



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Estudio de la obesidad inducida por la dieta sobre el
desarrollo de la dieta en un modelo de ojo seco
experimental

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

L I C E N C I A D O E N O P T O M E T R Í A

P R E S E N T A

EVELIN GRISEL MORALES BASILIO

Director de tesis: Dr. José Luis Reyes Hernández

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019.





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.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1-RESUMEN.....	2
2-INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Anatomía del globo ocular.....	4
2.2 La superficie ocular	5
2.3 Fisiología de la película lagrimal	8
2.4 Antecedentes históricos de la enfermedad de Ojo seco (OS).....	11
2.5 Epidemiología de la enfermedad de OS.....	12
2.6 Definición de Ojo seco.....	13
2.7 Patología de Ojo seco.....	14
2.8 Origen y factores de riesgo.....	15
2.9 Inmunoregulación: Tejido linfóide asociado a ojo (EALT).....	17
2.10 Inmunopatología de Ojo seco.....	18
2.11 Diagnóstico, tratamiento e impacto en la calidad de vida.....	21
2.12 Tratamiento.....	23
2.13 Definición de Obesidad.....	23
2.14 La obesidad como un factor ambiental	24
2.15 El desarrollo de la obesidad y respuesta inmune.....	24
3-JUSTIFICACIÓN.....	27
4- HIPÓTESIS	28
5-OBJETIVO PRINCIPAL.....	29

6- OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
7-MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
7.1 Inducción de Obesidad	30
7.2 Estandarización de técnicas para evaluar OS.....	30
7.3 Inducción y evaluación del cuadro clínico de Ojo Seco.....	30
7.4 Cuantificación de volumen lagrimal por la técnica Schirmer.....	31
7.5 Análisis del patrón de mucinas mediante la técnica de Ferning.....	31
7.6 Cuantificación de células caliciformes.....	32
7.7 Recolección de tejidos.....	32
7.8 Cuantificación de citocinas POR ELISA sándwich.....	33
7.9 Cultivo celular de bazo.....	34
7.10 Citometría de Flujo.....	35
8-RESULTADOS.....	36
9-DISCUSIÓN.....	65
10-CONCLUSIÓN.....	71
11-PERSPECTIVAS.....	73
12-APÉNDICE.....	75
13-BIBLIOGRAFÍA	75

ABREVIATURAS

OS - Ojo seco

CALT – (Conjunctiva associated lymphoid tissue) – Tejido linfoide asociado a conjuntiva

LDALT – (Lacrimal drainage associated lymphoid tissue) - Tejido linfoide asociado a glándula lagrimal

EALT – (Eye associated lymphoid tissue) – Tejido linfoide asociado a ojo

IL – Interleucina

TNF α – (Tumor necrosis factor alpha) – Factor de necrosis tumoral alfa

IFN γ - Interferon gamma

TGF β – (Transforming growth factor beta) – factor transformante beta

VEGF – (Vascular Endothelial Growth Factor) – Factor de crecimiento endotelial vascular

IL-RA - Receptor antagonista de interleucina 1

APC – (Antigen presenting cell) – Célula presentadora de antígeno

CD – Celulas dendríticas

TA – Tejido adiposo

HFD – (High fat diet) – Dieta alta en grasa

SC – (Standart chow) – Dieta standart

ConA – Concanavalina A

Th1 – (T helper 1) – Células cooperadoras tipo 1

Th17 – (T helper 17) – Células cooperadoras tipo 17

Ig - Inmunoglobulina

1- RESUMEN

Ojo seco es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular caracterizada por la desestabilización de la película lagrimal y aumento de la osmolaridad. La polarización de respuestas tipo Th1 y Th17 en el ganglio cervical son características del proceso inflamatorio, la participación del bazo no ha sido asociada con este padecimiento. OS es un signo característico de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, no obstante, la relación con obesidad no ha sido descrita. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo conocer los cambios en la respuesta inmunológica y su asociación con los signos clínicos, antes y durante el desarrollo de obesidad por el consumo de una dieta alta en grasas comparado con una dieta estándar en un modelo de OS experimental de 10 días.

Ratones machos de 7-8 semanas de la cepa C57BL/6 y BALB/c fueron alimentados durante 10 semanas, se observó que sorprendentemente la cepa C57BL/6 HFD que genero mayor cantidad de TA, parece ser más resistente al desarrollo de los signos clínicos durante el modelo, comparado con los grupos de la cepa BALB/c. La participación de poblaciones celulares como neutrófilos mostraron asociación con signos clínicos de OS atenuados. Por otra parte, una mayor concentración de IL-13 e IL-15 así como altos porcentajes de CD8⁺ parecen ser patogénicos, pues fueron evidentes en los grupos que desarrollaron de manera más grave la enfermedad, el papel de los macrófagos demostró ser importante para el desarrollo de OS ya que adquieren el marcador de migración CCR5, sin embargo, este trabajo no permitió conocer el lugar donde llegaron a ejercer su función efectora.

Posteriormente, se planteó la pregunta, si el efecto benéfico en la cepa C57BL/6 era dependiente del consumo, similar a un suplemento alimenticio. El experimento realizado para este fin demostró que es dependiente de un consumo por tiempo prolongado.

Por lo que, al alimentar a la misma cepa por 15 semanas, se esperaba un efecto similar al observado por 10 semanas, sin embargo, ambos grupos mostraron

signos clínicos similares lo que se asoció a la posible inflamación generada por HFD debido al desarrollo de hepatomegalia y principios de esteatosis hepática que fueron evidentes en este grupo.

Las similitudes de los signos clínicos con las poblaciones celulares demuestran que el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ son similares en ambos grupos, además que la participación de neutrófilos demostró ya no tener una relación con los signos de la enfermedad, lo que indicó que en este punto ya no son capaces de modular una respuesta inmunológica, la participación de macrófagos capaces de migrar aun es relevante por lo que es imperativo el seguimiento de esta población en futuros estudios.

En resumen, este trabajo demuestra la importancia del bazo en eventos de la respuesta inmune en la superficie ocular, la participación de poblaciones celulares como CD8, neutrófilos y macrófagos en OS, así como el posible papel patogénico de IL-13. Lo que implica generar estudios especializados en estas moléculas para enfocar posibles blancos terapéuticos.

2- INTRODUCCIÓN

2.1 Anatomía del globo ocular

El globo ocular está compuesto de diversos tejidos, los cuales tienen como función principal generar impulsos eléctricos, mismos que son conducidos a la corteza cerebral por fibras nerviosas con el fin de interpretar y formar una imagen visual. Para que esta función se lleve a cabo de manera exitosa la luz del exterior debe pasar por una serie de tejidos transparentes, la luz es capaz de estimular las células fotosensibles de la retina encargadas de comenzar la respuesta nerviosa. Parte crucial es la adecuada ubicación de los tejidos, con el fin de entender la anatomía ocular, podemos seccionar al ojo en tres porciones: anterior, media y posterior; donde cada sección tiene una función única, diferente y esencial para la una correcta formación de impulsos neurosensoriales (ver Tabla 1). Por lo tanto, los tejidos del globo ocular cumplen una función refringente, neurosensorial y de tolerancia inmunológica.

UBICACIÓN	TEJIDOS
ANTERIOR	También conocida como superficie ocular Conjuntiva, córnea, párpados. (Glándulas de Meibomio, glándulas de Zeis, glándulas de Krause, células caliciformes y glándulas de Wolfring).
MEDIA	Humor acuoso, iris, cristalino, procesos ciliares, cuerpo ciliar, zónulas, canal de Schlemm y porción de esclera media.
POSTERIOR	Humor vítreo, retina, coroides, porción anterior de nervio óptico y porción de esclera posterior.

Tabla 1. Descripción de las 3 principales divisiones del globo ocular.

2.2 La superficie ocular

La superficie ocular, se encuentra en la porción anterior del globo ocular la cual, al estar en constante contacto con el medio exterior, posee diferentes tipos células y glándulas que forman una barrera física para preservar su integridad.

La superficie ocular tiene un papel esencial en la formación de la imagen visual ya que alberga en la porción apical a la córnea, la cual tiene la capacidad de refractar alrededor de 2/3 partes de luz que entran al globo ocular¹ gracias a su transparencia. Las diferentes estructuras que conforman la superficie ocular tiene un papel importante, ya que cada una cuenta con células altamente especializadas, las cuales se describen a continuación:

Córnea

La córnea es un tejido transparente, a-vascular que actúa como una barrera protectora, se encuentra en contacto con la película lagrimal y en ratones constituye alrededor de 2/3 partes del globo y en humanos tiene un diámetro de 11-12 mm horizontal con 9-11 mm vertical.

Consta de las siguientes capas¹:

Epitelio corneal: formado por aproximadamente 5-7 capas de células, se compone de células superficiales, aladas y basales, esta última capa es la única con actividad mitótica. Entre las células del sistema inmune residentes en este tejido podemos encontrar abundantes células dendríticas. Para formar una barrera semi-permeable en la región lateral cada célula contiene uniones estrechas, adherentes y gap.

Las células del epitelio corneal contienen microvellosidades en su parte apical, las cuales se unen a la porción mucínica de la lágrima para poder recibir la

humectación e hidratación adecuada. El epitelio corneal sufre una renovación celular aproximadamente cada 7-10 días mediante descamación o involución.

Capa de Bowman: compuesta por diferentes tipos de colágeno como tipo I y V entre otros, sin embargo, no tiene la capacidad de regeneración, puesto que es una membrana que proviene del estroma anterior, su función es de soporte.

Estroma: formada principalmente por tipos de colágeno I, VI, XII, matriz extracelular, queratinocitos y proteoglicanos, por la correcta posición de las fibras de colágenos y matriz extracelular le dan a la córnea la característica de transparencia.

Membrana de Descemet: Membrana diferenciada del endotelio corneal en la etapa embrionario y posnatal. Esta membrana está formada principalmente colágena tipo IV.

Endotelio: monocapa más profunda que controla el contenido de agua que entra y sale del estroma. Las células de la capa endotelial también regulan la permeabilidad mediante la presencia de uniones estrechas y tipo gap. También en su porción lateral se lleva a cabo el transporte celular por medio de enzimas como: bombas de Na^+ y K^+ así como ATPasa y anhidrasa carbónica, estas vías son esenciales ya que de ellas depende el flujo neto de iones que se mueven entre humor acuoso y estroma.

La córnea es el tejido con más terminaciones nerviosas del cuerpo. Su inervación es por el nervio trigémino en su rama naso-ciliar, las cuales se insertan en el estroma dando lugar a una malla plexiforme la cual perfora la capa de Bowman formando un plexo debajo de las células epiteliales basales.²

Conjuntiva

La conjuntiva es un tejido formado por dos capas de gran importancia pues albergan diferentes tipos de células que cumplen funciones como tolerancia inmunológica. Además, en este tejido residen otros tipos celulares (células caliciformes) que contribuyen con la secreción de mucinas que son importantes para la correcta formación de la película lagrimal¹.

Epitelio conjuntival: compuesto por aproximadamente 3-5 capas de epitelio columnar escamoso estratificado no queratinizado, de manera intercalada se encuentran células caliciformes. Otros componentes incluyen vasos sanguíneos, tejido fibroso, canales linfáticos, glándulas accesorias como Wolfring y de Krause³, melanocitos, linfocitos T y B, así como células dendríticas.⁴

Lamina propia: también conocida como submucosa conjuntival, en esta capa se encuentran la mayoría de las células del sistema inmune como son linfocitos, neutrófilos, mastocitos, células plasmáticas así como las glándulas accesorias de Krause localizadas en el fórnix superior e inferior las cuales secretan una pequeña porción de la mucina que compone a la película lagrimal.⁴ Cuenta con suministro sanguíneo a partir de las arterias ciliares anteriores, la arcada tarsal posterior y la arcada sanguínea laterales. En las arterias ciliares anteriores provienen de la arteria oftálmica que a su vez es derivada de la arteria carótida.

Enfermedades como anemia falciforme, diabetes tipo 2, hipertensión, oclusión de la arteria carótida y leptospirosis generan repercusiones en la conjuntiva, por lo cual no es descabellado pensar que otras enfermedades inflamatorias sistémicas repercutan en la en superficie ocular.⁴

2.3 Fisiología de la película lagrimal

La película es un fluido de aproximadamente 3µm con una concentración total de proteínas de 6-10mg/ml⁵ (alrededor de 1800 proteínas y péptidos diferentes)⁶, se encuentra distribuida en cara apical del epitelio conjuntival y corneal.

Su secreción puede ser aumentada en respuesta a diferentes estímulos como disminución de la humedad, aumento de la luz que incide en el ojo, frío, estimulación mecánica, daño físico y daño por microorganismos.

Sirve como una interface entre el ambiente externo y la superficie ocular. Estas funciones se pueden llevar a cabo gracias a que la película lagrimal consta de 3 diferentes capas homogenizadas y distribuidas por toda la superficie.

La capa lipídica, acuosa y mucínica⁷ forman la película lagrimal, cada capa secretada por diferentes glándulas y células, que por consecuente su composición molecular difiere entre sí, sin embargo en conjunto son capaces de potenciar una respuesta a estímulos de daño o estrés en la superficie ocular (ver tabla 2.)

CAPA	ORIGEN, FUNCIÓN, COMPOSICIÓN.
LIPÍDICA	<p><u>Origen:</u> Glándulas de Meibomio</p> <p>Espesor: 0.015-0.16μm^8</p> <p><u>Función:</u> Evita la evaporación de la lagrima, al ser la capa más externa que se encuentra en contacto con el ambiente.</p> <p><u>Composición:</u> Esteres de colesterol, ceras de colesterol, ácidos grasos O-acyl-omega, colesterol libre, triglicéridos y ceramidas.⁹</p>
ACUOSA	<p><u>Origen:</u> Glándula lagrimal, glándulas de Krause y glándulas de Wolfring.</p> <p>Espesor: 4μm^8</p> <p><u>Función:</u> Capa intermedia la cual contiene inmunoglobulina A (IgA) que ayuda en la defensa de la superficie, ayuda al esparcimiento de la película lagrimal después del parpadeo, genera actividad antimicrobiana por las moléculas que contiene, se secreta un total de 1.2μl por minuto⁸</p> <p><u>Composición:</u> Lactoferrina, lipocalina, lisozima, SIgA, peroxidasa, fosfolipasa, defensinas, TGFα (por sus siglas en inglés transforming growth factor alpha), TGFβ (por sus siglas en inglés transforming growth factor beta), FGF (por sus siglas en inglés fibroblast growth factor), HGF (por sus siglas en inglés hepatocyte growth factor), PDGF (por sus siglas en inglés platelet derived growth factor), retinol y lactrina.¹⁰</p>
MUCÍNICA	<p><u>Origen:</u> Células caliciformes</p> <p>Espesor: 2.5-5μm^8</p> <p><u>Función:</u> Capa más interna ayuda a prevenir la adherencia de microorganismos a las células epiteliales de córnea y conjuntiva así como generar una superficie regular en toda la córnea¹⁰.</p> <p><u>Composición:</u> TGFβ, MUC 1, 2, 4, 5AC, 7.</p> <p>Metabolitos: Hormonas moléculas de señalización, cisteínas, ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tirosina, vitamina D, sodio, potasio, bicarbonato, calcio, glucosa^{11 12}.</p>

Tabla 2. Descripción de los principales compuestos encontrados en las diferentes capas de la película lagrimal.

Por otra parte, en la última década la presencia de mucinas ha cobrado gran importancia pues se encuentran en todos los tejidos cubiertos por mucosa, participando en funciones esenciales como lubricación, protección epitelial y regulación inmunológica, en la superficie ocular se han identificado tres tipos de glicoproteínas: formadoras de gel, solubles y transmembranales (ver tabla 3)¹³.

MUCINA	TIPO	UBICACION
MUC1	Unidas a membrana	Película lagrimal, epitelio conjuntival y corneal, glándula lagrimal.
MUC2	Formadora de gel	Película lagrimal, epitelio conjuntival, células goblet.
MUC3	Transmembranal	
MUC4	Transmembranal	Película lagrimal, epitelio conjuntival, células goblet.
MUC5AC	Formadora de gel	Película lagrimal, epitelio conjuntival, células goblet
MUC5B	Formadora de gel	Glándula lagrimal, células goblet.
MUC6	Formadora de gel	
MUC7	Soluble	Película lagrimal, epitelio conjuntival, glándula lagrimal.
MUC8	Sin clasificación	
MUC9	Soluble	Glándula lagrimal.
MUC11	Sin clasificación	
MUC12	Transmembranal	

Tabla 3. Se describen brevemente las mucinas más relevantes hasta ahora descritas en la superficie ocular.

La relevancia actual es que estas mucinas pueden ser utilizadas incluso como marcadores de diferentes enfermedades, incluyendo algunos tipos de neoplasias. Aun cuando la lágrima es un fluido capaz de generar la homeostasis en la superficie ocular, existe la posibilidad que la cantidad y calidad de la misma disminuya, en respuesta a diferentes fenómenos como humedad, constante exposición al aire acondicionado, lo que provocan signos y síntomas de malestar ocular. A este proceso se le conoce como enfermedad de ojo seco.

2.4 Antecedentes históricos de la enfermedad de Ojo seco (OS)

Históricamente la enfermedad se conocía por el nombre de Keratonjuntivitis Sicca atribuido por el suizo Herik SC Sjögren el cual lo consideraba como un signo de la triada para el diagnóstico de la enfermedad de Sjörgen.¹⁴ El cambio en el nombre de la enfermedad se produjo cuando Andrew De Roetth en 1950 propuso el nombre “Ojo Seco”¹⁵ desde ese momento diversos autores se refirieron así a la enfermedad, el termino prevalece hasta la actualidad.

Sin embargo en 1993 el Instituto Nacional del Ojo (National Eye Institute) una organización encargada promover el cuidado de la salud visual en Estados Unidos, realizó un trabajo formal definiendo a ojo seco como un “trastorno” de la película lagrimal por deficiencia o excesiva evaporación, lo que produce un daño en la superficie ocular interpalpebral lo cual se asocia a síntomas de discomfort.¹⁶ La finalidad del trabajo fue por la necesidad de definir los aspectos que englobaba en ese entonces “síndrome de ojo seco” para poder asumir un manejo clínico adecuado ya que uno de los mayores retos históricos de los estudios epidemiológicos es la ausencia de una adecuada estandarización de la definición de la enfermedad y su clasificación¹⁷.

Las organizaciones como TFOS, DEWS (por sus siglas en inglés Dry Eye Work Shop) encaminadas a actualizar al clínico para mejorar la atención a la población y desarrollo de nuevos tratamientos diferentes a los paliativos hasta ese momento existentes, decidieron en el 2007 reconsiderar la definición de ojo seco por el importante papel que se le encontró a la hiperosmolaridad e inflamación en el

desarrollo de la inmunopatología de ojo seco ya que por muchas décadas la enfermedad fue limitada a definirse como una deficiencia en la capa acuosa de la película lagrimal que provocaba resequedad ocular. Así mismo en el reporte se elaboró una nueva clasificación por etiología, mecanismo y severidad de la enfermedad

No obstante, las mismas organizaciones (DEWS, TFOS) siguieron evaluando los nuevos avances científicos enfocados a la enfermedad y fue así que en el año 2017 se redefinió la enfermedad ya que suficientes reportes mostraron evidencia del daño neurosensorial que provoca la enfermedad en la superficie ocular muy específicamente en cornea, generando así la definición que se menciona más adelante.

Cada uno de los cambios en la definición de ojo seco ha sido generada para impartir nuevas estrategias de información a la población y educadores los cuales son encargados de cuidar la salud visual en pro de mejorar los diagnósticos y tratamientos a pacientes que sufren la enfermedad.

2.5 Epidemiología de la enfermedad de OS

Actualmente no existen datos epidemiológicos certeros a cerca del porcentaje de población mexicana que padece ojo seco, esto debido a que los pequeños estudios que se realizan con este fin difieren en los criterios de inclusión, como son región, raza, edad, sexo, etc. Existen aproximaciones estadísticas donde se menciona que alrededor de 0.1-33% de la población mundial padece ojo seco, donde se ha observado que las personas con mayor edad son más susceptibles.¹⁸

También existen estudios estadísticos sobre la prevalencia de la enfermedad de ojo seco en países como Australia (7.4%)¹⁹, China (33.7%)²⁰, Canadá (25%)²¹ y Japón (33%)²², así estos estudios enfatizan que el porcentaje reportado depende de cómo se realiza el diagnóstico de la enfermedad, la severidad, población estudiada así como los factores de riesgo asociados.

