



---

---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Estudio del factor inhibidor de la migración de  
macrófagos (MIF) en la inmunopatogénesis 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**

PABLO EMILIO HERNÁNDEZ LÓPEZ

Directora de tesis: Dra. Alicia Vázquez Mendoza

Asesor principal: Dr. José Luis Reyes Hernández





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.

# Dedicatorias

A mi madre: Juana López Hernández, gracias por apoyarme siempre, donde quiera que estés, gracias por todo tu apoyo durante todo el tiempo que estuviste conmigo, por tu guía, sabiduría y el entusiasmo que pusiste para que sea alguien diferente en esta vida, a pesar de que no estás aquí conmigo de manera física, sé que siempre estarás presente en todo lo que haga.

A mi padre: Cesar Hernández Yescas, por estar siempre al pendiente de mi hermano y de mí, por ver que nada nos falte, porque además de ser además padre, eres amigo, compañero y guía excepcional.

A mi hermano: Fabián Uriel Hernández López, gracias por todo tu apoyo y buenos consejos a pesar de él ser el menor.

A toda la familia López Hernández, Daniel, Nathalie, Diego, Tía Rita, Tío Martin, su apoyo y sus consejos en estos últimos cuatro años, han sido de gran importancia en mi vida.

A toda la familia Hernández Yescas, Tía Leti, Tío Miguel, Abuelo Toño, Abuela Vicky, Tía Gabriela.

A mi novia Angélica González Arredondo por siempre estar ahí detrás de mí, apoyándome, motivándome y ser una persona en quien puedo confiar en todo momento.

A mis amigos Fernando, Raúl, Juan, Bety, María Castro Ortiz, Braulio, Brenda, Anita, Kelly, Andy y Erick porque su amistad trascendió más allá de los salones y la clínica donde nos conocimos.

A mis amigos de laboratorio, Eve, Jazz, Danae, Alexia, Doc Tonatiuh, Doc Oscar y Doc Nelly, gracias por apoyarme dentro y fuera de este proyecto.

A la Dra. Alicia Vázquez Mendoza, por su gran apoyo en este proyecto, por confiar en mí, por todo el tiempo dedicado, por sus regaños, consejos y por todas las preguntas el tiempo preguntarme de inmunología, ojo seco y MIF.

Al Dr. José Luís Reyes Hernández, por darme un espacio en el laboratorio, por su apoyo y por siempre estar preguntándome sobre MIF e inmunología, ya que eso me motivo a seguir leyendo.

A Marisol Ibet González González, por siempre ayudarnos en el laboratorio en todo lo que necesitamos y hace falta.

A la M. en C. Imelda Juárez Avelar, por su asesoría metodológica en la realización de este proyecto.

# **Agradecimientos**

A mi familia y amigos

A la Dra. **Miriam Rodríguez Sosa** por permitirme estar un tiempo en su laboratorio.

A mis sinodales por su tiempo:

**Dra. Alicia Vázquez Mendoza.**

**Dr. José Luis Reyes Hernández.**

**Especialista. Oscar Antonio Ramos Montes**

**MVR. Nadia Yael Morales Rodríguez**

**Dr. Roberto De Aro Hernández**

Al personal de Bioterio de la FES Iztacala

**Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM. No. De proyectoTA200118.**

EN MEMORIA DE:

Juana López Hernández

Pedro López Ramírez

María de Dolores Hernández Avalos

# ÍNDICE

<b>1.- Resumen</b>	1
<b>2.- Introducción</b>	3
2.1.- Estructura de la superficie y respuesta inmune	4
2.2.-Estructura y función de la película lagrimal	5
2.3.-Definición y clasificación de ojo seco	7
2.4.-Prevalencia e incidencia	8
2.5.-Signos y síntomas de ojo seco	9
2.6.-Diagnóstico	9
2.7.-Tratamiento	9
2.8.-Inflamación y ojo seco	10
2.9.-Factor inhibidor de la migración de macrófagos	11
2.1.1.- Función de MIF en la respuesta inmune en enfermedades infecciosas	12
2.1.2.-Participacion de MIF en enfermedades inflamatorias y autoinmunes	13
2.1.3.-Expresion de MIF en tejidos oculares	13
<b>3.- Justificación</b>	15
<b>4.- Objetivo general</b>	16
4.1.- Objetivos particulares	16
<b>5.- Hipótesis</b>	17
<b>6.- Metodología</b>	18
6.1.- Genotipo de los animales experimentales por técnica de PCR	18

6.1.1.- Extracción de DNA	18
6.1.2.- Amplificación del Gen	18
6.1.3.- Electroforesis	19
6.2.- Evaluación de la calidad de la película lagrimal por las técnicas de Schirmer, Ferning y citología de impresión	20
6.3.- Inducción de Ojo seco	20
6.4.- Evaluación de los signos clínicos de ojo seco en ratones MIF <sup>+/+</sup> y MIF <sup>-/-</sup> a través de las técnicas Schirmer, Ferning y Citología de impresión en ratones de con ojo seco	20
6.4.1.- Determinación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer	20
6.4.2.- Determinación del patrón de arborización de mucinas	20
6.4.3.- Cuantificación del número de células caliciformes	21
6.5.- Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (sándwich) en suero	21
6.5.1.- Obtención de suero	21
6.5.2.- Sensibilización de la placa	22
6.5.3.- Muestras y curva	22
6.5.4.- Revelado	22
6.6.- Análisis de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T (CD4, CD8) por citometría de flujo	23
6.7.- Análisis del perfil de citocinas en cultivos de linfocitos obtenidos de bazo y ganglios linfáticos cervicales	24
6.7.1.- Obtención de células de ganglio linfático cervical y bazo	24
<b>7.- Resultados</b>	<b>26</b>

<b>8.- Discusión</b>	38
<b>9.-Resumen de resultados</b>	43
<b>10.- Conclusiones</b>	44
<b>11.- Bibliografía</b>	45
<b>12.- Apéndices</b>	51

## **Abreviaturas**

DC.- del inglés “Dendritic Cells”. Traducción “Celulas Dendriticas”

APC. - del inglés “Antigen Presenting Cells”. Traducción “Células Presentadoras de Antígeno”

OSDI. - del inglés “Ocular Surface Disease Index”. Traducción “Índice de enfermedad de la superficie ocular”

MGD. - del inglés “Meibomian Gland Disfuncion”. Traducción “Disfunción de las glándulas de meibomio”

MIF. - del inglés “Macrophage Migration Inhibitory Factor”. Traducción “Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos”

BUT. - del inglés “Break Up Time” . Traducción “Tiempo de Ruptura Lagrimal”

DAMP. - del inglés “Damage Associated Molecular Patterns. Traducción “Patrones moleculares asociados a daño”.

