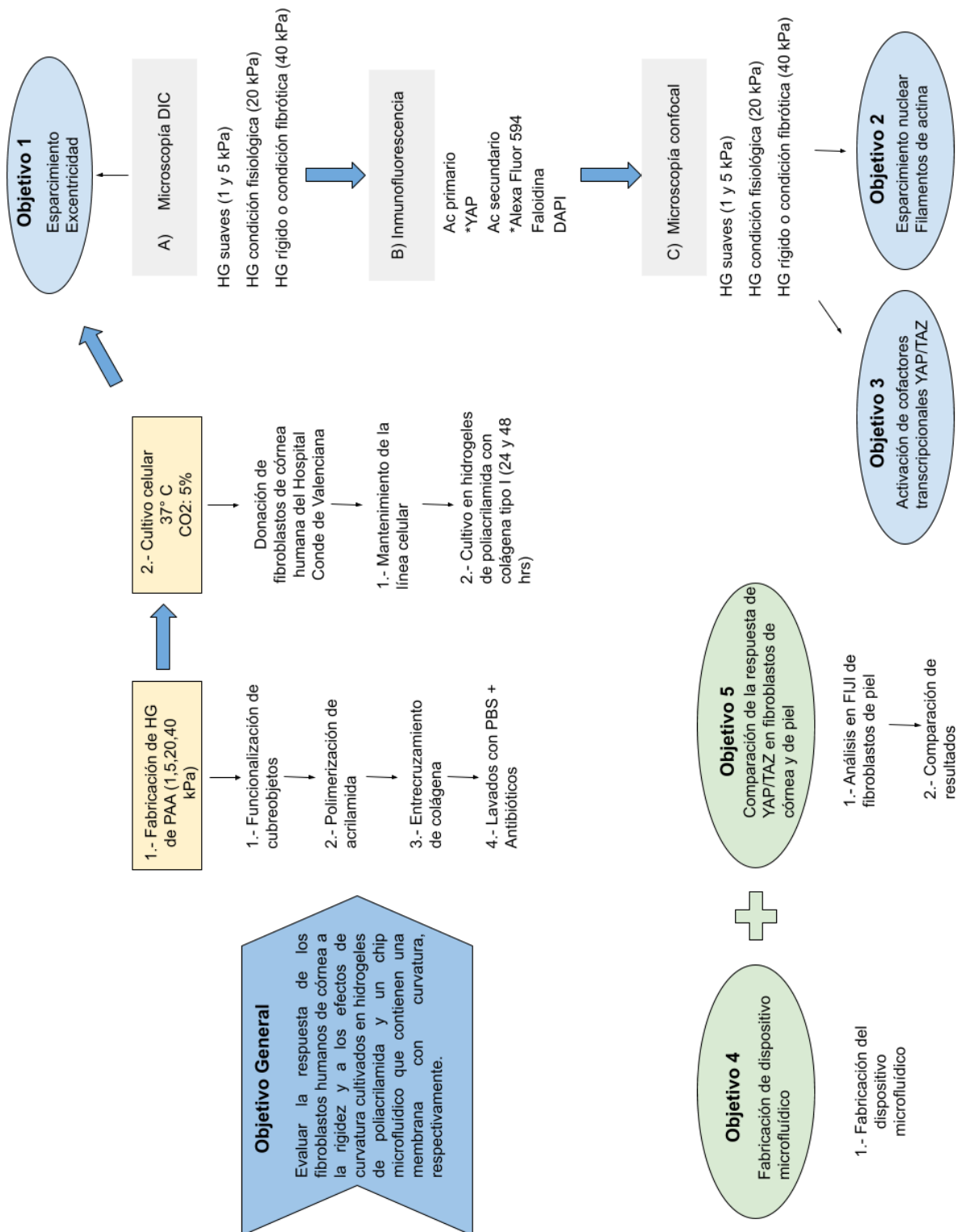
Evaluar la respuesta de los fibroblastos humanos de córnea a la rigidez mediante el cultivo en hidrogeles de poliacrilamida y a los efectos de curvatura a través de un dispositivo microfluídico que contiene una membrana con curvatura.

5.1.1 Objetivos Específicos

1. Evaluar el esparcimiento (cambio en el área de la célula) y la excentricidad (que tan circular o alargada se mantiene la célula) en los fibroblastos cultivados en los hidrogeles de poliacrilamida (HG PAA) con diferente rigidez.
2. Determinar el esparcimiento nuclear (cambio en el área del núcleo) y la formación de filamentos de actina (F-actina) en fibroblastos de córnea cultivados en HG PAA con diferente rigidez.
3. Evaluar la activación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en fibroblastos de córnea cultivados en HG PAA.
4. Comparar la respuesta de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ de los fibroblastos de piel y de córnea humana cultivados en HG PAA.
5. Fabricar un dispositivo microfluídico para la evaluación de la formación de filamentos de actina en los fibroblastos de córnea cultivados bajo el efecto de curvatura.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

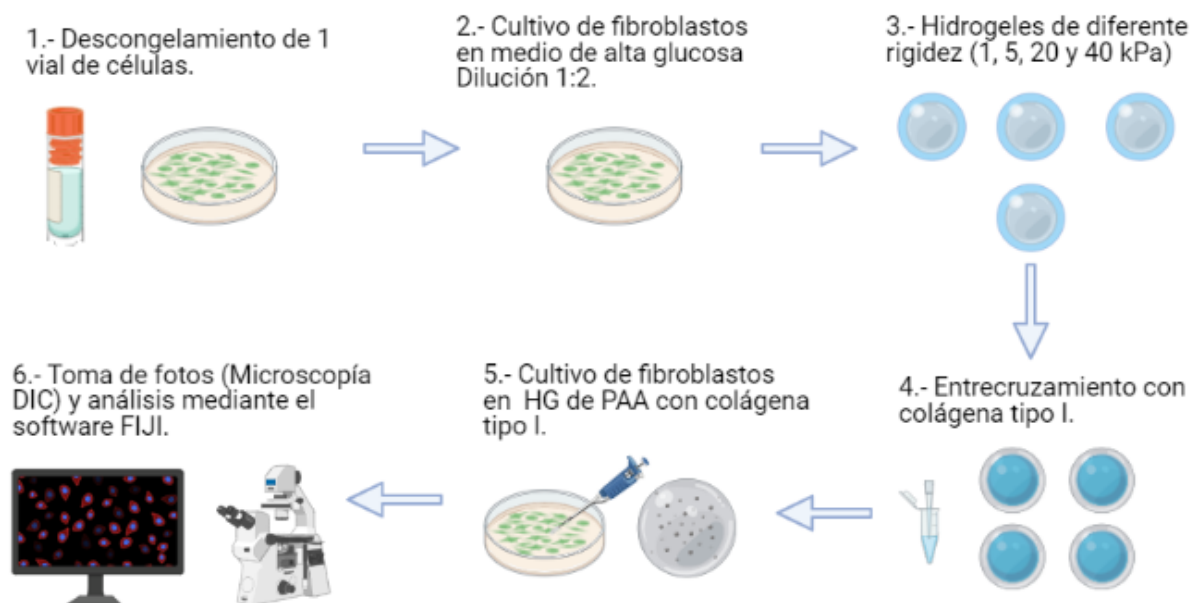
En el siguiente diagrama se explica la metodología utilizada para los primeros tres objetivos planteados.



6.1 Evaluar el esparcimiento (cambio en el área de la célula) y la excentricidad (que tan circular o alargada se mantiene la célula) en los fibroblastos de córnea humana cultivados en los hidrogeles de poliacrilamida (HG PAA) con diferente rigidez.

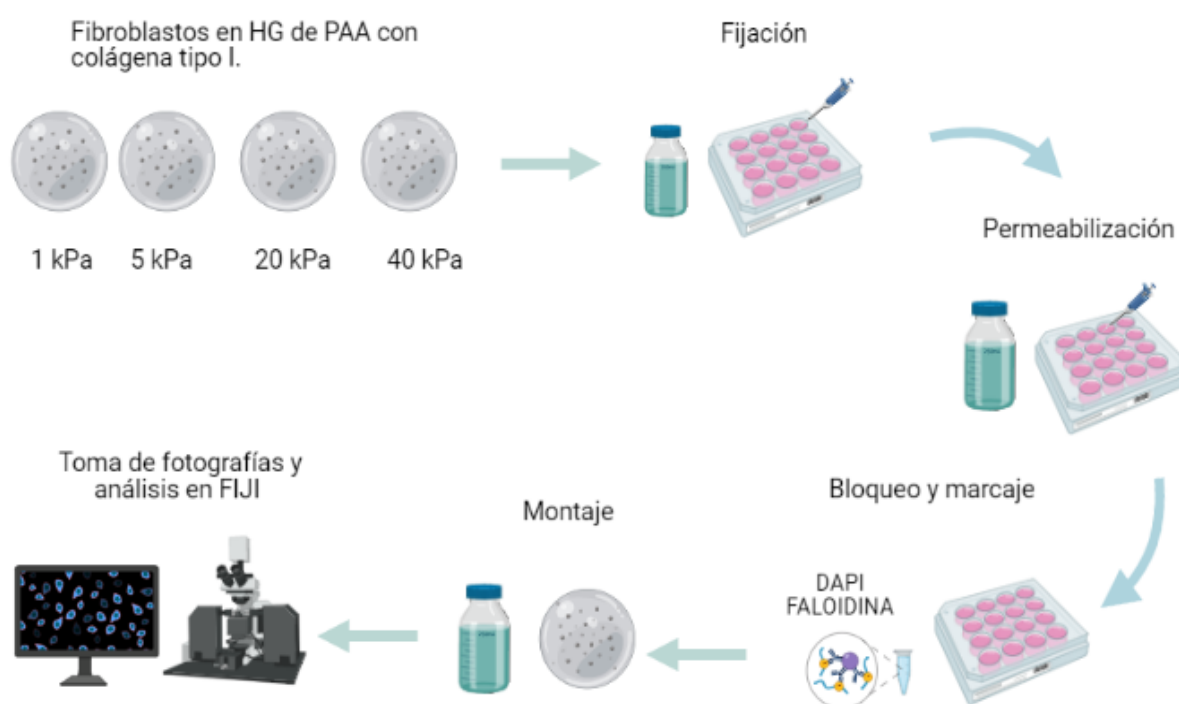
Para realizar el objetivo número 1, se fabricaron hidrogeles de poliacrilamida con los siguientes valores de rigidez: 1 kPa, 5 kPa, 20 kPa y 40 kPa.

En un cubreobjetos se elaboraron los HG PAA, asimismo, se les depositó colágena tipo 1 conjugada para después cultivar fibroblastos de córnea humana. Los fibroblastos se mantuvieron en medio de DMEM con alta glucosa hasta su cultivo en HG PAA a una densidad de 5.0×10^4 células en cada experimento. Posteriormente se evaluó el esparcimiento y excentricidad en los fibroblastos cultivados en HG PAA mediante microscopía de contraste diferencial de interferencia, o DIC (por sus siglas en inglés), y se analizaron las imágenes por el software libre FIJI como se ilustra a continuación:



6.2 Determinar el esparcimiento nuclear (cambio en el área del núcleo) y la formación de filamentos de actina (F-actina) en fibroblastos de córnea cultivados en HG PAA con diferente rigidez.

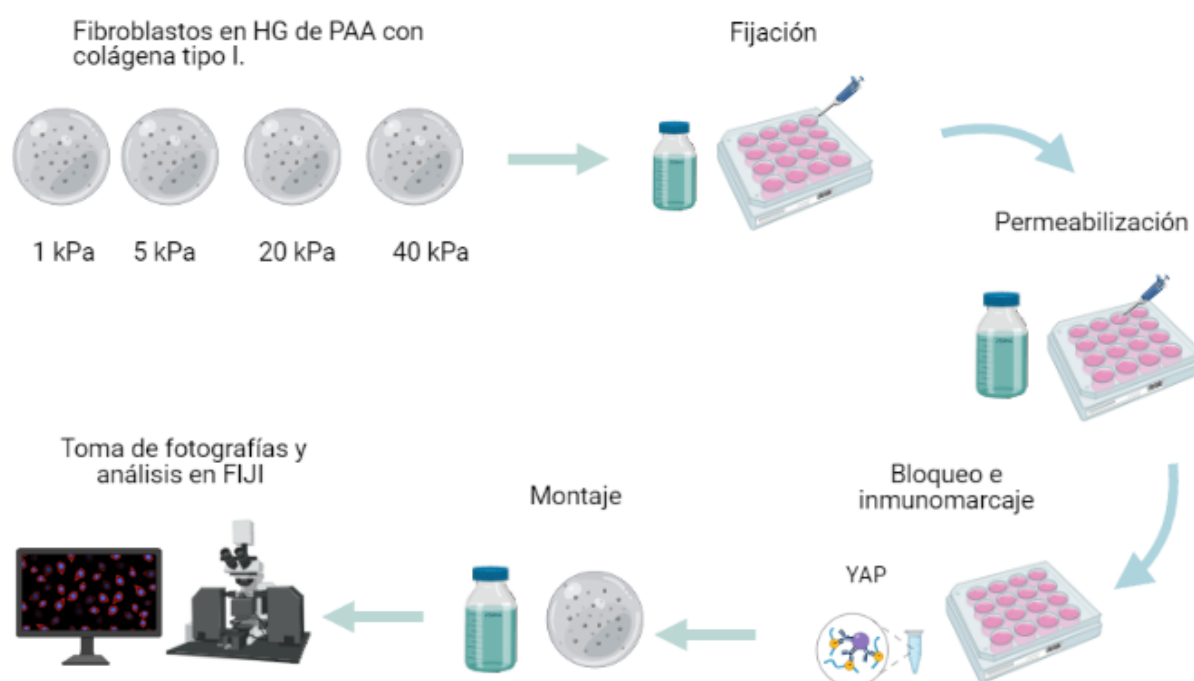
Como se muestra a continuación, se evaluó para el objetivo 2 la formación de F-actina y la deformación nuclear. Para la deformación nuclear se marcaron los núcleos con DAPI y su análisis (área del núcleo) se llevó a cabo en el software FIJI. La formación de F-actina se determinó de forma cualitativa a través del marcaje con faloidina acoplada al fluorocromo Alexa 488, sólo se observó la intensidad de la marca que sirvió para medir el área celular.



6.3 Evaluar la activación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en fibroblastos cultivados en HG PAA.

En el objetivo 3, se evaluó mediante inmunofluorescencia la activación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en fibroblastos de córnea cultivados en HG PAA.

Para ello, en HG PAA de diferente rigidez se cultivaron fibroblastos de córnea a 24 y 48 h. A través de inmunomarcaje con un anticuerpo primario anti-YAP (63.7) de Santa Cruz (SC-101199, monoclonal de ratón), se estudió la activación de los cofactores, ya que, este anticuerpo reconoce a ambas proteínas YAP y TAZ, posteriormente, se tomaron fotografías en un microscopio de fluorescencia (The ZOE Cell Imager) y se analizaron en con el software FIJI, como se ilustra enseguida:

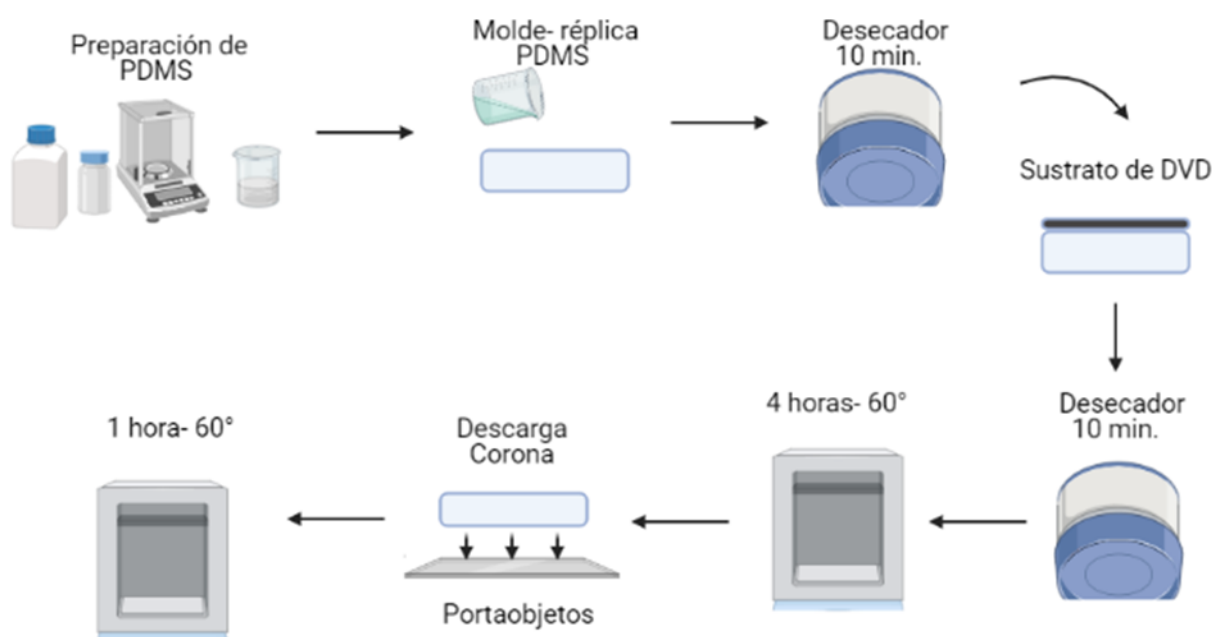


6.4 Para la fabricación del dispositivo o chip con canales microfluídicos se utilizó la siguiente metodología.

Se realizó una réplica en PDMS a través de la técnica molde-réplica en un molde de polimetilmetacrilato (PMMA) asimismo, fue necesario hacer una estructuración por spin coating (método para fabricar una película uniforme sobre un sustrato) de la membrana de Loctite 3525 sobre una membrana de IPS (Obducat Intermediate Polymer Stamp) esta membrana contiene la réplica del patrón de difracción de un DVD. La membrana de Loctite 3525 es importante en el dispositivo porque está microestructurada con una réplica de una rejilla de difracción y de esta manera

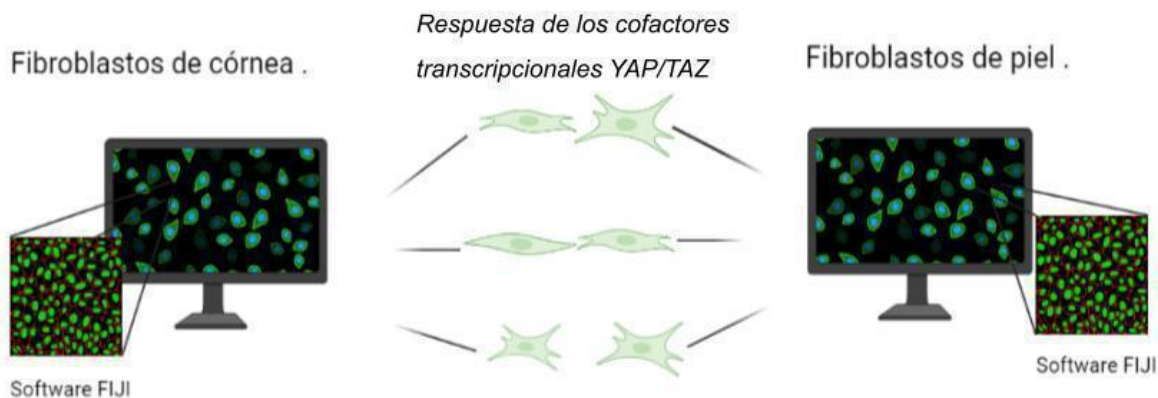
puede generar un patrón que se puede utilizar para caracterizar deformaciones al momento del inflamamiento de la membrana y ver el comportamiento del material.

Posteriormente, se adhiere la membrana de Loctite 3525 al bloque de PDMS, para ello, fue necesario irradiar el bloque de PDMS y el portaobjetos de vidrio con descarga corona (consiste en realizar una descarga eléctrica sobre las superficies a unir) con una bobina Tesla como se muestra en la siguiente imagen.



6.5 Comparar la respuesta de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ de los fibroblastos de piel y de córnea humana cultivados en HG PAA.