Por otra parte existen estudios como el de O'Brien PD, quien menciona que aproximadamente el 25% de pacientes que acuden a consulta para evaluación visual reporta síntomas de ojo seco colocándose como un problema de salud pública y posicionando a la enfermedad como una de las condiciones más comunes de practicantes enfocados a la salud visual.²³

En 1984 Fox RI *et al*²⁴, expone que la prevalencia de ojo seco aumenta en pacientes con enfermedades autoinmunes, enfermedades que tienen una prevalencia de 19.1 +/- 43.1% aproximadamente de la población mundial²⁵, la cual en su mayoría son mujeres.

En 2003 Schaumberg DA *et al*, realizaron un estudio epidemiológico sobre la prevalencia de ojo seco sintomático entre hombres y mujeres de E.U, donde encontraron que la prevalencia es de 7% en mujeres (3.2 millones) y 4% (1.05 millones) en hombres mayores de 50 años²⁶ es importante recalcar que el reporte evidencia los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad así mismo se une a los pequeños estudios estadísticos realizados donde los resultados exponen que el sexo femenino tiene mayor prevalencia de la enfermedad en comparación a hombres²⁷.

En México, según la página de CONRICyt, menciona que, en un estudio estadístico realizado en el Instituto Nacional del Conde de Valenciana importante en la Ciudad de México por brindar atención oftalmológica y optométrica, nueve de cada diez pacientes que atienden padecen ojo seco.

2.6 Definición de Ojo Seco

La definición actualizada se realizó con el nuevo conocimiento generado en los últimos años y con más especialistas involucrados en el área, dicha investigación marcó el preámbulo para mejorar la clasificación de la enfermedad en base a la etiopatogenia, mecanismo y la gravedad, con la finalidad de ayudar a la práctica e investigación clínica. La nueva definición surgió como una necesidad de incluir todas las características que se descubrieron;

“El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por la pérdida de homeostasis de la película lagrimal, acompañada de síntomas oculares, en los que la inestabilidad de la película lagrimal, la hiperosmolaridad, inflamación, daño de la superficie ocular y las anomalías neurosensoriales desempeñan papeles etiológicos.”²⁸

2.7 Patología de Ojo Seco

La enfermedad de ojo seco es reconocida como un trastorno de la Unidad funcional lagrimal LFU (LFU por sus siglas en inglés lacrimal functional unity) la cual se encuentra integrada por glándulas lagrimales, superficie ocular (córnea, conjuntiva, glándulas de meibomio), párpados, nervios sensoriales y motores.²⁸ La unidad controla los principales componentes de la película lagrimal de una forma regulada respondiendo a las repercusiones que el medio ambiente externo, interno, envejecimiento, baja frecuencia del parpadeo entre otros puedan generar estrés en la superficie ocular; gracias a que los tejidos antes mencionados constan de un componente neural/inmunológico, en conjunto son capaces de mantener y generar una película lagrimal pre-corneal estable²⁸.

La estabilidad de la LFU y película lagrimal es vital para mantener la transparencia de la córnea, puesto que este tejido es capaz de captar el oxígeno a través de la película lagrimal para poder llevar a cabo el metabolismo ideal que le otorga la característica principal que es la transparencia en sus fibras de colágena.

Por lo tanto, una buena retroalimentación entre cornea y película lagrimal se traduce en una buena calidad visual del individuo. Cabe destacar que la estabilidad de la película lagrimal es un sello distintivo de un ojo sano. Entonces cuando existe un fallo o daño en cualquier tejido que compone a la LFU (nervios sensoriales aferentes, motores eferentes, o glándulas secretoras de lagrime) se produce la desestabilización de la película lagrimal generando condiciones que promueven la enfermedad de ojo seco²⁸, donde la inflamación de la superficie ocular se presenta como una consecuencia de los procesos desencadenados.

La enfermedad se caracteriza por los siguientes signos y síntomas:

SIGNOS	SÍNTOMAS
Inflamación en la superficie ocular.	Sensación de cuerpo extraño.
Hiperosmolaridad.	Visión borrosa.
Secreción de lagrimal refleja al inicio del cuadro clínico.	Fatiga ocular.
Irritación ocular.	Sensación de resequedad.
Hiperemia.	
Disfunción secretora crónica.	
Daño epitelial y conjuntival.	
Disminución de la sensación corneal con posible afección en la respuesta refleja.	
Pérdida de la transparencia corneal en cuadro clínico severo. ²⁹	

Tabla 4. Lista de los signos y síntomas de OS

La tabla anterior se enfoca a los signos y síntomas que comparten los diferentes tipos de ojo seco, sin embargo, las moléculas que median el daño en las diversas etiologías son diferentes, por lo que se ha reportado en diversas publicaciones que el aumento de la osmolaridad en la lagrime es un sello distintivo de ojo seco y parece ser el mecanismo central en la patogénesis del daño en la enfermedad, actualmente se usa como un marcador de ojo seco.³⁰

2.8 Origen y factores de riesgo

Existen diversas causas de la enfermedad, las cuales resultan a partir de dos etiologías principales; ojo seco evaporativo y ojo seco acuodeficiente la

diferenciación de ambas etiologías marco la pauta para la sub-clasificación de la enfermedad donde se encuentran; enfermedad de ojo seco asociado a Sjörgen, asociado a deficiencias de glándulas lagrimales, hiposecreción refleja, afecciones en la apertura palpebral, uso de lente de contacto y conjuntivitis alérgica, etc.

En el siguiente esquema se observa la clasificación actual más aceptada de la enfermedad, cabe destacar que el modelo de ojo seco experimental que se utilizó en esta investigación es ojo seco acuodeficiente no asociado a síndrome de Sjörgen.



Figura 1. Categorización de la enfermedad de OS. Tomado de Lemp, M. A., Baudouin, C., Baum, J., Dogru, M., Foulks, G. N., Kinoshita, S., ... & Rolando, M. (2007). The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocular Surface*, 5(2), 75-92, traducción anónima.

2.9 Inmunoregulación: Tejido linfoide asociado a ojo (EALT)

La superficie ocular también necesita un sistema de protección al estar en contacto con el ambiente la cual se conoce como EALT (por sus siglas en ingles Tejido Linfoide Asociado a Ojo) el cual deriva de MALT (por sus siglas en ingles Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) MALT es el tipo de tejido linfoide secundario que se encuentra en lugares como son conjuntiva, pulmones e intestino; puede distribuirse de manera específica o difusa.

En el caso particular del globo ocular, cuenta con tejido difuso donde se encuentran poblaciones de linfocitos y leucocitos distribuidos en la glándula lagrimal (Tejido Linfoide Asociado a la Glándula Lagrimal), conjuntiva (CALT, Tejido linfoide Asociado a Conjuntiva) y sistema de drenaje (LDALT Tejido Linfoide Asociado a Drenaje Lagrimal), en conjunto estos tres sistemas conforman EALT (ver Figura 3).

Entre las características más importantes de EALT se encuentra, la presencia de células linfoides residentes, por lo cual no tiene un fenotipo inflamatorio al contrario participan en la protección y regulación en respuesta a un reto.

Sin embargo, ahora se conoce que en la lámina propia de la conjuntiva existen numerosos vasos sanguíneos (vénulas grandes endoteliales³¹) que participan en la migración regulada de células linfoides (recirculación) pues expresan diferentes moléculas asociadas a la migración y adhesión leucocitaria.

La protección de EALT también incluye a la córnea, ya que al cerrar los ojos o en vigilia se encuentra en contacto directo con la mucosa de la conjuntiva tarsal.

Entre las poblaciones presentes en EALT que mantienen la tolerancia característica de la superficie ocular en condiciones normales se encuentran linfocitos CD4⁺, CD8⁺ supresoras, linfocitos $\gamma\delta$, células NKT (por sus siglas en inglés T cells natural killer) y linfocitos intraepiteliales.

Se ha identificado a linfocitos T CD8⁺ como la población más abundante en el epitelio conjuntival sin embargo tienen un papel supresor lo cual es importante

para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Por el contrario, la población de linfocitos T CD4⁺ se localiza en la lámina propia de conjuntiva.

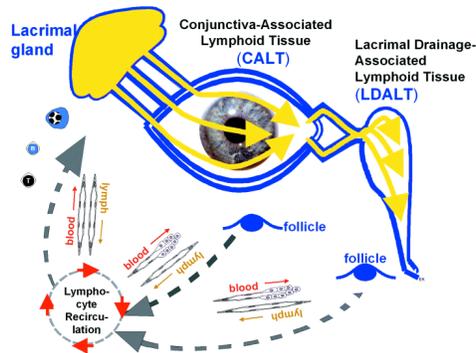


Figura 2. Descripción de la organización del tejido linfoide asociado a ojo. Tomado de Knop, E., & Knop, N. (2005). The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *Journal of anatomy*, 206(3), 271-285.

Una población con menor proporción son células plasmáticas quienes son productoras de IgA, así como la presencia de IL-6 parece tener un papel crucial en la inmunoregulación ocular sin embargo en la patología de ojo seco mantiene la respuesta Th1 (por sus siglas en inglés T helper type 1) en la superficie.

Moléculas como como VIP (por sus siglas en inglés vasointestinal peptide- péptido vasointestinal) que es secretado por terminaciones nerviosas corneales^{32 33} induce un papel protector al expresar TGF β (Factor transformante beta) e IL-10 (interlucina 10) induciendo un fenotipo Tregs (T reguladoras)³³, (fenotipo importante en la superficie ocular para el mantenimiento de la inmunoregulación), estas últimas moléculas también son expresadas por las células epiteliales corneales y conjuntivales.

La molécula IL1-RA (receptor antagonista de interleucina 1) es expresada y secretada por células epiteliales corneales y conjuntivales, su función es modular la respuesta inflamatoria de IL-1 (interleucina 1).

2.10 Inmunopatología del Ojo Seco

En el proceso inmunopatológico de la enfermedad de ojo seco, la hiperosmolaridad e inflamación juegan un papel importante pues se generan como

consecuencia al estrés en la superficie ocular lo cual lleva a la pérdida del microambiente tolerogénico³⁴, ya que las células epiteliales detectan señales de daño o estrés y responden sobre expresando diferentes moléculas como MHCII (por sus siglas en inglés major histocompatibility complex II) e ICAM-1 (por sus siglas en inglés intercelular adhesión molecular), esto resulta en muerte celular (apoptosis) en células epiteliales conjuntivales quienes promueven la activación de vías como MAPK (por sus siglas en inglés mitogen activated protein kinase), JNK (por sus siglas en inglés Jun N-terminal kinase), y p38 lo que tiene como resultado la estimulación en la expresión de citocinas inflamatorias como: TNF- α (por sus siglas en inglés tumor necrosis factor alpha), IFN- γ (por sus siglas en inglés interferón gamma), IL-1 β (interleucina 1 beta), IL-17 (interleucina 17), IL-6 (interleucina 6)³⁵

La producción de las citocinas inflamatorias antes mencionadas, conlleva a la activación de células presentadoras de antígeno (por sus siglas en inglés APC) residentes en la superficie ocular³⁶, (diversos estudios reportan que eliminar las células dendríticas residentes previene el desarrollo de ojo seco) que una vez activadas expresan el receptor de quimiocina CCR7³⁷, quien permite la migración de la célula hacia los ganglios linfáticos más cercanos (respuesta aferente), ahora se conoce que este proceso se lleva a cabo en los ganglios cervicales³⁸, una vez que las APCs llegan inducen la diferenciación y proliferación de células T CD4⁺, quienes son polarizadas a los fenotipos Th1 y Th17 (por sus siglas en inglés T helper type 17) por la influencia de citocinas como IL-12 (interleucina 12) e IFN γ así como IL-6, IL-23 (interleucina 23), y TGF β respectivamente³⁹.

Posteriormente, los linfocitos diferenciados regresan a través de vasos linfáticos eferentes a la superficie ocular por la activación de receptores de quimiocinas como son CXCR5 y CCR5 para Th1, CCL20 en el caso de Th17, una vez en la superficie ocular ocasionan daño epitelial de córnea y conjuntiva⁴⁰.

La infiltración de estos fenotipos celulares genera la expresión de citocinas que promueven el mantenimiento de inflamación y daño celular.

La respuesta que provoca cada subtipo de células T CD4⁺ es diferente y caracterizan por lo siguiente:

Th1 estimula la secreción de IFN- γ e IL-1 β , en particular IFN γ induce la activación de células presentadoras de antígeno, la disminución de células goblet y daño en células epiteliales corneales. Por otra parte, IL-1 β estimula la expresión de TNF α y MMP3 (por sus siglas en inglés matrix metalloproteinase 3), la presencia de IL-1 β y TNF α estimula el reclutamiento de leucocitos a la zona de inflamación donde estos actúan promoviendo la expresión de moléculas de adhesión como es ICAM-1 en el epitelio conjuntival, así como la expresión de MHCII en células presentadoras de antígeno, esto promueve mayor tráfico leucocitario a la zona de inflamación³⁹.

La respuesta tipo Th17 es conocida por ser de inducción temprana y antagonista del fenotipo Treg, en la superficie ocular; promueve la expresión de MMP 3 y 9 quienes tienen la capacidad de generar disrupción de la barrera corneal⁴¹ al generar cambios en las uniones de las células epiteliales apicales corneales. IL-17 es una citocina producida por células Th17 quien ha sido identificada como células efectoras en distintas variedades de enfermedades autoinmunes en humanos y modelos experimentales como: esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso encefalomielite y uveítis autoinmune,^{41 42 43} sin embargo, en la superficie ocular se le atribuyen cambios a través de VEGFD/C, VEGRF-3 (por sus siglas en inglés vascular endotelial growth factor), para generar linfogénesis, proceso que aumenta el calibre y número de conexiones linfáticas contribuyendo a aumentar el tráfico celular al ganglio cervical, el aumento en la expresión de IL-6 como parte de este fenotipo tiene correlación con la severidad de los síntomas de la enfermedad. Por su parte, IL-23 parece ser esencial para la sobrevivencia y proliferación de células Th17. Por último, poco se sabe acerca de la actuación de autoantígenos como iniciadores de la disrupción de la tolerancia inmunológica, sin embargo se ha mencionado que M3R y KIK13 (Kallikrein13) pueden actuar como autoantígenos en la superficie ocular⁴⁴,

2.11 Diagnóstico, tratamiento e impacto en la calidad de vida

Actualmente, existen diferentes tipos de pruebas que apoyan el diagnóstico clínico de ojo seco, las cuales permiten valorar la calidad de mucinas de la película lagrimal a través de la observación de los patrones de arborización que estas generan, la cantidad total de lagrime basal y la observación de la morfología y número de células epiteliales y caliciformes. En conjunto estas pruebas contribuyen a evaluar la estabilidad de la superficie ocular.

Prueba de Schirmer⁴⁵⁴⁶:

Técnica funcional para evaluar la cantidad de lágrima que es producida durante 5 minutos.

La técnica consiste en colocar una tira de Schirmer en cada ojo durante cinco minutos en el canto externo de ojo lugar donde existen pocas terminaciones nerviosas (al tocar alguna terminación nerviosa de la superficie ocular se estimula lagrimeo reflejo) y con la vista del paciente al frente.

Posteriormente la tira de schirmer es retirada, medida y comparada con valores estándar.



Valores normales humanos: 2-5 cm en 5 minutos

Valores normales roedor: 2-3 mm durante 5 minutos (la estandarización se realizó en 20, previo al inicio de la investigación)

Prueba de Ferning⁴⁷:

Técnica que permite evaluar la calidad de lagrimal producida, a la cual se le asigna un grado por el tipo de arborización que presenta, espacio entre arborizaciones y presencia de moco; por lo tanto, grado 1 y 2 indica una buena

calidad mucínica, 3 y 4 indica la presencia de alteración en mucinas, estos grados son comparados en por la escala de Rolando.

La técnica consta de tomar una muestra de lágrima con ayuda de una micro pipeta o una pipeta Pasteur la cual es colocada en un portaobjetos y vista al microscopio a 10x y 40x para evaluar la calidad de mucinas.

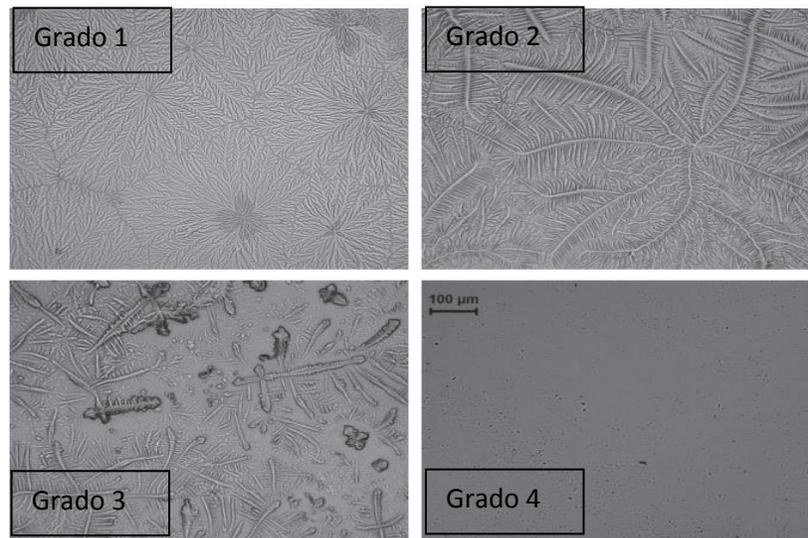


Figura 3. Clasificación del patrón de mucinas según la escala de Rolando.

Citología de impresión^{48,49}:

Técnica no invasiva que permite evaluar el número, así como la morfología de las células caliciformes presentes en el epitelio conjuntival. Esto permite dilucidar si existe estrés en la superficie ocular. A través de la escala de Nelson se puede evaluar el grado de daño, la técnica ha cobrado importancia ya que en años se han podido caracterizar poblaciones celulares por citometría de flujo⁵⁰ para su análisis inmunológico y biología molecular.

2.12 Tratamiento

Aunque existen diversas técnicas para el diagnóstico de la enfermedad poco se ha avanzado en un tratamiento eficaz, entre los medicamentos más usados resaltan; ciclosporina, corticoesteroides tópicos, derivados de tetraciclinas⁵¹ y recientemente suplementos alimenticios⁵². Sin embargo, en los tratamientos como ciclosporina el tratamiento debe ser utilizado meses antes para que en determinado tiempo realice su función específica lo que implica que a largo plazo el medicamento cause síntomas de irritación y comezón ocular. Por otra parte, los corticoides tópicos a pesar de generar la mejora clínica no pueden ser utilizados por intervalos de tratamiento largos pues provocan aumento de la presión intraocular, formación de catarata, glaucoma y susceptibilidad a infecciones.⁵³

El uso de lubricantes oftálmicos como el carbómero⁵⁴, alcohol polivinílico, hialuronato de sodio, celulosas etc, son las opciones más utilizadas sin embargo aunque cumplen la función de aliviar los síntomas, también pueden causar la obstrucción de glándulas de meibomio, visión borrosa y baja retención en la superficie ocular.

Por ahora terapias contra la enfermedad siguen en fase experimental como son: terapia contra SAR1118 y contra LFA-1⁵⁵. Esto implica que hasta ahora los medicamentos existentes solo funcionen como paliativos.⁵⁶

Actualmente se considera que ojo seco tiene un impacto en la calidad de vida, ya que si la función visual se ve afectada y repercute directamente en actividades diarias, actividad física, productividad en el ámbito laboral y directa e indirectamente en el costo de la enfermedad⁵⁷.

2.13 Definición de Obesidad

Según la Organización Mundial de la salud, lo define como la acumulación anormal o excesiva de grasa que presenta un riesgo para la salud. Una medida de obesidad en bruto es el índice de masa corporal (IMC), el peso de una persona (en kilogramos) dividido por el cuadrado de su altura (en metros)⁵⁸.