PAMP. - del inglés “Patogen Associated Molecular Patterns. Traducción “Patrones moleculares asociados a patógenos”

ROS. - del inglés “Reactive Oxygen Species. Traducción “Especies reactivas de oxígeno”

NOS.- del inglés “Nitric Oxygen Synthase”. Traducción “Óxido nítrico sintasa”

IBD. - del inglés “Inflammatory Bowel Disease”. Traducción “Enfermedad inflamatoria del intestino

## 1.- Resumen

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una molécula de la respuesta inmune (RI) ampliamente reconocida por su participación en diversas patologías autoinmunes e inflamatorias. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la participación de MIF en el desarrollo y curso de enfermedades inflamatorias oculares como ojo seco (OS). Con el fin de contribuir a establecer la participación de esta molécula en el desarrollo de OS empleamos ratones silvestre (MIF<sup>+/+</sup>) y deficientes para MIF (MIF<sup>-/-</sup>) a los cuales se les indujo OS durante 21 días. Posterior a la inducción de OS, los ratones fueron monitoreados a fin de evaluar los signos característicos de esta patología y analizar la respuesta inmune a los 0, 7, 14 y 21 días post-inducción de OS y a los siete días de la suspensión del modelo.

Ratones ♂ fondo genético Balb/c MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup>, se les indujo OS mediante la inyección de 0.5 mg de escopolamina vía subcutánea (SC), tres veces al día por 21 días, se observaron siete días más tras la suspensión del modelo (fase de recuperación). Una vez inducido el modelo de OS, los ratones fueron monitoreados a fin de evaluar la estabilidad de la película lagrimal, a través de la determinación del volumen lagrimal, el patrón de arborización de mucinas y el número de células caliciformes. Se obtuvo suero a las 0, 7, 14 y 21 dpi, y a los siete días de haber suspendido el modelo (fase de recuperación) para determinar (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) por ELISA-sándwich. Los resultados obtenidos revelaron que los ratones MIF<sup>-/-</sup> tuvieron menor pérdida del volumen lagrimal en comparación con los ratones MIF<sup>+/+</sup> (15.5% y 43.5%, respectivamente), mostraron un patrón de arborización de mucinas tipo II y III. Interesantemente, estos resultados correlacionaron con una menor pérdida de células caliciformes en comparación a los ratones control MIF<sup>+/+</sup> (31.4% y 52.5%, respectivamente). Además, los ratones MIF<sup>-/-</sup> tuvieron una menor producción de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  en suero en comparación con los ratones control MIF<sup>+/+</sup>.

Por otro lado, el análisis de la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , en sobrenadante de cultivos de ganglio cervical y bazo a los 5dpi, solo mostro resultados estadísticamente significativos en la producción de TNF- $\alpha$  en células de ganglio cervical estimuladas con 1

ug de CoA. Finalmente, el ensayo de citometría de flujo de poblaciones celulares en ganglio cervical, revelo que los ratones MIF<sup>-/-</sup> presentaron un menor porcentaje de macrófagos CCR5<sup>+</sup>/MHC<sup>+</sup> y células T CD4<sup>+</sup>, pero no de CD8<sup>+</sup>a los 7 y 14 post-inducción de OS.

En conjunto estos resultados, nos permitieron observar que los ratones MIF<sup>-/-</sup> mostraron una mayor recuperación una vez suspendida la inducción de ojo seco con escopolamina, ya que presentaron incremento en el volumen lagrimal, un mayor número de células caliciformes y un patrón de arborización de mucinas tipo I considerado fisiológico.

## **2.- Introducción**

El sistema inmune es un conjunto de órganos y células, las cuales se encargan de distinguir entre lo propio de lo no propio, contribuyendo de esta manera a mantener la homeostasis del organismo y proteger al cuerpo ante agentes externos. Además, se encarga de reparar los tejidos cuando sufren algún tipo de daño. Con fines de estudio, la respuesta inmune se divide en: respuesta inmune innata y adaptativa las cuales están diferenciadas principalmente por el tipo de receptores, células y proteínas involucradas en cada una, entre otros [1, 2].

La inmunidad innata es considerada la primera línea de defensa del organismo, cuenta con componentes celulares y humorales, entre los cuales se destacan barreras epiteliales, proteínas del sistema de complemento, células fagocíticas como: macrófagos (Mφ), neutrófilos y células dendríticas (DC), además de la secreción de citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias, supresoras y quimiocinas [1, 2].

Uno de los mecanismos centrales de la respuesta inmune innata es la inflamación. La inflamación es considerada un componente complejo y necesario en respuesta a estímulos biológicos, químicos o físicos capaces de producir daño, por lo que se inducen diversos eventos celulares y moleculares, los cuales se encargan de iniciar y regular dicho proceso. Durante la fase aguda las células migran al sitio de lesión gracias a la liberación de citocinas, quimiocinas y proteínas de fase aguda [1, 2].

La inflamación aguda es considerada suficiente para resolver el daño e iniciar los procesos de reparación tisular. Sin embargo, un proceso inflamatorio persistente (crónico) como resultado de una exposición prolongada a un estímulo o a una reacción inapropiada contra autoantígenos, puede inducir daño tisular y fibrosis. Diversos grupos de investigación han reportado que la inflamación crónica contribuye a numerosas enfermedades locales y sistémicas, como artritis, asma, aterosclerosis, enfermedades autoinmunes, diabetes, cáncer entre otras [1, 3-6].

## 2.1.- Estructura de SO y regulación inmune

La superficie ocular (SO) está conformada por córnea, conjuntiva y película lagrimal, es la parte anterior del ojo y la más expuesta al medio ambiente, por lo que también la parte más susceptible a sufrir daño por traumatismos o infecciones causadas por virus, bacterias y hongos [7-9]. (Figura 1)

Se ha descrito a la superficie ocular como un sistema, es decir, un conjunto dinámico de estructuras las cuales ayudan a mantener la homeostasis en la superficie ocular, entre ellas se encuentran: epitelio corneal y conjuntival, glándula lagrimal principal, glándulas de meibomio, película lagrimal, ductos nasolagrimales, irrigación, inervación, y tolerancia inmunológica. Todos estos componentes forman el sistema de la superficie ocular encargados de nutrir, lubricar, humectar, proteger y mantener a las estructuras transparentes, permitiendo el paso de la luz hacia la retina [10-13].

El ojo tiene la particularidad de ser un órgano inmunológicamente privilegiado, es decir, debido a la exposición constante que tiene la SO con el medio ambiente, cuenta con mecanismos de tolerancia inmunológica, entre los que se destaca la presencia de linfocitos T reguladores (Tregs) encargados de secretar citocinas antiinflamatorias y supresoras, como interleucina 10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) los cuales evitan que a la menor interacción de un antígeno con M $\phi$  o DC, se desencadene una respuesta inflamatoria [14-17]. Sin embargo, diversos estudios han reportado que enfermedades inflamatorias oculares de origen infeccioso y no infeccioso como: conjuntivitis, uveítis, queratitis, retinitis, vasculitis y ojo seco (OS), pueden afectar el nervio óptico, los vasos sanguíneos, la córnea, la conjuntiva, párpados y músculos extraoculares [8, 9, 12, 17].