Para evaluar este objetivo, se utilizaron imágenes proporcionadas por el laboratorio de micro y nanotecnología, tomadas por la alumna Dalia Stephanie Aguirre Maldonado. Las imágenes son de HG de PAA de diferente rigidez (1, 5, 20 kPa) cultivados con fibroblastos de piel (células BJ) a 48 h marcados con faloidina y DAPI. Las muestras se analizaron mediante el software FIJI y posteriormente los resultados obtenidos por el análisis acerca de la respuesta de los cofactores transcripcionales de ambos fibroblastos (córnea y piel), se compararon.



7. MÉTODOS

7.1 FABRICACIÓN DE SUSTRATOS CON RIGIDEZ CONTROLADA (HIDROGELES DE POLIACRILAMIDA)

Silanización de portaobjetos. Los portaobjetos en los que se va a colocar el hidrogel de poliacrilamida, se debe preparar la superficie del portaobjetos exponiéndolos a diclorodimetilsilano (DCDMS) por 1 h, de esta manera evitamos que el hidrogel quede adherido a la superficie de vidrio.

Para ello primero se deben de limpiar correctamente, utilizando una limpieza ultrasónica. Los portaobjetos a tratar se ponen en caja de vidrio con etanol al 70% durante 5 minutos en el baño ultrasónico que mediante el efecto de cavitación quita la suciedad del cubreobjeto. El proceso se repite una vez más pero con agua desionizada durante 5 min.

Una vez limpios los portaobjetos, se trataron con diclorodimetilsilano (DCDMS). En un frasco se colocaron 40 μ L de la solución y en un tupper se acomodaron los portaobjetos a tratar cerrándose durante toda la noche, dentro de la campana de extracción. Pasadas las 24h el tupper se abrió un poco y se dejó otra noche entreabierto en la campana de extracción. Posteriormente se realizó una limpieza con agua desionizada.

Funcionalización de cubreobjetos. Se limpiaron los cubreobjetos ultrasonicamente con alcohol al 96% dos veces durante 5 minutos y una tercera vez

con agua desionizada. Este proceso nos permite limpiar y oxidar (aparición de grupos funcionales tales como -OH o -COOH) la superficie para poder modificar la superficie. En seguida, se incubaron con una solución de 3-(Metacrilato de trimetoxisilil) propilo (TMSPMA) al 2%, en solución al 1% de ácido acético en etanol absoluto (v/v). Generalmente, se utilizan 10 mL de la solución por caja petri cubierta con parafilm, donde se pueden colocar aproximadamente 10 cubreobjetos, se recomienda que la caja sea de vidrio por la presencia de ácido acético. Después, la caja con la solución se pone en agitación durante 1 hora. El tiempo de incubación puede variar dependiendo del tiempo en el que se van a mantener en cultivo las células, a mayor tiempo de agitación, mayor será el tiempo de adherencia del hidrogel al cubreobjetos.

Finalmente, se desechó la solución y se limpió cada uno de los cubreobjetos sumergiéndolos en etanol al 96% una vez y dejándolos secar en una sanita.

Preparación de hidrogeles de poliacrilamida. Para obtener los diferentes grados de rigidez, se utilizaron diferentes proporciones de cada solución (acrilamida, bisacrilamida y agua dH₂O), para medir los pascales en el laboratorio se ha confirmado al menos para 1 y 5 kPa por el método de indentación (consiste en presionar con un indentador la superficie del hidrogel para medir dureza y módulo de Young).

Por lo tanto, se realizaron geles de diferente rigidez (1,5, 20 y 40 kPa), para cada condición se realizó una solución como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Cantidades para HGPAAs.

	1 kPa	5 kPa	20 kPa	40 kPa
Agua (dH₂O)	860 µL	800 µL	668 µL	560 µL
Acrilamida 40%	125 µL	125 µL	200 µL	200 µL
Bisacrilamida 2%	15 µL	75 µL	132 µL	240 µL

Se muestran las cantidades utilizadas para preparar 1 ml de solución para los diferentes módulos elásticos (1,5,20 y 40 kPa) de los HGPAAs, las cantidades fueron adaptadas de acuerdo con Tse JR y Engler AJ 2010.

En el mililitro de solución se agregaron 10 μL de APS y 1 μL de TEMED y se mezclaron para una polimerización uniforme. Posteriormente, se agregó 110 μL de la solución en los portaobjetos silanizados y por encima se colocaron los cubreobjetos circulares acoplados al TMSPMA evitando la formación burbujas y tratando de que abarque todo el cubreobjetos. Se dejaron polimerizar aproximadamente 30 minutos. Después de la polimerización, los cubreobjetos con el hidrogel adherido se lavaron 3 veces con 1mL de PBS 1X durante 10 minutos c/u en agitación.

Pegado de proteína en la superficie del hidrogel. Después del proceso de polimerización, los hidrogeles se lavaron con solución amortiguadora de HEPES 50 mM pH 8.2 durante 10 minutos en agitación.

Posteriormente, se preparó una solución de 1 mM de sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino) hexanoate (Sulfo-SANPAH) en 75% de 50 mM de HEPES y 25% DMSO (v/v) como se muestra en la tabla 4. El Sulfo-SANPAH es un entrecruzado fotoactivable que contiene un éster reactivo a aminos y a una azida que cuando se expone a la luz UV como se describe más adelante, forma reacciones de adición que sirven en este caso para favorecer el entrecruzamiento de proteínas como la colágena tipo I.

En una caja petri recubierta con *parafilm* se colocaron 100 μL de la solución (HEPES/DMSO/Sulfo-SANPAH) colocando los cubreobjetos con el gel hacia la gota y se expusieron en luz UV 365 nm durante 15 minutos, como se mencionó anteriormente, se utiliza para activar al Sulfo-SANPAH y favorecer el entrecruzamiento de proteínas de superficie celular.

Posteriormente, se lavaron 3 veces con HEPES 50 mM de pH 8.2 durante 10 minutos cada lavado para descartar los sobrantes de sulfo-SANPAH no acoplado a los HGPAAs.

Tabla 4. Proporciones para pegar proteína a la superficie de los HGPAAs.

Sulfo-SANPAH	150 μ L
HEPES	1,125 μ L
DMSO	375 μ L

Tabla 4. Se muestran las cantidades utilizadas para preparar más 1 ml de solución para pegar proteína a la superficie de los HGPAAs con los diferentes módulos elásticos (1,5,20 y 40 kPa).

Finalmente se agregaron 100 μ L de solución de colágena tipo I de cola de rata (Corning ®, 354236) a una concentración de 50 μ g/ml en HEPES 50 mM pH=8.2 y se deja en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche (*overnight*). Previo a cultivar los fibroblastos, los HG PAA fueron esterilizados realizando 3-5 lavados con PBS 1x estéril más antibióticos al 1% (penicilina-estreptomicina 10,000 U/ml).

7.2 CULTIVO CELULAR

Los fibroblastos humanos de córnea, fueron donados del Hospital Conde de Valenciana por el Dr. Yonathan Garfías, los fibroblastos se obtienen a través del cultivo de tejido sobrante de la donación (cornetes). Las células fueron cultivadas por lo menos una semana después de su descongelación con medio DMEM alta glucosa (4500 mg/L) suplementado con glutamax 1%, suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 10% más antibióticos al 1% (penicilina-estreptomicina 10,000 U/ml), bajo condiciones estándar de CO₂ 5% a 37°C en cajas de poliestireno tratado (TCPD, por sus siglas en inglés).

Cuando la caja presentó una confluencia mayor al 90% (en todos los experimentos) se resembraron a una densidad de 5.0×10^4 células en cada hidrogel de 1, 5, 20 y 40 kPa de rigidez (cubreobjetos de 20 mm de diámetro) en placas de cultivo de 12 pozos. Las células cultivadas en los hidrogeles se mantuvieron con el mismo medio DMEM suplementado durante 24 h y 48 h.

7.3 MARCAJE POR FLUORESCENCIA / INMUNOFLUORESCENCIA

Fijación y permeabilización. Las células se procesaron a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1X filtrado por 0.22 μ m y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a 37°C a las 24h y 48h posteriores a la siembra. Una vez fijadas las células, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 1X durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente; posterior a la permeabilización, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X filtrado para quitar el exceso de tritón.

Bloqueo e inmunomarcaje. Para el bloqueo se realizó una solución de suero de caballo al 10 % en PBS 1X filtrado y se incubó por 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo primario monoclonal de ratón para la proteína YAP (anti-YAP, 63.7) de Santa Cruz (SC-101199) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo; las muestras se dejaron en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Antes de colocar el anticuerpo secundario (anti-mouse) las células se lavaron 3 veces con PBS 1X filtrado para descartar los excesos del anticuerpo primario.

En adelante las muestras se cubrieron de la luz. A temperatura ambiente, el anticuerpo secundario (anti-ratón) acoplado a Alexa-fluor 594 diluido 1:250 en PBS 1X fue incubado durante 60 minutos. Para detectar los filamentos de actina (F-actina), se lavaron las células 3 veces con PBS 1X y se marcaron con Faloidina (*phalloidin*) acoplada al fluorocromo Alexa-fluor488 a una dilución 1:50 en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se marcó el núcleo con DAPI (1mg/ mL) a una dilución 1:1000 en PBS 1X por 10 minutos a temperatura ambiente.

Montaje y captura de imágenes. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X 10 min por lavado y un lavado rápido con agua desionizada. Las muestras se montaron con 120 μ L de Mowiol por cada cubreobjetos, en un cubreobjetos rectangular porque al momento de enfocar en el microscopio, esto nos ayuda a estar dentro del rango de la distancia de trabajo del enfoque y de esta forma, se evita enfocar a través de los HG PAA.

Posteriormente, se tomaron imágenes en el microscopio ZOE Cell Imager ya que cuenta con imágenes en campo claro y tres canales de fluorescencia: el canal azul

nos permitió ver la tinción con DAPI que tiene una excitación de 360 nm y una emisión de 460 nm, igualmente, en el canal verde se observó la marca de faloidina cuya excitación y emisión es de 556/570 nm respectivamente, por último, en el último en el canal rojo se logró observar la marca de YAP, su excitación es de 590 nm y un emisión de 617 nm.

Cuantificación y estadística. Las imágenes se tomaron a una escala de 100 μm , asimismo, se tomaron mínimo 5 campos por condición. Las imágenes fueron utilizadas para la medición manual del esparcimiento (cambio en el área que tiene la célula sobre la superficie) y excentricidad de la célula (que tan circular es la célula), para la marca nuclear de DAPI se realizó una cuantificación semiautomática, todo esto mediante el software FIJI como se explica en el ANEXO. El análisis de imágenes se realizó a partir de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se elaboró mediante el *software* GraphPad Prism donde se empleó ANOVA de una vía (se utilizó para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la media de los 3 experimentos independientes) y el método de Tukey (para comparar las medias resultantes del análisis de varianza, además de diferenciar si los resultados son significativamente entre ellos y permite compararlos con el control).

Para evaluar la excentricidad, las células se consideran como una elipse; se divide el eje menor entre el mayor. De esta manera, nos permite conocer qué tan circular es la célula, así, los valores cercanos a 1 indican que la célula es circular por el contrario valores cercanos a 0 nos dice que son menos circulares, tal como se mencionó anteriormente.

7.4 DISEÑO DE FABRICACIÓN

Elaboración de chip con membrana deformable. Para la fabricación de chips con membrana deformable de PDMS se utilizaron dos diseños. El polidimetilsiloxano (PDMS) es un polímero biocompatible, transparente a la luz, no tóxico e inerte (ECETOC, 2011), también, es un material muy utilizado para la fabricación de dispositivos microfluídicos.

El primer diseño consta de un poste central con microcanales de ángulos encontrados. El poste central es importante para la fabricación de la membrana

directamente en el molde y los microcanales encontrados fueron fabricados de esta forma, por si se requiriera colocar otro chip encima se evitaría la obstrucción de los inlets. Para el otro diseño se utilizaron canales rectos con un poste central, el procedimiento fue el mismo. Las diferencias entre los canales o el diseño se debe al tipo de respuestas que se requiere del dispositivo o la geometría del mismo, por ejemplo, esfuerzos de estiramiento, curvatura, o bien, si se necesita presión positiva o negativa.

Para la fabricación de ambos diseños se requirieron 3.3 gramos de PDMS (Kit de PDMS Sylgard 184) una vez preparado, se vierte en el molde de acrílico micromaquinado (técnica de fabricación para formar estructuras en 3D) en el laboratorio por Yasab Ruiz, quien a través de la técnica de microfresado (micromilling) fabricó el molde de polimetilmetacrilato (PMMA) mediante un control numérico por computadora donde, al ajustar las posiciones de los ejes puede producir un diseño asistido y funcional. Después, se coloca en el desecador hasta que no se observen burbujas para evitar la entrada de aire. Posteriormente la cara que se quiere replicar se coloca hacia abajo y se vuelve a colocar en el desecador por aproximadamente 10 minutos, para evitar que en esa parte también no quede aire ya que tienden a formarse burbujas y dificultan la observación en el microscopio.

Finalmente para que el PDMS polimerice, se mete al horno a 60° durante 4 horas, esa réplica se pega a un portaobjetos utilizando descarga corona, que consiste en irradiar con Plasma Etcher a potencia media (Potencia=200 W, Presión=200 mTorr), o bien, también se puede utilizar una bobina tesla por 10 segundos esto se hace para cerrar herméticamente la cámara de presión. Es importante considerar que una vez pasada la descarga en el portaobjetos, y una vez colocado el chip este ya no se puede mover; únicamente se debe de hacer un poco de presión para asegurar que pegue de manera correcta y se mete al horno a 60° por una hora adicional.

Este dispositivo además de fabricarse, se le realizaron pruebas de viabilidad, para ver la deformación de la membrana mediante el uso de bombas microfluídicas y la simulación de la circulación de medio (agua con colorante) como se muestra más adelante en la Fig. 15.

8. RESULTADOS

8.1. Los fibroblastos de córnea responden a la rigidez mediante el esparcimiento (cambios en el área) y su excentricidad.

Se ha demostrado el impacto de la de la rigidez tanto en la unión a la MEC y como consecuencia en la viabilidad en diferentes células; por ejemplo en córnea, en las células epiteliales, se ha visto que responden a los sustratos de rigidez variable.

Conforme a lo esperado por la literatura previa, los fibroblastos de córnea cultivados a 24 horas en sustratos suaves (1 kPa y 5 kPa) mostraron células alargadas y más pequeñas, en comparación a los cultivados en sustratos rígidos (20 kPa y 40 kPa) las cuales tienen un comportamiento similar al control (1 GPa). Esto se refleja en el área celular determinada como se menciona en métodos, donde los promedios de los sustratos suaves (1 kPa y 5 kPa) están alrededor de los 400 μm^2 , por otra parte, los sustratos rígidos no mostraron una diferencia significativa con el control, sus promedios son de aproximadamente 600-700 μm^2 (Fig. 8B). No obstante, es importante recalcar que entre sustratos rígidos no se presentaron diferencias morfológicas y de esparcimiento, esto puede deberse a lo que se mencionó anteriormente acerca de la condición fibrótica donde se ha reportado que es alrededor de los 70 kPa (Fig. 7 y Fig. 8 B y E).

Por otro lado, para evaluar si existe un aumento en el cambio (esparcimiento) del área celular con el tiempo, se decidió analizar la respuesta de los fibroblastos de córnea en cultivo a 48 horas, donde se observó que las células en todas las condiciones parecen no presentar cambios en morfología a diferencia de los cultivos a 24 horas (Fig.7). Sin embargo, respecto al cambio del área (esparcimiento celular), los cultivos en sustratos suaves (1 kPa y 5 kPa) mostraron una diferencia significativa respecto al control (1 GPa) al igual que el sustrato de 20 kPa. Por el contrario, el sustrato tomado aquí como fibrótico (40 kPa) no reflejó una diferencia significativa (Fig.8 E).

Asimismo, el esparcimiento (cambio del área celular) fue ligeramente mayor a 48 h debido al promedio del área celular en sustratos suaves; 1 kPa (500 μm^2) y 5 kPa

(600 μm^2) mientras que en sustratos rígidos el promedio para 20 kPa fue de 700 μm^2 , mientras que en 40 kPa fue de 800 μm^2 (Fig.8F).

Adicionalmente, se observó que los fibroblastos de córnea cultivados sobre HG PAA con un módulo elástico de 1 kPa , 5 kPa, 20 kPa y 40 kPa parecían mantener su forma celular estrellada a lo largo del tiempo, además de mostrar un aumento en su área celular, conservando una forma poco elíptica (excentricidad). Para comprobarlo, se evaluó la característica de excentricidad celular que indica que tan circulares son las células. De esta manera, el análisis indicó que sustratos rígidos y suaves tanto a 24h como a 48h tuvieron un promedio entre 0.3 y 0.4 de acuerdo a lo mencionado anteriormente, siendo estos resultados >1 , indica que las células no son circulares, por lo tanto, mantienen a lo largo del tiempo su forma estrellada independientemente de la rigidez del sustrato (Fig. 8D y 8G).

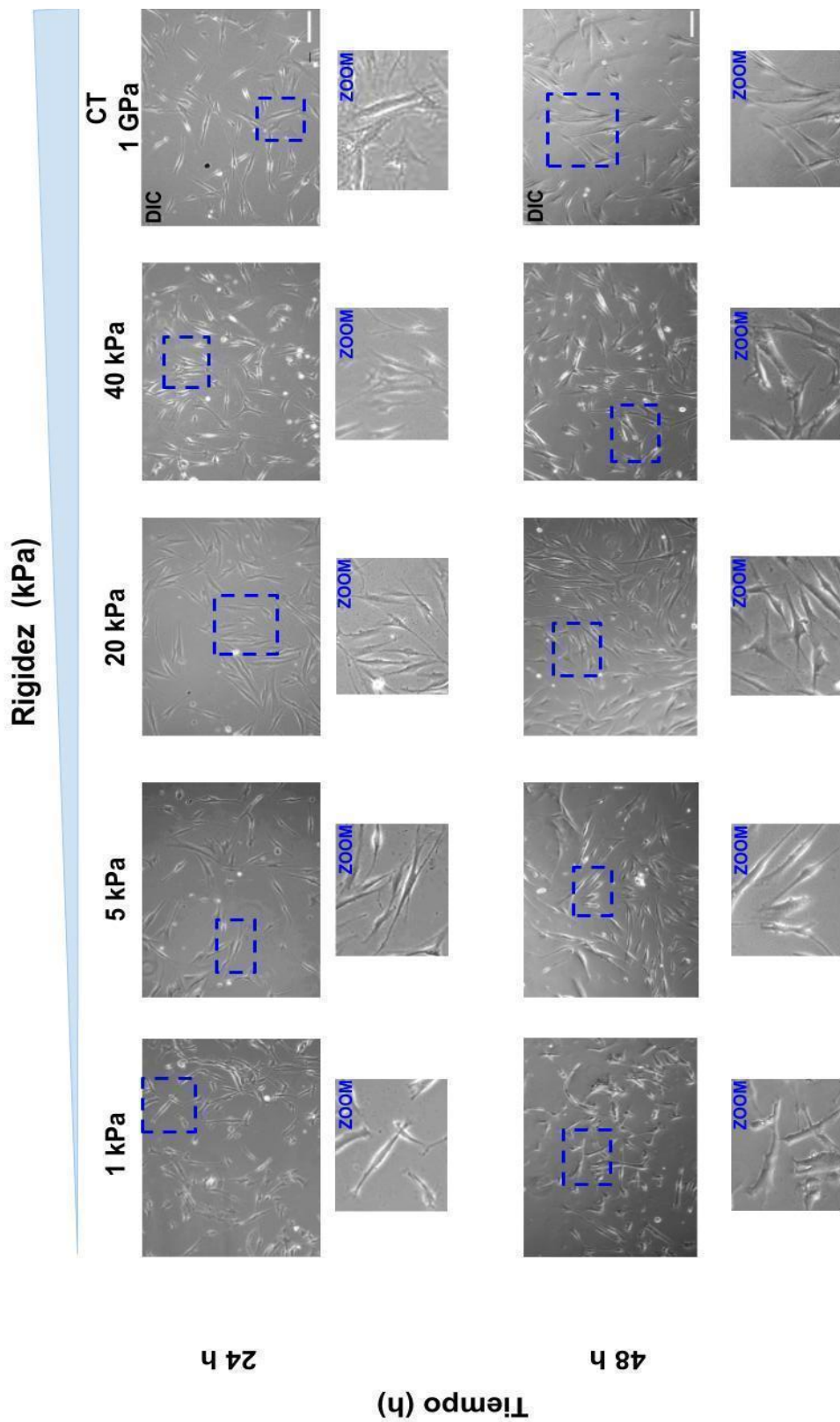


Figura. 7. Los fibroblastos de córnea responden a la rigidez mediante el esparsamiento del área y su excentricidad. Imágenes representativas de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAAs conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 1 y 5 (sustratos suaves), 20 (condición fisiológica) y 40 kPa (condición fibrótica) posterior a 24 y 48 h de cultivo, utilizando como control (CT) condiciones de cultivo con un cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 1 GPa, tomadas por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), el cuadro punteado muestra el área de magnificación de la imagen representativa de la morfología de los fibroblastos humanos de córnea. Barra de escala 100µm en todas las condiciones y en ambos tiempos de cultivo.