2.14 La obesidad como un factor ambiental de riesgo para enfermedades inflamatorias

La incidencia de la obesidad registró un dramático aumento en los últimos 30 años por lo que se ha convertido en un problema de salud pública en Norteamérica.⁵⁹ México se encuentra entre los tres primeros países con alta incidencia de obesidad. Existen dos factores asociados al aumento en la tasa de obesidad: el primero son las tendencias sedentarias en el estilo de vida actual y en segundo lugar las modificaciones alimentarias, específicamente el consumo frecuente de dietas altas en grasas y carbohidratos.

La obesidad y el sobrepeso son los principales factores de riesgo de una serie de enfermedades crónicas, como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Alguna vez considerado un problema solo en los países de altos ingresos, el sobrepeso y la obesidad ahora están aumentando drásticamente en los países de ingresos bajos y medianos, particularmente en los entornos urbanos.⁶⁰

Actualmente, se sabe que para que se desarrollen enfermedades inflamatorias crónicas, se requiere una compleja interacción entre la predisposición genética de los individuos y factores ambientales. Una gran variedad de factores ambientales pueden modificar el curso de enfermedades inflamatorias como por ejemplo: infecciones, uso desmedido de antibióticos (alteraciones del microbioma), contaminación y el hábito de fumar, sin embargo la obesidad se resalta como uno de los factores ambientales más importantes que podrían facilitar el inicio no solo de las enfermedades metabólicas y cardiovasculares sino como un participante central que promueve o facilita el inicio de enfermedades como colitis y alergias.⁶¹

2.15 El desarrollo de la obesidad está acompañado por cambios en la respuesta inmune.

Durante mucho tiempo se creyó que el tejido adiposo (TA) fungía únicamente como un órgano en donde se almacenaba la energía, ahora se sabe que el TA es un órgano altamente activo y puede secretar diversos mediadores tanto

inflamatorios (leptina) como anti-inflamatorios (adiponectina). La composición del TA no se limita a la actividad de los adipocitos en sus diferentes etapas del desarrollo que ahí se encuentran ya que en este tejido se encuentra una gran variedad de células inmunes residentes, predominantemente macrófagos y en un menor número de granulocitos y linfocitos. Una característica esencial es que previo el desarrollo de la obesidad todas estas poblaciones celulares despliegan fenotipos reguladores y por lo tanto desempeñan un papel tolerogénico. Por el contrario, de manera paralela a los procesos de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, se dan cambios metabólicos en estas células lo cual provoca la secreción de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β y quimiocinas como MCP1 (CCL2) en humanos y ratones, por lo que ahora se conoce alteran las funciones de las células residentes quienes cambian su fenotipo, ahora inflamatorio.⁶²

Además, se observan cambios en las células residentes y una gran infiltración de otras poblaciones como eosinófilos y mastocitos, que migran al tejido adiposo en respuesta a la producción de quimiocinas.⁶³ Todos estos cambios inmunológicos generados por el TA, han llevado a la identificación de un proceso inflamatorio crónico considerado de bajo grado, el cual acompaña al desarrollo de obesidad, dicho fenómeno actualmente es llamado “Metainflamación”⁶⁴. El microambiente inflamatorio local si no es controlado puede extenderse hacia órganos distantes del TA, como ocurre en el desarrollo de hígado graso.

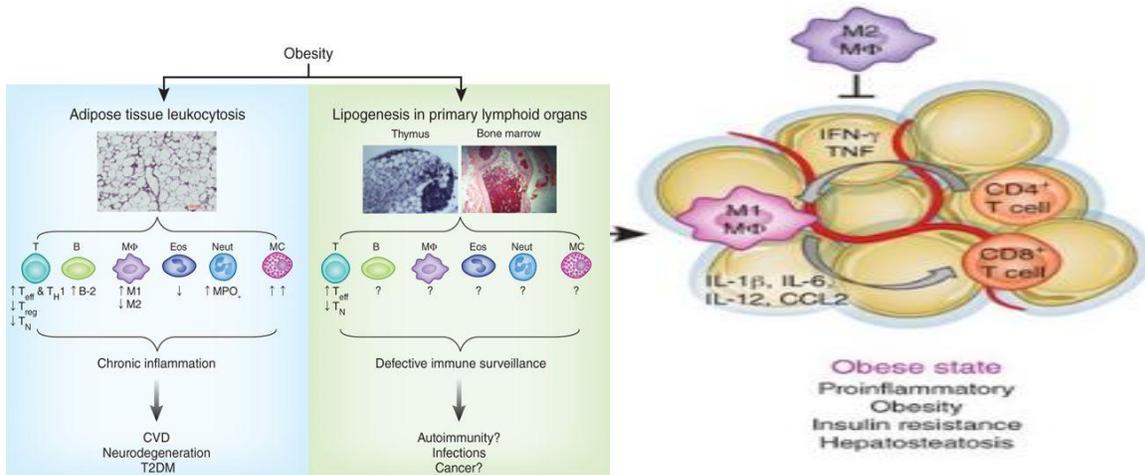
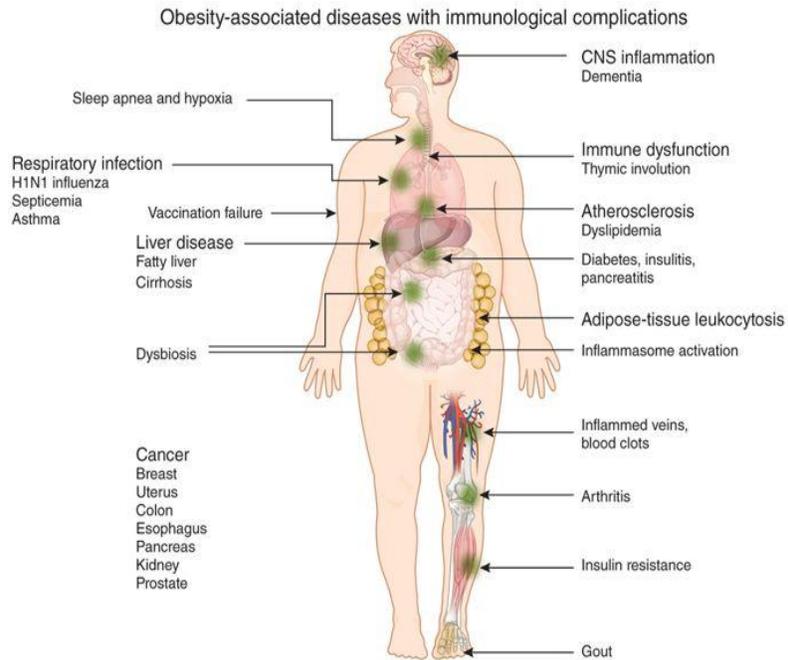


Figura 4. Cambios en el sistema inmune asociados al desarrollo de obesidad. Tomado de Kanneganti, T. D., & Dixit, V. D. (2012). Immunological complications of obesity. *Nature immunology*, 13(8), 7

3- JUSTIFICACIÓN

Se han determinado importantes cambios asociados a la obesidad como los responsables de iniciar o agravar el curso de enfermedades inflamatorias, sin embargo, el impacto que tiene la obesidad en el desarrollo de enfermedades inflamatorias oculares ha sido pobremente explorado. La prevalencia e incidencia de obesidad en países como México es considerablemente alta, por lo que esto podría ser un factor de riesgo que hasta hoy ha sido ignorado para entender el desarrollo y persistencia de la inflamación ocular, contribuyendo al desarrollo de ojo seco ya que la mayoría de información se centra en retinopatía diabética como una complicación en personas con diabetes por un largo periodo de tiempo.

La investigación básica en este tema puede ayudar a identificar los mecanismos inmunológicos que se ven alterados en la enfermedad de ojo seco para así generar respuestas a terapias más eficientes dirigidas a mediadores inflamatorios alterados, y así superar tratamientos paliativos hasta ahora existentes.

4- HIPÓTESIS

Los ratones alimentados con una dieta obesogénica desarrollaran ojo seco de manera más grave comparado con animales expuestos a una dieta estándar.

5- OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar y comparar la gravedad de los signos de Ojo Seco entre animales alimentados con una dieta estándar (SC) y animales alimentados con una dieta obesogénica (HFD) en la cepa de ratones C57BL/6 y BALB/c.

6- OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar y comparar la gravedad de los signos de OS entre ratones con dieta SC y HFD, mediante las técnicas BUT, Schirmer, Ferning y Citología de Impresión.
- Realizar cultivos de ganglio y bazo para analizar el comportamiento de la respuesta inflamatoria sistémica.
- Analizar niveles de mediadores inflamatorios como son TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-13, IL-22 e IL-15 en sobrenadante de cultivo de bazo y suero de ambos grupos experimentales por la técnica de ELISA sándwich.
- Caracterizar y comparar las diferencias sistémicas y locales de poblaciones inmunes infiltrantes en respuesta al daño ocular inducido en entre la dieta Standard y Obesogénica (HFD) por medio de la técnica Citometría de flujo.

7- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Inducción de Obesidad

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c y C57BL/6 de 6-7 semanas de edad, la colonia de reproducción se encuentra en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos.

El primer grupo fue alimentado con una dieta estándar para roedores (SC, standard chow) y el segundo fue alimentado con dieta obesogénica con alto contenido en grasa (HFD, high fat diet) (40% de grasa). Ambos grupos se mantuvieron con las respectivas dietas durante diez semanas, donde el peso fue registrado semanalmente.

Para comprobar que los ratones no eran diabéticos se realizó toma de glucosa a la semana inicial, 5 y 10.⁶⁵ Esta prueba debía incluir valores menores a 250mg/dl.

7.2 Estandarización de técnicas para evaluar OS

Las técnicas para el diagnóstico de ojo seco en humanos (Schirmer, Ferning y Citología de impresión) fueron estandarizadas para conocer los valores normales de los ratones en cada prueba como se describen a continuación.

7.3 Inducción y evaluación del cuadro clínico de Ojo Seco

El modelo ojo seco se indujo con escopolamina, modelo que se tomó a consideración ya que es menos agresivo y el cual recrea características muy similares a la deficiencia acuosa de la película lagrimal. El modelo se logró inducir con inyecciones subcutáneas dorsales que contenían 1mg de escopolamina

(Sigma-Aldrich) en un vehículo de 60µl de solución salina estéril, tres veces al día durante diez días por cada ratón.

Para evaluar el cuadro clínico se realizaron las técnicas Schirmer, Ferning y citología de impresión, para determinar la estabilidad de la película lagrimal en los días 0, 5 y 10 post inducción de escopolamina, para evitar una sobrecarga de agentes químicos, los ratones no recibieron escopolamina debido a la anestesia que se va a administrar para llevar a cabo dichas pruebas.

7.4 Cuantificación de volumen lagrimal por la técnica Schirmer

El ratón fue previamente anestesiado con 40µl de anestesia (Xilasina, PiSA), el fármaco se dejó actuar durante 20 minutos y posteriormente se realizó la técnica.

La técnica consistió en colocar una tira de Schirmer (Ophthalmic Strips) en el párpado superior con ubicación temporal en ambos ojos durante 5 minutos para evaluar la cantidad de lagrime que produce el ratón, una vez terminado el tiempo se midió la tira con micrómetro Vernier digital (Mitutoyo) y los valores obtenidos fueron registrados y analizados.

Finalmente, la tira fue sumergida en OH 96% durante un minuto para fijar las células caliciformes que se adhirieron a la tira. La técnica se realizó en los días 0, 5, 10 posteriores a la inducción con escopolamina.

7.5 Análisis del patrón de mucinas mediante la técnica de Ferning

El ratón previamente anestesiado se dejó en reposo durante 15 minutos una vez terminada la técnica de Schirmer.

Posteriormente se tomó una muestra de lágrima de ambos ojos con una pipeta aditada con una punta de 1-10µl, cada lágrima se colocó en un portaobjetos.

Una vez terminado, fueron observadas al microscopio con el objetivo 40x y fotografiadas y a cada patrón de lagrime se le asignó un grado de daño de acuerdo a la escala de Rolando, donde 1 y 2 pertenece a un patrón mucinico ideal,

3 y 4 un patrón de daño. La técnica se realizó en los días 0, 5, 10 posteriores a la inducción de OS con escopolamina.

7.6 Cuantificación de células caliciformes

La cuantificación se realizó mediante la técnica Citología de impresión.

La técnica consistió en sumergir la tira de Schirmer utilizada para medir la cantidad lagrimal, en un tren de tinción que consistió en los siguientes líquidos:

Agua destilada por 10 segundos

Ácido peryódico por 10 minutos

Agua destilada por 5 minutos

Hematoxilina por 30 segundos

Agua moniacal por 30 segundos

Alcohol al 70 % por 5 minutos

Alcohol al 96% por 5 minutos

Xilol 1 por 11 minutos

Xilol 2 por 11 minutos

Xilol 3 por 11 minutos

Una vez que se terminó el tren de tinción, las tiras se dejaron secar y posteriormente se colocó en un portaobjetos, se analizó y conto en el microscopio a 10x, con ayuda de un contador celular.

7.7 Recolección de tejidos

Al término del experimento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se extrajo los siguientes tejidos de cada ratón: conjuntivas, glándula lagrimal, corneas, ganglios cervicales, bazos, hígados y colon.

Las muestras oculares de ojo izquierdo fueron fijadas en paraformaldehído, las muestras de ojo derecho disgregadas en TRIZOL y congeladas a -80°C.

Los ganglios cervicales y bazos fueron macerados y recuperados para realizar citometría de flujo (pellet celular) y ELISA sándwich (sobrenadante).

Hígados se fijaron en paraformaldehído para realizar histología.

Cada colon fue medido para comparar el efecto de la dieta alta en grasa (HFD) vs la dieta Standart (SC).

7.8 Cuantificación de citocinas por ELISA sándwich

La técnica ELISA se realizo es muestras de suero y sobrenadantes de cultivo de órganos como bazo y ganglio cervical, donde se realizó el siguiente proceso:

Sensibilización de la placa

Se diluyó el anticuerpo de captura en 10ml en buffer de pegado (Apéndice 1) se homogenizó y se colocaron 100µl por pozo utilizando una micro pipeta multicanal (Gilson) en la placa de ELISA (Costar) por 96 pozos. Para que se llevara a cabo la reacción de pegado del anticuerpo a la placa esta última se cubrió con papel aluminio y fue incubada a 4°C por una noche.

Muestras y curva

Al día siguiente la placa fue retirada del refrigerador de 4°C y se lavó 3 veces con la solución de lavado (Apéndice 1), después se secó tres veces de manera manual agitando la placa, y durante dos horas a temperatura ambiente se bloqueó el pegado inespecífico con 300µl de solución de bloqueo (Apéndice 1), después se lavó tres veces y posteriormente fue secada de manera manual.

Una vez que la placa se encontraba seca, se colocaron las muestras en los pozos correspondientes, para poder extrapolar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la correspondiente citocina recombinante murina, con diluciones al doble para cada una de las placas y se utilizaron las dos primeras filas de la placa, diluidas en solución de bloqueo.

Las curvas se iniciaron con una concentración de 12,000pg, nuevamente se incubo la placa por una noche a 4°C.

Revelado de ELISA sándwich

La placa se llevó a temperatura ambiente, se lavó 4 veces y se secó de manera manual, para posteriormente adicionar el anticuerpo correspondiente a cada citocina marcado con biotina en un volumen de 100µl por pozo de una dilución de 2µ/ml de anticuerpo por biotina en solución de bloqueo (Apéndice 1) y se incubó por una hora a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de incubación se lavó 4 veces la placa y se secó de manera manual.

Se preparó una dilución de 1:5000 de enzima streptoavidin peroxidasa en solución de bloqueo, para obtener un volumen final de 10 ml de esta dilución y colocar 100µl en cada pozo para dejar incubar las placas por 45 minutos a temperatura ambiente.

Por último, se lavó 5 veces la placa y se secó de manera manual.

Se preparó la solución del sustrato de la enzima que consistía en 100µl de H₂O₂ al 3% () en 10 ml de ABTS (Apéndice 1) se homogenizo la solución y se colocó 100µl por pozo, se dejó a temperatura ambiente 3 minutos y se llevó al lector de placa (EPOCH) utilizando filtro para lectura de 405nm de longitud de onda.

7.9 Cultivo celular de bazo

El bazo y ganglio fueron macerados con ayuda de cell strainers (Falcon) (100 µM) en la campana de esterilidad cada uno en una caja de Petri con 5ml de medio de cultivo, el sobrenadante fue recuperado y colocado en tubos estériles de 15ml, para obtener la suspensión celular las muestras fueron centrifugadas durante 5min a 3500rpm.

Las muestras se decantaron y a cada suspensión celular recuperada se le colocó 3ml de solución hemolizante (cloruro de amonio) durante 4 minutos, terminado el tiempo la reacción se paró con 3 ml de medio. Cada muestra fue centrifugada 5min durante 15min el sobrenadante se decantó y la suspensión celular se ajustó a un volumen de 15 ml en bazo y 3ml en ganglio cervical.

Para realizar la cuantificación de células se realizó una dilución 1:2, 20µl de muestra más 20µl de azul tripano, tomando 10 µl para contar en la cámara de Neubauer con la finalidad de ajustar 3 millones de células en cada mililitro de medio.

Una vez ajustadas las muestras a 3 millones:1ml, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos. Donde por cada ratón se sembraron 7 pozos de los cuales 4 fueron estimulados con Concanavalina y los 3 restantes no fueron estimulados.

Las placas de cultivo resultantes fueron incubadas durante 48hrs a 36°C, al término de la incubación se recuperaron los sobrenadantes y almacenados a una temperatura de -80°C, para ser analizados posteriormente en la técnica de ELISA sándwich.

7.10 Citometría de Flujo

La técnica de tinción se realizó con las muestras de cultivo de bazo y ganglio las cuales fueron ajustadas a 1×10^6 /ml.

Cada muestra fue centrifugada 5min a 3500rpm, el sobrenadante se decantó y se colocó en cada muestra 300µl de Buffer de FACS (ver apéndice 1) y los anticuerpos específicos (CD4-APC), (F480-PECy7), (CCR5-Percp), (MHCII-FITC), (Ly6G-APCCy7), (CD8-PE), en este momento se incubó por 30min. Pasado los 30min las muestras fueron centrifugadas por 5min a 3500rpm, se decantó para colocar buffer de FACS y paraformaldehído y así fijar las muestras para posteriormente ser analizadas en el Citómetro de Flujo (Attune, life technologies).

8.- RESULTADOS

8.1- Inducción de obesidad

Se registró el peso corporal de los ratones experimentales previo y a las 5 y 10 semanas posteriores a ser alimentados con las dietas indicadas. En las siguientes figuras se presenta el porcentaje de peso ganado comparado con el peso inicial en ambas cepas. Así los datos mostraron que en grupos de ratones de la cepa C57BL/6 aumentaron aproximadamente 70% con respecto a su peso inicial, contrario a la cepa BALB/c que genero una ganancia alrededor del 50% de peso con respecto al inicial. Por otro los grupos alimentados con la dieta SC generaron menos del 25% de ganancia de peso con respecto a su peso inicial.