Una de las características centrales de la mayoría de estas enfermedades es que la etiología va acompañada de procesos inflamatorios crónicos, que de no ser tratados de manera correcta podría dañar de manera irreversible estructuras como: córnea, cristalino, humor vítreo o retina, causando baja visión o ceguera en casos más graves [8, 9, 18-20].

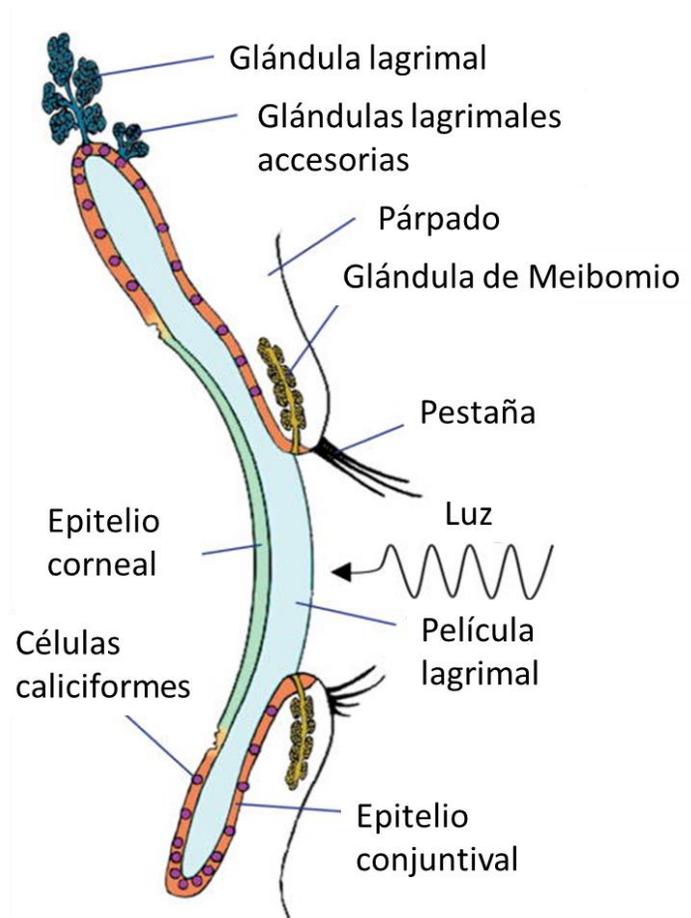


Figura 1. Imagen de la superficie ocular, tomada de “Rodríguez, M. B., & Argüeso, P. (2018). Glycosylation pathways at the ocular surface. *Biochemical Society transactions*, 46(2), 343-350.” Traducida y editada por Hernández Emilio.

## 2.2 Estructura y función de la película lagrimal

La película lagrimal es considerada la primera barrera de defensa del ojo frente al ambiente externo, ya que, además de funcionar como barrera física, contiene componentes del sistema inmune, entre los que se destaca la presencia de inmunoglobulinas, específicamente IgA e IgM [7]. Además, cuenta con una amplia variedad de péptidos antimicrobianos, entre los que destaca la presencia de beta-defensinas, lisozima, lactoferrina y lipocalina, que en conjunto se encargan de neutralizar y eliminar microorganismos potencialmente patógenos, que de no ser eliminados pueden inducir de procesos inflamatorios crónicos [21].

Estructuralmente la película lagrimal es un fluido trilaminar, no newtoniano, dinámico y complejo conformado por tres capas: la capa lipídica, es la porción más externa, esta capa deriva de las glándulas de meibomio y se extiende por toda la SO por acción del parpadeo, su función es estabilizar y brindar tensión superficial a la película lagrimal para evitar su rápida evaporación [18, 20, 22]. La capa acuosa, es producida por la glándula lagrimal principal, representa el 90% del volumen lagrimal, entre sus funciones se encuentran: el transporte de oxígeno, la lubricación de la SO, la neutralización y eliminación de patógenos a través de producción de IgA e IgG, lipocalina, lactoferrina y lisozima [8, 23, 24].

Finalmente, la capa interna o porción mucinica se encuentra en contacto con el epitelio de la córnea y la conjuntiva. Esta es producida principalmente por las células caliciformes de la conjuntiva bulbar, además estas células se encargan de secretar diferentes tipos de mucinas (MUC) en particular MUC1, 2, 4, 5AC, 16 y 20 (ver tabla 1). Estas mucinas están clasificadas en 3 tipos, las asociadas a membrana, formadoras de gel y solubles. En particular las mucinas asociadas a membrana son los principales constituyentes del glicocáliz, contribuyendo a mantener la estabilidad y adherencia de la película lagrimal a la superficie ocular [8, 15, 23, 25].

<b>MUCINA</b>	<b>TIPO</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>
<b>MUC1</b>	Asociada a membrana	Película lagrimal, conjuntiva, epitelio corneal
<b>MUC2</b>	Secretora formadora de gel	Película lagrimal, conjuntiva, células caliciformes
<b>MUC4</b>	Asociada a membrana	Película lagrimal, conjuntiva, epitelio corneal
<b>MUC5AC</b>	Secretora formadora de gel	Película lagrimal, epitelio conjuntival/células caliciformes
<b>MUC5B</b>	Secretora formadora de gel	Glándula lagrimal
<b>MUC7</b>	Secretora y soluble	Glándula lagrimal
<b>MUC16</b>	Asociada a membrana	Película lagrimal, conjuntiva y epitelio corneal
<b>MUC20</b>	Asociada a membrana	Conjuntiva y epitelio corneal

Tabla 1.- Tabla de mucinas presentes en la superficie ocular de humano. Traducción de Ablamowicz, A. F., & Nichols, J. J. (2016). Ocular surface membrane-associated mucins. *The ocular surface*, 14(3), 331-341.

Además de las funciones previamente descritas las células caliciformes, tienen un papel inmunológico central, ya que contribuyen a mantener un ambiente tolerogénico en la superficie ocular a través de la secreción TGF- $\beta$  [17].

En conjunto estas tres capas contribuyen a mantener una superficie ópticamente lisa, humectada, lubricada y transparente que permite el paso de la luz hacia la retina para preservar la calidad de la visión, además de brindar estabilidad a la superficie ocular [21, 26]. Sin embargo, diversos estudios han reportado que una rápida evaporación, alteraciones en el parpadeo o patologías asociadas a las glándulas de meibomio, glándula lagrimal principal o células caliciformes, así como factores ambientales como la temperatura, humedad, contaminación y aire acondicionado, pueden influir en la cantidad y calidad de la película lagrimal, trayendo como consecuencia la pérdida de la homeóstasis de la superficie ocular por incremento de la osmolaridad (cantidad de solutos dentro y fuera del espacio extracelular) contribuyendo al desarrollo de patologías inflamatorias de la superficie ocular como Ojo seco (OS) [27, 28].