8.1.2 Los fibroblastos de córnea forman fibras de estrés dependiente de la rigidez del cultivo.

Los resultados mostrados anteriormente reflejan que los fibroblastos de córnea humana responden a cambios en la rigidez de los HG PAA con colágena tipo I, mediante el aumento en su área celular y su excentricidad ≤ 0.5 . Para comprobar si en fibroblastos de córnea humana hay una relación entre los cambios en su morfología y la reorganización del citoesqueleto de actina, se estudió la formación de filamentos de actina (F-actina), a través del uso de faloidina (es un péptido bicíclico que marca selectivamente a F-actina) acoplada a Alexa 488 (es la que proporciona la fluorescencia) en fibroblastos de córnea humana cultivados en sustratos de rigidez variable (1, 5, 20 y 40 kPa) durante 24 y 48 horas de cultivo.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia, mostraron que los fibroblastos cultivados en sustratos suaves (1 y 5 kPa), presentan cualitativamente poco marcaje con faloidina (fibras de estrés que se muestran difusas) (Fig.8A). Sin embargo, en sustratos rígidos, se puede observar la formación de fibras de estrés y se mantienen a lo largo del tiempo (48 h). Asimismo, las células adquieren morfología de fibroblastos debido a la formación de esfuerzos intracelulares (tracción celular y los cambios mediados por la tensión en la composición y morfología de las adherencias focales) (Obiannama, O, et. al, 2019), es decir, se presentan como células con forma estrellada y prolongaciones. Por el contrario, en sustratos suaves a 48 horas, las células se muestran delgadas y alargadas (Fig.8A). Respecto a ello, se ha demostrado que en sustratos blandos se da una morfología dendrítica alargada y una disminución en el área (Lakshman, N y Petroll, M. 2012).

Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente por Maruri et.al. 2020, donde los queratocitos que se cultivaron por 5 días en geles de 1 kPa formaron menos fibras de estrés y, por el contrario, los queratocitos cultivados en geles rígidos de 10 kPa o cubreobjetos de vidrio presentaban una morfología diferente, formaban abundantes fibras de estrés y un marcaje mayor de actina de músculo liso alfa (*alfa-SMA*).

Por otra parte, la formación de fibras de estrés se ha visto relacionada con la contractilidad, el esparcimiento celular y cambios en la deformación o aumento del área nuclear en respuesta a estímulos mecánicos externos que tienen las células, debido a que las fibras de estrés al transmitir la señal mecánica al núcleo algunos complejos proteicos se unen al citoesqueleto en la envoltura nuclear y de esta manera, tienen la capacidad de deformarlo (Sosa B.A et al., 2012).

Por esta razón, se decidió evaluar el área nuclear a las 24 y 48 h. De acuerdo con los resultados esperados, existe un aumento significativo en el área nuclear de los fibroblastos de córnea humana en sustratos suaves 1 kPa ($100 \mu\text{m}^2$) y 5 kPa ($200 \mu\text{m}^2$), en condición fisiológica; 20 kPa ($300 \mu\text{m}^2$) y fibrosis 40 kPa (su promedio es de poco más de $300 \mu\text{m}^2$) a 24 h (Fig.8C) y 48 h cuyos promedios son similares, incluso entre condiciones hubo una diferencia significativa a excepción de 20 kPa vs. 40 kPa a 48 h (Fig.8F). En este sentido, es importante destacar que los resultados sugieren que los cambios en la rigidez de la matriz extracelular modulan la morfología y la organización del citoesqueleto.

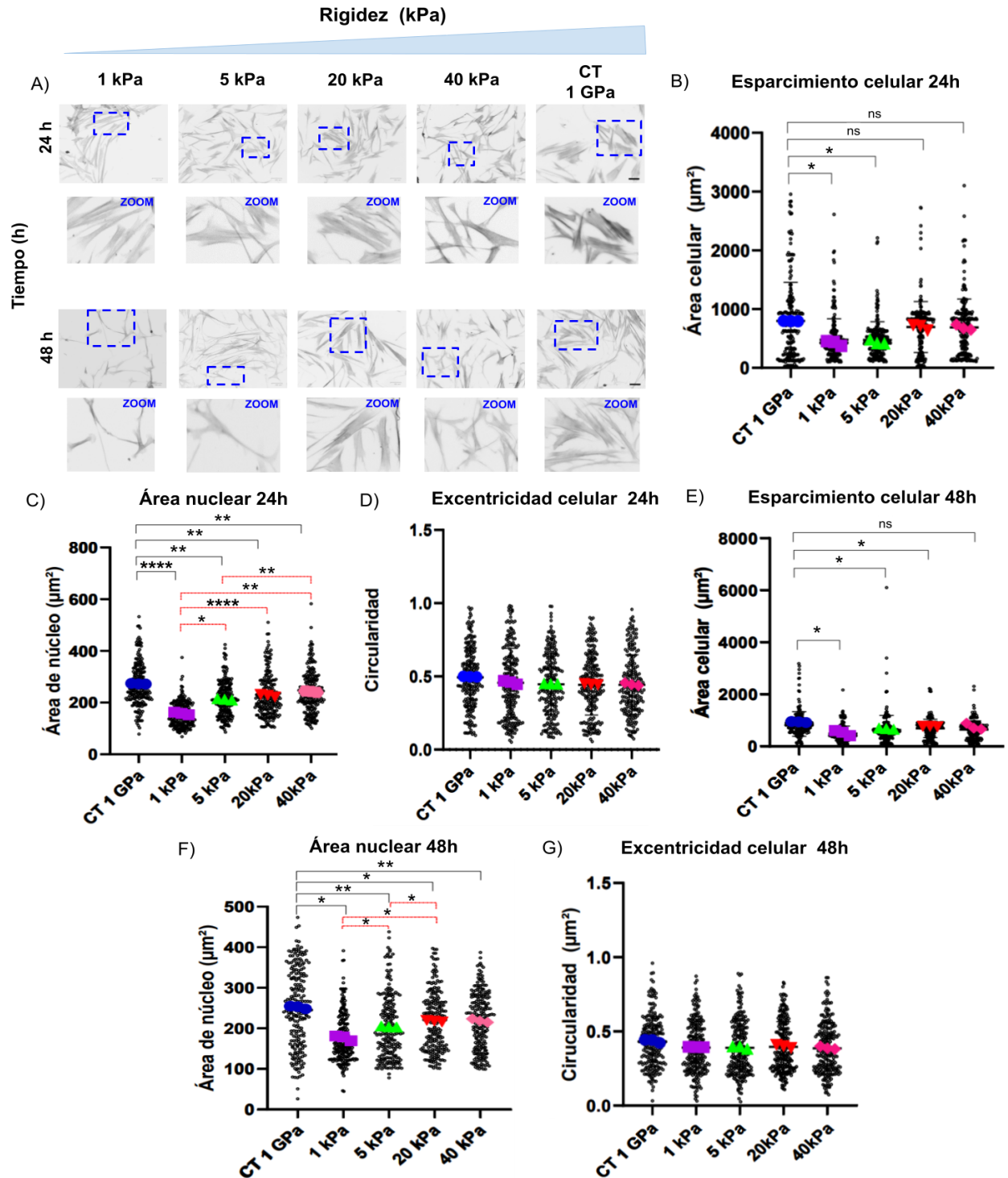


Figura 8. Formación de fibras de estrés de fibroblastos de córnea en condiciones de cultivo de rigidez variable. A) Imágenes y zoom de imágenes representativas de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAa con colágeno tipo I a diferente rigidez (módulo elástico) de 1, 5, 20 y 40 kPa tomando como control (CT) el cultivo en cubreobjetos de vidrio (1GPa) posterior a 24 y 48 h de cultivo, tomadas por microscopía de fluorescencia: formando fibras de estrés en sustratos rígidos. Barra de escala 100 μm .

B) Análisis estadístico de mediciones de área celular en cultivo de 24h, mostrando media y datos representativos de 3 experimentos individuales $n=900$, * p 0,0137 (1 kPa), * p 0.0103 (5 kPa), 20 y 40 kPa no muestran diferencia significativa (ns).

C) Análisis estadístico de mediciones de área nuclear en cultivo de 24h, mostrando media y datos representativos de 3 experimentos individuales $n = 900$, respecto al control **** $p < 0.0001$, ** $p 0.0038$, ** $p 0.0072$, ** $p 0.0070$. Entre condiciones; 1 kPa vs. 5 kPa * $p 0.0177$, 1 kPa vs. 20kPa **** $p < 0.0001$, 1 kPa vs. 40kPa ** $p 0.0028$, 5 kPa vs. 40kPa ** $p 0.0071$, 5 kPa vs. 20 kPa y 20 kPa vs. 40 kPa no presentan diferencia significativa (ns).

D) Análisis de excentricidad celular de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAa conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 1, 5, 20 y 40 kPa posterior a 24 h de cultivo donde se muestran los datos comparativos entre rigidez.

E) Análisis estadístico de mediciones de área celular en cultivo de 48h, mostrando media y datos representativos de 3 experimentos individuales $n=900$, * $p 0.0331$ (1 kPa), * $p 0.0287$ (5 kPa), * $p 0.0220$ (20 kPa), 40 kPa no presenta diferencia significativa (ns) .

F) Análisis estadístico de mediciones de área nuclear en cultivo de 48h, mostrando media y datos representativos de 3 experimentos individuales $n=900$, respecto al control * $p 0.0129$, ** $p 0.0039$, * $p 0.0231$, ** $p 0.0098$. Entre condiciones; 1 kPa vs. 5 kPa * $p 0.0401$, 1 kPa vs. 20kPa * $p 0.0107$, 5 kPa vs. 40kPa * $p 0.0252$, 1 kPa vs. 40kPa, 5 kPa vs. 20kPa, y 20kPa vs. 40kPa no presentan diferencia significativa (ns).

G) Análisis de excentricidad celular de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAa conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 1, 5, 20 y 40 kPa posterior a 48h de cultivo donde se muestran los datos comparativos entre rigidez.

8.3.1 La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ es diferente en los fibroblastos de córnea cultivados en rigidez variable.

Los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ son importantes para las células ya que moderan diferentes procesos biológicos clave. Por ejemplo, la activación transcripcional de YAP/TAZ, regula positivamente a varios genes que son relevantes en procesos en córnea que afectan su correcto funcionamiento como la cicatrización de heridas corneales, incluyendo a los factores de crecimiento e integrinas en específico $\alpha3\beta1$ (Muppala, S. et. al. 2019; McKay, T. et. al. 2020).

Por lo tanto, una vez que se comprobó que los fibroblastos de córnea humana tienen la capacidad de responder a cambios en los sustratos, es decir, a diferente rigidez se estudió la localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ, obteniendo como resultado después de 24 horas de cultivo no se mostró una translocación a núcleo en geles suaves (1 y 5 kPa) mientras que en los fibroblastos cultivados en geles rígidos (20 y 40 kPa) se observó una clara translocación. Sin embargo, es importante mencionar que en 5 kPa se muestra una translocación en algunas células aunque más atenuada en comparación con los geles de mayor rigidez (Fig. 9).

Contrario a ello, a las 48 h se refleja una translocación nuclear de YAP/TAZ independiente de la rigidez del sustrato pero es importante destacar que en 1 kPa se muestra una translocación atenuada (Fig.9).

Esto se confirma con los *perfiles de señal* mostrados en la Fig.10, en donde se puede observar que los fibroblastos de córnea humana cultivados en HG PAA con rigidez de 1 kPa y 5 kPa (sustratos suaves) entrecruzados con COLA 1 a 24 horas de cultivo, la densitometría de DAPI (línea azul) coincide parcialmente con la señal específica de YAP (línea roja). Por el contrario, los fibroblastos cultivados en sustratos rígidos de 20 kPa y 40 kPa condición fisiológica y fibrótica respectivamente, donde al igual que en el control (CT) coinciden con la señal de YAP/TAZ con DAPI, esto representa mayor densidad.

Lo que nos refiere a la localización nuclear de estos cofactores transcripcionales en sustratos de 20 kPa (condición fisiológica) y 40 kPa (condición fibrótica) y mayormente citoplasmática en sustratos suaves 1 kPa y 5 kPa (Fig.10). Por otra parte, en el cultivo a 48 horas, las señales específicas tienen una mayor coincidencia, es decir, la marca de DAPI coincide particularmente con la señal de YAP tanto en sustratos suaves como rígidos (Fig.11).

Por lo que podemos concluir que a tiempos prolongados independientemente de la rigidez del sustrato, los cofactores transcripcionales YAP/TAZ se encuentran nucleares. Esto puede deberse a que, el aumento de la rigidez de la MEC, en fibroblastos activa a YAP/TAZ que fomenta el desarrollo de mediadores profibróticos y el depósito de MEC (Xiaomin, C. et al. 2021).

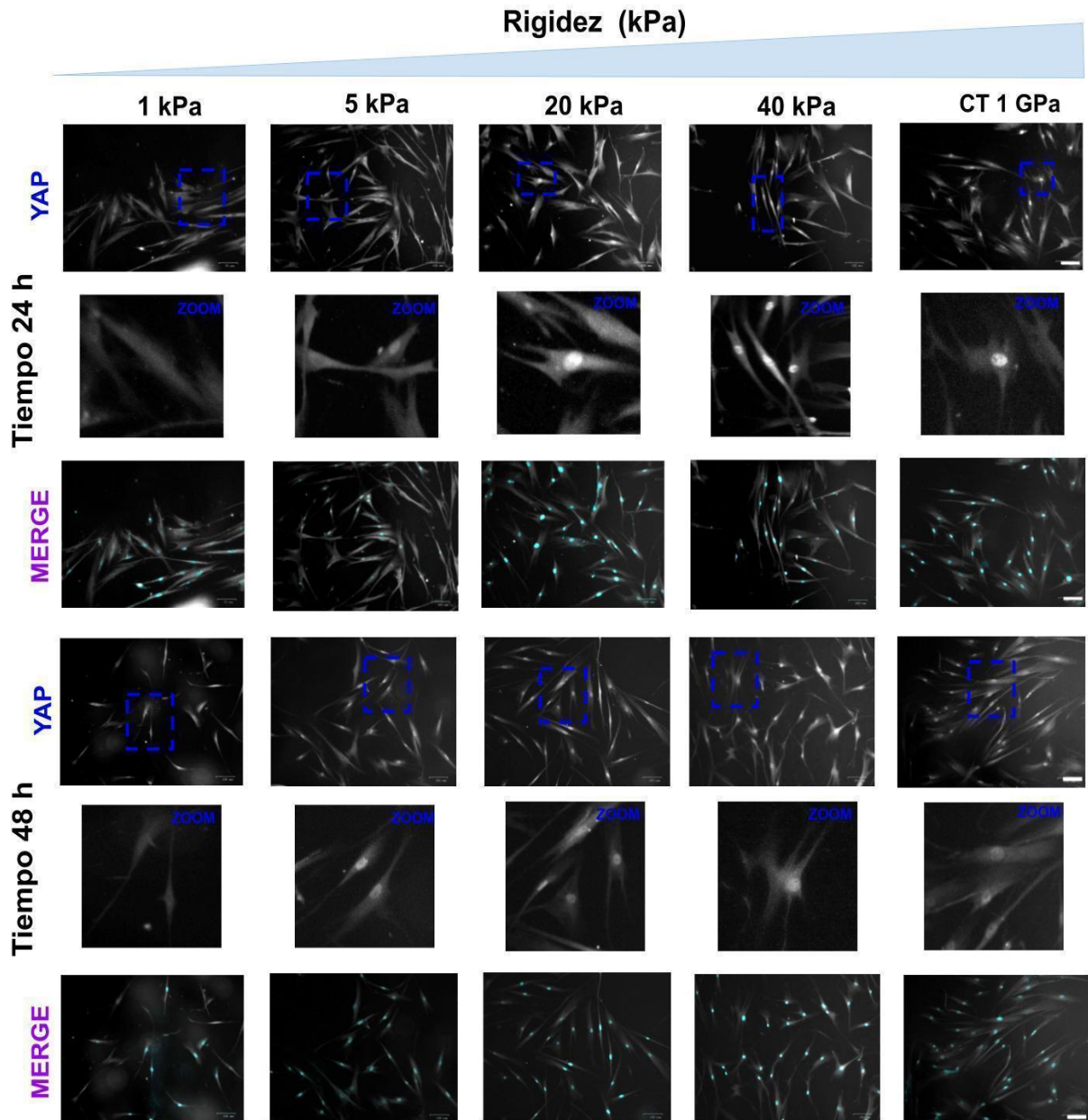


Figura 9. La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ es diferente en fibroblastos de córnea cultivados en sustratos de rigidez variable. Imágenes representativas y merge (YAP y DAPI) de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAAs conjugados con colágeno comercial tipo I, con un módulo elástico de 1 kPa, 5 kPa (sustratos suaves), 20 kPa (condición fisiológica) y 40 kPa (condición fibrótica) posterior a 24 y 48 h de cultivo, utilizando como control (CT) el cultivo sobre un cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 1 GPa recubiertos con colágeno tipo I marcadas con anti-YAP, DAPI, tomadas por microscopía de fluorescencia, la línea punteada azul representa la magnificación de las imágenes donde se muestran los núcleos representativos en el cual se observa la presencia o ausencia de la marca fluorescente. Barra de escala 100µm.