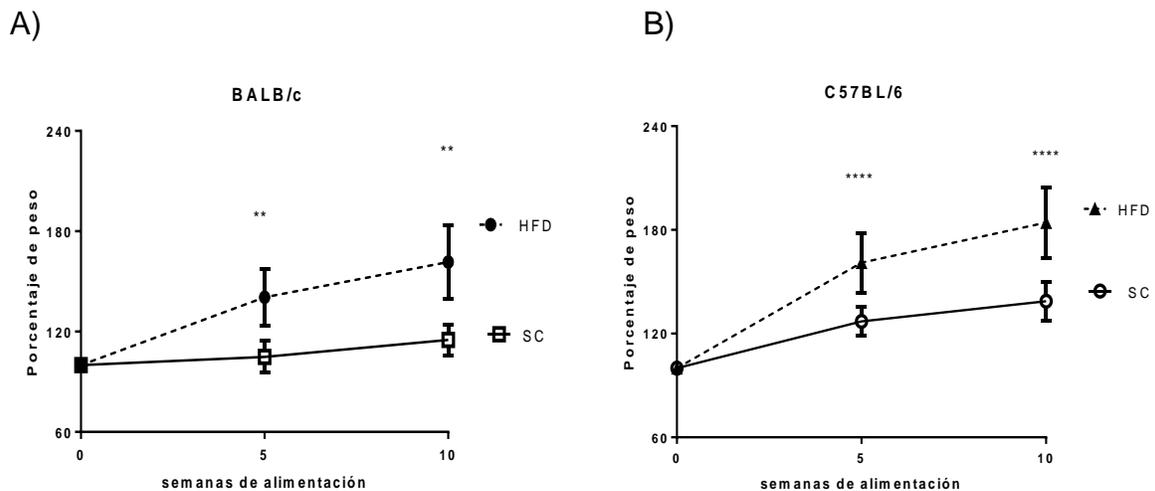
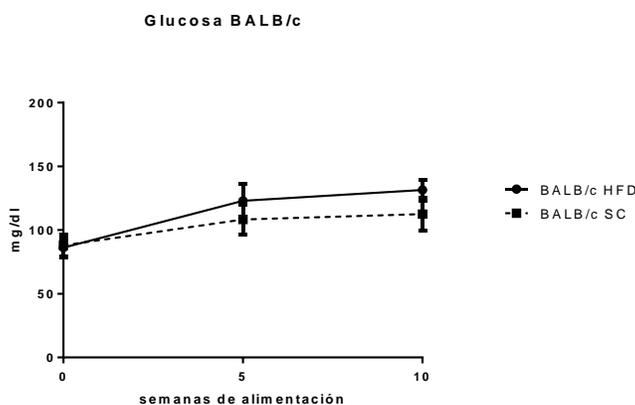


Figura 5-. Muestra el porcentaje de peso ganado en diferentes cepas, BALB/c (A) y C57BL/6 (B), alimentadas con HFD vs SC (A, B). ****p < 0.00001 **p < 0.01 analizado con la prueba "t" student, Graph pad 6, (n=10 en 5 experimentos C57BL/6, n=8 en 2 experimentos BALB/c).

8.2- Niveles de glucosa

Adicionalmente los niveles de glucosa se registraron en todos los grupos experimentales, los resultados se muestran en la figura 2 evidencian que ambas cepas alimentadas con la dieta HFD, aumentaron sus niveles de glucosa en sangre con respecto a las semanas de alimentación sin embargo ningún grupo reportó niveles mayores a 250mg/dl lo que sugiere que, no desarrollaron diabetes, pero presumiblemente generaron resistencia a insulina.

A)



B)

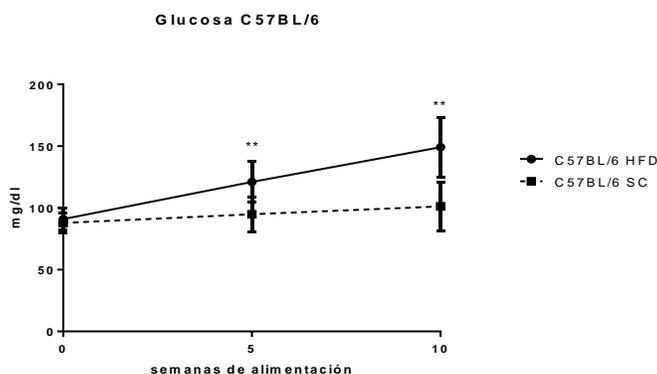


Figura 6-. La figura muestra niveles de glucosa en sangre de ambas cepas (figura 6A, 6B), donde ningún grupo supero los 250mg/dl. **p < 0.01 analizado con la prueba "t" student, Graph pad 6, (n=10 en 5 experimentos C57BL/6, n=8 en 2 experimentos BALB/c).

8.3- Cambios inducidos por la dieta en la cepa BALB/c

Para confirmar que la dieta HFD había generado los cambios esperados asociados a obesidad como aumento en el tamaño de tejido adiposo, alteración de la longitud del colón, y esteatosis hepática, los parámetros se registraron en la semana 10.

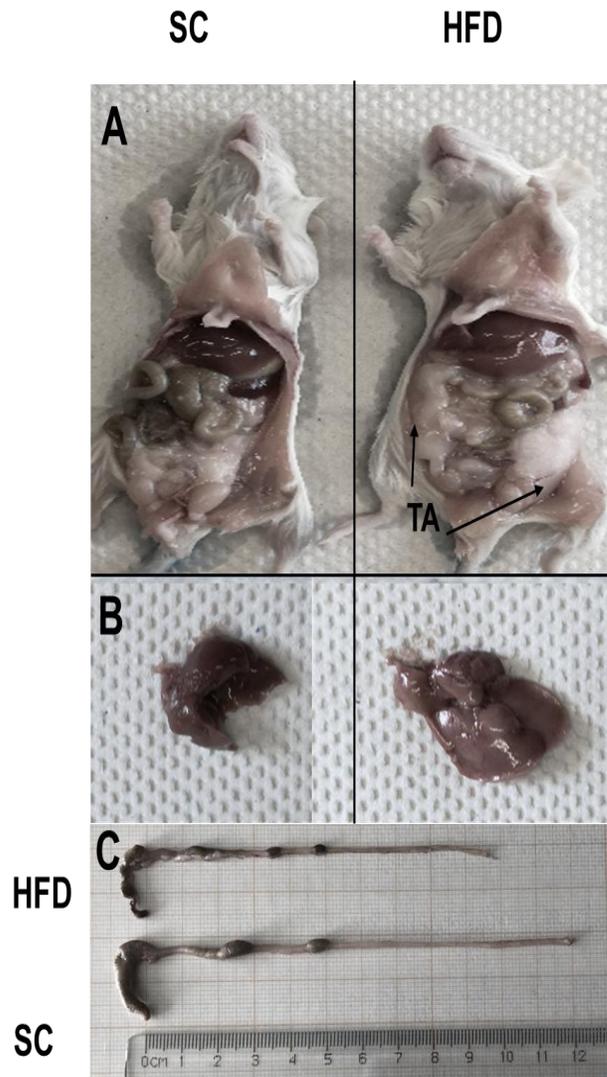


Figura 7-. Se muestran los cambios morfológicos inducidos por la dieta HFD vs la SC en la cepa de ratón BALB/c después de 10 semanas de alimentación, panel 8A; muestra las diferencias del aumento de tejido adiposo (TA), panel 8B; muestra las diferencias hepáticas, panel 8C; muestra los cambios longitudinales del colon. (n=4 en 2 experimentos BALB/c).

El panel anterior muestra los cambios en el tejido adiposo inducido por la dieta después de 10 semanas, fue evidente el grupo alimentado con una dieta alta en grasas genero un claro aumento de TA en comparación con el grupo SC.

Uno de los cambios más importantes en la obesidad crónica es la presencia de esteatosis hepática, pues esta condición es capaz de desencadenar inflamación en diferentes órganos dado lo anterior los hígados fueron extirpados y comparados. El panel 8B muestra un cambio morfológico evidente entre ambos grupos, sin embargo, al analizar el color, textura, tamaño y peso del órgano en comparación al grupo control las diferencias fueron mínimas.

Por último, el largo del colon fue medido, pues se ha reportado que una dieta alta en grasas es capaz de disminuir el tamaño del mismo. El panel 8C muestra el acortamiento del colon por parte del grupo HFD, sin embargo, el tamaño del ciego no sufrió modificaciones importantes. Una vez los grupos terminaron las semanas de alimentación, fueron sometidos a la inducción de la enfermedad donde se obtuvieron los siguientes resultados.

8.4- Inducción experimental de OS

Una vez que los grupos de la cepa BALB/c terminaron el tiempo de ingesta de la dieta, se indujo ojo seco y durante el curso de este se obtuvieron los siguientes datos.

La figura 9, muestra el comportamiento del volumen lagrimal de ambos grupos, al antes de iniciar el modelo de la enfermedad mostraron comportarse de manera similar, lo que infiere que la dieta HFD parece no tener un efecto importante en la ausencia de la enfermedad, sin embargo, una vez que se indujo el modelo, el grupo HFD mostro una ligera tendencia a disminuir su volumen lagrimal en comparación con el grupo SC (5% de grasa).

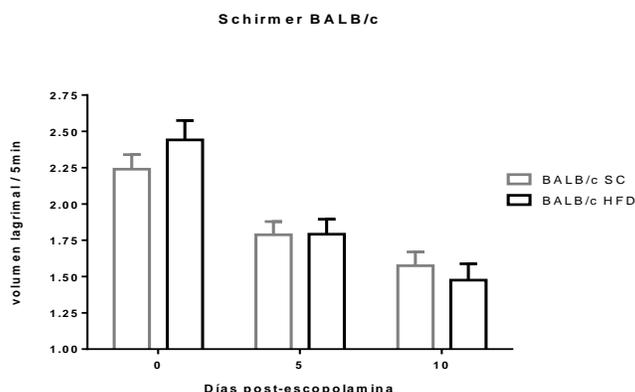
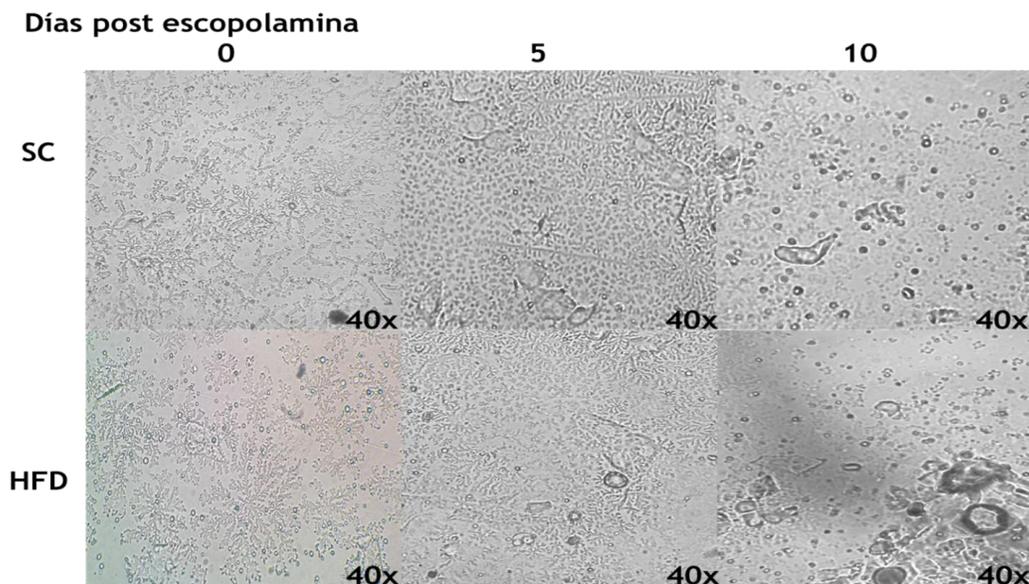


Figura 8-. La figura muestra el volumen lagrimal, por la prueba de Schirmer en la cepa BALB/c, en los 10 días de inducción del modelo con escopolamina, analizado con la prueba “t” student, Graph pad 6, (n=8 en 2 experimentos BALB/c).

Por otra parte, al analizar los patrones de arborización en los grupos de la cepa BALB/c después de 10 semanas de alimentación con ambas dietas, mostraron patrones de arborización de una lágrima saludable lo cual era esperado, sin embargo, a la inducción de ojo seco, ambos grupos mostraron una drástica disminución en el patrón de mucinas sin diferencias entre sí.

Lo que podría indicar que las diferencias fenotípicas de la cepa también tienen repercusión a nivel ocular.

Al analizar los patrones de arborización los grupos mostraron patrones de arborización de una lágrima saludable antes de la inducción del modelo, lo cual era esperado, sin embargo, a la inducción de OS, ambos grupos mostraron una drástica disminución en el patrón de mucinas sin diferencias entre sí.



Panel 1-. El panel muestra la diferencia en los patrones de arborización de mucinas en la cepa BALB/c alimentados con la dieta SC y HFD por 10 semanas y posterior a la inducción de ojo seco experimental. (n=8 en 5 experimentos C57BL/6, n=8 en 2 experimentos BALB/c).

Finalmente, el número de células caliciformes fueron contadas, los datos no muestran diferencias significativas entre los grupos, pues ambos disminuyen su número a lo largo de la inducción de OS, lo que indica que la tolerancia de la superficie ocular podría estar afectada.

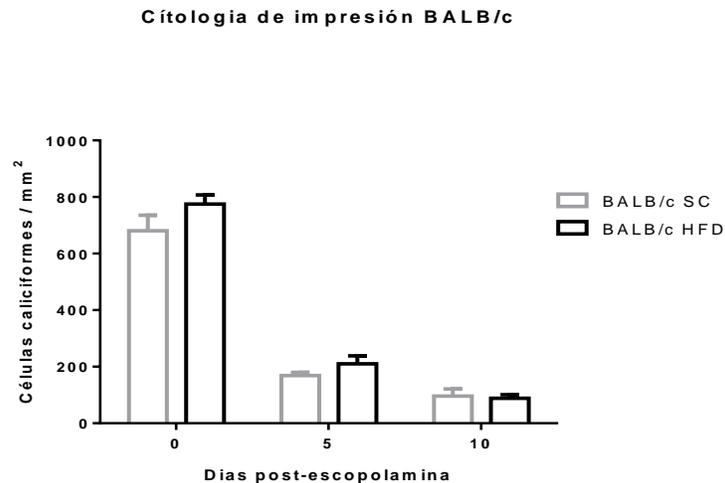


Figura 9-. La figura muestra el número de células caliciformes presentes en un mm² de la tira de Schirmer, por la técnica de citología de impresión en la cepa BALB/c, en los 10 días de inducción de escopolamina, analizado con la prueba “t” student, Graph pad 6, (n=6 en 2 experimentos BALB/c).

Es escasa la información que existe a cerca de la relación del globo ocular con tejidos linfoides secundarios, con el fin de regular una respuesta inmunológica. El proceso hasta ahora descrito es la interacción bazo-cámara anterior, dado lo anterior buscamos concentraciones de diferentes citocinas en sobrenadante de bazo; donde se encontraron los siguientes datos.

8.5- Cuantificación de citocinas en sobrenadante de bazo

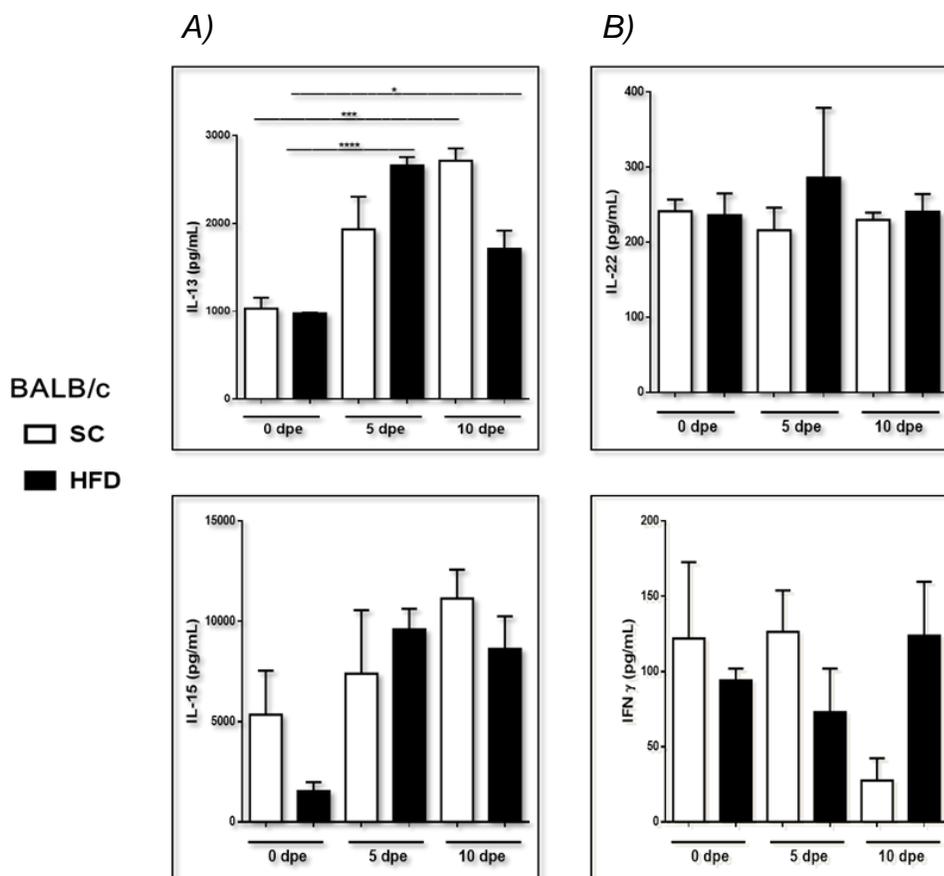


Figura 10.- Las figuras muestran los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo en bazo estimulados con 1 μ l de concanavalina, en grupos de ratones experimentales de la cepa BALB/c alimentados con dos tipos de dietas. ***p <0.0001, **p <0.01 *p <0.05, analizado con la prueba “t” student, Graph pad 6, (n= 10 en 1 experimento BALB/c).

En los grupos experimentales de la cepa BALB/c, evidenció que las concentraciones de IL-13 aumentaron exponencialmente a lo largo de la inducción del modelo, a excepción del día 10 donde el grupo HFD disminuyó su concentración.

La figura 10C muestran que tan solo la ingesta de dos tipos de dietas, induce cambios en la concentración de IL-15, pues la citocina se encuentra aumentada en

el grupo alimentado con SC, posterior a la inducción ambos grupos aumentaron exponencialmente su concentración.

Por otra parte, la concentración de IFN γ a pesar de mostrar cambios entre ambos grupos no fue significativa pues la concentración de picogramos oscila entre los 80 y 120 pg/mL. El análisis de IL-22 no mostro diferencias estadísticamente significativas.

8.6- Cambios inducidos por la dieta en la cepa C57BL/6

Por otra parte, los grupos de la cepa C57BL/6 mostraron un panorama diferente, pues la el TA (11A) generado fue mayor al grupo BALB/c HFD.

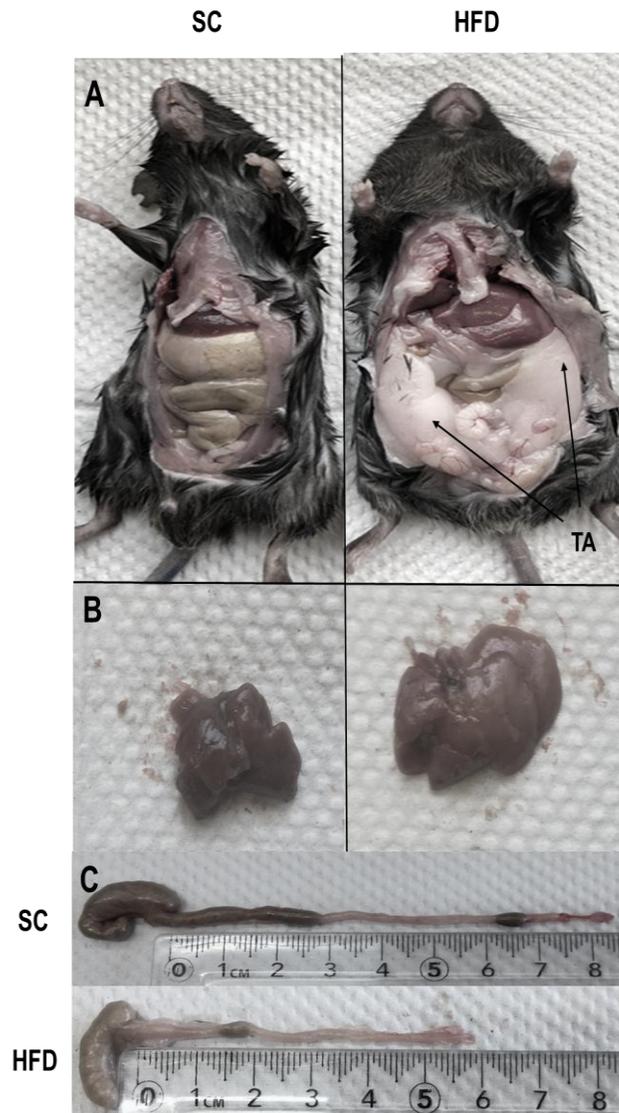


Figura 11.- En la figura se observan los cambios inducidos por la dieta HFD vs la SC en la cepa de ratón C57BL/6 después de 10 semanas de alimentación, panel 11A; muestra las diferencias del aumento de tejido adiposo (TA), panel 11B; muestra las diferencias hepáticas, panel 11C; muestra los cambios longitudinales del colon. (n=4 en 2 experimentos C57BL/6).