### **2.3 Definición y clasificación de ojo seco**

Dentro del grupo de enfermedades inflamatorias oculares de origen no infeccioso se encuentra OS. En su último informe el DEWS conformado por 150 expertos de 23 países, define a OS como una enfermedad inflamatoria de origen multifactorial de la superficie ocular, caracterizada por pérdida de la estabilidad de la película lagrimal, acompañada por hiperosmolaridad e inflamación de la superficie ocular y alteraciones neurosensoriales (DEWS 2017) [27].

El TFOS DEWS II en 2017, menciona dos categorías principales de esta patología, OS de tipo acuodeficiente y evaporativo, aunque, el acuodeficiente fue redefinido como “deficiente acuoso” de tipo autoinmune primario asociado a síndrome de Sjögren y secundario no asociado a síndrome de Sjögren y no autoinmune, en el que se incluye deficiencia lagrimal, obstrucción de los conductos lagrimales y bloqueo reflejo asociado a uso de fármacos (Figura 2) [27].

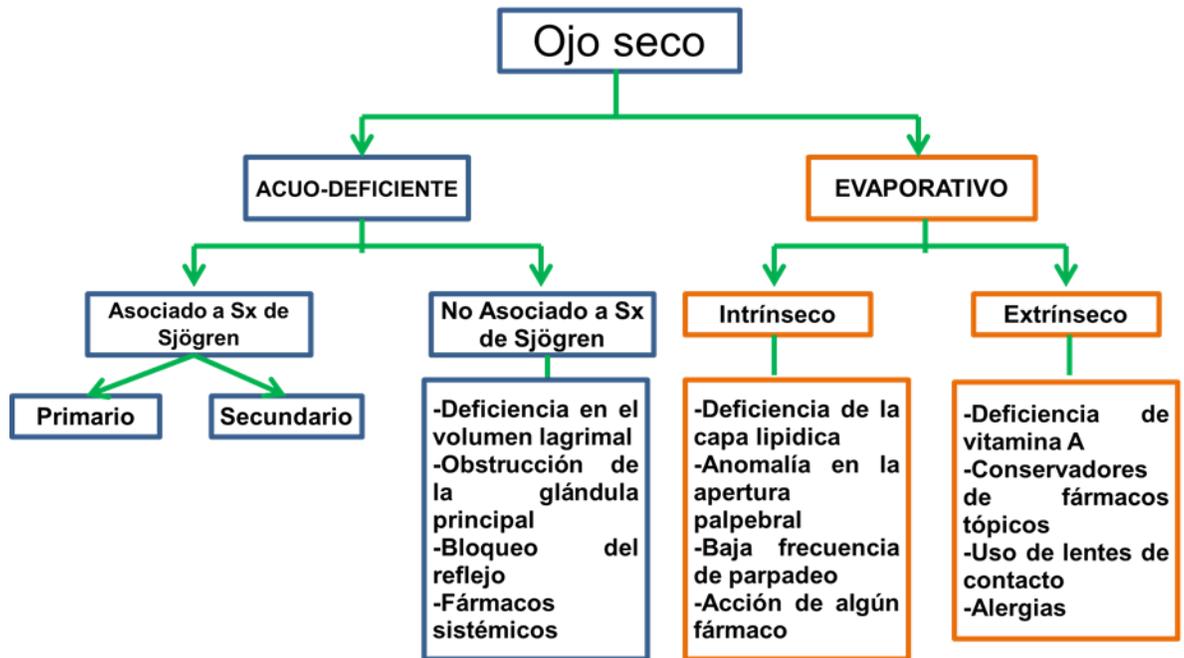


Figura 2 Clasificación ojo seco. Tomado de “The TFOS Dry Eye Workshop II: Executive Summary. The ocular surface [9]” traducida por Hernández Emilio.

## 2.4 Prevalencia e incidencia de ojo seco

La prevalencia mundial de OS, oscila entre el 5% y el 50% de la población [27]. Estudios epidemiológicos recientes en Estados Unidos reportan que alrededor de 5 millones de personas mayores a 50 años presentan síntomas graves de esta patología y aproximadamente 20 millones más comienzan a presentarlos. Estos estudios también destacan una mayor incidencia en mujeres, la cual asciende a 3.2 millones, mientras que en hombres es de 1.6 millones [7-10] [14, 27]. Además, Estados Unidos reportó que el gasto anual aproximado destinado al tratamiento de OS, es de 3.84 billones de dólares, por lo que OS es considerado un problema de salud pública [29].

Aun cuando OS ha sido considerado una patología inflamatoria ocular de adultos y personas de la tercera edad, un estudio reciente en población asiática ha reportado que niños y adolescentes principalmente de sexo femenino manifiestan signos de esta patología [30].

En México un estudio realizado en la Universidad de Monterrey, reportó que el 70.4% de los estudiantes presentan signos y síntomas de OS, además reportaron que existe una mayor prevalencia en mujeres [31].

Recientemente la clínica de optometría de la Facultad de estudios superiores Iztacala, reporto mediante un análisis lagrimal de Ferning y Schirmer en pacientes, que la población más afectada por esta patología se encuentra entre los 21 y 40 años de edad, demostrando que ya no solo es una enfermedad exclusiva de adultos mayores [32].

## **2.5 Signos y síntomas de ojo seco**

Como previamente se mencionó OS es considerada una enfermedad inflamatoria crónica de la superficie ocular, caracterizada por presentar síntomas como: prurito (comezón), sensación de cuerpo extraño, irritación, fotofobia (sensibilidad a la luz), hiperemia (ojo rojo) y signos como: descamación de la superficie corneal (pérdida de células caliciformes), disfunción de las glándulas de meibomio (MGD), rápida evaporación de la película lagrimal y pérdida de la sensibilidad corneal, que en casos graves puede causar ulceración, opacidad corneal y ceguera [20, 22, 30, 33].

## **2.6 Diagnóstico**

El diagnóstico de OS se realiza mediante pruebas subjetivas, específicamente a través del cuestionario de índice de enfermedad de la superficie ocular (OSDI) con el que se busca evaluar la sintomatología. Por su parte, las pruebas objetivas consisten en la aplicación de diferentes técnicas que permiten evaluar el cuadro clínico característico de OS [7]. Brevemente, el volumen lagrimal se determina por Schirmer, el patrón de arborización de mucinas por Ferning, el tiempo de ruptura lagrimal mediante (BUT) y la determinación del número de células caliciformes a través de citología de impresión [30, 34-37]. En conjunto estas técnicas permiten evaluar la calidad, cantidad y estabilidad de la película lagrimal.