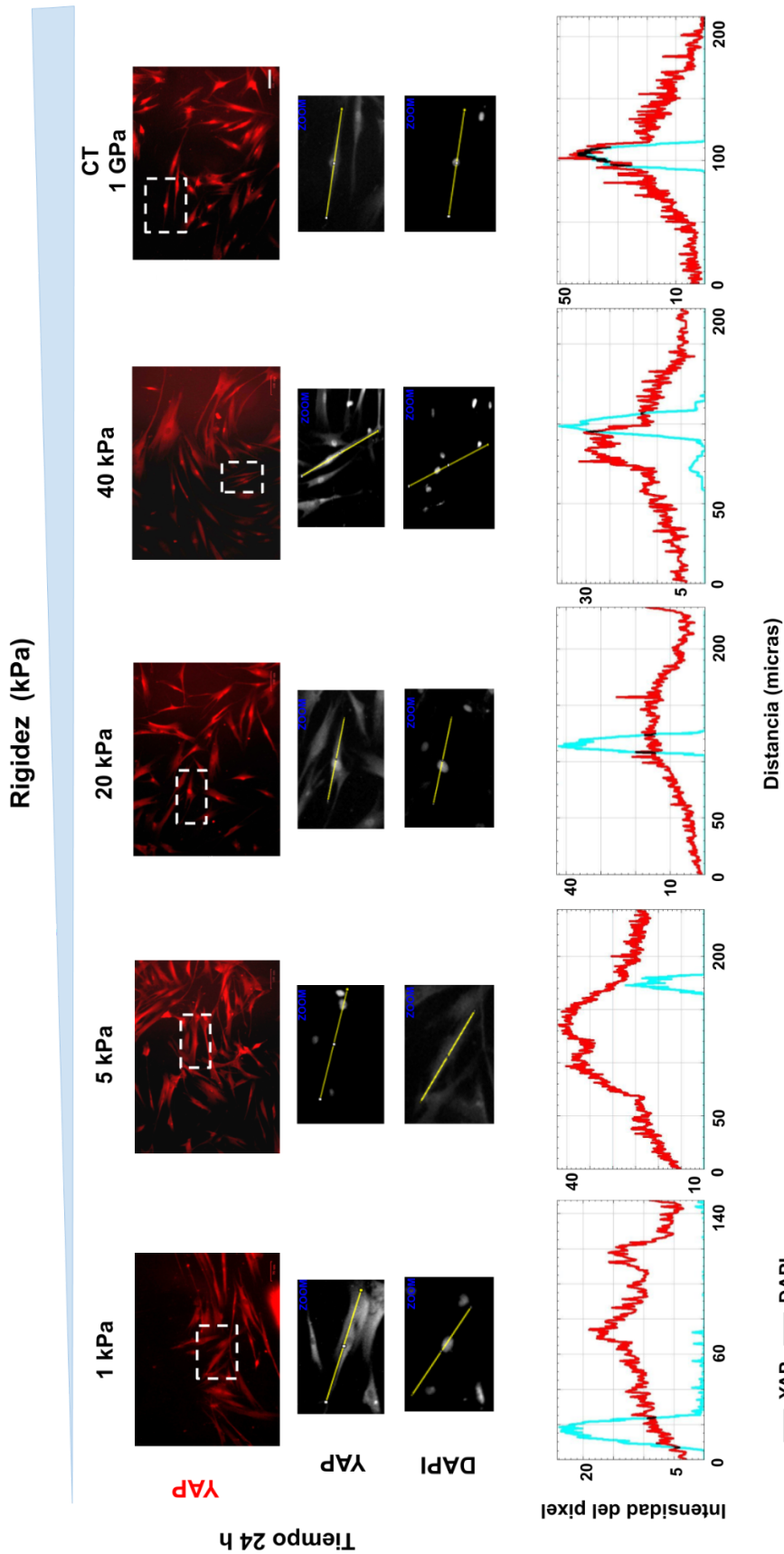


Figura 10. La localización subcelular de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ distribuida en núcleo y citoplasma es dependiente de la rigidez y del tiempo de cultivo en fibroblastos de córnea. Imágenes representativas de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAAs con colágeno tipo I, con un módulo elástico de 1 kPa y 5 kPa (condiciones suaves), 20 kPa (condición fisiológica) y 40 kPa (condición fibrótica) posterior a 24h de cultivo, utilizando como control (CT) cultivo en un cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 1 GPa (condición fibrótica) recubiertos con colágeno tipo I marcadas con anti-YAP, DAPI, tomadas por microscopía de fluorescencia e imagen comparativa (Plots) de núcleo y célula. La línea azul pertenece al núcleo donde el pico más alto representa la ubicación del mismo. Por el contrario, la línea roja, representa la marca de Yap (célula) donde el pico más alto representa una mayor señal. La línea blanca muestra el área seleccionada. Barra de escala 100µm.

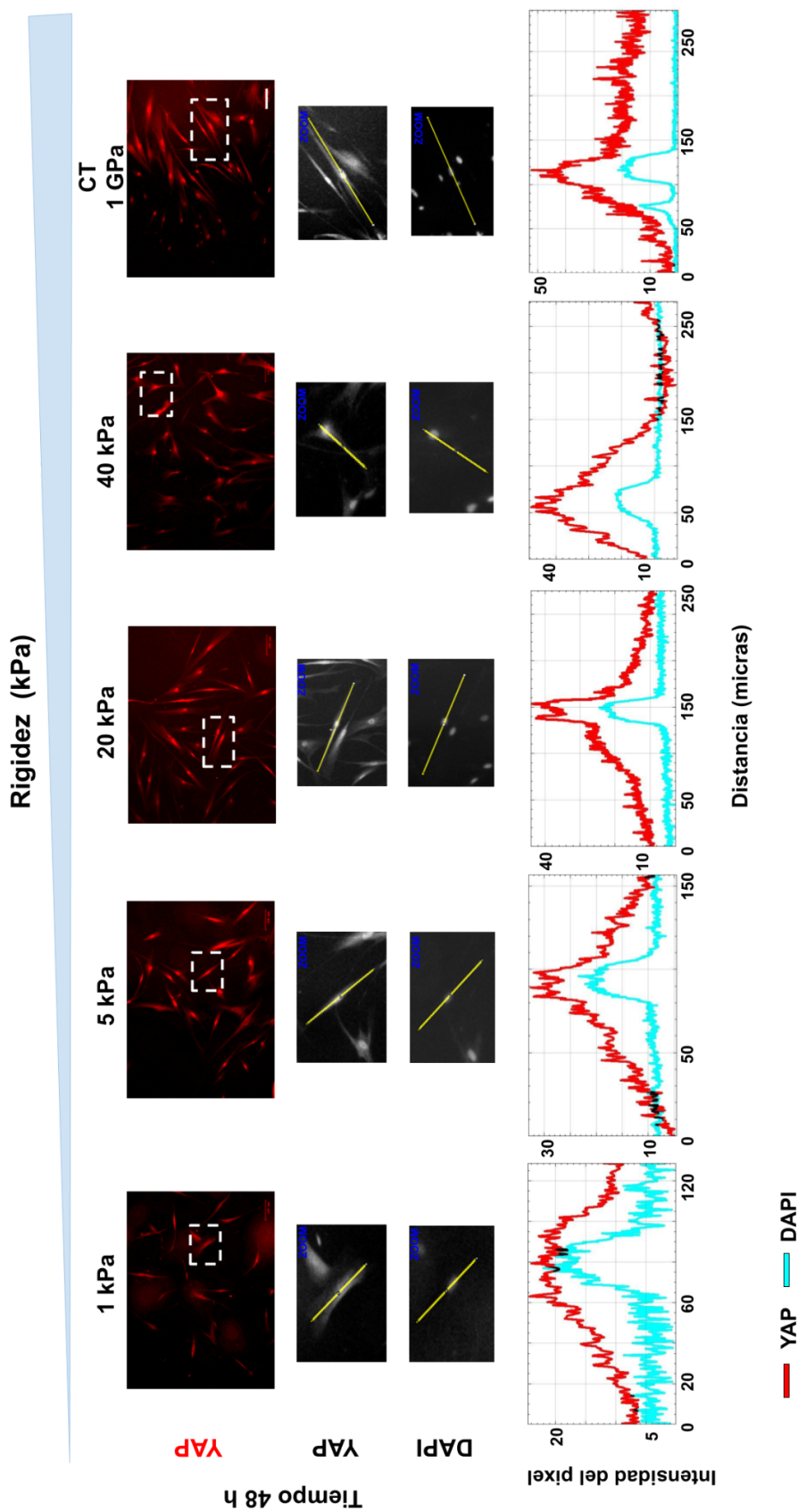


Fig. 11. La localización subcelular de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ distribuida en núcleo y citoplasma es dependiente de la rigidez y del tiempo de cultivo en fibroblastos de córnea. Imágenes representativas de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAAs con colágeno tipo I, con un módulo elástico de 1 kPa y 5 kPa (condiciones suaves), 20 kPa (condición fisiológica) y 40 kPa (condición fibrótica) posterior a 48 h de cultivo, utilizando como control (CT) cultivo en un cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 1 GPa recubiertos con colágeno tipo I marcadas con anti-YAP, DAPI, tomadas por microscopía de fluorescencia e imagen comparativa (Plots) de núcleo y célula. La línea azul pertenece al núcleo donde el pico más alto representa la ubicación del mismo. Por el contrario, la línea roja, representa la marca de Yap (célula) donde el pico más alto representa una mayor señal. La línea blanca muestra el área seleccionada. Barra de escala 100µm.

8.4.1 Los fibroblastos de piel humanos BJ forman fibras de estrés dependiente de la rigidez del cultivo.

Los fibroblastos de piel son el principal tipo de células que están presentes en la dermis, que pueden producir fibras de colágena, el cual es un componente relevante de la matriz extracelular ECM, del tejido conectivo dérmico (Dulińska, M. et. al. 2014).

Por ello, además de los fibroblastos de córnea se decidió explorar el comportamiento de fibroblastos de otro órgano, como los fibroblastos inmortalizados humanos de piel, conocidos como BJ, donde en el cultivo en sustratos suaves (1 kPa) no se muestra la formación de fibras de estrés a diferencia del cultivo en 5 kPa y 20 kPa en comparación del control (aprox. 1 GPa) que fue la caja de poliestireno (Fig. 12A). Estos resultados coinciden con los fibroblastos de córnea y con los reportados en células 3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón), donde se ha visto que en células cultivadas en hidrogeles de 1 y 5 kPa, la estructura de actina no se encuentra organizada en fibras de estrés, más bien, presentan una organización cortical difusa y distribuida de forma uniforme a diferencia de 10 kPa donde, los fibroblastos muestran una actina agrupada como fibras de estrés y en sustratos más rígidos como el vidrio, el citoesqueleto se organiza con fibras de tensión más desarrolladas y grandes (Solon, J. et.al., 2007).

Asimismo, como se mencionó anteriormente, la asociación de la formación de fibras de estrés con el esparcimiento celular también se refleja en fibroblastos de piel humana BJ ya que existe un aumento significativo respecto al control en el área de 1 kPa e incluso esta diferencia se puede ver entre 1 kPa vs 20 kPa. Sin embargo, la gráfica muestra una tendencia de aumento de área en relación con el incremento de rigidez (Fig. 12B) . De igual manera, de acuerdo a los resultados esperados, el área nuclear aumenta con la rigidez del sustrato (Fig. 12C), esto se refleja en el aumento significativo del área nuclear de los fibroblastos BJ en 1 kPa respecto al control y en 1 kPa vs 5 kPa.

En células como los hepatocitos se ha visto que el aumento en el área de núcleo adquiere características morfológicas diferentes que pasan de forma circular a estrellada, en el caso de los fibroblastos su forma es fusiforme o estrellada con múltiples prolongaciones, por lo que al igual que en los fibroblastos de córnea se decidió explorar la característica de excentricidad celular. El análisis mostró que los fibroblastos de piel BJ cultivados sobre sustratos suaves (1 kPa) a las 48h mantuvieron valores cercanos a 1, a diferencia de los sustratos de 5 kPa y 20 kPa cuyo promedio es $\leq .05$ (Fig. 12D).

Los resultados mostrados con los fibroblastos de piel humana (BJ) así como los hallazgos de los fibroblastos de córnea humana mostraron que independientemente del órgano, los fibroblastos responden a los cambios en la rigidez de su sustrato, de igual forma, la formación de fibras de estrés se ve asociada con el esparcimiento celular y la contractilidad como una posible respuesta a estímulos mecánicos a los que se exponen las células.

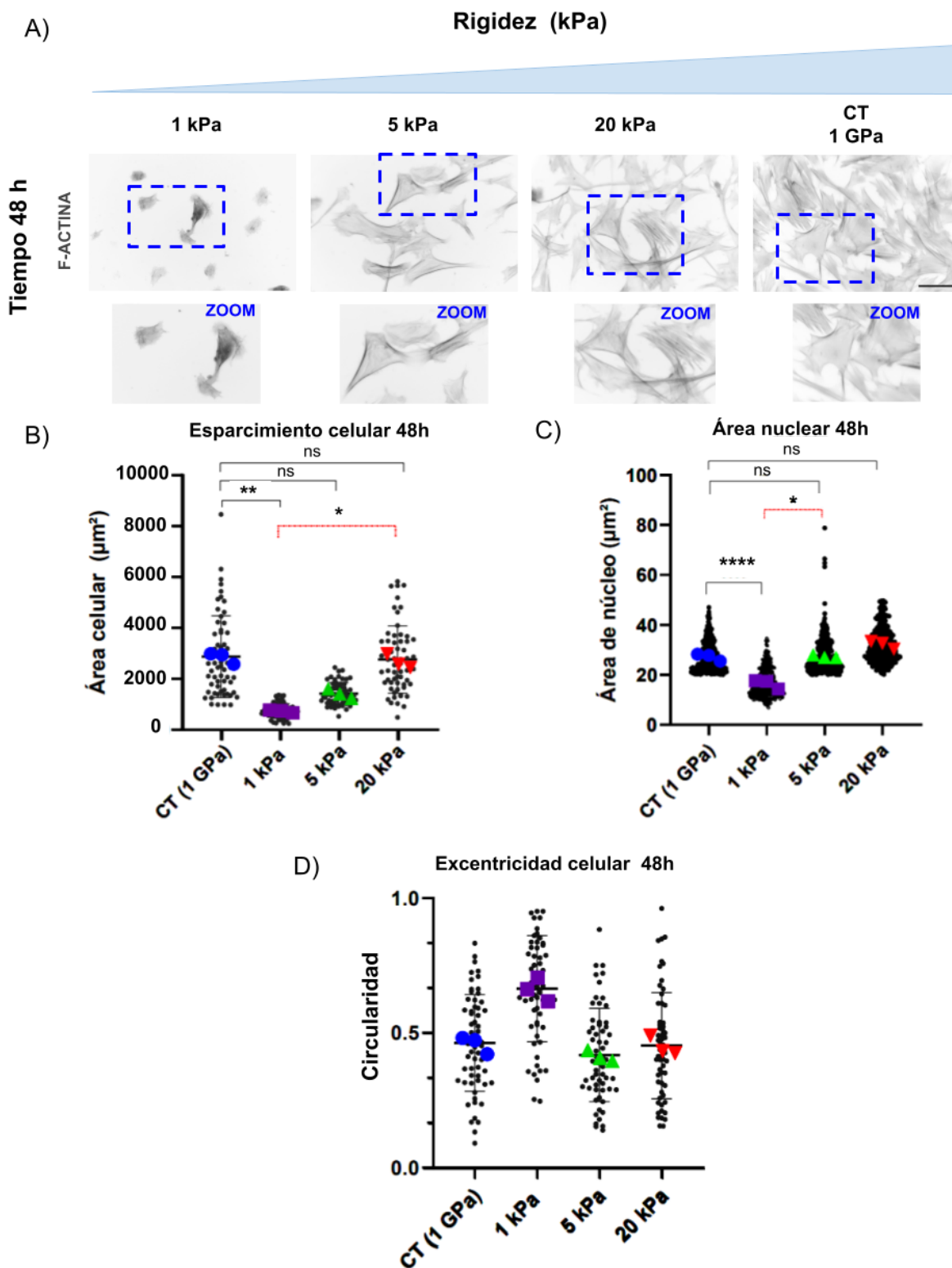


Fig. 12. Formación de fibras de estrés de fibroblastos BJ en condiciones de cultivo de rigidez variable.
 A) Imágenes y zoom de imágenes representativas de fibroblastos de córnea cultivados sobre HGPAa con colágena tipo I a diferente rigidez (módulo elástico) de 1, 5 y 20 kPa tomando como control (CT) el cultivo en cubreobjetos de vidrio (1GPa) posterior a 48 h de cultivo, tomadas por microscopía de fluorescencia: formando fibras de estrés en sustratos rígidos. Barra de escala 100 μm .

B) Análisis estadístico de mediciones de área celular en cultivo de 48h, mostrando media y datos representativos de 3 experimentos individuales $n=237$, ** $p < 0.0059$ (1 kPa), 5 y 20 kPa no muestran diferencia

significativa (ns). Entre condiciones; 1 kPa vs. 20kPa *p 0.0176, 1 kPa vs. 5 kPa y 5 kPa vs. 20 kPa no presentan diferencias significativas (ns).

C) Análisis estadístico de mediciones de área nuclear en cultivo de 24h, mostrando media y datos representativos de 3 experimentos individuales $n=236$, respecto al control **** $p<0.0001$, 5 kPa y 20 kPa no mostraron diferencias significativas (ns). Entre condiciones; 1 kPa vs. 5 kPa *p 0.0166, 1 kPa vs. 20kPa *p 0.0332, y 5 kPa vs. 20 kPa no presentó diferencia significativa (ns).

D) Análisis de excentricidad celular de fibroblastos de piel (BJ) cultivados sobre HGPAa conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 1, 5, 20 y 40 kPa posterior a 24 h de cultivo donde se muestran los datos comparativos entre rigidez.

8.4.2 La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ es diferente en células BJ cultivadas en sustratos de rigidez variable.

Dados los hallazgos con fibroblastos de córnea humana, donde se observó que después de 24 horas de cultivo no se mostró una translocación a núcleo en geles suaves (1 y 5 kPa) a diferencia de los fibroblastos cultivados en geles rígidos (20 y 40 kPa), es importante mencionar que en 5 kPa se muestra una translocación, aunque más atenuada en algunas células, en comparación con los geles de mayor rigidez. Sin embargo, a las 48 h la translocación nuclear es independiente de la rigidez del sustrato, solo en 1 kPa esta translocación se ve atenuada.

De acuerdo con lo señalado anteriormente sobre los cambios en la mecánica de la dermis donde las alteraciones mecánicas (pueden ser los cambios en la rigidez del sustrato) donde de la matriz extracelular dérmica (MEC) influyen tanto en la actividad, como en el fenotipo y la translocación nuclear (Achterberg, V. et. al., 2014) se decidió explorar la translocación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en células BJ.

Para las células BJ se observó que el cultivo a 48 h mostró a 1 kPa una localización subcelular mayoritariamente citoplasmática de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ a diferencia de los geles que tienen una rigidez de 5, 20 kPa y CT, donde la expresión de estos cofactores se ve en núcleo (Fig.13).

Asimismo, al realizar los *perfiles de señal* de una célula (Fig.14), se observa, en el *perfil* de 1 kPa la señal del marcaje con DAPI coincide pero no abarca toda la marca de YAP/TAZ a diferencia de los geles de 5, 20 kPa y CT donde la densidad de ambas marcas (DAPI, YAP/TAZ) coincide demostrando que hay una mayor expresión en núcleo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en fibroblastos de córnea a 48 h (Fig. 9 y 11), lo que sugiere un comportamiento similar en los fibroblastos dependiente del tiempo y de la rigidez.

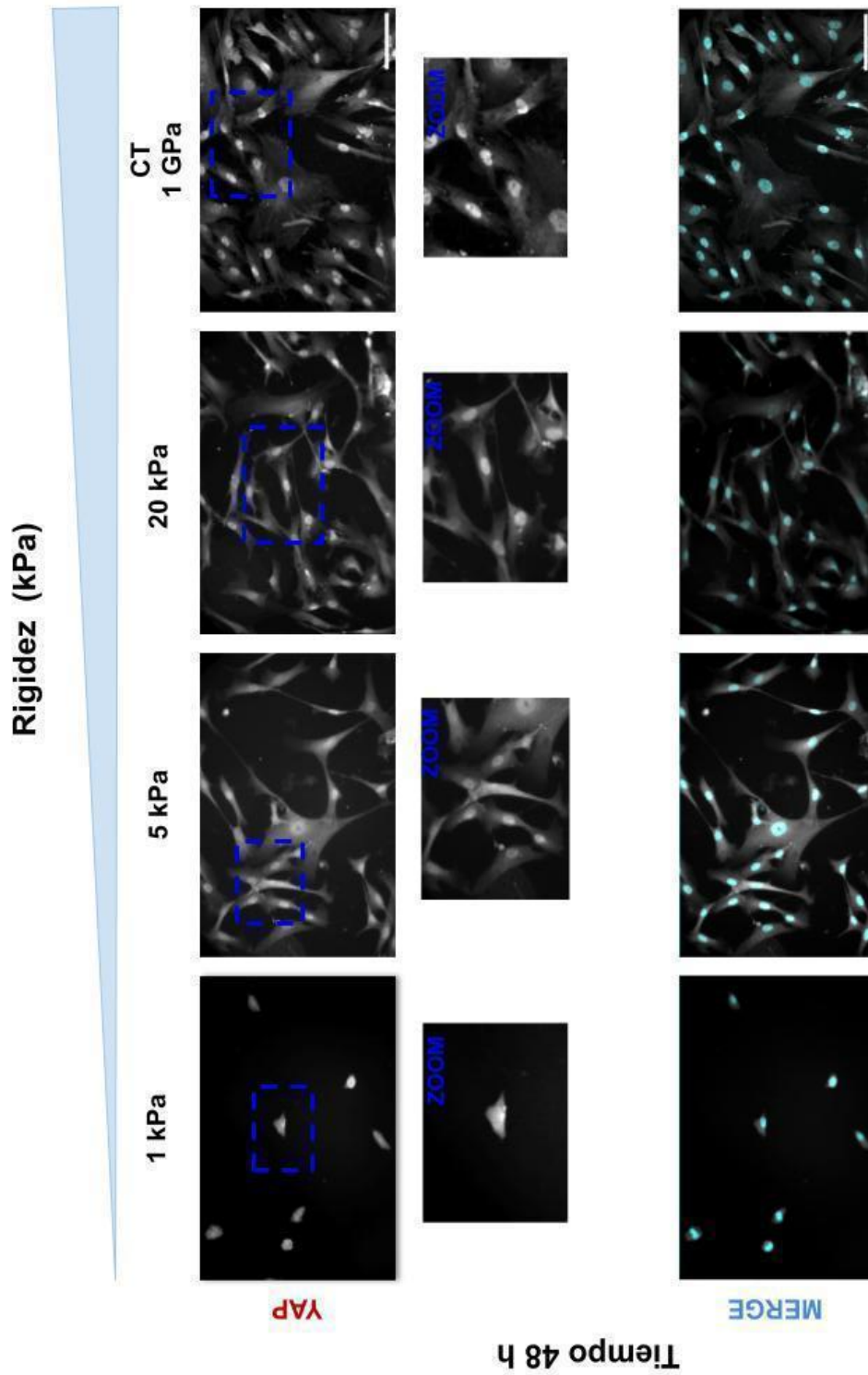


Figura. 13. La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ es diferente en células BJ cultivadas en sustratos de rigidez variable. Imágenes representativas de fibroblastos (BJ) cultivados sobre HGPAAs conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 1, 5 y 20 kPa posterior a 48 h de cultivo, utilizando como control (CT) condiciones de cultivo con un cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 1 GPa recubiertos con colágena tipo I marcadas con anti-YAP y DAPI, tomadas por microscopía de fluorescencia. La línea punteada azul representa la magnificación de las imágenes donde se muestran los núcleos representativos en el cual se observa la presencia o ausencia de la marca fluorescente. Barra de escala 100µm.