Los cambios morfológicos eran los esperados debido a la diferencia genética de ambas cepas. Los cambios en el hígado, mostraron al grupo HFD con una ligera tendencia a tener un hígado de mayor tamaño, así como una ligera coloración blanquecina. Adicionalmente como se puede observar en el panel 11C, la longitud del colon fue menor en HFD, tal y como se reportó en la cepa BALB/C, pero en este caso la disminución fue exacerbada. Lo anterior nos llevó a deducir que debido a estas diferencias morfológicas el cuadro clínico de la enfermedad se vería exacerbado en comparación a la cepa BALB/c.

8.7- Inducción experimental de OS

Antes de la inducción de OS, los grupos no mostraron diferencias entre su volumen lagrimal, al igual que en la cepa BALB/c, lo que reafirma la idea que la ingesta de la dieta no juega un papel deletéreo en la ausencia de OS. Sin embargo, después de la inducción del modelo, SC presentó una disminución significativa en el volumen lágrima comparado con HFD, lo que no era esperado, debido a los cambios morfológicos por la dieta alta en grasa.

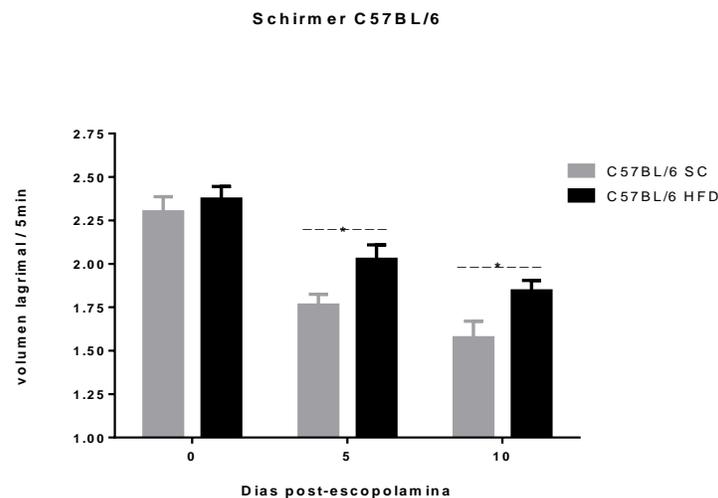
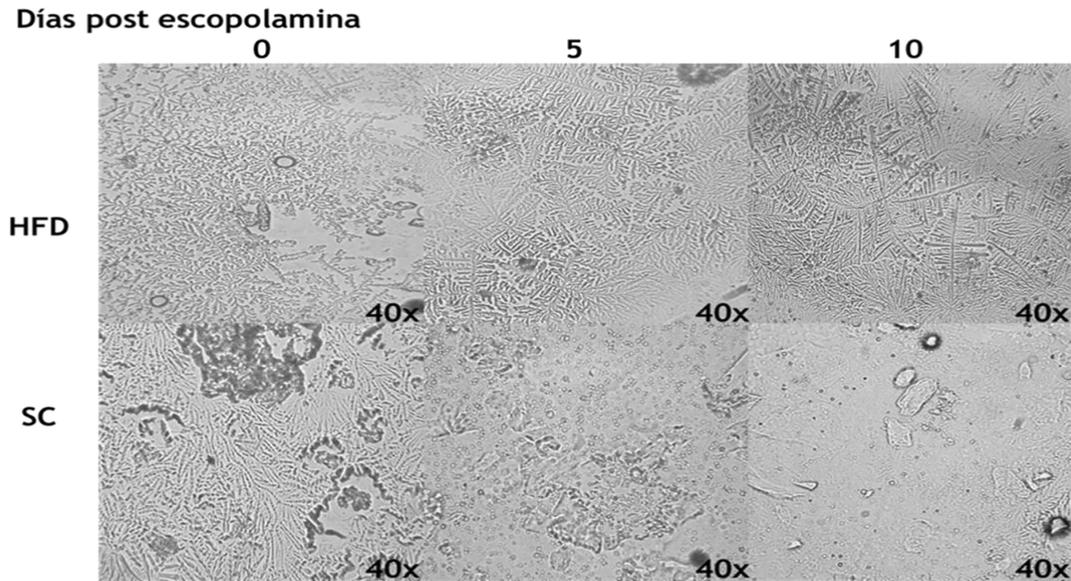


Figura 12.- La gráfica muestra el volumen lagrimal, por la prueba de Schirmer en la cepa C57BL/6, en los 10 días de inducción del modelo con escopolamina. *p <0.05, analizado con la prueba “t” student, Graph pad 6, (n=8 en 5 experimentos C57BL/6).



Panel 2.- El panel muestra la diferencia en los patrones de arborización de mucinas en la cepa C57BL/6 alimentados con la dieta SC y HFD por 10 semanas y posterior a la inducción de ojo seco experimental. (n=8 en 5 experimentos C57BL/6).

Al realizar la prueba de Ferning, en ambos grupos después de ser alimentados por 10 semanas se observó patrones de arborizaciones que indicaban una lagrime saludable, a la inducción de ojo seco sorprendentemente HFD preservó el patrón de arborización, lo que no ocurrió en el grupo control, pues posterior a la inducción los patrones evidenciaron la pérdida de arborizaciones lo que sugirió que la ingesta de una dieta alta en grasas por 10 semanas generó un papel de protección o atenuación al menos en la cepa C57BL/6.

En el análisis de células caliciformes presentes en la superficie ocular, demostró que estas sin ningún estímulo se encuentran en número similares y comparables de la misma forma con BALB/c, posterior a la inducción ambos grupos pierden células de manera muy similar.

En este punto podemos explicar, que posterior a la inducción del modelo, la técnica de citología de impresión no genera diferencias entre ambas cepas.

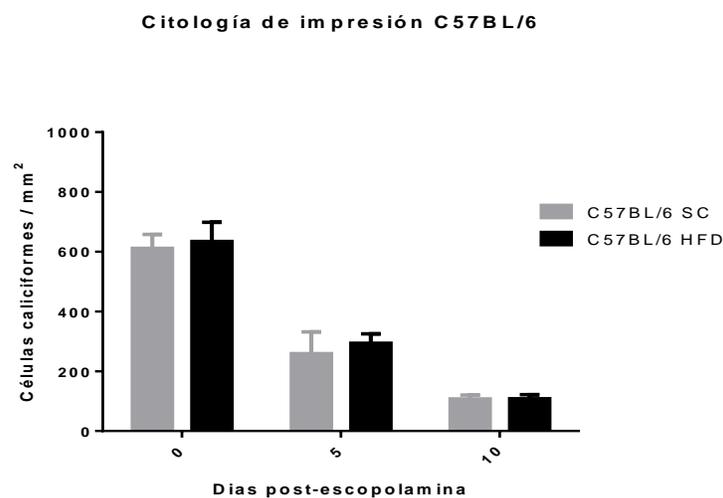


Figura 13.- La figura muestra el número de células caliciformes presentes en un mm² de la tira de Schirmer, por la técnica de Citología de Impresión en la cepa C57BL/6, en los 10 días de inducción del modelo con escopolamina, analizado con la prueba "t" student, Graph pad 6, (n=8 en 5 experimentos C57BL/6).

8.8- Cuantificación de citocinas en sobrenadante de bazo

La cuantificación de citocinas en el sobrenadante de bazo en la cepa C57BL/6 mostraron las siguientes diferencias.

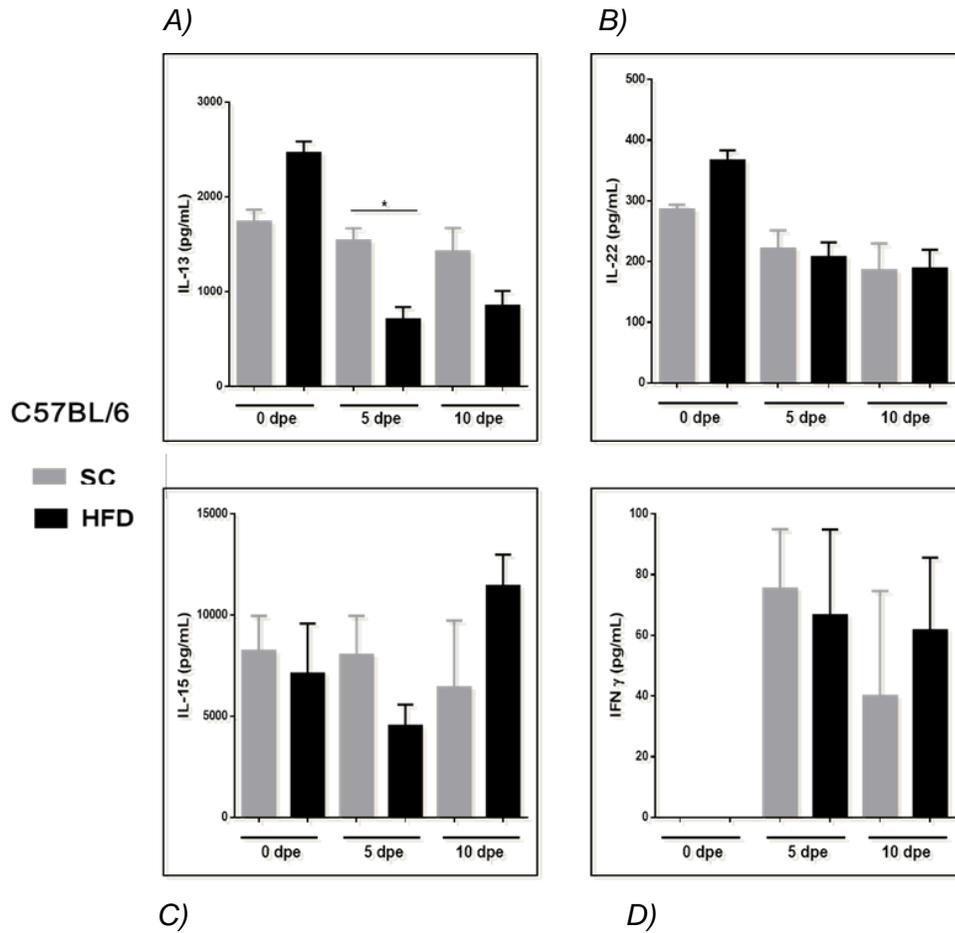


Figura 14.- La figura muestran los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo en bazo estimulados con 1µl de concanavalina en la cepa C57BL/6 alimentados con dos tipos de dietas. ***p <0.0001 *p <0.05, analizado con la prueba “t” student, Graph pad 6, (n=10 en 2 experimentos).

Las figuras anteriores muestran las diferencias en la concentración de citocinas en el sobrenadante del cultivo celular de bazo, la figura 14A evidencia que la concentración de IL-13 se encuentra aumentada tan solo por la ingesta de una dieta alta en grasas, a pesar de ello una vez que se indujo el modelo, la concentración disminuyó, mientras que el grupo alimentado con la dieta SC mantuvo una concentración constante.

La expresión de IL-15 mostró disminución en ambos grupos al día 5 respecto al día 0, sin embargo, el grupo HFD logró aumentar la expresión al día 10.

Por otra parte, los niveles de IL-22 mostraron tendencia a disminuir su expresión en ambos grupos posterior a la inducción de ojo seco.

Finalmente, el análisis de IFN γ , mostró niveles nulos al día 0, posterior a la inducción de ojo seco ambos grupos aumentaron sus concentraciones, aunque la cantidad de picogramos presentes no fue significativa

8.9- Análisis de poblaciones celulares de bazo

Para conocer si el comportamiento de las citocinas medidas, se relacionaba con la presencia o ausencia de diferentes tipos celulares capaces de expresarlas, se analizaron diferentes poblaciones celulares de bazo por citometría de flujo en los grupos experimentales de la cepa C57BL/6 quienes mostraron mayor diferencia a nivel anatómico y molecular.

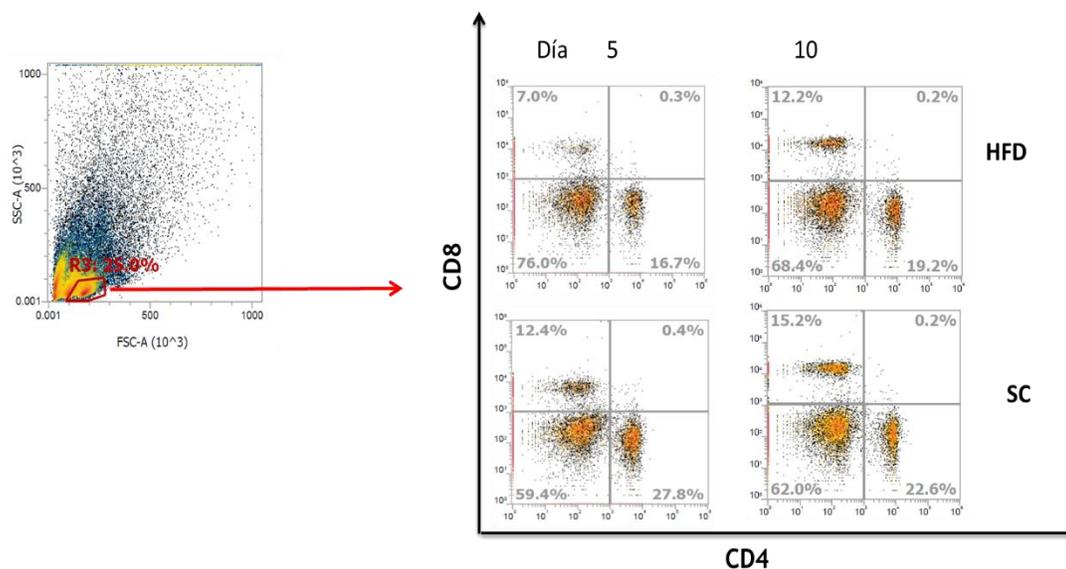


Figura 15.- La figura muestra la estrategia de análisis para la diferenciación de células no granulares, y de lado derecho las imágenes representativas de la caracterización en la población celular de células CD4⁺, CD8⁺ de los grupos experimentales de la cepa C57BL/6 alimentadas por 10 semanas, a los días 5 y 10 post inducción de ojo seco experimental. (n=5 en 4 experimentos C57BL/6).

La figura anterior muestra las imágenes con los porcentajes representativos de las poblaciones celulares correspondientes a cada grupo experimental, demostrando la existencia de una población mayor de células CD4 y CD8 en el grupo control en comparación al grupo alimentado con HFD.

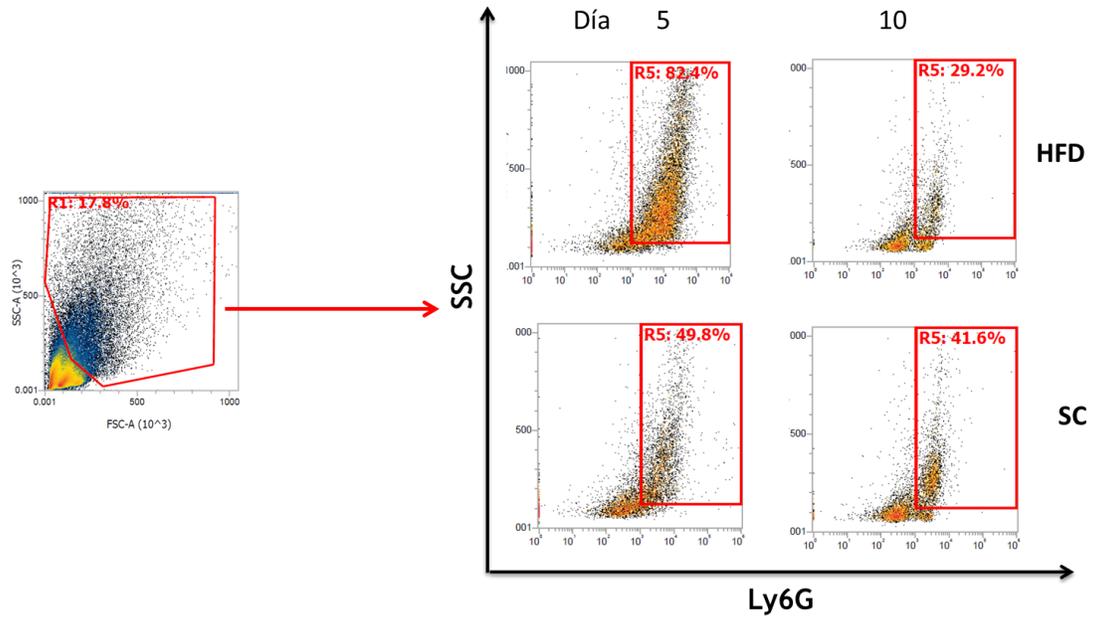


Figura 16.- La figura muestra la estrategia de análisis para la diferenciación de células granulares, de lado derecho las imágenes representativas de la caracterización en población celular de neutrófilos diferenciada por granularidad y respuesta al marcado Ly6G de los grupos experimentales de la cepa C57BL/6 alimentadas por 10 semanas con diferentes dietas a los días 0, 5 y 10 post inducción de ojo seco experimental. (n=5 en 4 experimentos C57BL/6).

El comportamiento de neutrófilos en el bazo después de la inducción de ojo seco experimental, evidencia el aumento el porcentaje de células en HFD al día 5 post-inducción, el cual disminuye al día 10. A diferencia el grupo alimentado con la dieta SC, quien mostro niveles similares en el proceso de inducción.

Estos datos sugieren la participación de neutrófilos del bazo en el proceso inflamatorio.

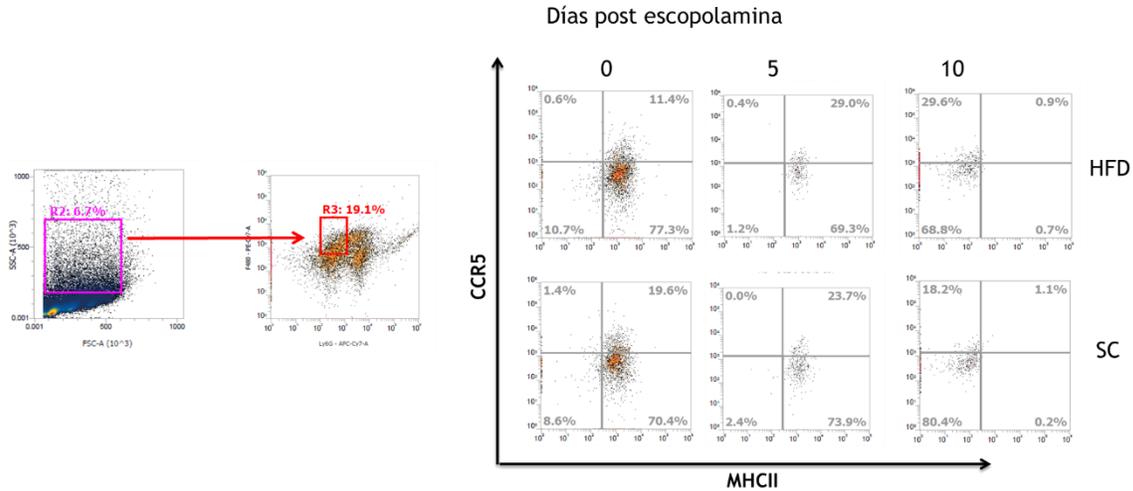


Figura 17.- La figura muestra la estrategia de análisis para la diferenciación de células granulares, de lado derecho las imágenes representativas de la caracterización en población celular de macrófagos que responder a marcadores CCR5 y MHCII de los grupos experimentales de la cepa C57BL/6 alimentadas por 10 semanas con diferentes dietas a los días 0, 5 y 10 post inducción de ojo seco experimental. (n=5).

Otro parámetro importante es el comportamiento de macrófagos activados capaces de migrar del bazo, por lo cual se decidió utilizar los marcadores CCR5 y MHCII para su identificación.

Por parte el grupo experimental C57BL/6 HFD muestra el aumento de macrófagos capaces de migrar al día 5, cuando al día 10 disminuye la población que los datos sugieren que migraron quedando solo células que expresan el marcador CCR5 que presumiblemente serían células dendríticas o células B.