## **2.7 Tratamiento**

El tratamiento se basa principalmente en el uso de lágrimas artificiales y corticoesteroides por largos periodos, sin embargo, el uso prolongado puede conllevar al desarrollo de

múltiples complicaciones locales y sistémicas como inmunosupresión y aumento de la presión intraocular [27, 28]. Además de estos tratamientos convencionales para ojo seco, también existe la aplicación de suero autólogo para casos más graves y la reparación del tejido, además de la suplementación alimenticia con Omegas 3 y 6, así como también el uso de inmuno reguladores como la ciclosporina [27].

## **2.8 Inflamación y ojo seco**

La inflamación de la superficie ocular es causada por factores ambientales, endógenos, microbianos, hormonales o factores genéticos, dicho estrés promueve la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP), los cuales producen la expresión de citocinas proinflamatorias, metaloproteinasa 3 y 9, así como la secreción de quimiocinas, que en conjunto inducen la maduración de células presentadoras de antígeno (APC) que residen en la superficie ocular, una vez activadas las APC, viajan al ganglio linfático más cercano (cervical), donde llevan a cabo la presentación antigénica a los linfocitos T, promoviendo su diferenciación hacia los subtipos T helper tipo 1 y 17 (Th1 o Th17) principalmente [38].

Una vez que la diferenciación de linfocitos se lleva a cabo, estos migran hacia la superficie ocular, donde comienzan a liberar citocinas proinflamatorias como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 17 (IL-17) y factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) perpetuando un ambiente inflamatorio sobre la superficie ocular (Figura 3) [14, 25, 33, 39, 40].

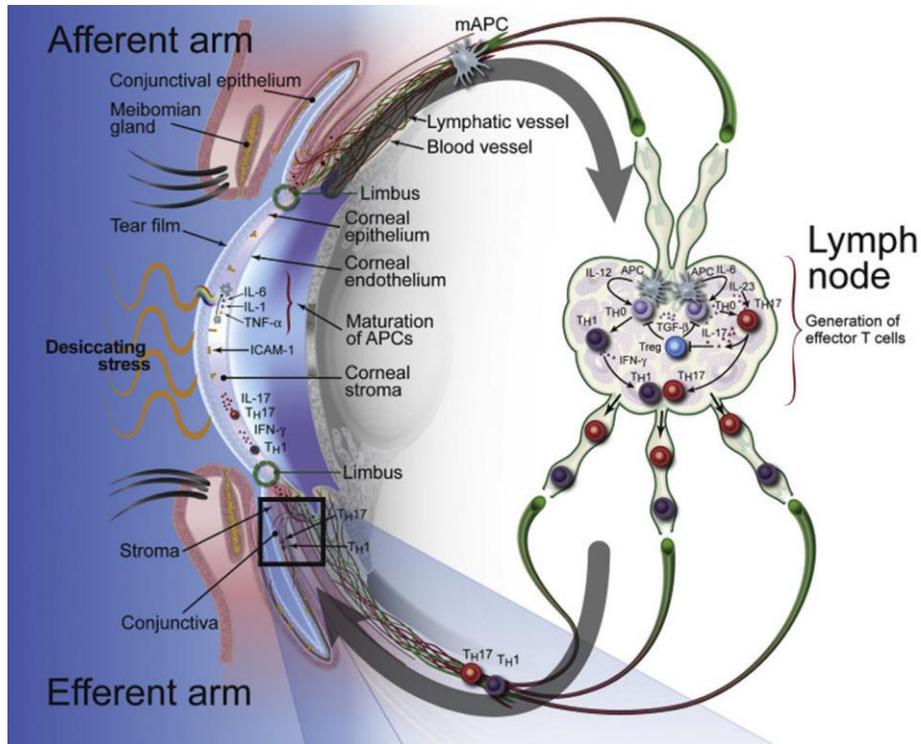


Figura 3.- Representación gráfica de las vías aferente y eferente de la respuesta inmune en ojo seco “Rhee, M. K., & Mah, F. S. (2017). Inflammation in Dry Eye Disease: How Do We Break the Cycle?. *Ophthalmology*, 124(11), S14-S19.”

## 2.9 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina inflamatoria descrita en 1960, estructuralmente está conformada por 3 subunidades idénticas con un peso molecular de 12.5 KDa. Esta citocina es secretada por células del sistema inmune como: macrófagos, monocitos, células dendríticas, células B, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos [41, 42].

Además, se sabe que puede ser producida por la glándula pituitaria, miocitos cardiacos, hepatocitos, fibroblastos, células del riñón y páncreas, confiriéndole otra característica importante como lo es su actividad enzimática [41-44].

Diversos estudios han reportado su participación en la respuesta inmune innata, promoviendo la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . También se sabe que tiene actividad quimiotáctica y es capaz de inhibir el efecto de los corticoesteroides [41, 43].

Estudios más recientes reportaron que MIF es capaz de activar la vía de señalización de las cinasas (MAPKinasas) a través de su receptor CD74 el cual promueve la quimiotaxis de células del sistema inmune, además de CD74, recientemente se reportó que MIF es reconocido por otros receptores para quimiocinas específicamente (CXCR2/4) y que dicha unión resulta expresión de algunos mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , óxido nítrico y ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2). Interesantemente, se demostró que MIF tiene la capacidad de inhibir a la proteína proapoptótica p53 [41-44].

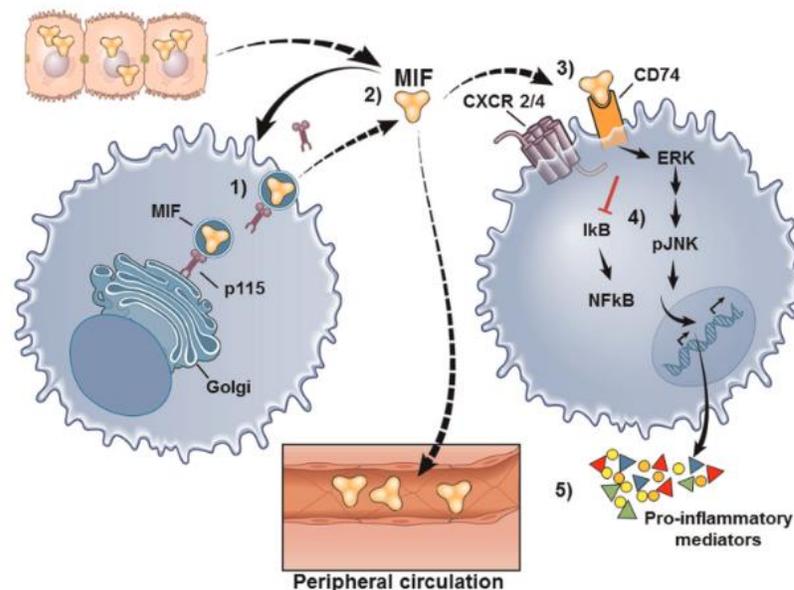


Figura 5.- Representación gráfica de la señalización de MIF imagen obtenida de Barnes, M. A., Roychowdhury, S., & Nagy, L. E. (2014). Innate immunity and cell death in alcoholic liver disease: role of cytochrome P450E1. *Redox biology*, 2, 929-935.