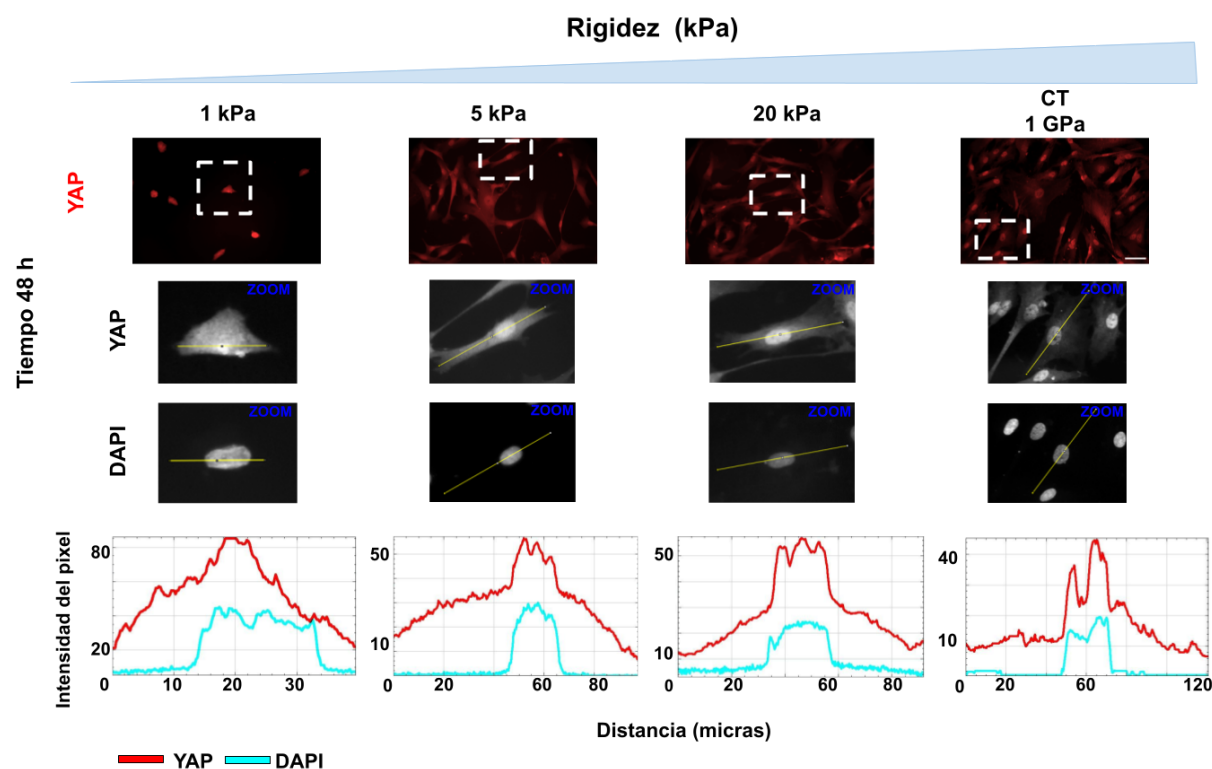


Figura. 14. La localización subcelular de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ distribuida en núcleo y citoplasma es dependiente de la rigidez en células BJ. Imágenes representativas y zoom de fibroblastos BJ cultivados sobre HGPAAs conjugados con colágeno tipo I, con un módulo elástico de , 1, 5 y 20 kPa posterior a 48 h de cultivo, utilizando como control (CT) el cultivo en un cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 1 GPa recubiertos con colágeno tipo I marcadas con anti-YAP, DAPI, tomadas por microscopía de fluorescencia e imagen comparativa (Plots) de núcleo y célula. La línea azul pertenece al núcleo donde el pico más alto representa la ubicación del mismo, Por el contrario, la línea roja, representa la marca de Yap (célula) donde el pico más alto representa una mayor señal. La línea blanca muestra el área seleccionada. Barra de escala 100µm.

8.4.3 La localización subcelular de los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ es similar en fibroblastos de córnea y células BJ cultivadas en sustratos de rigidez variable.

Los resultados mostrados previamente sobre la translocación de los coactivadores YAP/TAZ en células BJ y fibroblastos de córnea nos permite hacer la comparación de las condiciones de 1 kPa, 5 kPa y 20 kPa.

Como se muestra en la Tabla 5. los fibroblastos de córnea humana cultivados en HGPAAs a 48h y recubiertos con COLA 1 solamente la condición de 1 kPa muestra una translocación atenuada de los cofactores transcripcionales al igual que en fibroblastos de piel BJ 1 kPa presenta a YAP/TAZ de forma atenuada en núcleo.

Por otra parte, en ambos tipos de fibroblastos las condiciones de 5 kPa, 20 kPa y 40 kPa presentan una clara translocación de YAP/TAZ a núcleo similar a lo que ocurre en los controles (1 GPa). Esto se debe a lo mencionado anteriormente sobre la relación entre el aumento de rigidez de la MEC y la activación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en fibroblastos. La importancia de la translocación de estos cofactores se debe a que fomenta el incremento de depósito excesivo de MEC y el desarrollo de mediadores profibróticos.

Estos hallazgos se relacionan con lo encontrado en los *perfiles de señal* presentados previamente en la Fig. 11 y 14 donde se observa que la señal del marcaje con DAPI coincide con la marca de YAP/TAZ, sin embargo, no abarca toda la marca de los cofactores transcripcionales. Por el contrario, tanto en el control (CT) como en los geles de 5, 20 y 40 kPa la densidad de la marca de DAPI y YAP/TAZ coinciden, mostrando una mayor expresión en núcleo.

Es importante señalar que la translocación se asocia a la excentricidad que es distinta para ambos tipos celulares, los fibroblastos de córnea se muestran de forma alargada (tanto en sustratos rígidos como suaves) por el contrario, los fibroblastos BJ se encuentran de forma más redondeada, esto también se puede observar en la distancia en micras de los *perfiles de señal* (Fig. 11 y 14) donde los fibroblastos de córnea tienen en 1 kPa una distancia de 120 micras, en 5 kPa 150 micras y en 20 kPa 250 micras, en comparación de las células BJ que en 1 kPa presenta 30 micras mientras que en 5 y 20 kPa, 80 micras.

Lo que sugiere que para que exista una translocación de los cofactores transcripcionales es suficiente la contracción del área, lo que confirma que la translocación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en fibroblastos es dependiente de la rigidez del sustrato y del tiempo.

Tabla 5. Comparación de la translocación nuclear de YAP/TAZ.



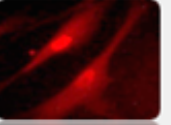

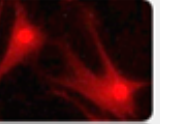
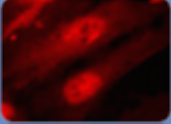

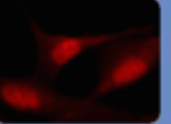
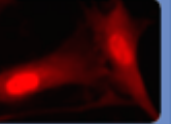
Célula	CT (1 GPa)	1 kPa	5 kPa	20 kPa	40 kPa
Fibroblastos de córnea cultivados a 48h	Translocación nuclear de YAP/TAZ 	Translocación nuclear atenuada de YAP/TAZ 	Translocación nuclear de YAP/TAZ 	Translocación nuclear de YAP/TAZ 	Translocación nuclear de YAP/TAZ 
	Fibroblastos de piel (BJ) cultivados a 48h	Translocación nuclear de YAP/TAZ 	Translocación nuclear atenuada de YAP/TAZ 	Translocación nuclear de YAP/TAZ 	Translocación nuclear de YAP/TAZ 

Tabla 5. Se muestra la comparación en texto e imágenes representativas (zoom en núcleo) de la translocación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ en fibroblastos de córnea humana cultivados sobre HGPAA conjugados con colágena comercial tipo I, con un módulo elástico de 1 y 5 (sustratos suaves), 20 (condición fisiológica) y 40 kPa (condición fibrótica) posterior a 48 h de cultivo, utilizando como control (CT) condiciones de cultivo con un cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 1 GPa y fibroblastos de piel BJ cultivados sobre HGPAA con colágena tipo I a diferente rigidez (módulo elástico) de 1, 5 y 20 kPa tomando como control (CT) el cultivo en cubreobjetos de vidrio (1 GPa) posterior a 48 h de cultivo,

8.5.1 Fabricación de chip microfluídico con membrana deformable.

Una córnea sana y transparente es esencial para la visión. Esto depende de su integridad estructural que puede dañarse con la exposición a diversas agresiones biológicas, químicas y/o físicas que son causa de discapacidad visual y ceguera. Para conocer mejor la respuesta de las células a diferente rigidez sometidas a curvatura, se fabricó un dispositivo microfluídico que puede ser utilizado para ensayos de cultivo con condiciones de curvatura (Fig.15 A y B). El dispositivo se diseñó con una base de portaobjetos de vidrio de 1 mm de espesor, seguido de una réplica de PDMS de 4 mm de espesor a partir de moldes fabricados por microfresado (*micromilling*), los cuales tienen canales de 300 μm de ancho x 100 μm

de alto, con una cámara de inflamiento de 12 mm de diámetro y 4 mm de altura (Fig. 15 A y B). Los moldes fueron fabricados por el Laboratorio Nacional LaNSBioDyT.

La réplica de PDMS tiene un adhesivo (Loctite 3525) que tiene un espesor de 60 μm , en este dispositivo se utiliza para adherir el sustrato de PDMS con el hidrogel de poliacrilamida (Vázquez, G et. al., 2019). El gel de poliacrilamida tiene un espesor aproximado de 1mm, además, es transparente y tiene la ventaja de poder conectar covalentemente proteínas para poder realizar el cultivo celular.

Dado que el diseño del dispositivo es adaptable, se diseñaron dos chips uno con canales rectos (Fig.15 D) y otro con canales encontrados (canales que tienen sus entradas en sentido contrario uno del otro) (Fig.15 C), la orientación de los canales depende del experimento que se requiere. Sin embargo, en ambos chips, al someterlos a presión positiva mediante el uso de bombas microfluídicas Fluigent, donde la presión ejercida por las bombas se mantiene en el dispositivo, inicialmente, la membrana del dispositivo se encuentra plana (Fig.15 E) ya que no tiene ninguna presión (0 bar), por el contrario cuando se realiza un incremento en la presión la membrana se va deformando, o bien, generando una curvatura (Fig.16 A); es importante mencionar que en ambos chips no se tuvieron fugas, esto se sabe debido a que se realizaron pruebas con las bombas microfluídicas, se simuló el paso de medio con agua con colorante y ninguno de los dos chips presentó fugas (Fig.16 A).

Este chip es capaz de soportar una presión hidrostática de aproximadamente 200 mba que fue la presión utilizada (Fig. 16 B), donde se puede observar que el punto máximo del radio de curvatura es de 13.23 mm y el punto mínimo es de 6.90 mm mostrando un comportamiento similar a la curvatura fisiológica de la córnea que en la superficie posterior es de 6.5 mm y en la superficie anterior es de 7.8 mm (Tabla 1).

El radio de curvatura fue calculado a través de un análisis de imágenes con un código desarrollado por Fernanda López García como parte de sus estudios de Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales, UNAM. El código usa como

referencia el primer diámetro que se elige al correr el programa MatLab donde inicialmente se introduce una escala, después, en el programa se seleccionan 3 puntos sobre la circunferencia de la membrana; los dos puntos laterales son el diámetro y el punto central es el punto más alto de la curvatura. El radio de curvatura se calcula con la ecuación de la recta de las coordenadas obtenidas de la selección de los puntos, posteriormente, el programa permite encontrar las ecuaciones de las mediatrices de las líneas y el punto donde estas se unen, de esta forma se puede obtener el punto central de la circunferencia. Finalmente, el programa convierte el radio de píxeles a mm con la ayuda de la escala que se agregó al inicio.

Los resultados obtenidos demuestran que el radio de curvatura se puede modificar con diferencias en la presión, por lo que estos estímulos en un cultivo de fibroblastos de córnea permitirá estudiar más a fondo e invivo lo que sucede en las células en un ambiente similar al de la córnea.

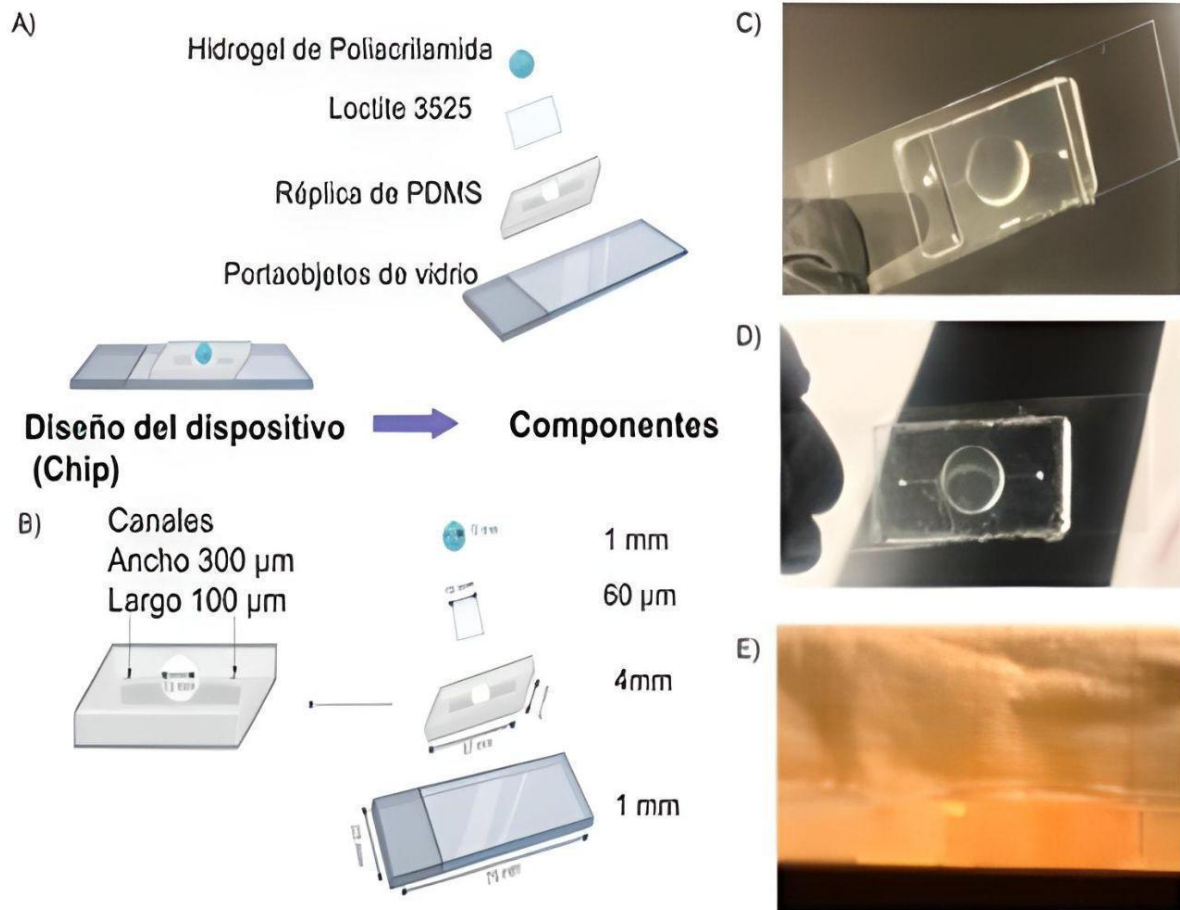


Fig. 15. Diseño de fabricación de chip de PDMS. (A) Diseño del dispositivo microfluídico. (B) Medidas y espesor de los componentes del chip, de arriba hacia abajo se encuentra el hidrogel de poliacrilamida, membrana de loctite 3525, réplica de PDMS y portaobjetos de vidrio. (C) Chip con canales encontrados uno de entrada y otro de salida de 300 μm de ancho por 100 μm de alto (D) Chip con canales rectos un canal de entrada y otro de salida de 300 μm de ancho por 100 μm de alto, ambos con un espesor de 4 mm y una membrana deformable de 12 mm de radio (E) Vista lateral del chip sin cambios de presión en la membrana.

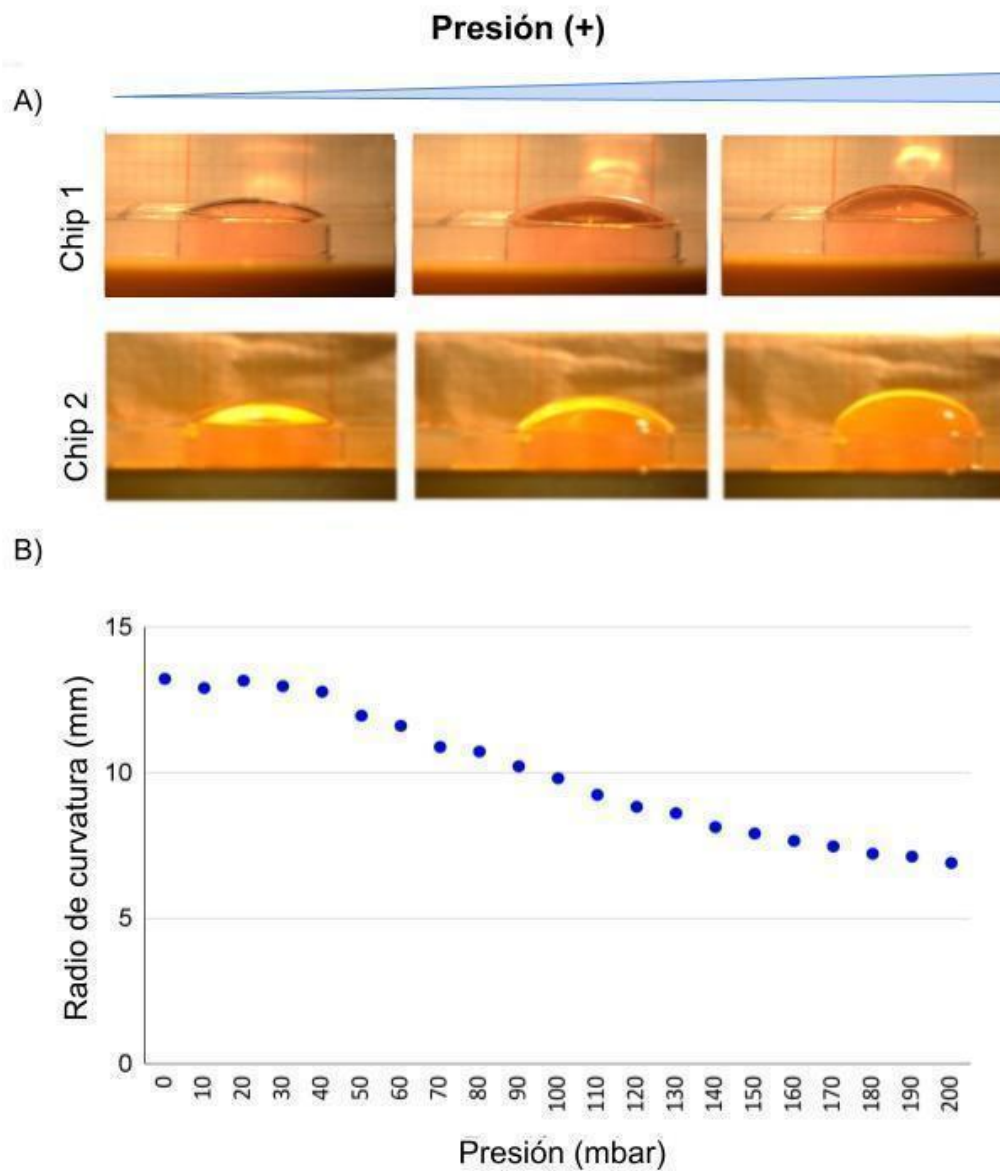


Fig. 16. Proceso de inflamiento de chip de PDMS. (A) Proceso de inflamiento de la membrana deformable del chip o incremento de la presión mediante la programación de ciclos de bombas microfluidicas fluigent (chip 1) hasta llegar al punto máximo de inflamiento de la membrana (chip 2) (B) Gráfica del proceso de enfriamiento (chip1) donde se obtiene el radio de curvatura (mm) de una membrana con presiones entre 0 y 200 mbar, siendo 13.23 mm el radio de curvatura máximo y 6.90 mm el mínimo.