Debido a las diferencias existentes evidentes entre ambas cepas en el cuadro clínico y niveles de citocinas en bazo, la pregunta que surgió es que, si estas dependían, del tipo de ingesta de la dieta como un suplemento alimenticio, el cual pudiera retrasar los signos de la enfermedad. Por lo tanto, se realizó un experimento en la cepa C57BL/6, pues fue quien mostro mayores cambios benéficos, donde, al mismo tiempo de la inducción de OS, se administró la dieta HFD y SC.

8.10- Diferencias en la cepa C57BL/6 debido a la ingesta de la dieta durante la inducción de OS experimental

Se utilizaron ratones de entre 8-9 semanas se dividieron en dos grupos; un grupo fue alimentado con la dieta estándar y otro con la dieta HFD durante 10 días, 10 días en los cuales se indujo ojo seco experimental.

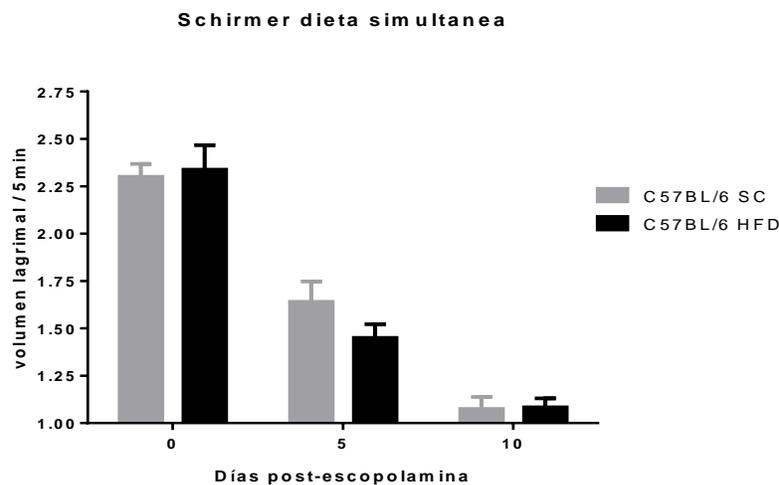
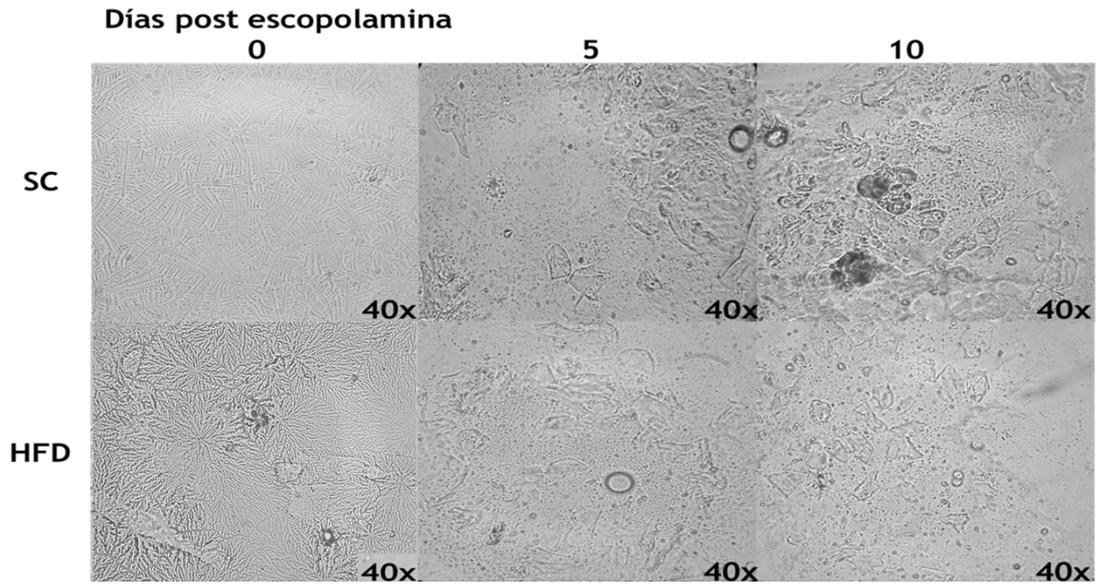


Figura 18.- La figura muestra el volumen lagrimal en ratones de la cepa C57BL/6 alimentados con diferentes dietas al momento de la inducción de ojo seco experimental, analizado con la prueba “t” student, Graph pad 6, (n=10 en 1 experimento C57BL/6).

La prueba de Schirmer evidencio que después de 5 y 10 días de alimentación e inducción de ojo seco, ambos grupos perdieron volumen lagrimal de la misma forma.



Panel 3.- La figura muestra imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas en ratones de la cepa C57BL/6 alimentados con diferentes dietas al momento de la inducción de ojo seco experimental. (n=8 en 5 experimentos C57BL/6, n=8 en 2 experimentos BALB/c).

Lo mismo sucedió en la prueba de Ferning pues ambos grupos perdieron el patrón de arborización después de la inducción de ojo seco.

Los datos muestran que la ingesta de una dieta diferente al momento de la inducción de ojo seco, no provoca ningún cambio. Lo que podría sugerir que los cambios clínicos y celulares pueden ser dependientes del tiempo de ingesta con un efecto benéfico o deletéreo por la posible generación de esteatosis hepática.

Por lo tanto, se realizó el siguiente experimento.

8.11- Diferencias en la cepa C57BL/6 debido a la ingesta de la dieta durante 15 semanas y posterior inducción experimental de OS

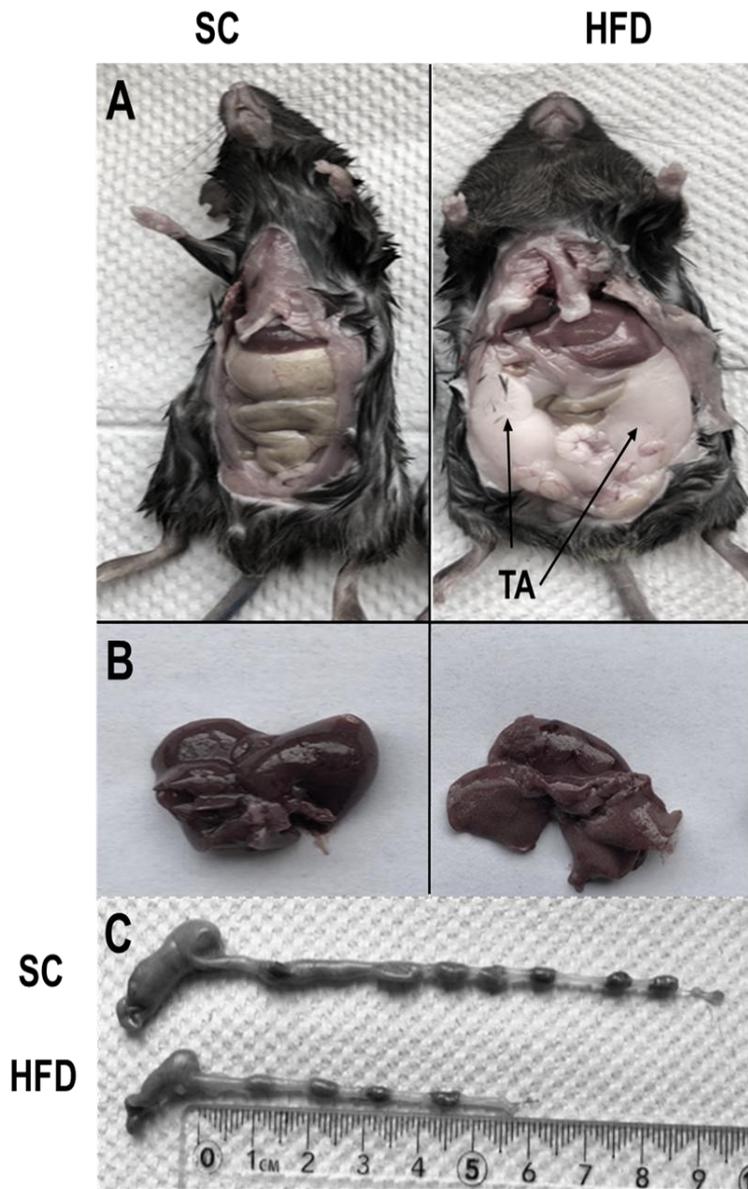


Figura 19.- El panel muestra los cambios morfológicos inducidos por la dieta HFD vs la SC en la cepa de ratón C57BL/6 después de 15 semanas de alimentación, panel 19A; muestra las diferencias del aumento de tejido adiposo (TA), panel 19B; muestra las diferencias hepáticas, panel 19C; muestra los cambios longitudinales del colon. (n=2 en 2 experimentos C57BL/6).

Para conocer si los cambios encontrados en el cuadro clínico en la inducción de ojo seco se debían al tiempo de ingesta de la dieta se realizó un experimento con ratones de 8-9 semanas de la cepa C57BL/6 los cuales se dividieron en dos grupos; un grupo fue alimentado con una dieta estándar y otro alimentado con una dieta HFD durante 15 semanas, con la finalidad de saber si un ingesta por mayor tiempo provocaba cambios a nivel ocular, pues los ratones podían desarrollar mayor grado de esteatosis y así modificar el cuadro clínico en ratones obesos comparados con el control.

El panel 19A, 19B, 19C muestran los cambios anatómicos de los grupos de ratones alimentados durante 15 semanas con dos tipos de dietas, fue evidente que los ratones alimentados con la dieta HFD mostraron una correcta recreación de las características de obesidad como: acortamiento de colon, el cambio de tamaño del ciego pues el grupo de ratones HFD evidenciaron un aumento de tamaño vs SC.

Por último, el aumento del tejido adiposo fue evidente como era esperado, sin embargo, el tiempo de la ingesta de dieta no fue lo suficiente para generar esteatosis hepática exacerbada. El grupo control no mostro diferencias.

Schirmer, 15 semanas de alimentación.

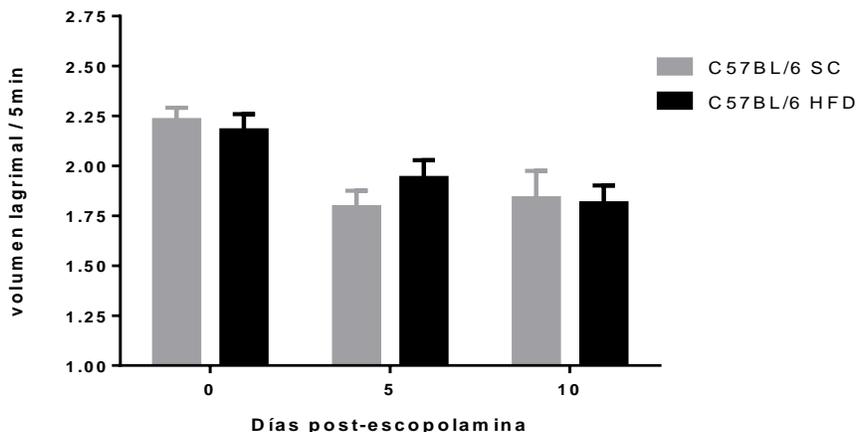
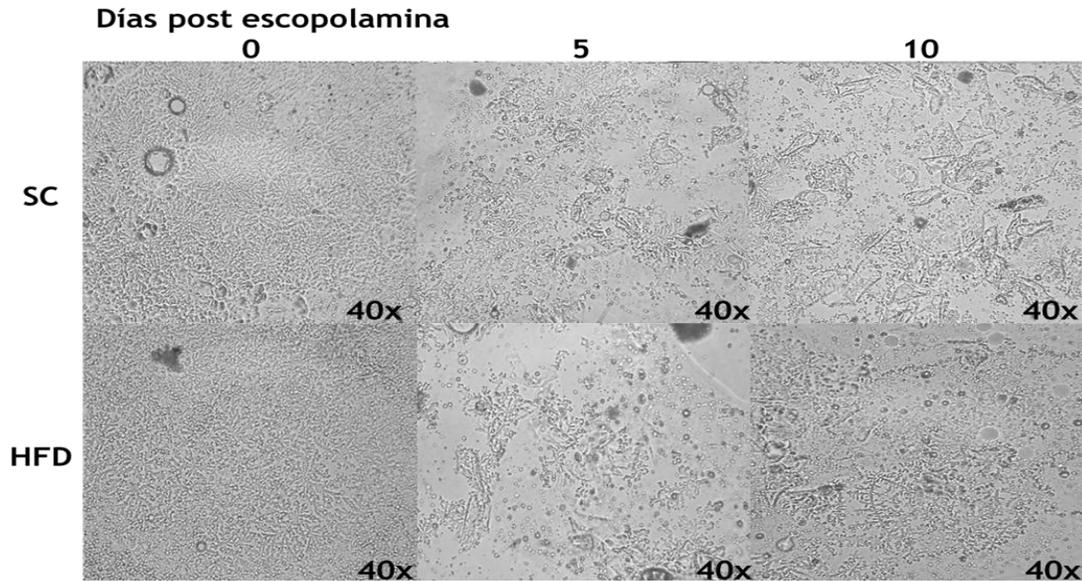


Figura 20.- La figura muestra el volumen lagrimal en los grupos de ratones alimentados después de 15 semanas con una dieta HFD y SC, así como después de la inducción de ojo seco experimental, analizado con la prueba “t” student, Graph pad 6, (n=10 en 1 experimento C57BL/6).

La prueba de Schirmer mostró que ambos grupos generaron niveles similares en volumen lagrimal después de las 15 semanas de alimentación y sorprendentemente posterior a la inducción de ojo seco, con una ligera tendencia del grupo SC a disminuir volumen en el día 5.



Panel 4.- El panel muestra imágenes representativas del patrón de arborización mucinas de ratones C57BL/6 alimentados durante 15 semanas con dos tipos de dietas. (n=10 en 1 experimento C57BL/6).

El patrón de arborización de mucinas evidencio que después de 15 semanas ambos grupos presentaron un patrón de arborización correspondiente a una lágrima saludable, sin embargo, ambos grupos después de la inducción de ojo seco tuvieron una disminución paulatina de la calidad de mucinas siendo ligeramente más evidente en el grupo SC.

Los datos mostrados sugieren que, después de 15 semanas de alimentación los grupos experimentales no generaron diferencias en los signos clínico dependiente de la dieta en realidad se comportan de manera similar, sin embargo, es importante resaltar que aun cuando el grupo de ratones C57BL/6 desarrollo mayor tejido adiposo y aumento del tamaño del hígado esto no genero exacerbación en el cuadro clínico de ojo seco experimental.

Lo que probablemente sugiere, la implicación de cambios a nivel sistémico relacionados al grado de esteatosis, pues en este experimento de 15 semanas de

alimentación con la dieta HFD la esteatosis fue mayor comparado con el experimento de 10 semanas de alimentación.

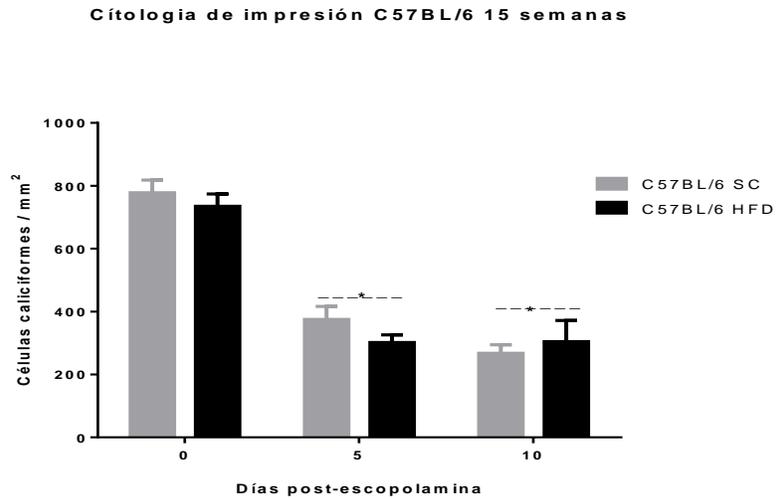


Figura 21.- La gráfica muestra el número de células caliciformes presentes en un mm² en la tira de Schirmer, por la técnica de citología de impresión en la cepa C57BL/6, en los 10 días de inducción de escopolamina. *p <0.0001 *p <0.05, analizado con la prueba "t" student, Graph pad 6, (n=8 en 5 experimentos C57BL/6).

8.12- Cuantificación de citocinas en sobrenadante de bazo

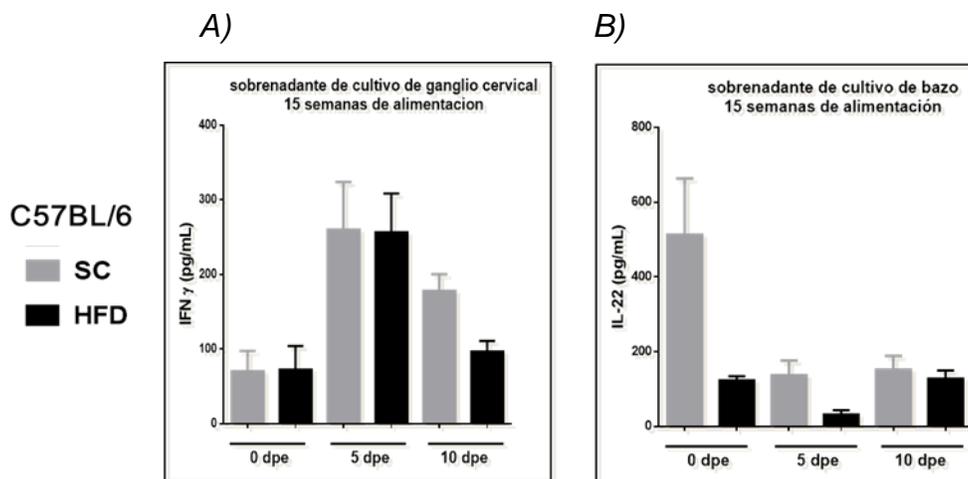


Figura 22.- La figura muestra los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo en bazo estimulados con 1 μ l de concanavalina, en grupos de ratones experimentales de la cepa C57BL/6 alimentados con dos tipos de dietas durante 15 semanas. ***p <0.0001, *p <0.05, analizado con la prueba "t" student, Graph pad 6, (n=10 en 1 experimento C57BL/6).

La figura 22 A, muestra la concentración de IFN γ de los sobrenadantes de cultivo celular de bazo después de 15 semanas de alimentación aumentando sus concentraciones después de 5 días post-inducción, sin embargo al día 10 la concentración disminuye en ambos grupos pero parece ser más evidente en HFD. No obstante, las concentraciones a lo largo de la inducción, no son altas, por lo que probablemente IFN γ no desarrolle un papel importante.

La figura 22 B, evidencia el comportamiento de IL-22 en sobrenadante de bazo, las concentraciones en ambos grupos mostraron ser menores a 200 pg/mL a lo largo del modelo, a excepción del día 0 en SC con una concentración mayor a 400 pg/mL,

8.13- Análisis de poblaciones celulares de bazo

El análisis de poblaciones celulares, que se presenta a continuación demuestra diferencias claras respecto a las 10 semanas de alimentación, en la misma dieta. En la figura 23 se puede observar que, las diferencias de células CD4⁺ y CD8⁺, después de 15 semanas de alimentación difieren, encontrando mayor porcentaje de ambas poblaciones en la dieta HFD, sin embargo, una vez que se inició la inducción con escopolamina ambos grupos disminuyeron su porcentaje de células en bazo de manera similar, a excepción del día 5 donde se observó un aumento en el porcentaje de células CD8⁺ en HFD con respecto a SC.