### 2.1.1 Función de MIF en la respuesta inmune en enfermedades infecciosas

Dado que MIF posee función tanto de citocina como quimiocina, tiene la capacidad de potenciar la respuesta inmune innata sobre todo ante microorganismos promoviendo la presentación de antígeno y diferenciación de los linfocitos T robusteciendo la respuesta inmune haciéndola más efectiva y rápida [41].

Otra característica importante de MIF es que de manera natural se encuentra preformada en el organismo, permitiendo su rápida liberación en el momento que sea

necesario y responder de manera rápida a moléculas provenientes de la pared celular de bacterias gram-negativas como el lipopolisacarido (LPS) [42, 45].

Diversos estudios han demostrado el papel protector de MIF al conferir resistencia frente a infecciones causadas por bacterias como: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pneumoniae* [42]. A través de la activación de APC, producción de citocinas inflamatorias, especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NOS) [42, 45].

### **2.1.2 Participación de MIF en enfermedades inflamatorias y autoinmunes**

Investigaciones recientes reportaron que MIF contribuye al desarrollo o agravamiento del cuadro clínico de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como: artritis reumatoide, aterosclerosis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), principalmente a través de la secreción de mediadores inflamatorios y el reclutamiento de poblaciones celulares [4, 5, 43].

Además, se ha observado que MIF inhibe la apoptosis de células tumorales, y favorece la secreción de factores angiogénicos, promoviendo la proliferación y supervivencia de algunos tumores [5].

De manera interesante, se ha demostrado que la inhibición de MIF reduce los signos de patologías como: lupus, esclerosis múltiple y cáncer en estudios *in vivo* con ratones. En particular un estudio del instituto de reumatología en Seúl propuso que MIF pudiera ser considerado un blanco terapéutico en enfermedades inflamatorias como artritis, ya que su inhibición en modelos murinos ha sido asociada con la atenuación del cuadro clínico de artritis reumatoide [4].

### **2.1.3 Expresión de MIF en tejidos oculares**

Estudios pioneros realizados por diferentes grupos alrededor del mundo, han reportado niveles basales de MIF en tejidos como retina, córnea y glándula lagrimal de ratones [46]. Otros estudios demostraron que incluso puede llegar a tener implicaciones en procesos de embriogénesis de algunos tejidos oculares, tal es el caso del estudio realizado por Winston G.J y colaboradores en 1993, quienes reportaron que MIF podría participar en

la diferenciación de células del cristalino [47]. También se demostró que MIF y otras citocinas como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL17 e IFN- $\gamma$  se encuentran presentes en tejidos de la SO y en tejidos como córnea, conjuntiva, glándula lagrimal y lágrima de pacientes con dermatitis atópica, retinopatía diabética, uveítis y vitreoretinopatía [46, 48-52].

En 2016, Elise Warcoin y colaboradores reportaron una mayor expresión de transcritos y la proteína MIF en cultivos celulares de córnea y conjuntiva de humano expuestos a un ambiente hiperosmolar [52]. En este mismo año Yang. H *et al* reportaron un incremento en la expresión de transcritos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL17, IFN- $\gamma$  y MIF y sus receptores (CD74, CD44 y CXCR2/4) en un modelo de uveítis, además interesantemente demostraron que la inhibición de MIF atenúa la respuesta inflamatoria de tipo Th1 y Th17 y en consecuencia el daño a estructuras oculares [53].

Finalmente, Wang J. y colaboradores observaron que el uso de un inhibidor de MIF (ISO-1) redujo la pérdida de células neurosensitivas (conos y bastones) y el desprendimiento de retina en un modelo murino de retinopatía diabética [54].

Aun cuando son claras las evidencias del papel patogénico de MIF en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, es escasa la información que se tiene en enfermedades inflamatorias oculares. En particular se desconoce si MIF contribuye al reclutamiento y activación de poblaciones celulares inflamatorias en tejidos oculares como córnea conjuntiva y glándula lagrimal.

Considerando los antecedentes antes expuestos y el hecho de que OS es una enfermedad inflamatoria crónica de la superficie ocular el presente trabajo busca contribuir a comprender si MIF participa en el desarrollo y/o agravamiento de los signos de ojo seco.

### **3.- Justificación**

Los antecedentes mencionados muestran que el proceso inflamatorio es un factor clave en el agravamiento de patologías autoinmunes e inflamatorias y que MIF tiene la capacidad de promover dicho proceso y contribuir a exacerbar dichas patologías. Sin embargo, aun cuando se sabe que MIF se expresa constitutivamente en la superficie ocular, la información en cuanto a su participación en ojo seco es escasa y no se ha investigado el impacto que pudiera tener su inhibición en el desarrollo de esta enfermedad.

Para contribuir al conocimiento, proponemos analizar las características patológicas de ojo seco, así como las posibles alteraciones en el contexto de la respuesta inmune, utilizando el modelo experimental inducido con escopolamina en ratones deficientes del gen funcional de MIF (MIF<sup>-/-</sup>) y ratones silvestres (MIF<sup>+/+</sup>).

#### **4.- Objetivo general**

Definir la participación de MIF, en los signos de ojo seco, a través del análisis de la respuesta inmune en ratones silvestres y deficientes para MIF.

##### **4.1.-Objetivos particulares**

- Evaluar y comparar la estabilidad de la película lagrimal, es decir, el volumen lagrimal, patrón de arborización de mucinas y número de células caliciformes en ratones con ojo seco experimental.

- Determinar si MIF contribuye a exacerbar el cuadro inflamatorio característico de ojo seco, a través de la evaluación del perfil de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en suero de ratones experimentales.

## **5.- Hipótesis**

El factor inhibidor de la migración de macrófagos favorece la producción de mediadores pro-inflamatorios e infiltración de poblaciones celulares inflamatorias que en conjunto agravan el cuadro clínico de ojo seco.

## **6.- Metodología**

### **6.1.- Genotipo de los animales experimentales por PCR**

#### **6.1.1.- Extracción de DNA**

Para determinar el genotipo de los grupos experimentales MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> se empleó el método descrito por Laid P.W. [55]. Brevemente, se utilizaron ratones macho fondo genético Balb/c, entre 6.9 semanas de edad, se utilizaron guantes, material nuevo y estéril, libre de DNAsas y RNAasas. Se obtuvieron aproximadamente 0.5 cm de la porción final de la cola de cada uno de los ratones experimentales, el tejido se transfirió a tubos (Eppendorf) de 1.8 ml, para llevar acabo la digestión del tejido se agregaron 500 µl de buffer de lisis (Apéndice 1) y 20 µl de proteinasa K (In vitrogen) se dejó incubar toda la noche a 55° C.