9. DISCUSIÓN

Se ha visto que los fibroblastos responden a los sustratos de rigidez variable. Por ello, se han llevado a cabo investigaciones sobre la proliferación y mecanorespuesta mediante sustratos biomiméticos con módulos elásticos variables (Palchesko, R. et al., 2015). Se sugiere que los fibroblastos de córnea pueden responder a sustratos con rigidez de 1, 5, 20 y 40 kPa conjugados con la proteína colágena tipo I (COLA1), considerando que el ojo humano en condiciones sanas presenta una rigidez de aproximadamente 20-24 kPa y que en valores de 70 kPa se presenta una condición fibrótica (Thomasy, S. et al., 2018). Por tanto, se decidió utilizar una rigidez de 40 kPa en los HG PAA como máximo y complementando, se utilizaron condiciones por debajo de las fisiológicas (1 kPa y 5 kPa) para evaluar si las células respondían a sustratos más suaves.

Al igual que en el modelo de córnea, en fibroblastos de piel también se ha evidenciado que las propiedades biomecánicas son relevantes para las funciones de las células, es decir, las células detectan señales mecánicas y pueden traducirse en respuestas bioquímicas (Schulze, C. et al., 2010). Los fibroblastos de piel están sometidos a cambios en situaciones tanto fisiológicas como patológicas, estas últimas pueden ser el desarrollo de cicatrices hipertróficas, fibrogénesis y como se mencionó anteriormente en el modelo de córnea en la cicatrización de heridas.

Se sabe que los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ están relacionados con la transmisión de señales mecánicas que regulan actividades transcripcionales en el núcleo. El ratón *knockout* del coactivador YAP genera letalidad embrionaria, por lo que se relaciona con un papel esencial en el desarrollo y la importancia de la mecanotransducción en etapas tempranas (Morin, E., et al. 2006). Asimismo, diversos estudios de silenciamiento del coactivador TAZ refleja un papel importante ya que, su desactivación desarrolló quistes renales (Hossain, Z., et al. 2007) aunque también se ha visto su relación con la arquitectura y homeóstasis en pulmones (Hong, W., y Guan, K., 2012). Por lo que se asocia esta proteína con mantener el desarrollo de los órganos. Adicionalmente, los cofactores YAP/TAZ actúan como reguladores de las patologías de fibrosis y cáncer (Ci, X., et al, 2021).

Por otra parte, la proteína YAP en el citoplasma se asocia con el regulador Smad 7 para coreprimir la señalización de Smad, por el contrario, en el núcleo puede hacer la regulación transcripcional mediante la asociación con las proteínas Smad2/3, este complejo fosforilado interactúa con Smad4 para formar el complejo Smad 2/3/4 el cual se une a YAP/TAZ citoplasmático y se da la translocación nuclear, al unirse con el elemento regulador responsivo a las proteínas TEAD activando la transcripción (Varela, X, et. al, 2010). Asimismo, las células tienen diferentes mecanismos por los cuales regulan a la activación de las proteínas YAP/TAZ mediante la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina y la activación del aparato de actomiosina.

En sustratos rígidos, (que en este caso fueron de 5 kPa, 20 kPa y 40 kPa para ambos tipos de fibroblastos) favorecen la formación de las adherencias focales y fibras de estrés (filamentos de actina) que traducen fuerzas mecánicas aplicadas directamente al núcleo. Se ha visto que estas fuerzas generan un aplanamiento nuclear, lo cual produce un aumento en la importación a núcleo del cofactor transcripcional de YAP, que se da por una restricción en la mecánica de los poros nucleares (Elostegui, A. et. al. 2017). Aunque en el presente trabajo no se estudió este cambio, esto podría estar pasando en los sustratos cultivados con fibroblastos de córnea y de piel, por esta razón valdría la pena evaluarlo. Por el contrario, en el sustrato suave, de acuerdo con los valores trabajados aquí, los fibroblastos tanto de córnea como de las células BJ es de 1 kPa, dado que posiblemente las fuerzas mecánicas no llegan al núcleo, se da un equilibrio en el transporte núcleo/citoplasmático de YAP mediante los poros nucleares (Noguchi, S. et. al. 2018). Es relevante destacar que se encontraron diferencias en el esparcimiento y excentricidad entre células BJ y los queratocitos a 1 kPa a pesar de que en ambos tipos celulares no se vio una clara translocación de los cofactores transcripcionales.

Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente, donde se encontró que un aumento en la rigidez de la MEC genera la translocación nuclear de YAP/TAZ y, esta señal, se genera por la proteína RhoA GTPasa que detecta este cambio mediante la formación de adherencias focales y al mismo tiempo forma fibras de estrés. Por el contrario, en sustratos blandos no se observa la translocación de YAP/TAZ, localizándose en el citoplasma; en consecuencia, no hay formación de fibras de estrés (Codelia et al., 2014).

Los datos encontrados aquí sugieren que el cofactor YAP mostró una aparente regulación en fibroblastos de córnea y células BJ, dependiente de la rigidez. La translocación nuclear de YAP/TAZ en fibroblastos de córnea cultivados en 5, 20 y 40 kPa a las 24 horas es dependiente del tiempo, ya que, de igual manera, en los queratocitos cultivados en sustratos de 5, 20 y 40 kPa a 48 horas, se observó una translocación a núcleo, cabe resaltar que en 1 kPa esta se percibió atenuada, es decir, hay ausencia de acumulación de YAP en núcleo. Como se mencionó anteriormente, esto podría deberse a que YAP está localizado en núcleo a baja densidad celular. Asimismo, se ha visto que la fosforilación de YAP Ser 112 incrementa en la inhibición por contacto, de esta manera la sobreexpresión de YAP no fosforilable retrasa la proliferación por ello, las células alcanzan densidades más altas (Das, A. et al., 2016). También, se ha demostrado que la mecanorregulación de YAP en ausencia del contacto célula-célula depende de la sensación de rigidez de la MEC (la unión celular a MEC rígida o suave), así como del área de propagación celular y la actividad de miosina II (Dupont, S., et al., 2011). Por otra parte, en células BJ cultivadas en sustratos de 5 y 20 kPa se observa una translocación clara de los cofactores transcripcionales de YAP/TAZ (Tabla 5).

La reorganización de los filamentos de actina (por faloidina) también puede explicar la marca nuclear o citoplasmática de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ por ejemplo, en sustratos suaves (1 y 5 kPa en fibroblastos de córnea y 1 kPa en fibroblastos de piel), los fibroblastos presentan menor señal de fibras de estrés, dando como resultado que la marca de YAP se encuentre mayoritariamente en citoplasma. Sin embargo, en sustratos rígidos de 20 y 40 kPa en córnea y 5 y 20 kPa en fibroblastos de piel existe la formación de fibras de estrés y se mantienen a lo largo del tiempo (48 h) en el caso de los fibroblastos de córnea, que a su vez podrían generar deformaciones nucleares debido a la entrada al núcleo de las proteínas (Sosa BA et al., 2012) y como se observó, a diferencia de los sustratos suaves, existe una translocación de YAP.

Respecto a lo mencionado anteriormente sobre las fibras de estrés en sustratos rígidos, se ha reportado en la literatura que cuando las células perciben estímulos mecánicos llevan a cabo un proceso que implica la reorganización del citoesqueleto de actina así como cambios internos. Dicho proceso también implica la regulación

de algunas proteínas, así como reclutamiento en adhesiones focales y la activación de vías de señalización que son características de la contractilidad. Esto implica la regulación de GTPasas y adherencias focales que en conjunto, le permiten a las células adaptarse al nuevo ambiente (Sun P. et al., 2019). Estas respuestas dependen del tipo celular, ya que el rango de rigidez del sustrato se relaciona con el tipo de tejido de donde son las células. Por ejemplo, los fibroblastos tienen mayor esparcimiento (cambios en el área) a partir de los 10 kPa (Solon, J. et.al., 2007), lo cual tiene sentido con los datos reportados tanto en córnea como en células BJ de 1 kPa a las 48 h. Una hipótesis para explicar el aumento en el esparcimiento (cambios en el área) en sustratos más rígidos es que al ejercer una tracción en la matriz extracelular y en las adherencias focales como consecuencia, la célula crea tensión dentro de su membrana y en la red de actina cortical (Solon, J. et.al., 2007).

Los estímulos mecánicos, como la rigidez y el confinamiento, promueven la reorganización del citoesqueleto de actina dando como resultado la formación de fibras de estrés. Este mecanismo de respuesta de las células se relaciona directamente con proteínas como las integrinas, que son complejos de adhesión importantes en la relación célula-matriz extracelular (Pocaterra A. et al., 2019) por ejemplo, los queratocitos, así como las células epiteliales y endoteliales se adhieren a sus sustratos mediante distintos heterodímeros de integrinas, en los fibroblastos de córnea $\alpha3\beta1$ tiene una localización preferente en regiones de la membrana denominada adhesiones focales (Muppala, S. et. al. 2019; McKay, T. et. al. 2020). También, se ha informado que los estímulos mecánicos pueden modificar el comportamiento celular, por ejemplo, la proliferación y migración direccional en fibroblastos son parte de la respuesta a este tipo de estímulos. En células epiteliales de córnea se vió que la velocidad de migración fue significativa en sustratos suaves en comparación con los rígidos (Molladavoodi, S. et al. 2014).

En el presente estudio los fibroblastos de córnea marcados con faloidina (que reconocen los filamentos de actina) en sustratos suaves como es 1 y 5 kPa, presentan un arreglo de actina cortical, por el contrario, en sustratos rígidos, existe la formación de fibras de estrés y se mantienen a lo largo del tiempo (48 h). De igual manera, en las células BJ en 1 kPa, no se ve la formación de fibras de estrés (o bien, se percibe difusa), en 5 y 20 kPa al igual que el control, se puede observar la

formación de estas F-actina. Es decir, en sustratos rígidos a 48 h, las fibras de estrés se ven más prominentes y organizadas en haces paralelos en todo el citoplasma. Asimismo, es relevante destacar que en 5 kPa además de las características de las fibras de estrés mencionadas anteriormente, después de 24 horas de cultivo hubo una translocación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ, aunque más atenuada en algunas células en comparación con los geles de mayor rigidez.

Se ha reportado que en fibroblastos embrionarios de ratón con sobreexpresión de talina, a partir de los 5 kPa el cofactor YAP se transloca al núcleo y el citoesqueleto de actina forma fibras de estrés, a diferencia del control donde YAP se encuentra principalmente en citoplasma (Elosegui, A. et. al., 2017). Curiosamente, en células 3T3 se ha visto que en el cultivo de fibroblastos sobre silicona, presentaron formación de fibras de estrés, sin embargo, parecían ser más delgadas a diferencia de los fibroblastos cultivados en caja petri, cabe mencionar que en el presente estudio esta condición fue el control CT (1 GPa).

Con respecto a la morfología y excentricidad de los fibroblastos, es diferente en las células BJ y en células corneales. En sustratos blandos (1 kPa) las células BJ se observan en forma redonda, los resultados mostraron que a diferencia de 5 kPa y 20 kPa cuyo valor fue $\leq .05$, 1 kPa obtuvo un valor cercano a 1. Esto puede deberse a que los cambios en las propiedades mecánicas como, por ejemplo, los que ocurren en la piel durante la remodelación de tejidos o el envejecimiento que afectan la actividad de los fibroblastos residentes. Asimismo, se ha comprobado que existe un estado de activación de fibroblastos dérmicos humanos en sustratos de 5 kPa (Achterberg, V. et. al., 2014). En contraste, en los fibroblastos de córnea las células se muestran alargadas en 1 kPa pues presentan un valor $\leq .05$ al igual que en 5 kPa, 20 kPa y 40 Kpa a 24h y 48h. En general, los fibroblastos presentan cambios en la morfología, pueden verse como células alargadas y sus núcleos pueden ser planos y delgados dependiendo de si están activos o inactivos los fibroblastos. Sin embargo, se ha propuesto que los fibroblastos son fenotípicamente estables pero, también se presentan heterogéneos por lo que regulan tanto la forma como la función (Ravikanth, M. et al. 2011).

En cuanto a la córnea, desde el desarrollo embrionario las fuerzas físicas que ejercen los fibroblastos organizan la matriz extracelular en un patrón que brinda un soporte estructural que a su vez le permite mantener su transparencia (Karamichos, D. et. al. 2007). En este sentido, también es importante la mecánica de la MEC, ya que los estímulos mecánicos y la tensión forman contactos focales y fibras de estrés en las células cuya formación puede ser modulada la misma contracción de las células. Tal y como se pudo observar a través de la técnica de marcaje con faloidina en fibroblastos de córnea en los geles de 20 kPa y 40 kPa (Fig. 8). Por su parte, el marcaje de F-actina en las células BJ, donde la formación de estas fibras de estrés se observaron en sustratos de 5 kPa y 20 kPa (Fig 12). Asimismo, en ambos tipos de fibroblastos (BJ y córnea) en el sustrato de 1 kPa no presentó la formación de fibras de estrés. Sin embargo, es la condición de 20 kPa en donde los dos tipos de células coincidieron en la formación de las fibras.

Es importante destacar que tanto en células BJ como en fibroblastos de córnea se ve una disminución del área celular aunque la excentricidad es distinta para ambos tipos celulares, los fibroblastos de córnea tienden a mantener su forma alargada en sustratos suaves y rígidos en contraste con los fibroblastos BJ que presentan de una forma un poco más redondeada, lo cual es interesante ya que se ha visto que las células redondeadas tienden a traslocar YAP/TAZ (Zhao B. et al., 2008). Sin embargo, en fibroblastos de córnea esta translocación se dió en sustratos rígidos de 5, 20 y 40 kPa. Los queratocitos tienen forma fusiforme, plana, se encuentran paralelos a la superficie y sus extensiones se entrelazan entre sí por uniones tipo *GAP* (Boy, S. et.al., 2012). La morfología descrita previamente de ambos fibroblastos podría explicar por qué en los *perfiles de señal* (Fig. 11 y 14) se observa que los fibroblastos de córnea tienen una distancia de 120-250 micras, en comparación de las células BJ donde su distancia es de 30-80 micras.

Por otra parte, diferentes enfoques, como la Ingeniería de tejidos ha utilizado sistemas para imitar la fisiología de la córnea que va desde los cultivos en 2D que no son ideales debido a que están limitados en el número y tipo de células, lo que resulta en una diferencia con el tejido nativo. Asimismo, los cultivos en 3D también presentan dificultades en cuanto a consistencia, viabilidad y solidez de la fabricación pero permite controlar la ubicación de diferentes tipos de células así como de su

matriz extracelular. Sin embargo, los avances en biofabricación y dispositivos en chip pueden generar estructuras complejas y con mayor fidelidad (Marcos, L. Wilson, S. y Roach, P., 2021). Por ello, nuestros resultados podrían extrapolarse a un modelo que simule las condiciones fisiológicas de la córnea, de acuerdo con los datos previamente mostrados, el modelo presentado aquí cumple con los valores de la curvatura de la córnea, recordando que el comportamiento fisiológico de la córnea en la superficie posterior es de 6.5 mm y en la superficie anterior es de 7.8 mm y con el modelo se obtuvo un radio máximo de radio de 13.23 mm y un punto mínimo es de 6.90 mm (Fig.16B). Por tanto, se propone el estudio de los cofactores transcripcionales mediante un chip microfluídico que emula las características de rigidez, curvatura y un estímulo mecánico a través de cambios de presión controlada, como el modelo presentado (Fig.15) que de acuerdo a las características del mismo, permite realizar el cultivo de células y la evaluación de la translocación de YAP/TAZ in vivo a una rigidez y curvatura fisiológica.

Como se mencionó anteriormente, en el LaNSBioDyT se fabricó y caracterizó el dispositivo microfluídico con recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida de 20 kPa, se encontró que a 0 mbar el gel se observó opaco y a 500 mbar se veía transparente, ya que conforme aumenta la presión hay un contacto positivo entre la membrana de Loctite 3525 y el hidrogel de poliacrilamida con un comportamiento elástico en un rango de 0-500 mbar, es decir, deformaciones pequeñas (Ruíz, Y. 2019), esta opacidad es importante debido a que puede presentar problemas en el momento de realizar un análisis con microscopía. Aunque no se probó el dispositivo con el hidrogel de poliacrilamida, en el laboratorio de micro y nanotecnología como ya se mencionó, se realizó la caracterización del dispositivo con un recubrimiento de hidrogel de poliacrilamida de 20 kPa, donde se vió que a esta rigidez se requiere una presión menor para provocar una deformación en la membrana, se sugirió que esto se debe a que la membrana de Loctite 3525 con hidrogel de poliacrilamida, transfiere el esfuerzo hacia el hidrogel.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos comprobaron que tanto los fibroblastos de córnea como las células BJ, los cambios en la rigidez del sustrato de cultivo y responden con la formación de fibras de estrés ya que en fibroblastos de córnea cultivados en sustratos suaves (1 y 5 kPa) se ve la presencia de menos fibras de estrés con el tiempo de cultivo. En sustratos rígidos, existe la formación de fibras de estrés y se mantienen a lo largo del tiempo (48 h). En contraste, en el cultivo de células BJ en sustratos suaves (1 kPa) no se muestra la formación de fibras de estrés y la actina se encuentra arreglada corticalmente, a diferencia del cultivo en 5 kPa y 20 kPa en comparación del control (aprox. 1 GPa).

Por otra parte, en cuanto a la translocación de los cofactores transcripcionales YAP/TAZ se observó que en fibroblastos de córnea y de piel la señal de YAP se encuentra nuclear en sustratos rígidos, mientras que en sustratos blandos la marca se encuentra citoplasmáticamente, sin embargo, en 1 kPa en ambos tipos celulares se encontró una baja presencia de señal de YAP independientemente del cambio en esparcimiento.

Adicionalmente, se obtuvo un dispositivo microfluídico que simula las características fisiológicas de curvatura de la córnea, dicha curvatura pudo ser controlada mediante el uso de bombas microfluídicas.

De esta manera se puede estudiar la respuesta de las células realizando un cultivo sobre el HG PAA a diferente rigidez sometidas a curvatura.

11. PERSPECTIVAS

Para el modelo de córnea es necesario realizar estudios complementarios que permitan confirmar lo encontrado aquí, por ejemplo, en un sustrato biomimético in vivo como el que se propuso en la figura 15 y 16, un chip microfluídico con un pozo central conectado a microcanales que transportan flujo que deforma la membrana con base en la presión ejercida.