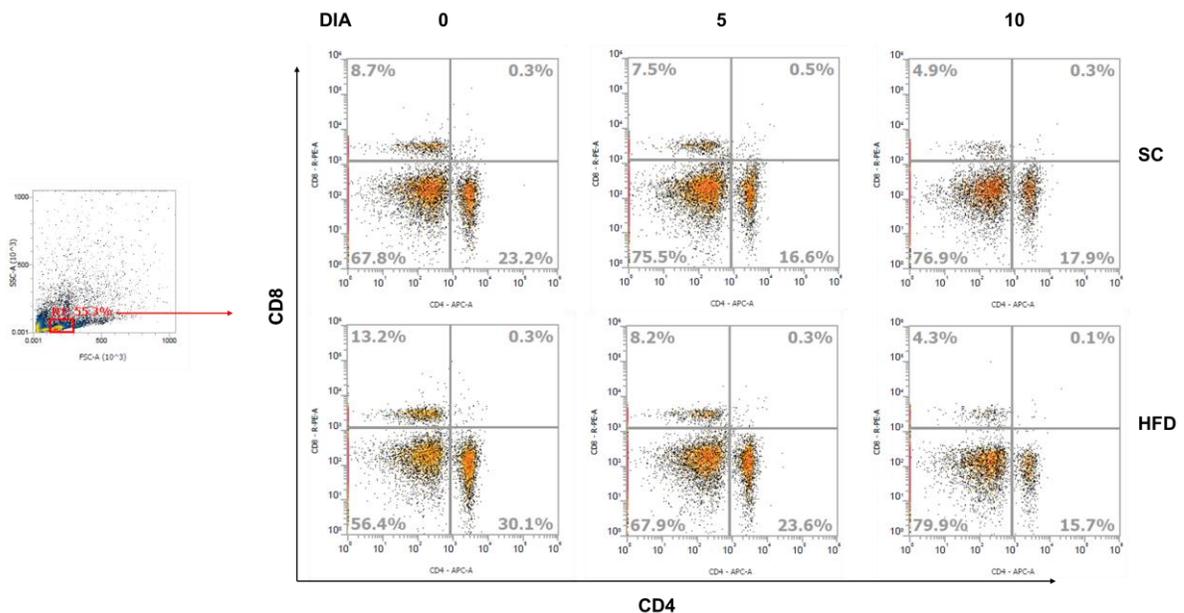


Figura 23.- La figura muestra la estrategia de análisis para la diferenciación de células no granuladas, de lado derecho se muestran las imágenes representativas de la caracterización de las poblaciones CD4⁺, CD8⁺ de los grupos experimentales de C57BL/6 alimentados por 15 semanas a los días 0, 5 y 10 post inducción de ojo seco experimental. (n=5 en 1 experimento C57BL/6).

Por otro lado, el análisis para identificar la población de neutrófilos con el marcador Ly6G, muestra de la misma manera, los cambios inducidos por la dieta, donde el grupo HFD presenta mayor porcentaje de neutrófilos, posterior a la inducción ambos grupos parecen tener una tendencia a aumentar el porcentaje de células al día cinco, sin embargo, al día 10 ambos grupos disminuyen (Figura 24). Los resultados hasta ahora mostrados por Citometría de flujo son los esperados debido a que se comprobó que no existían cambios significativos en los signos clínicos de la enfermedad.

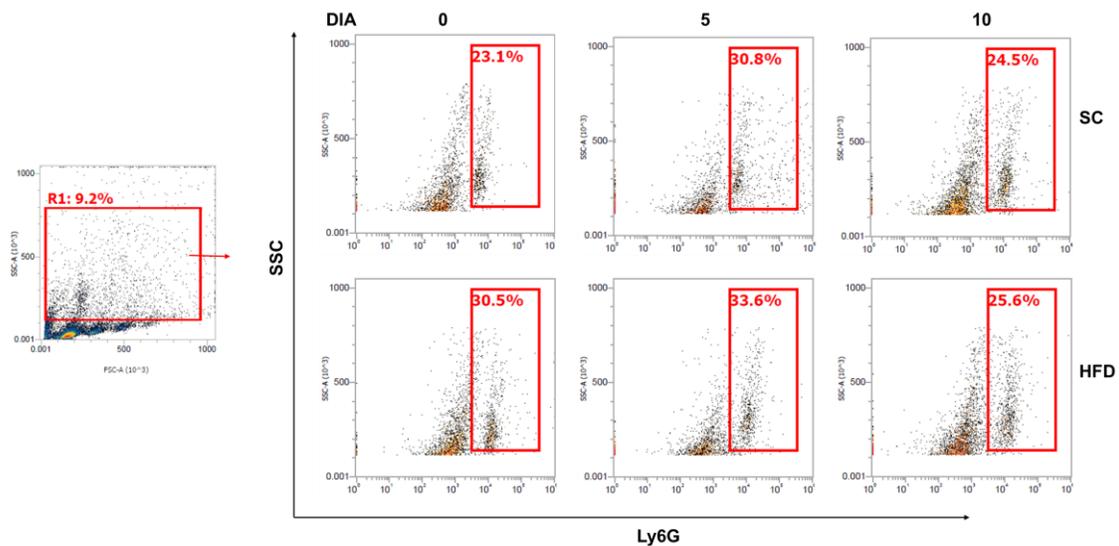


Figura 24.- La figura muestra las imágenes representativas de la estrategia de análisis para la diferenciación de células granulares, de lado derecho la caracterización de la población celular de neutrófilos diferenciada por granularidad y respuesta al marcado Ly6G de los grupos experimentales de la cepa C57BL/6 alimentadas por 15 semanas, a los días 0, 5 y 10 post inducción de ojo seco experimental. (n=5 en 1 experimento C57BL/6).

El análisis, para la diferenciación de macrófagos (F4/80) demostró en primer lugar que existían diferencias claras en comparación a los grupos alimentados por 10 semanas pues presentaron un menor porcentaje de células F4/80⁺, el grupo SC parece ser el grupo que presenta mayor pérdida del porcentaje de células (58.4%), posteriormente al día 5 parece tener un aumento para finalmente disminuir al día

10. El grupo HFD presento mayor porcentaje de células después de la alimentación por 15 semanas (63.8%) y a la inducción del modelo, la pérdida de células fue consistente.

El análisis con los marcadores utilizados, demuestran que estas células tienen la capacidad de migrar debido a que presentan el marcador CCR5, sin embargo, otras células que presentan este marcador son las células B y dendríticas. El cuadrante superior izquierdo, muestra que al día 10 el porcentaje de células que expresan CCR5 aumenta (SC: 15.4%, HFD: 13.8%).

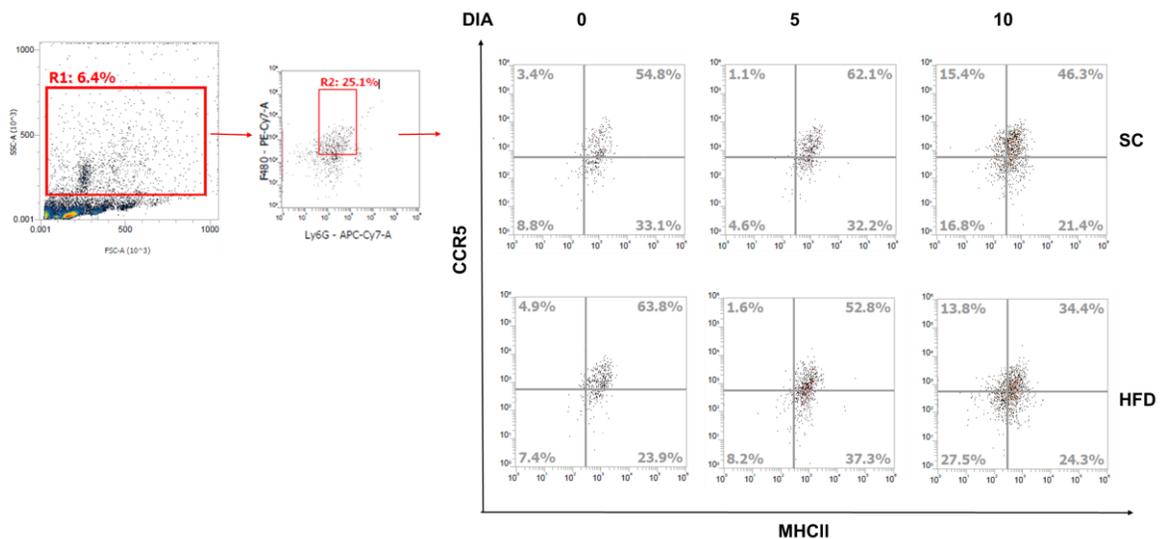


Figura 25.- El figura muestra la estrategia de análisis para la diferenciación de células granulares, de lado derecho se muestran las imágenes representativas de la caracterización en la población celular de macrófagos que responden a marcadores CCR5 y MHCII de los grupos experimentales C57BL/6 alimentado por 15 semanas, a los días 0, 5 y 10 post inducción de ojo seco experimental. (n=5 en 1 experimento).

9- DISCUSIÓN

La respuesta inflamatoria es uno de los principales procesos requeridos en respuesta a daño o infección en los seres vivos, el mecanismo de inflamación se presenta como una cadena de acontecimientos organizados que provocan cambios a nivel celular y vascular. De no controlarse, esta respuesta inflamatoria persistente ocasiona daño irreversible como el que se observa en enfermedades crónico-degenerativas. Cómo se regula dicho proceso en órganos considerados inmunoprivilegiados como el ojo en el contexto de “metainflamación” ha sido poco estudiado, por lo cual la presente investigación tuvo como objetivo conocer el efecto de obesidad en un modelo experimental de ojo seco.

Nuestros resultados muestran que durante un régimen de 10 semanas de alimentación con una dieta obesogénica (HFD), los ratones obtuvieron un aumento significativo (50-60%) de peso corporal comparado contra el peso inicial, mientras que los ratones alimentados con dieta normal (SC) únicamente aumentaron un 10-20% comparado con su peso inicial (Figura 5). El aumento de peso en los ratones HFD de ambas cepas fue similar y no presento diferencias significativas (figura 5A, 5B). El impacto de la dieta obesogénica fue evidente en el tracto gastrointestinal, como se observa en figuras 1 y 2, en donde se muestra una disminución en la longitud del colon de los ratones obesos, pero no en los ratones alimentados con dieta SC. Interesantemente, cuando se determinaron los niveles de glucosa en sangre se observó un aumento significativo únicamente en los ratones C57BL/6 alimentados con HFD (Figura 6B). Esto último es apoyado por reportes previos en donde se describe que tras una administración más prolongada de una dieta obesogénica (24 y 32 semanas)⁶⁵ el aumento de glucosa ocurre de manera más pronunciada en los ratones de la cepa C57BL/6 pero no en ratones de la cepa BALB/c, por lo tanto, confirma la susceptibilidad diferencial entre estas cepas de ratones ante la administración de la misma dieta.

Es importante puntualizar que los niveles de glucosa en sangre en nuestros distintos grupos experimentales no sobrepasaron los 160mg/dl, indicando un estado de hiperglucemia sin alcanzar los niveles reportados en ratones diabéticos.

Por ejemplo, recientes investigaciones en modelos murinos de diabetes (ratones ob/ob⁶⁶), reportan niveles de glucosa entre 250 mg/dl a 400mg/dl.

Aun cuando ambas cepas HFD aumentaron de peso, fue evidente que la cepa BALB/c no genero gran cantidad de tejido adiposo visceral, ni disminución del tamaño del colon esto es correspondiente a estudios como el de N. Jovicic *et al*⁶⁷, quienes lo atribuyen a una respuesta predominante Th2 que se desarrolla en la cepa BALB/c. Por otra parte, este mismo grupo menciona que dicha cepa tiene mayor susceptibilidad a desarrollar esteatosis hepática⁶⁷ dato contrastante con nuestra investigación, pues aun cuando ambos grupos HFD mostraron aumento de tamaño en el hígado las diferencias no fueron estadísticamente significativas, esto sugiere que el tiempo de alimentación con la dieta HFD que se utilizó en esta investigación, no fue suficiente para desarrollar esteatosis, mientras que en otros reportes claramente se observa el desarrollo de hígado graso cuando los animales son alimentados con dietas obesogénicas por periodos de tiempo más largos^{68 69 70}.

Posterior a la inducción de obesidad, se indujo ojo seco en grupos experimentales de ambas cepas. Encontramos que en el caso de los ratones de la cepa BALB/c ambos grupos (SC y HFD) presentaron signos clínicos de ojo seco sin ninguna diferencia significativa como se observa en los parámetros utilizados para determinar la severidad de ojo seco. De hecho, en el caso de volumen lagrimal los ratones BALB/c HFD mostraron una ligera tendencia no significativa en esta disminución al final del experimento (Figura 8). Por otra parte, la calidad lagrimal y citología de impresión (determinación de perdida de células caliciformes), encontramos que tanto la pérdida progresiva del patrón de mucinas, así como la disminución del número de células caliciformes ocurre de manera similar en ambos grupos de ratones (SC y HFD) BALB/c (Figura 9). Por lo tanto, se observó que en la cepa de ratones BALB/c la administración de la dieta obesogénica que seleccionamos tiene un efecto mínimo en el curso de nuestro modelo de ojo seco.

Por otro lado, y de manera sorprendente los ratones C57BL/6 HFD presentaron un curso atenuado de los signos de la enfermedad a lo largo de la inducción.

Encontramos que tanto el volumen lagrimal como el patrón de mucinas se preservan en los ratones C57BL/6 HFD comparado con lo observado en ratones C57BL/6 SC, en los cuales ambos parámetros se afectaron progresivamente (Figura 12). Interesantemente, Fujita *et. al.* reportaron un retraso en la pérdida de audición en ratones alimentados con una dieta HFD⁷¹, mientras que ratones obesos son más resistentes al daño hepático inducido por tioacetamida.⁷²

Sin embargo, el efecto benéfico que reportamos parece ser dependiente del tiempo de la dieta pues cuando se administró la dieta durante el tiempo de inducción de ojo seco (10 días), los ratones no mostraron diferencias entre sí como podemos ver en las figuras 18 y panel 3, esto es consistente, pues existen diferentes investigaciones experimentales que demuestran la efectividad que tiene la suplementación alimenticia con omega 3 y 6 sobre la estabilidad de la película lagrimal^{73 74}, sin embargo, la dieta administrada en nuestra investigación contiene bajas concentraciones de estos lípidos lo cual podría explicar los resultados obtenidos.

Para confirmar el hecho que el tiempo de administración de la dieta obesogénica es determinante en los efectos sobre el desarrollo de ojo seco, decidimos alimentar a los ratones C57BL/6 por 15 semanas con la dieta obesogénica (HFD). De manera muy interesante, nuestros resultados muestran que el efecto observado con 10 semanas de alimentación con HFD desapareció en ratones alimentados con HFD por 15 semanas. Como se mostró en las figuras 19A, 19B Y 19C, sugerimos que puede tener relación a los cambios encontrados en hígado después de 15 semanas de alimentación, los cuales pudieron ser capaces de generar repercusión sistémica, pues Hubler MJ, menciona que un proceso como esteatosis hepática promueve una respuesta Th1 y Th17 que es capaz de extenderse a órganos distantes⁷⁵, dado lo anterior proponemos investigar los efectos de esteatosis hepática exacerbada a nivel ocular.

Un punto importante en nuestra investigación fue conocer la relación que existe entre citología de impresión (número de células) y Ferning (patrón de arborización) la cual ya ha sido reportada previamente⁷⁶ y es congruente con los datos

obtenidos, pues a mayor cantidad de células caliciformes mejor patrón de arborización, sin embargo, enfatizamos la importancia de futuras investigaciones similares a esta, ya que es necesario analizar el tipo de mucinas producidas por las células caliciformes de la superficie ocular, a fin de identificar mucinas capaces de promover una respuesta negativa, esto debido a que en otros tejidos linfoides asociados a mucosa se ha asociado la expresión MUC5AC a asma y MUC2 a enfermedades inflamatorias del intestino y que estas mucinas juegan un papel patogénico a través de producción exacerbada de moco⁷⁷ y la disrupción de la barrera epitelial respectivamente⁷⁸.

Los cambios asociados a niveles de citocinas en suero en enfermedades oculares ha sido pobremente descrito, por lo que nosotros proponemos que la migración puede llevarse a cabo por las siguientes características; la conjuntiva cuenta venas y arterias conjuntivales, las cuales son ramificaciones de la vena yugular interna y arteria carótida lo que permitiría una recirculación sistémica.

Dado lo anterior, nuestros datos sugieren que existen variaciones en niveles totales de IL-1 β y TNF α en suero del grupo C57BL/6 HFD posteriores a la inducción de enfermedad, estas variaciones parecen tener una retroalimentación con la población total de neutrófilos encontrados en el bazo, lo que puede sugerir que dichos neutrófilos pueden ser la fuente principal de las citocinas mencionadas, mediando el proceso inflamatorio en los primero cinco días, estos resultados corresponderían a reportes ya publicados^{79 80}, los cuales enmarcan la importancia de la rápida respuesta de neutrófilos frente a un reto sin embargo, en condiciones del grupo control el proceso inflamatorio probablemente sea llevado a cabo de una forma más rápida al no encontrar en variaciones en IL-1 β , TNF α y neutrófilos al día 5 y 10 post inducción, pero si en poblaciones CD4⁺ y CD8⁺, lo que podría sugerir que son los linfocitos T median la inflamación en condiciones no asociadas a obesidad.

Las similitudes de la severidad en los signos clínicos de OS en los ratones alimentados durante 15 semanas son reflejadas en la presencia de porcentajes similares de CD4⁺, CD8⁺ y neutrófilos a lo largo del modelo.

Sorpresivamente, la cuantificación de citocinas estimuladas en cultivo celular de bazo sugiere que las citocinas con mayor implicación son IL-13 e IL-15. Particularmente, encontramos que los niveles de IL-13 eran menores en ratones obesos de 10 semanas comparado ratones SC, sugiriendo que IL-13 pudiera tener un papel patogénico en este modelo de ojo seco.

Estos datos son sorprendentes debido a que normalmente la presencia de IL-13 es asociada a un perfil Th2 (anti-inflamatorio) sin embargo, reportes de investigadores como Vela AT, exponen a IL-13 como factor principal en el desarrollo de fibrosis en infección por *Schistosoma mansoni*^{81 82}, aunado a los recientes datos publicados donde participa directamente en la hiperplasia de células caliciformes de la mucosa respiratoria, provocando metaplasia escamosa⁸³. Dado lo anterior sugerimos, que aun cuando IL-13 es importante en la diferenciación de células caliciformes¹⁶, nuestros datos sugieren que niveles exacerbados generan un papel patogénico a nivel ocular, lo que probablemente se deba a la incorrecta señalización a través la vía no canónica (IL-13R α 2), pues este receptor recientemente ha sido asociado al crecimiento de tumores en cerebro⁸⁴, o posiblemente a una respuesta Th2 patogénica como en casos reportados de asma^{85 86}. Debido a esta información hacemos énfasis en la necesidad de analizar en futuras investigaciones la participación de STAT6.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que los niveles de IL-15 aumentan tras la inducción de ojo seco en la cepa BALB/c, estos datos son consistentes con investigaciones que exponen la relación que existe entre altos niveles de IL-15 con la presencia de inflamación exacerbada⁸⁷. Interesantemente, a pesar de la alta secreción de IL-15 en los ratones BALB/c, no se observó un curso exagerado en el modelo de obesidad.

Dado lo anterior, nuestros resultados no permiten dilucidar el verdadero rol de IL-15 sin embargo, en combinación con los niveles encontrados de IL-1 β y TNF α proponemos su participación en la expresión de otro tipo de poblaciones celulares como células NK y/o linfocitos B.

Finalmente, la citometría de flujo reveló que los macrófagos en ratones alimentados durante 10 y 15 semanas de bazo son diferentes en términos de los niveles de MHCII en los primeros 5 días, comparados con los del día 10 post inducción de ojo seco. Aun cuando no sabemos el destino de estas células, proponemos que el proceso de migración puede ser un posible mecanismo de reparación en respuesta al proceso inflamatorio que sugerimos se lleva a cabo presumiblemente por Th2, pues ahora se conoce que la conexión de circulación sistémica entre humor acuoso y bazo permite llevar a cabo el proceso de inmunoregulación en cámara anterior a través de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior (ACAID) ^{88 89}, toda esta información es importante para entender que las arterias y venas de conjuntiva nacen y drenan de la misma rama que utiliza la cámara anterior para dicho proceso, lo que puede hacer posible la migración de macrófagos de bazo a conjuntiva. Además que en la figura 17 y 25 podemos observar que al día 10 existen otras poblaciones celulares que tiene el marcador MHCII que no son macrófagos lo que podría indicar que linfocitos B y células dendríticas podrían estar implicadas en los días posteriores a la inducción de la enfermedad.