Posteriormente, se centrifugo a 11000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante con micropipeta y se colocó en tubos Eppendorf con 500µl de isopropanol frio, invirtiéndolos de manera suave hasta hacer evidente la precipitación del DNA. Se centrifugo nuevamente a 11000 rpm durante 1 min para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante para proceder a lavar el botón de DNA con etanol frio al 75% en el mismo tubo se resuspendiendo la pastilla y centrifugando nuevamente a 11000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue desechado, dejando evaporar el etanol del tubo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se resuspendió en 200 µl de H<sub>2</sub>O miliQ (mQ).

#### **6.1.2.- Amplificación del gen**

Se utilizaron primers específicos (Apéndice 2) para el reconocimiento del gen MIF. Se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas y RNAsas de 0.2 ml, la reacción se realizó con un volumen final de 25 µl con los siguientes reactivos (R Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED 1.5, Ampliqon) en el siguiente orden.

Reactivo	Volumen
Master mix	12.5 µl
FMIF	1 µl
RMIF	1 µl
FNEO	1 µl
RNEO	1 µl
Muestra	1 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl

Los tubos se colocaron en el termociclador (Thermo fisher) con la temperatura de alineación de 58°C.

### **6.1.3.- Electroforesis**

Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) al 1% en buffer TBE 1x (Apéndice 1) y 0.1% de bromuro de etidio sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se mantuvo a 4°C por 15 minutos para que se solidificara.

A cada uno de los tubos les agrego 5 µl de buffer de carga blue juice con Sybr-Green (Cleaver) una vez mezclados se tomaron 8 µl de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 3 µl del marcado de peso molecular 100 pb (Amplicon).

Las muestras fueron colocadas en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 90 volts 200 mA durante 40 minutos. Se capturo la imagen con el equipo Gel Doc EZ Imager (BIORAD).

#### **6.1.4.- Evaluación de la calidad de la película lagrimal por las técnicas de Schirmer, Ferning y citología de impresión**

Antes de inducción del modelo de ojo seco se evaluó la cantidad y calidad de la película lagrimal a ambos grupos experimentales, con el fin corroborar que todos los ratones presentaran estabilidad de la película lagrimal.

#### **6.3.- Inducción de ojo seco**

Una vez determinado el genotipo de los ratones control  $MIF^{+/+}$  y deficientes para  $MIF^{-/-}$  (donados por la Dra. Miriam Rodríguez Sosa responsable del laboratorio 5 de la Unidad de Biomedicina UBIMED-FESI) se les inyectó vía subcutánea (s.c) con 0.5 mg de escopolamina (SIGMA-Aldrich), cada 4 horas 3 veces al día durante 21 días.

#### **6.4.- Evaluación de los signos clínicos de ojo seco en ratones $MIF^{+/+}$ y $MIF^{-/-}$ a través de las técnicas Schirmer, Ferning y Citología de impresión en ratones de con ojo seco**

##### **6.4.1.- Determinación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer**

Esta prueba fue descrita y reportada por Otto Schirmer en 1961 y permite determinar el volumen lagrimal en milímetros [34]. Para realizar esta prueba se colocaron las tiras de Schirmer (schirmer strips) sobre el párpado inferior en la región temporal de cada uno de los ratones durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se utilizó un vernier digital para medir el volumen lagrimal a los 0, 7, 14 y 21 post-inducción de OS y a los 7 días de haber suspendido la inducción del modelo (fase de recuperación).

##### **6.4.2.- Determinación del patrón de arborización de mucinas**

El patrón de arborización de mucinas se determinó a través de la técnica de Ferning en los grupos control y experimentales. Para colectar la lágrima se utilizó una pipeta de transferencia de 3 ml a la cual se le adaptó una punta 0.5-10  $\mu$ l, se colectaron 2  $\mu$ l de lágrima y se colocó en un portaobjetos. Las muestras se observaron y analizaron utilizando un microscopio electrónico (Motic), el tipo de patrón de arborización se determinó utilizando la clasificación de Rolando donde el patrón tipo 1 se caracteriza por presentar arborizaciones uniformes y sin espacios entre ellas, el tipo 2 presenta arborizaciones

pequeñas y menos ramificadas, con algunos espacios entre ellas, en el tipo 3 se observan arborizaciones pequeñas con muy pocas ramificaciones y numerosos espacios vacíos, finalmente patrón tipo 4 se caracteriza por ausencia de arborizaciones y se pueden presentar cúmulos de moco [35].

#### **6.4.3.- Cuantificación del número de células caliciformes**

El número de células caliciformes se determinó utilizando la técnica de citología de impresión. Brevemente, de las tiras de Schirmer utilizadas para determinar el volumen lagrimal se cortó la porción que estuvo en contacto con la conjuntiva palpebral y se fijó en alcohol al 96%, posteriormente se tiñeron con PAS-Hematoxilina (Apéndice 1). Una vez teñidas las membranas se colocaron en portaobjetos, se observaron para determinar su morfología y contaron para determinar el número de células/mm<sup>2</sup>.

Para determinar el grado de metaplasia escamosa se utilizó la clasificación de Nelson, donde el grado 0 es considerado normal con abundantes células caliciformes (>500 células/mm<sup>2</sup>) presencia de células epiteliales pequeñas, sin espacios entre ellas. el grado 1, ligeramente alterado, con células epiteliales mayores, poligonales con espacios, se observa disminución en las células caliciformes (350-500 células/mm<sup>2</sup>), mientras que el grado 2 se considera alterado, presenta células epiteliales de mayor tamaño y pérdida de células caliciformes (100-350 células/mm<sup>2</sup>), finalmente el grado 3 se observa una marcada alteración, las células epiteliales son muy grandes y poligonales con diversas alteraciones (células binucleadas, núcleos picnóticos o ausentes, queratinizadas o no, las células caliciformes están marcadamente disminuidas (<100 células/mm<sup>2</sup>) [36, 37, 56].

#### **6.5.- Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (sándwich) en suero**

##### **6.5.1.- Obtención de suero**

De los ratones con ojo seco se obtuvo sangre realizando una incisión en la vena caudal, a los 0, 7, 14 y 21 post-inducción de OS y a los 7 días de haber suspendido la inducción del modelo (fase de recuperación).

La sangre se centrifugo en tubos Eppendorff de 1.8 ml de 2 a 3 veces a 3500 rpm por 10 min hasta la obtención pura del suero, este se mantuvo en congelación a -70°C hasta su uso.