En este chip, se pueden cultivar los fibroblastos de córnea en una membrana deformada por curvatura con valores similares a los reportados e incluso con ligeras modificaciones es posible sembrar células endoteliales. De modo que permita evaluar in vivo la polimerización de actina mediante el uso de la molécula acoplada a una proteína fluorescente (mTurquoise) para determinar la formación de filamentos de actina en los HG de PPA deformados por curvatura. Sin embargo, se tiene que caracterizar y establecer una curva de calibración entre presión y radio de curvatura para cada rigidez a estudiar. Asimismo, se debe de considerar la fuerza que debe de haber para mantener la deformación de la membrana durante cierto periodo de tiempo.

Considerando la versatilidad del diseño y que el proceso de fabricación permite que el diseño del chip se adapte a lo que se requiere, se podría considerar el diseño de tres canales para estudiar también, en un canal el comportamiento de células epiteliales, en otro canal simular la membrana de Bowman cultivando solo colágena tipo 1 (tomando en cuenta que es acelular) y en el siguiente simular el estroma (donde están embebidos los queratocitos).

Además, podría evaluarse la fuerza de tracción de las células o las fuerzas mecánicas al núcleo ya que, como se mencionó anteriormente, se ha visto que esto produce un aplanamiento nuclear, lo cual genera un aumento en la importación a núcleo de YAP, que se da por una restricción en la mecánica de los poros nucleares.

12. REFERENCIAS

- Achterberg, V. F., Buscemi, L., Diekmann, H., Smith-Clerc, J., Schwengler, H., Meister, J. J., Wenck, H., Gallinat, S., y Hinz, B. (2014). The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function. *The Journal of investigative dermatology*, 134(7), 1862–1872. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.90>
- Alcocer, P. (2016). Variaciones de la biomecánica corneal inducidas por el embarazo. Tesis Doctoral. Universidad Cardenal Herrera, Valencia.
- Alonso, S., Collado, J. y Gómez, A. (1993). Oftalmología II. Universidad de Cantabria: Servicio de Publicaciones.
- Arffa, R. y Grayson, M. 1997. Diseases of the cornea. España: Harcourt Brace.
- Azar, D. T. (2008). Cirugía refractiva + DVD-ROM, 2a ed.. España: Elsevier.
- Bai J, Fu H, Bazinet L, Birsner AE and D'Amato RJ (2020) A Method for Developing Novel 3D Cornea-on-a-Chip Using Primary Murine Corneal Epithelial and Endothelial Cells. *Front. Pharmacol.* 11:453. doi: 10.3389/fphar.2020.00453
- Boy, S., Gutiérrez, A. y McCulley, J. (2012). Atlas y Texto de Patología y Cirugía Corneal. Rep. de Panamá: Jaypee-Highlights Medical Publishers, Inc.
- Cai X, Wang K-C and Meng Z (2021) Mechanoregulation of YAP and TAZ in Cellular Homeostasis and Disease Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:673599. doi: 10.3389/fcell.2021.673599
- Caplan, N. y A. Banaszekiewicz, P. (2019). *Biomecánica. Ortopedia de posgrado*, 617–638. doi:10.1017/9781108686624.027
- Cardinali, P. (2007). Fundamentos de Optometría. Editorial Médica Panamericana.
- Codelia, V. A., Sun, G., and Irvine, K. D. (2014). Regulation of YAP by mechanical strain through Jnk and Hippo signaling. *Curr. Biol.* 24, 2012–2017. doi: 10.1016/j.cub.2014.07.034
- Das, A., Fischer, R. S., Pan, D., y Waterman, C. M. (2016). YAP Nuclear Localization in the Absence of Cell-Cell Contact Is Mediated by a Filamentous Actin-dependent, Myosin II- and Phospho-YAP-independent Pathway during Extracellular Matrix Mechanosensing. *The Journal of biological chemistry*, 291(12), 6096–6110. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708313>
- Díaz, D., Rodríguez, A., Buendía, M., Reynoso, O., Fernández, J. y Ambrosio, J. (2015). Mecanotransducción: como la célula percibe los estímulos. *Revista Tamé*, 4 (11):396-411.
- Dulińska-Molak, I., Pasikowska, M., Pogoda, K. *et al.* Cambios relacionados con la edad en las propiedades mecánicas de los fibroblastos humanos y su reversión prospectiva después del tratamiento con tripéptidos antiarrugas. *Int J Pept Res Ther* 20, 77–85 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9370-z>

- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., y Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179–183. <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- ECETOC Joint Assessment of Commodity Chemicals. JACC No. 55. Linear Polydimethylsiloxanes CAS No. 63148-62-9. Second. Belgium: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals; 2011.
- Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, Lezamiz A, Uroz M, Kosmalska AJ, Oria R, Kechagia JZ, Rico-Lastres P, Le Roux AL, Shanahan CM, Trepast X, Navajas D, Garcia-Manyes S, Roca-Cusachs P. (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*. Nov 30;171(6):1397-1410.e14. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.008. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29107331.
- Engler, AJ, S. Sen, HL Sweeney y DE Discher. 2006. La elasticidad de la matriz dirige la especificación del linaje de células madre. *Célula*. 126 :677–689.
- Farsi, A., Pullen, A., Latham, J. *et al.* Full deflection profile calculation and Young's modulus optimisation for engineered high performance materials. *Sci Rep* 7, 46190 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep46190>
- Fernández, A., Moreno, J., Prósper, F., García, M. y Echeveste J. (2008). Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques. *An. Sist. Sanit. Navar*, 31 (1): 53-69.
- Fuest, M., Yam, G. H., Mehta, J. S., & Duarte Campos, D. F. (2020). Prospects and Challenges of Translational Corneal Bioprinting. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 7(3), 71. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030071>
- Guede, D., González, P., y Caeiro, J.R.. (2013). Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5(1), 43-50. <https://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2013000100008>
- Gouveia, R. M., Koudouna, E., Jester, J., Figueiredo, F., Connon, C. J.. (2017). Template Curvature Influences Cell Alignment to Create Improved Human Corneal Tissue Equivalents. *Adv. Biosys* 1, 1700135. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700135>
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*. 2001 Sep;12(9):2730-41. doi: 10.1091/mbc.12.9.2730. PMID: 11553712; PMCID: PMC59708.
- Hong W, Guan KL. The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Sep;23(7):785-93. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.05.004. Epub 2012 May 29. PMID: 22659496; PMCID: PMC3459069.
- Hossain, Z., Ali, S., Ko, H., Xu, J., N. C., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W., Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a

targeted inactivation of Wwtr1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30;104(5):1631-6. doi: 10.1073/pnas.0605266104. Epub 2007 Jan 24. PMID: 17251353; PMCID: PMC1785239.

- IAPB. (s.f.). Atlas de la Visión de la IAPB: Estimaciones mundiales de la pérdida de visión. <https://www.iapb.org/es/learn/vision-atlas/magnitude-and-projections/global/>
- Jones, R, Hamley, I, Connon, C. (2012). Ex vivo expansion of limbal stem cells is affected by substrate properties. *Stem Cell Res.* May;8(3):403-9. doi: 10.1016/j.scr.2012.01.001. Epub 2012 Jan 31. PMID: 22386779.
- Junko, Y., Ayumi, O., Seiichi, Y., Satoru, Y., Toshiaki, T., Shiro, A. (2014). Development and Evaluation of Porcine Atelocollagen Vitrigel Membrane With a Spherical Curve and Transplantable Artificial Corneal Endothelial Grafts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55(8):4975-4981. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14211>.
- Karamichos D, Lakshman N, Petroll WM. (2007). Regulation of corneal fibroblast morphology and collagen reorganization by extracellular matrix mechanical properties. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Nov;48(11):5030-7. doi: 10.1167/iovs.07-0443. PMID: 17962454; PMCID: PMC2080831.
- Last, J., Thomasy S., Croasdale C., Russell P & Murphy C. (2012). Compliance profile of the human cornea as measured by atomic force microscopy. *Micron* 43(12): 1293–1298.
- Malacara, D. (2015). Óptica Básica. Fondo de Cultura Económica, Ediciones Científicas Universitarias.
- Marcos, L. F., Wilson, S. L., y Roach, P. (2021). Tissue engineering of the retina: from organoids to microfluidic chips. *Journal of Tissue Engineering.* <https://doi.org/10.1177/20417314211059876>
- Maruri, D., Miron, M., Kivanany, P., Hack, J., Schmidtke, D., Petroll, W., y Varner, D.. (2020). ECM Stiffness Controls the Activation and Contractility of Corneal Keratocytes in Response to TGF- β 1, *Biophysical Journal.* 119: 9., 1865-1877, ISSN 0006-3495, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.08.040>.
- McKay, T., Schlötzer-Schrehardt, U., Pal-Ghosh, S., Stepp, M. (2020) Integrin: Basement membrane adhesion by corneal epithelial and endothelial cells. *Exp Eye Res.* Sep;198:108138. doi: 10.1016/j.exer.2020.108138. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32712184; PMCID: PMC7508807.
- Miyagi H, Jalilian I, Murphy CJ, Thomasy SM. Modulation of human corneal stromal cell differentiation by hepatocyte growth factor and substratum compliance. *Exp Eye Res.* 2018 Nov;176:235-242. doi: 10.1016/j.exer.2018.09.001. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30193807; PMCID: PMC6339683.
- Moendarbary, E., y Harris, A. R. (2014). Cell mechanics: Principles, practices, and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 6(5). <https://doi.org/10.1002/wsbm.1275>

- Molladavoodi, Sara, Hyock-Ju, Kwon, Medley, John y Gorbet, Maud. (2014). Human corneal epithelial cell response to substrate stiffness. *Acta biomaterialia*. 11. 10.1016/j.actbio.2014.10.005.
- Montefusco, C. y Matos, L. (2016). El humor vítreo como fluido biológico de importancia clínica en ciencias forenses. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 50(1), 27-35. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-295720160001000006&lng=es&tlng=es.
- Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, Stonebraker JR, Teed J, Alb JG, et al. (2006) Defectos en la vasculogénesis del saco vitelino, fusión corioalantoidea y elongación del eje embrionario en ratones con interrupción específica de Yap65. *Mol Cell Biol*. 26 :77–87.
- Muppala S, Raghunathan VK, Jalilian I, Thomasy S, Murphy CJ. YAP and TAZ are distinct effectors of corneal myofibroblast transformation. (2019). *Exp Eye Res*. Mar;180:102-109. doi: 10.1016/j.exer.2018.12.009. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30578787; PMCID: PMC6455812.
- Neema Lakshman, W. Mateo Petroll; Regulación del factor de crecimiento de fenotipos mecánicos de queratocitos corneales en matrices de colágeno tridimensionales. *Invertir. Oftalmol. Vis. ciencia* 2012;53(3):1077-1086. hacer:<https://doi.org/10.1167/iovs.11-8609>.
- Noguchi S, Saito A, Nagase T. YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 20;19(11):3674. doi: 10.3390/ijms19113674. PMID: 30463366; PMCID: PMC6274979.
- Obianamma E. Onochie, Alicia Zollinger, Celeste B. Rich, Michael Smith, Vickery Trinkaus-Randall. (2019). Epithelial cells exert differential traction stress in response to substrate stiffness, *Experimental Eye Research*. 181; 25-37. ISSN 0014-4835, <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.01.014>.
- Palchesko, R., Lathrop, K., Funderburgh, J. *et al*. In Vitro Expansion of Corneal Endothelial Cells on Biomimetic Substrates. *Sci Rep* 5, 7955 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep07955>
- Peate, I., Macleod, J. (2021). *Pudner. Enfermería en el paciente quirúrgico*. España: Elsevier España, S.L.U..
- Pocaterra, A., Santinon, G., Romani, P., Brian, I., Dimitracopoulos, A., Ghisleni, A., Carnicer-Lombarte, A., Forcato, M., Braghetta, P., Montagner, M., Galuppini, F., Aragona, M., Pennelli, G., Bicciato, S., Gauthier, N., Franze, K., y Dupont, S. (2019). F-actin dynamics regulates mammalian organ growth and cell fate maintenance. *Journal of Hepatology*, 71(1). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.022>
- Ravikanth M, Soujanya P, Manjunath K, Saraswathi TR, Ramachandran CR. Heterogeneity of fibroblasts. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011 May;15(2):247-50. doi: 10.4103/0973-029X.84516. PMID: 22529592; PMCID: PMC3329689.

- Ruiz, Y. (2019). Fabricación Y Caracterización De Un Chip De Inflamamiento Para Proporcionar Estímulos Mecánicos A Células. [Tesis de Maestría, UNAM].
- Saona, C. (2006). Contactología Clínica. Barcelona: Masson.
- Saornil, M.A., Becerra, E., Méndez, M.C., y Blanco, G.. (2009). Tumores de la conjuntiva. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 84(1), 7-22. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912009000100003&lng=es&tlng=es.
- Schulze C, Wetzel F, Kueper T, Malsen A, Muhr G, Jaspers S, Blatt T, Wittern KP, Wenck H, Käs JA. Stiffening of human skin fibroblasts with age. *Biophys J*. 2010 Oct 20;99(8):2434-42. doi: 10.1016/j.bpj.2010.08.026. PMID: 20959083; PMCID: PMC2956221.
- Seo, J., Byun, W., Frank, A., Massaro-Giordano, M., Lee, V., Bunya, V.Y., y Huh, D. (2016). Human blinking 'eye-on-a-chip'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57, 3872-3872.
- Sosa, B. A., Rothbaler, A., Kutay, U., y Schwartz, T. U. (2012). LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell*, 149(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.046>
- Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J*. 2007 Dec 15;93(12):4453-61. doi: 10.1529/biophysj.106.101386. PMID: 18045965; PMCID: PMC2098710.
- Speight, P., Kofler, M., Szászi, K., y Kapus, A. (2016). Context-dependent switch in chemo/mechanotransduction via multilevel crosstalk among cytoskeleton-regulated MRTF and TAZ and TGF β -regulated Smad3. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11642>
- Sun, P., Zhang, G., Su, X., Jin, C., Yu, B., Yu, X., Lv, Z., Ma, H., Zhang, M., Wei, W., y Li, W. (2019). Maintenance of Primary Hepatocyte Functions In Vitro by Inhibiting Mechanical Tension-Induced YAP Activation. *Cell Reports*, 29(10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.128>
- Tamayo, L. y Bernal, J. (1998). Alteraciones visuales y auditivas de origen genético. (1998). Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Medicina, Instituto de Genética Humana.
- Thomasy, S. M., Raghunathan, V. K., Miyagi, H., Evashenk, A. T., Sermeno, J. C., Tripp, G. K., Morgan, J. T., & Murphy, C. J. (2018). Latrunculin B and substratum stiffness regulate corneal fibroblast to myofibroblast transformation. *Experimental eye research*, 170, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.02.003>
- Torres, R., Merayo-Llodes, J., Jaramillo, M. y Galvis, V. (2005). Biomecánica de la córnea. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 80(4), 215-223.
- Tse, J. R., y Engler, A. J. (2010). Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. In *Current Protocols in Cell Biology* (Issue SUPPL. 47). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1016s47>

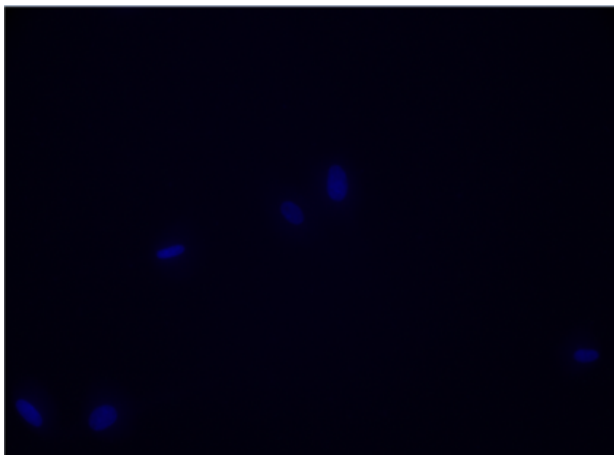
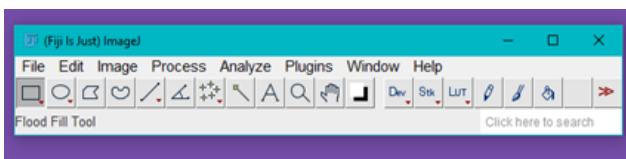
- Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, Rossant J, Wrana JL, 2010. El complejo Crumbs acopla la detección de densidad celular con el control dependiente de hipopótamo de la vía TGF-beta-SMAD . *desarrollo Celda* 19 , 831–844.
- Vázquez-Victorio G, Peto-Gutiérrez C, Díaz-Bello B, Cano-Jorge M, Pérez-Calixto D, Jiménez-Escobar A, et al. (2019). Building a microfluidic cell culture platform with stiffness control using Loctite 3525 glue. *Lab Chip*.19(20):3512–25.
- Velázquez, G. (2015). Fisiología corneal en usuarios de lentes de contacto. *Columna Internacional IACLE [Serie en Internet]*.
- Villa, C. y Santodomingo, J. (2010). La córnea parte I: Estructura, función y anatomía microscópica. *Gaceta Optica*, 454: 14-18.
- Volker F. Achterberg, Lara Buscemi, Heike Diekmann, Josiane Smith-Clerc, Helge Schwengler, Jean-Jacques Meister, Horst Wenck, Stefan Gallinat, Boris Hinz.(2014). The Nano-Scale Mechanical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Dermal Fibroblast Function. *Journal of Investigative Dermatology*, 134: 7, 1862-1872. ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1038/jid.2014.90>.
- Wallace HB, McKelvie J, Green CR, Misra SL. Corneal Curvature: the Influence of Corneal Accommodation and Biomechanics on Corneal Shape. *Transl Vis Sci Technol*. 2019 Jul 8;8(4):5. doi: 10.1167/tvst.8.4.5. PMID: 31316864; PMCID: PMC6615368.
- Xu, P., Londregan, A., Rich, C, Trinkaus, V. (2020). Changes in Epithelial and Stromal Corneal Stiffness Occur with Age and Obesity. *Bioengineering (Basel)*. 7;7(1):14. doi: 10.3390/bioengineering7010014. PMID: 32046198; PMCID: PMC7175307.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development*, 21(21), 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zhou, J., Aponte-Santamaría, C., Sturm, S., Bullerjahn, J. T., Bronowska, A., y Gräter, F. (2015). Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing. *PLoS Computational Biology*, 11(11).<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004593>

13. ANEXO

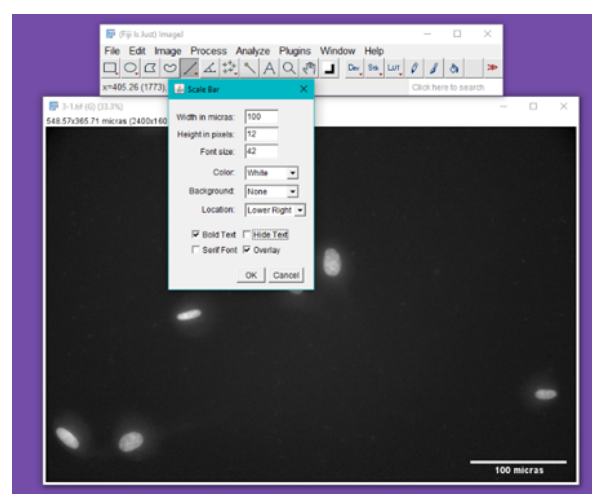
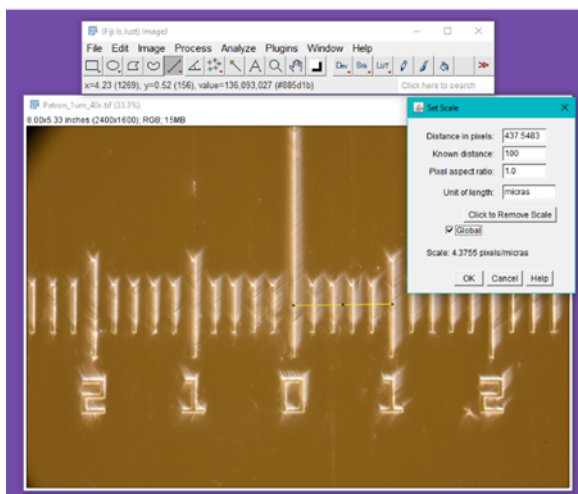
13.1 Cuantificación de área nuclear y esparcimiento