10- CONCLUSIONES

- La ingesta de una dieta alta en grasa por 10 semanas ocasiona una ganancia similar de peso corporal en ambas cepas BALB/c y C57BL/6.
- La inducción de obesidad causo hiperglicemia en ratones C57BL/6 pero no en ratones BALB/c.
- La administración de una dieta obesogénica no es factor desencadenante de la enfermedad de ojo seco en ratones BALB/c y C57BL/6 de nuestra facultad.
- El impacto benéfico de la ingesta de una dieta alta en grasas observado en la cepa C57BL/6 es dependiente al tiempo de administración de dicha dieta.
- El curso atenuado de ojo seco en los ratones C57BL/6 HFD se asocia con la supresión de la producción de IL-13 en bazo.
- La respuesta Th2 parece desempeñar un rol patogénico en la enfermedad de ojo seco, donde presumiblemente IL-13 parece tener un papel dominante.

11- PERSPECTIVAS

-Cambiar el tipo de ingesta de dieta de un alta en grasas por un alta en carbohidratos.

-Aumentar el tiempo de ingesta de dieta alta en grasa hasta generar cambios extremos en hígado.

-Aumentar el tiempo de inducción de ojo seco.

-Medir niveles de IL-17 en suero y sobrenadante de cultivo celular en bazo.

-Neutralizar IL-13 e IL-15 en el modelo de ojo seco experimental.

-Analizar marcadores B202 y CD56.

-Analizar la participación de IL-4, STAT6 e IL-13R α 2

-Analizar cambios celulares en timo, pues también participa en la inmunoregulación de la cámara anterior.

-Análisis en la expresión de genes de mucinas y citocinas inflamatorias, en conjuntiva y cornea en ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante la inducción de ojo seco.

12- APENDICE 1

Buffer de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para 10lts y pH 7.4.

80 gr NaCl

11.6 gr Na₂HPO₄

2 gr KH₂PO₄

2 gr KC

Buffer de lisis (Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R., & Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic acids research*, 19(15), 4293.)

200 mM NaCl

5mM de ácido Etilnediaminatetraacético (EDTA)

0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS)

100 mM Tris HCl, pH 8.5

Se afora con agua destilada hasta 1Lt.

Solución hemolizante

Tris base 0.17 M

NH₄Cl 0.16 M

Se prepara para 300ml.

Buffer de pegado (ELISA)

0.1 de NA₂HPO₄

Para 1 lt con agua destilada.

Solucion de lavado (ELISA)

1000ML de PBS mas 0.5% de Tween 20

Solucion de bloqueo (ELISA)

Adicionar 150mg de ABTS (ICN Biomedicals) en 500 ml de 0.1 M de acido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un Ph DE 4.35 posteriormente se hicieron alícuotas de 11ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -80°C.

Buffer de FACS

0.1% de azida de sodio NaN_3 , 1% de suero fetal bovino SFB en 1lt de PBS.

13- BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian journal of ophthalmology*, 66(2), 190.
- ² Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian journal of ophthalmology*, 66(2), 190.
- ³ Takahashi, Y., Watanabe, A., Matsuda, H., Nakamura, Y., Nakano, T., Asamoto, K., ... & Kakizaki, H. (2013). Anatomy of secretory glands in the eyelid and conjunctiva: a photographic review. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, 29(3), 215-219.
- ⁴ Shumway, C. L., & Wade, M. (2018). *Anatomy Head, Eye, Conjunctiva*.
- ⁵ Zhou, L., Zhao, S. Z., Koh, S. K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., ... & Beuerman, R. W. (2012). In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of proteomics*, 75(13), 3877-3885.
- ⁶ de Souza, G. A., de Godoy, L. M., & Mann, M. (2006). Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome biology*, 7(8), R72.
- ⁷ Jeon, K. W. (Ed.). (2004). *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology* (Vol. 240). Elsevier.
- ⁸ Cwiklik, L. (2016). Tear film lipid layer: a molecular level view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(10), 2421-2430.
- ⁹ Butovich, I. A., Lu, H., McMahon, A., & Eule, J. C. (2012). Toward an animal model of the human tear film: biochemical comparison of the mouse, canine, rabbit, and human meibomian lipidomes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(11), 6881-6896.
- ¹⁰ Jeon, K. W. (Ed.). (2004). *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology* (Vol. 240). Elsevier.
- ¹¹ Jalbert, I. (2013). Diet, nutraceuticals and the tear film. *Experimental eye research*, 117, 138-146.
- ¹² Semeraro, F., Costagliola, C., Cancarini, A., Gilberti, E., Tosco, E., & Apostoli, P. (2012). Defining reference values of trace elements in the tear film: Diagnostic methods and possible applications. *Ecotoxicology and environmental safety*, 80, 190-194.
- ¹³ Moniaux, N., Escande, F., Porchet, N., Aubert, J. P., & Batra, S. K. (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci*, 6(1), 192-1.
- ¹⁴ Sjögren HSC. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis filiformis bei Hypofunktion der Tränendrüsen) *Acta Ophthalmol.* 1933;(Supp. II):1–151. Copenhagen.
- ¹⁵ Murube, J. (2004). Andrew de Roeth (1893–1981): dacryologist who introduced the term dry eye. *The ocular surface*, 2(4), 225-227.
- ¹⁶ Dartt, D. A., Dana, R., & D'Amore, P. (Eds.). (2011). *Immunology, inflammation and diseases of the eye*. Academic Press.
- ¹⁷ Stapleton, F., Alves, M., Bunya, V. Y., Jalbert, I., Lekhanont, K., Malet, F., ... & Viso, E. (2017). TFOS DEWS II Epidemiology Report. *The ocular surface*, 15(3), 334-365

-
- ¹⁸ Dartt, D. A., Dana, R., & D'Amore, P. (Eds.). (2011). Immunology, inflammation and diseases of the eye. Academic Press.
- ¹⁹ McCarty, C. A., Bansal, A. K., Livingston, P. M., Stanislavsky, Y. L., & Taylor, H. R. (1998). The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology*, 105(6), 1114-1119.
- ²⁰ Lin, P. Y., Tsai, S. Y., Cheng, C. Y., Liu, J. H., Chou, P., & Hsu, W. M. (2003). Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study. *Ophthalmology*, 110(6), 1096-1101.
- ²¹ Doughty, M. J., Fonn, D., Richter, D., Simpson, T., Caffery, B., & Gordon, K. (1997). A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients presenting to optometric practices across Canada. *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry*, 74(8), 624-631.
- ²² Shimmura, S., Shimazaki, J., & Tsubota, K. (1999). Results of a population-based questionnaire on the symptoms and lifestyles associated with dry eye. *Cornea*, 18(4), 408-411.
- ²³ O'Brien, P. D., & Collum, L. M. (2004). Dry eye: diagnosis and current treatment strategies. *Current allergy and asthma reports*, 4(4), 314-319.
- ²⁴ Fox, R. I., Howell, F. V., Bone, R. C., & Michelson, P. E. (1984, November). Primary Sjogren syndrome: clinical and immunopathologic features. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 14, No. 2, pp. 77-105). WB Saunders.
- ²⁵ Lerner, A., Jeremias, P., & Matthias, T. (2015). The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int J Celiac Dis*, 3(4), 151-155.
- ²⁶ Schaumberg, D. A., Sullivan, D. A., Buring, J. E., & Dana, M. R. (2003). Prevalence of dry eye syndrome among US women. *American journal of ophthalmology*, 136(2), 318-326.
- ²⁷ Stapleton, F., Alves, M., Bunya, V. Y., Jalbert, I., Lekhanont, K., Malet, F., ... & Viso, E. (2017). TFOS DEWS II Epidemiology Report. *The ocular surface*, 15(3), 334-365.
- ²⁸ Craig, J. P., Nichols, K. K., Akpek, E. K., Caffery, B., Dua, H. S., Joo, C. K., ... & Stapleton, F. (2017). TFOS DEWS II definition and classification report. *The ocular surface*, 15(3), 276-283.
- ²⁹ Gayton, J. L. (2009). Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, 3, 405.
- ³⁰ Close International Dry Eye Workshop The definition and classification of dry eye disease Report of the International Dry Eye Workshop (DEWS) (2007) *Ocul Surf*, 5 (2) (2007), pp. 75-92
- ³¹ HAYNES, R. J., TIGHE, P. J., SCOTT, R. A. H., & DUA, H. S. (1999). Human conjunctiva contains high endothelial venules that express lymphocyte homing receptors. *Experimental eye research*, 69(4), 397-403.
- ³² Szliter, E. A., Lighvani, S., Barrett, R. P., & Hazlett, L. D. (2007). Vasoactive intestinal peptide balances pro-and anti-inflammatory cytokines in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected cornea and protects against corneal perforation. *The Journal of Immunology*, 178(2), 1105-1114.

-
- ³³ S K Chauhan, R Dana. Role of Th17 cells in the immunopathogenesis of dry eye disease
- ³⁴ Baudouin, C. A new approach for better comprehension of diseases of the ocular surface. *J Fr Ophtalmol*. 2007 Mar;30(3):239-46.
- ³⁵ De Paiva, C. S., Corrales, R. M., Villarreal, A. L., Farley, W. J., Li, D. Q., Stern, M. E., & Pflugfelder, S. C. (2006). Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Experimental eye research*, 83(3), 526-535.
- ³⁶ Lee, H. S., Amouzegar, A., & Dana, R. (2017). Kinetics of Corneal Antigen Presenting Cells in Experimental Dry Eye Disease. *BMJ Open Ophthalmology*, 1(1), e000078.
- ³⁷ Jin, Y., Chauhan, S. K., Saban, D. R., & Dana, R. (2010). Role of CCR7 in facilitating direct allosensitization and regulatory T-cell function in high-risk corneal transplantation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(2), 816-821.
- ³⁸ Maruoka, S., Inaba, M., & Ogata, N. (2018). Activation of Dendritic Cells in Dry Eye Mouse Model. *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(8), 3269-3277.
- ³⁹ Pflugfelder, S. C., & de Paiva, C. S. (2017). The pathophysiology of dry eye disease: what we know and future directions for research. *Ophthalmology*, 124(11), S4-S13.
- ⁴⁰ S K Chauhan, R Dana. Role of Th17 cells in the immunopathogenesis of dry eye disease
- ⁴¹ Zheng, X., de Paiva, C. S., Li, D. Q., Farley, W. J., & Pflugfelder, S. C. (2010). Desiccating stress promotion of Th17 differentiation by ocular surface tissues through a dendritic cell-mediated pathway. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(6), 3083-3091.
- ⁴² Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E., & Kuchroo, V. K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *The Journal of Immunology*, 183(11), 7169-7177.
- ⁴³ Furuzawa-Carballeda, J., Vargas-Rojas, M. I., & Cabral, A. R. (2007). Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmunity reviews*, 6(3), 169-175.
- ⁴⁴ Stern, M. E., Schaumburg, C. S., & Pflugfelder, S. C. (2013). Dry eye as a mucosal autoimmune disease. *International reviews of immunology*,
- ⁴⁵ Nakamura, T., Hata, Y., Nagata, M., Yokoi, N., Yamaguchi, S., Kaku, T., & Kinoshita, S. (2015). JBP485 promotes tear and mucin secretion in ocular surface epithelia. *Scientific reports*, 5, 10248.
- ⁴⁶ Felix, C. M., Lee, S., Levin, M. H., & Verkman, A. S. (2017). Pro-Secretory Activity and Pharmacology in Rabbits of an Aminophenyl-1, 3, 5-Triazine CFTR Activator for Dry Eye Disorders. *Investigative ophthalmology & visual science*, 58(11), 4506-4513.
- ⁴⁷ Masmali, A. M., Purslow, C., & Murphy, P. J. (2014). The tear ferning test: a simple clinical technique to evaluate the ocular tear film. *Clinical and Experimental Optometry*, 97(5), 399-406.

-
- ⁴⁸ Nakamura, T., Hata, Y., Nagata, M., Yokoi, N., Yamaguchi, S., Kaku, T., & Kinoshita, S. (2015). JBP485 promotes tear and mucin secretion in ocular surface epithelia. *Scientific reports*, 5, 10248.
- ⁴⁹ Shimazaki-Den, S., Dogru, M., Higa, K., & Shimazaki, J. (2013). Symptoms, visual function, and mucin expression of eyes with tear film instability. *Cornea*, 32(9), 1211-1218.
- ⁵⁰ Bron, A. J., Abelson, M. B., Ousler, G., Pearce, E., Tomlinson, A., Yokoi, N., ... & Schaumberg, D. (2007). Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocular Surface*, 5(2), 108-152.
- ⁵¹ Hessen, M., & Akpek, E. K. (2014). Dry eye: an inflammatory ocular disease. *Journal of ophthalmic & vision research*, 9(2), 240.
- ⁵² Thulasi, P., & Djalilian, A. R. (2017). Update in current diagnostics and therapeutics of dry eye disease. *Ophthalmology*, 124(11), S27-S33.
- ⁵³ Stern, M. E., Schaumburg, C. S., & Pflugfelder, S. C. (2013). Dry eye as a mucosal autoimmune disease. *International reviews of immunology*, 32(1), 19-41.
- ⁵⁴ Calonge, M. (2001). The treatment of dry eye. *Survey of ophthalmology*, 45, S227-S239.
- ⁵⁵ Stern, M. E., Schaumburg, C. S., & Pflugfelder, S. C. (2013). Dry eye as a mucosal autoimmune disease. *International reviews of immunology*, 32(1), 19-41.
- ⁵⁶ K. W. (Ed.). (2004). *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology* (Vol. 240). Elsevier.
- ⁵⁷ Pflugfelder, S. C. (2008). Prevalence, burden, and pharmacoconomics of dry eye disease. *Am J Manag Care*, 14(3 Suppl), S102-S106.
- ⁵⁸ Obesity-Preventing, W. H. O. (1997). *managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity*. Geneva: Who, 7-17.
- ⁵⁹ Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., ... & Abraham, J. P. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The lancet*, 384(9945), 766-781.
- ⁶⁰ Obesity-Preventing, W. H. O. (1997). *managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity*. Geneva: Who, 7-17.
- ⁶¹ Maniscalco, M., Paris, D., Melck, D. J., D'amato, M., Zedda, A., Sofia, M., ... & Motta, A. (2017). Coexistence of obesity and asthma determines a distinct respiratory metabolic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(5), 1536-1547.
- ⁶² Carbone, F., La Rocca, C., De Candia, P., Procaccini, C., Colamatteo, A., Micillo, T., ... & Matarese, G. (2016, October). Metabolic control of immune tolerance in health and autoimmunity. In *Seminars in immunology* (Vol. 28, No. 5, pp. 491-504). Academic Press.
- ⁶³ Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M., & Kim, J. B. (2014). Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Molecules and cells*, 37(5), 365.

-
- ⁶⁴ Rausch, M. E., Weisberg, S., Vardhana, P., & Tortoriello, D. V. (2008). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *International journal of obesity*, 32(3), 451.
- ⁶⁵ Jovicic, N., Jeftic, I., Jovanovic, I., Radosavljevic, G., Arsenijevic, N., Lukic, M. L., & Pejnovic, N. (2015). Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in response to high-fat feeding. *PLoS One*, 10(7), e0134089.
- ⁶⁶ Özcan, U., Yilmaz, E., Özcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., ... & Hotamisligil, G. S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313(5790), 1137-1140.
- ⁶⁷ Jovicic, N., Jeftic, I., Jovanovic, I., Radosavljevic, G., Arsenijevic, N., Lukic, M. L., & Pejnovic, N. (2015). Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in response to high-fat feeding. *PLoS One*, 10(7), e0134089.
- ⁶⁸ Collins, S., Martin, T. L., Surwit, R. S., & Robidoux, J. (2004). Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & behavior*, 81(2), 243-248.
- ⁶⁹ Strissel, K. J., DeFuria, J., Shaul, M. E., Bennett, G., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2010). T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity*, 18(10), 1918-1925.
- ⁷⁰ Wu, H., Ghosh, S., Dai Perrard, X., Feng, L., Garcia, G. E., Perrard, J. L., ... & Ballantyne, C. M. (2007). T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*, 115(8), 1029-1038.
- ⁷¹ Fujita, T., Yamashita, D., Uehara, N., Inokuchi, G., Hasegawa, S., Otsuki, N., & Nibu, K. I. (2015). A high-fat diet delays age-related hearing loss progression in C57BL/6J mice. *PloS one*, 10(1), e0117547
- ⁷² Won, Y. S., Song, J. W., Lim, J. H., Lee, M. Y., Moon, O. S., Kim, H. C., ... & Kwon, H. J. (2016). Genetically obese (ob/ob) mice are resistant to the lethal effects of thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 291, 38-45.
- ⁷³ Miljanovic, B., Trivedi, K. A., Dana, M. R., Gilbard, J. P., Buring, J. E., & Schaumberg, D. A. (2005). Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women-. *The American journal of clinical nutrition*, 82(4), 887-893.
- ⁷⁴ Kokke, K. H., Morris, J. A., & Lawrenson, J. G. (2008). Oral omega-6 essential fatty acid treatment in contact lens associated dry eye. *Contact Lens and Anterior Eye*, 31(3), 141-146.
- ⁷⁵ Hubler, M. J., & Kennedy, A. J. (2016). Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 34, 1-7.
- ⁷⁶ Jackson, J. A., & Perrigin, J. A. (1999). Relationship of impression cytology and tear ferning to reports of dry eye. *Journal of the American Optometric Association*, 70(3), 187-192.

-
- ⁷⁷ Reid, A. T., Veerati, P. C., Gosens, R., Bartlett, N. W., Wark, P. A., Grainge, C. L., ... & Knight, D. A. (2018). Persistent induction of goblet cell differentiation in the airways: therapeutic approaches. *Pharmacology & therapeutics*, *185*, 155-169.
- ⁷⁸ Allais, L., Kerckhof, F. M., Verschuere, S., Bracke, K. R., De Smet, R., Laukens, D., ... & Cuvelier, C. A. (2016). Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environmental microbiology*, *18*(5), 1352-1363.
- ⁷⁹ Guma, M., Ronacher, L., Liu-Bryan, R., Takai, S., Karin, M., & Corr, M. (2009). Caspase 1-independent activation of interleukin-1 β in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *60*(12), 3642-3650.
- ⁸⁰ Kato, T., & Kitagawa, S. (2006). Regulation of neutrophil functions by proinflammatory cytokines. *International journal of hematology*, *84*(3), 205.
- ⁸¹ Vella, A. T., & Pearce, E. J. (1992). CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *The Journal of Immunology*, *148*(7), 2283-2290.
- ⁸² Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K., & Kitani, A. (2006). IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. *Nature medicine*, *12*(1), 99.
- ⁸³ Reid, A. T., Veerati, P. C., Gosens, R., Bartlett, N. W., Wark, P. A., Grainge, C. L., ... & Knight, D. A. (2018). Persistent induction of goblet cell differentiation in the airways: therapeutic approaches. *Pharmacology & therapeutics*, *185*, 155-169.
- ⁸⁴ Debinski, W., Dickinson, P., Rossmesl, J. H., Robertson, J., & Gibo, D. M. (2013). New agents for targeting of IL-13RA2 expressed in primary human and canine brain tumors. *PLoS One*, *8*(10), e77719.
- ⁸⁵ Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., ... & Kay, A. B. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *New England Journal of Medicine*, *326*(5), 298-304.
- ⁸⁶ Platts-Mills, T., Vaughan, J., Squillace, S., Woodfolk, J., & Sporik, R. (2001). Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *The Lancet*, *357*(9258), 752-756.
- ⁸⁷ Abadie, V., & Jabri, B. (2014). IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunological reviews*, *260*(1), 221-234.
- ⁸⁸ Paunicka, K., Chen, P. W., & Niederkorn, J. Y. (2012). Role of IFN- γ in the establishment of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)-induced CD8+ T regulatory cells. *Journal of leukocyte biology*, *91*(3), 475-483.
- ⁸⁹ Cone, R. E., & Pais, R. (2009). Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID): an acute response to ocular insult protects from future immune-mediated damage+?. *Ophthalmology and eye diseases*, *1*, OED-S2858.