Pasos para realizar la cuantificación de núcleos con el programa ImageJ o FIJI

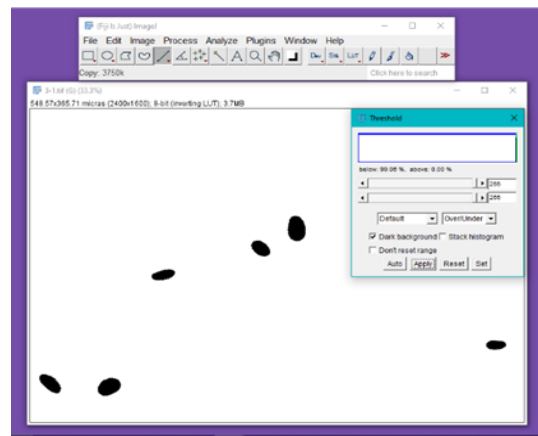
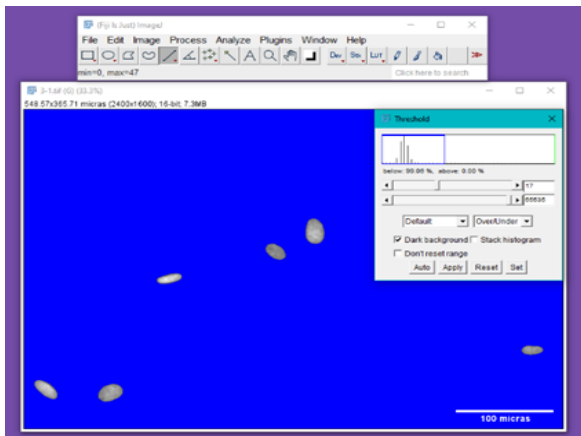
- 1.- Abrir la imagen. **File** → **Open**.
- 2.- Ajustar a escala de grises **Image** → **type** → **16 bits**
- 3.- Crear una copia de la imagen y trabajar sobre ella. **Control+ Shift + D**



- 4.- Ajustar barra de escala. **Abrir patrón (40x)** a medir 0->1 → **analyze** a **set scale**.
- 5.- Poner la escala en la imagen. **Analyze** → **tools** → **scale bar**

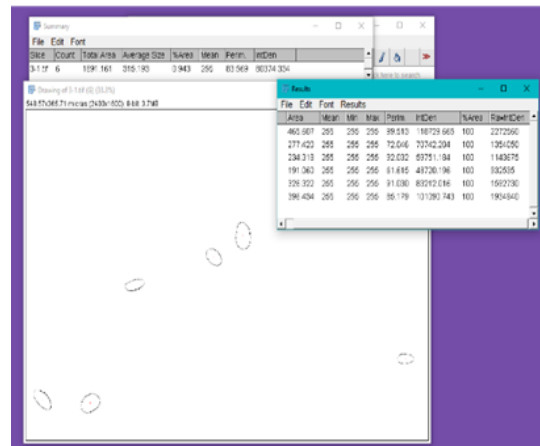
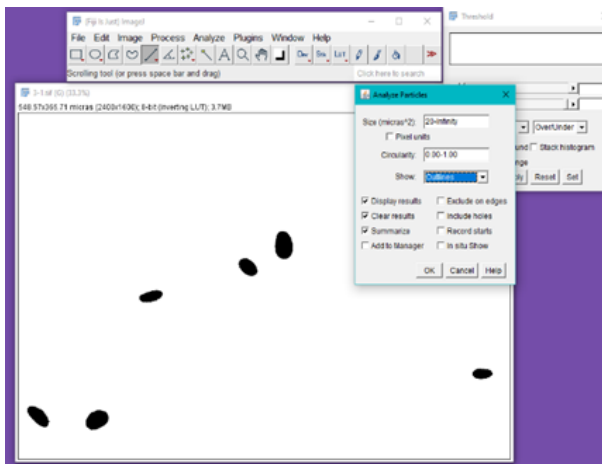


6.- Medición de áreas nucleares. **Image** → **adjust** → **Threshold**



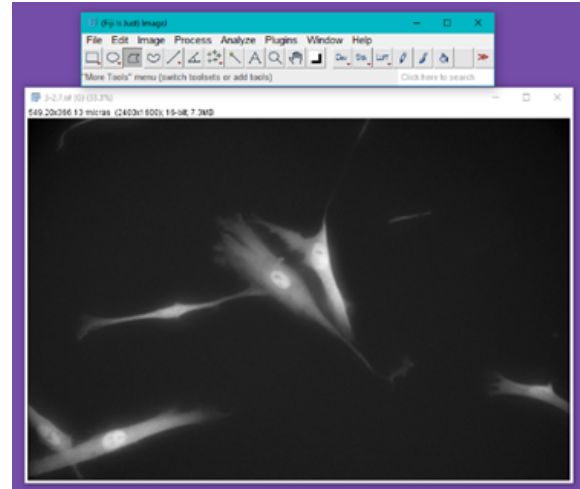
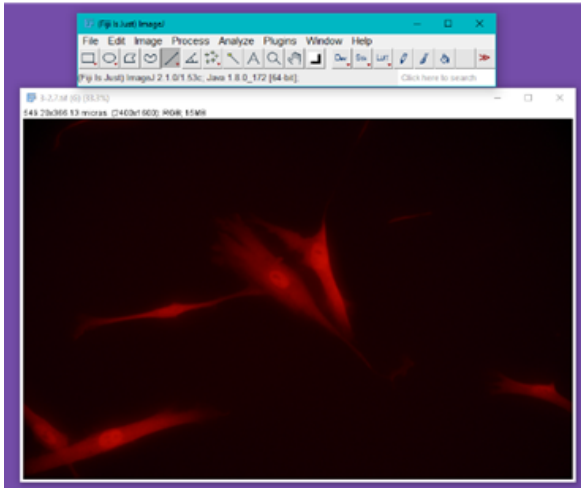
7.- Para separar núcleos. **Process** → **Binary** → **Watershed**.

8.- Medición de núcleos. **Analyze** → **Analyze particles**

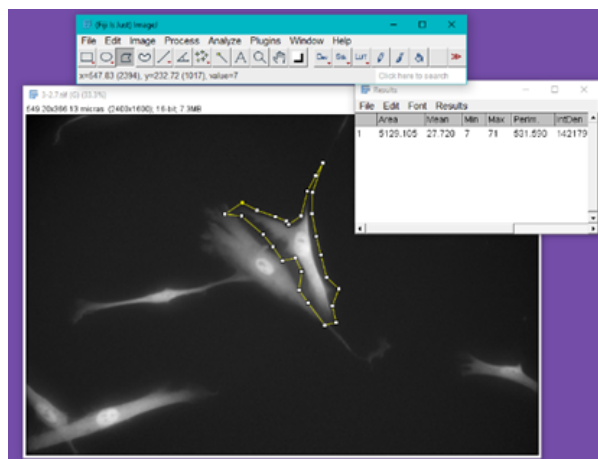


13. 2 Cuantificación área celular y excentricidad

- 1.- Abrir la imagen. **File** → **Open**
- 2.- Ajustar escala de grises. **Image** → **type** → **16 bits**

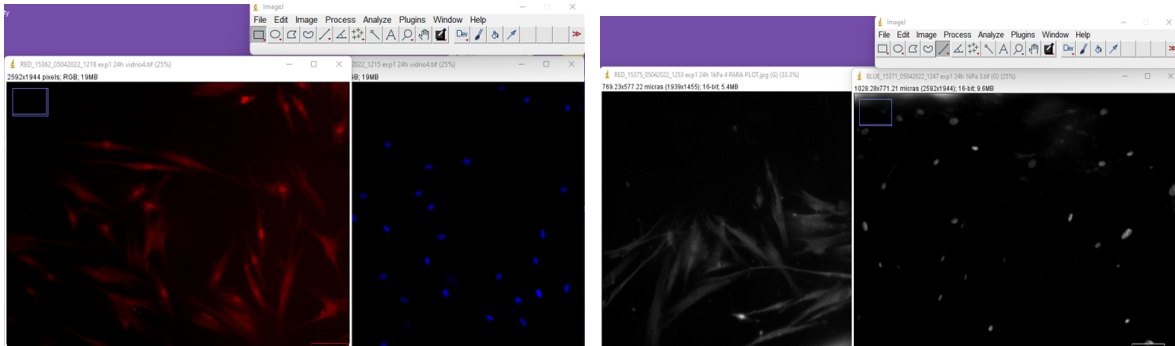


- 3.- Delimitar las células manualmente. **Polygon Freehand** → **Analyze** → **Measure**

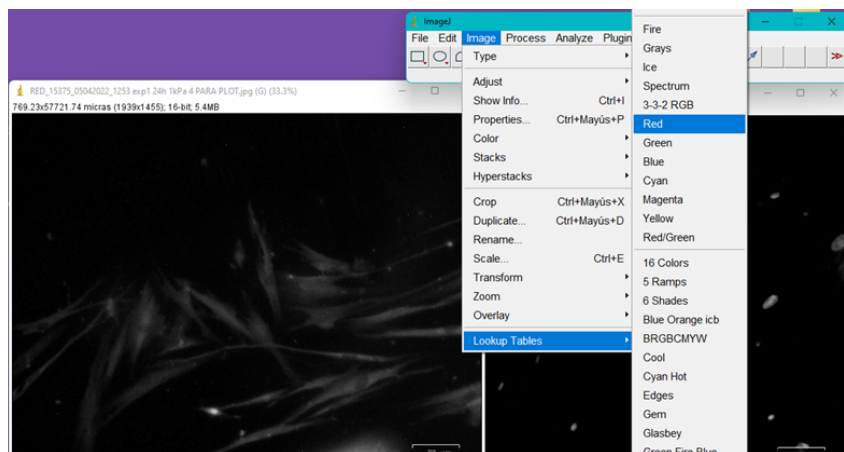


13.3 Trazado de Perfiles de señal

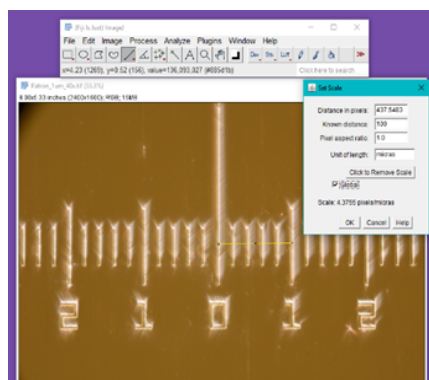
- 1.- Abrir la imagen. **File** → **Open**.
- 2.- Ajustar a escala de grises **Image** → **type** → **16 bits**



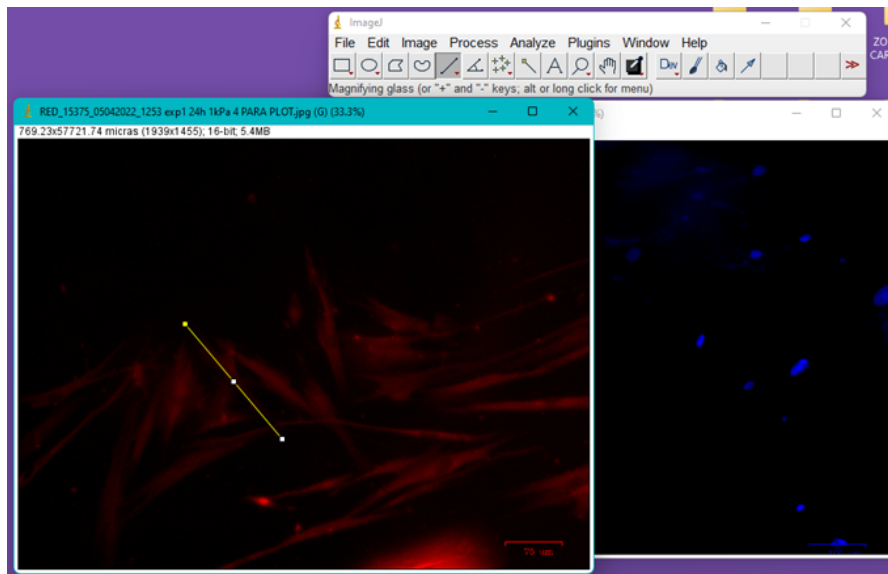
- 3.- Ponerle color para no confundirse en este caso para la marca de YAP (rojo) y para núcleos o DAPI (Cyan). **Image** → **Lookup tables** → **escoger color**



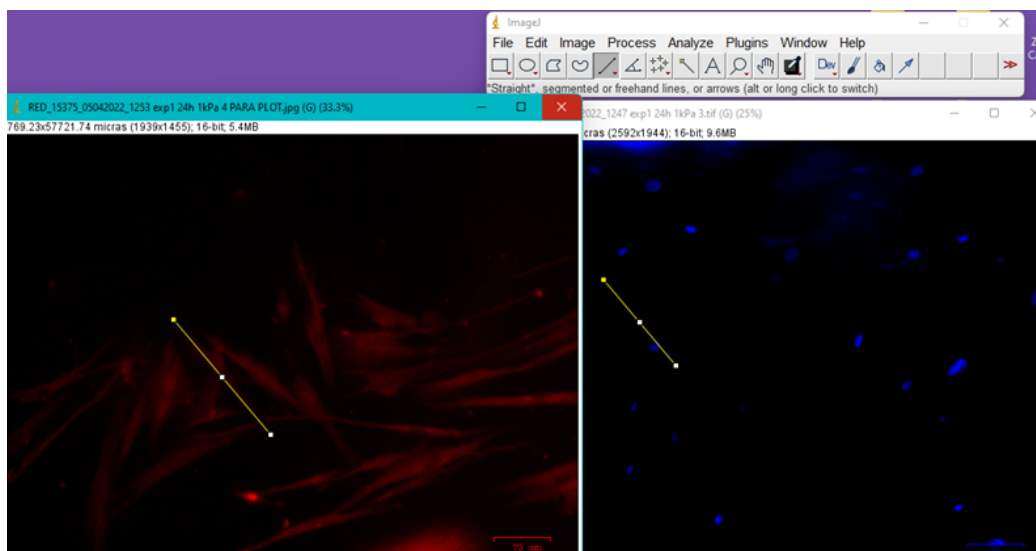
- 4.- Ajustar escala. **Abrir patrón** → **Medir 0->1** → **analyze** → **set scale**



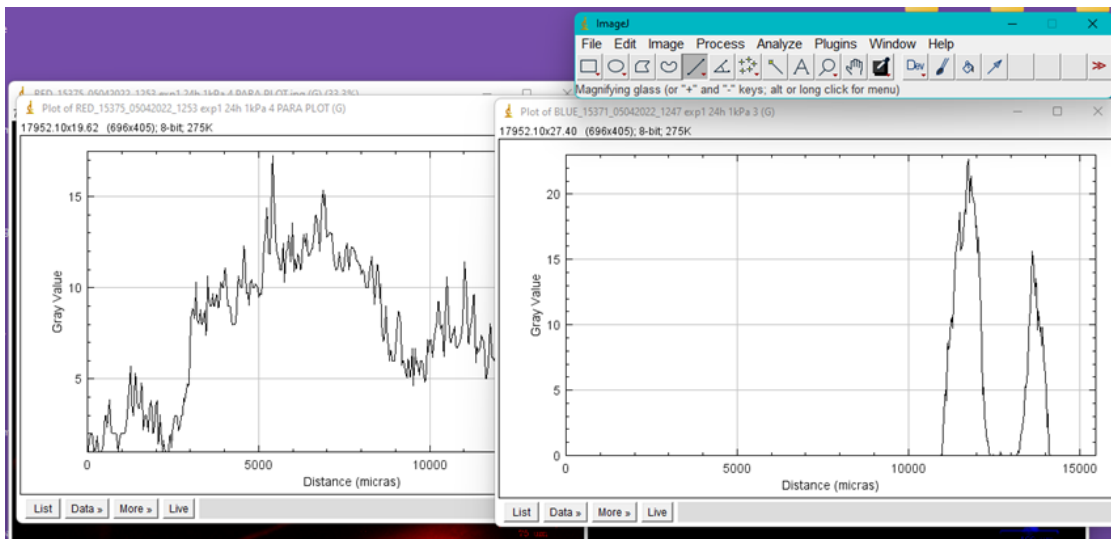
5.- Seleccionar lo que se quiere medir (Sobre la imagen donde está la marca de YAP se traza una línea en el eje mayor)



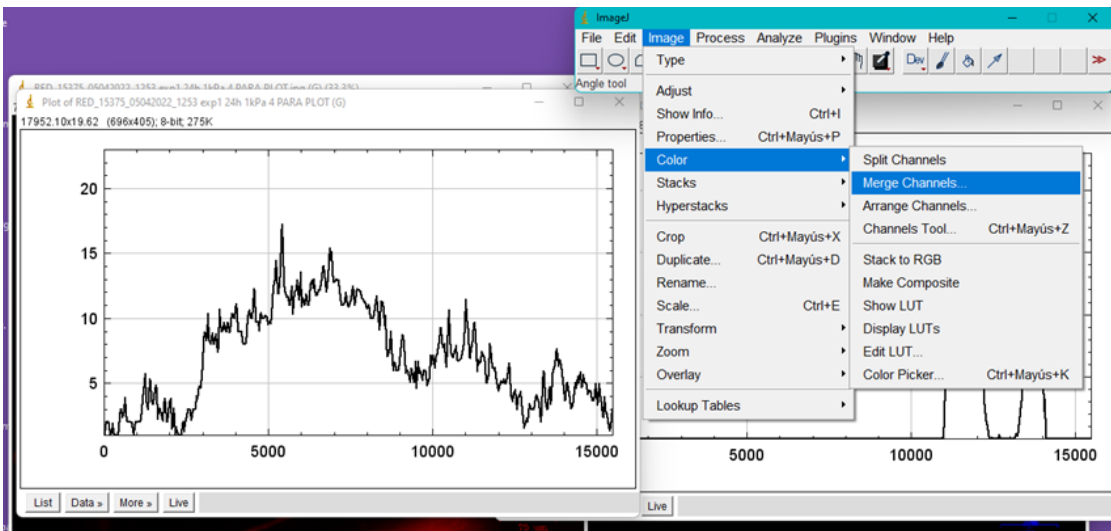
6.- En la imagen de DAPI con **Control+Shift+E** se marca lo mismo que se seleccionó en la imagen de YAP.



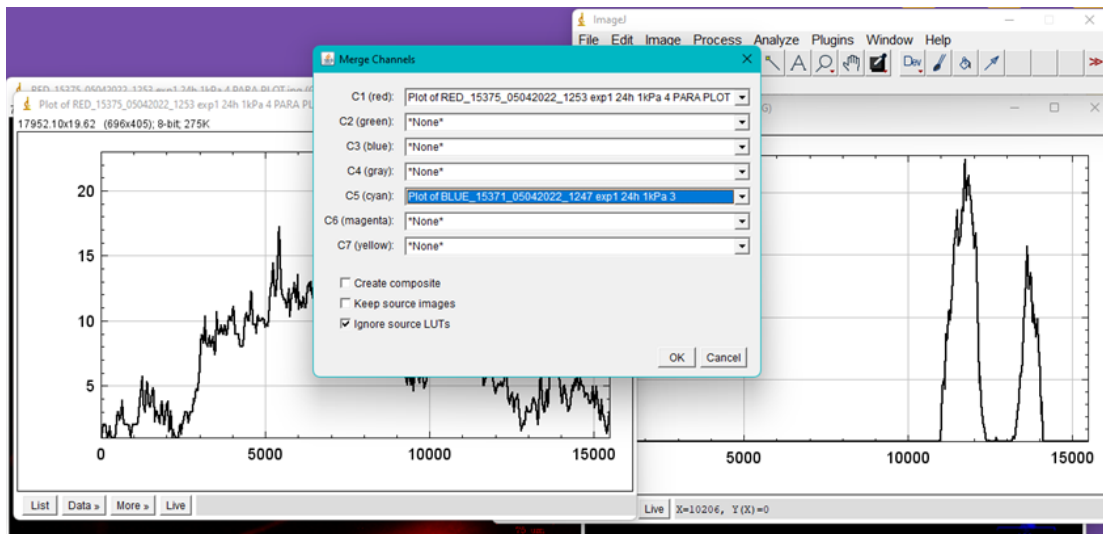
7.- Seleccionar una imagen (donde está la marca de YAP O DAPI) y poner **Control+K** y repetir lo mismo para la siguiente imagen.



8.- Realizar el merge de ambos plots: **Image** → **color** → **merge channels**



9.- Seleccionar el color para cada uno de los plots (se pueden hacer modificaciones de grosor, escala, letra, etc).



10.- Se obtiene el PLOT