La concentración de citocinas (IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4) se evaluó por medio de la técnica de ELISA sándwich y de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Prepotech). En todos los casos el procedimiento fue similar, siguiendo las especificaciones del proveedor y como previamente se reportó. A continuación, una descripción general y breve del procedimiento.

#### **6.5.2.- Sensibilización de la placa**

El anticuerpo de captura se diluyó a una concentración de 2 $\mu$ g/ml de buffer de fosfatos, pH 9 (0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 9 J.T Baker) para cada una de las citocinas adicionando 50 $\mu$ l/pozo en placa de 96 para ELISA (Nunc Maxisorp). Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C.

#### **6.5.3.- Muestras y curva**

Al día siguiente las placas se mantuvieron a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con solución de lavado (PBS tween- 20, al 0.05% Sigma). Se les adiciono 200 $\mu$ l de buffer de bloqueo (10% FCS en PBS) y se incubaron a temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente las placas se lavaron 2 veces con solución de lavado y se colocaron 25  $\mu$ l/pozo de las muestras a determinar por duplicado, usando como control una curva de citocinas recombinante correspondiente a cada una de las citocinas de nuestro interés, empezando con una concentración inicial de 12000 pg/ml (PreproTech) y siguiendo diluciones a la mitad de buffer de bloqueo. Las placas se incubaron a 4°C durante la noche.

#### **6.5.4.- Revelado**

Las placas se llevaron a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces con buffer de lavado y se secaron por aspiración, se les adiciono el anticuerpo de detección marcado con biotina correspondiente para cada citocina a una concentración de 2 $\mu$ l/ml en buffer de bloqueo (Apéndice 1), las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h posteriormente se lavaron 5 veces con solución de lavado. Se adiciono 6 $\mu$ l/pozo (Apéndice 1) del conjugado

de estreptoavidina peroxidasa (PreproTech) a una dilución de 1:2000 en buffer de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, las placas se lavaron 6 veces con buffer de lavado y se adicionó 100µl/pozo del sustrato ABTS recién preparado (Sigma) (0.5% ABTS en 0.1M ácido cítrico anhidro, pH 4.35 con NaOH más 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, todos los reactivos marca Sigma). La densidad óptica se determinó durante los primeros 30 min de iniciada la reacción en un lector de placas de ELISA (SpertraMax 250, Molecular Devices) a 405nm.

#### **6.6.- Análisis de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T (CD4, CD8) por citometría de flujo**

Ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> control y experimentales fueron sacrificados en condiciones de esterilidad, a los días 0, 7 y 14 día a fin de analizar las células reclutadas en los ganglios linfáticos cervicales y el bazo. En la campana los órganos se maceraron en 5 ml de buffer uno (ver apéndice 1) y se recuperó el sobrenadante en tubos cónicos de 15 ml estériles. Las células se centrifugaron a 2000rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 y 5 ml de buffer de FACS (Apéndice 1) se homogeneizó la suspensión y se contó en cámara de Neubauer. Las células se ajustaron con buffer de FACS a 1 millón por ml y se pasaron a tubos Eppendorf de 1.8 ml para su análisis por citometría nuevamente se concentraron las células centrifugando 10 min a 2000 rpm para decantar y resuspender con 200 µl del mismo buffer. Por último, se agregaron los anticuerpos conjugados con los distintos marcadores de fluorescencia y un anticuerpo isotipo (IgG2a) como control para pegado inespecífico, a una concentración de 0.2 µg marcados de la siguiente manera.

F480 (PE- Cyanine 7) Marca eBioscience

CCR5 (PErCP –eFluor 710) Marca eBioscience

MHC II (FITC) Marca eBioscience

Ly-6G (APC-Cy) Marca BD Pharmigen

CD4<sup>+</sup> (APC)

CD8<sup>+</sup> (PE)

Una vez agregados los anticuerpos se incubó durante 30 minutos a 4°C, se lavaron las células dos veces más con buffer de FACS a 2000 rpm por 10 minutos para eliminar los anticuerpos no adheridos, finalmente se les agrego 500 µl para su lectura utilizando el programa Cell Quest y el citómetro ATTUNE NxT (Marca Thermofhisher) para la captura y análisis de cada muestra.

## **6.7.- Análisis del perfil de citocinas en cultivos de linfocitos obtenidos de bazo y ganglios linfáticos cervicales**

### **6.7.1.- Obtención de células de ganglio linfático cervical y bazo**

A los 5 días post-inducción de ojo seco, se sacrificaron ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup>. En condiciones de esterilidad, se obtuvo el bazo y el ganglio linfático cervical, se colocaron en cajas Petri con 1 ml de buffer 1, posteriormente los órganos fueron macerados y las células separadas usando separadores celulares marca (B.D Falcon, cell strainer) con émbolos estériles de jeringas, finalmente se colectaron en tubos Falcon estériles de 15ml (Nalgen, Nunc Int).

Para concentrar las células se centrifugó a 1500rpm por 10 min, posteriormente fueron tratadas con 3 ml de solución hemolizante (Apéndice 1) durante 5 minutos a fin de eliminar los eritrocitos, posteriormente se agregaron 3 ml de buffer 1 a fin de detener la reacción y se centrifugaron por 5 minutos y se decantaron. Las células libres de eritrocitos se les agrego 5 ml de medio D-MEM (Gibco suplementado con D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10% SFB y estreptomycin) para homogeneizar. Para contar las células viables

se empleó la prueba de exclusión con azul tripano, se adicionaron 10µl de la muestra y 10µl de azul tripano (Sigma Chermicals co). En la cámara de Neubauer se colocaron 10µl con micropipeta estéril del homogeneizado y se contaron 5 cuadrantes para obtener el número de células por mililitro, después se ajustaron a  $5 \times 10^3$  células/ml con medio D-MEM. Se colocaron 100 µl por pozo en una placa de 96 pozos (B.D. Falcon), para obtener una concentración final de  $3 \times 10^5$  células/pozo. Una vez sembradas las células en la placa, se estimularon con 2.5 µg de concanavalina A (CoA) y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, posteriormente el sobrenadante fue colectado y congelado a -70°C hasta su uso para cuantificar la producción de citocinas por ELISA-sándwich.

## 7.- Resultados

### 7.1 Determinación del genotipo de ratones control (MIF<sup>+/+</sup>) y deficientes para MIF (MIF<sup>-/-</sup>).

Con el objetivo de asegurarnos que los ratones experimentales cumplieran con la condición de silvestre (MIF<sup>+/+</sup>) o deficientes para el gen que codifica para MIF (MIF<sup>-/-</sup>), todos los ratones se genotiparon por la técnica de PCR. La Figura 6 muestra una electroforesis en gel de agarosa del amplificado del gen funcional para MIF, con un peso de 200pb en los carriles 6 a 8 utilizado como control y para el gen de neomicina (NEO), gen de inserción en los ratones deficientes para MIF con peso de 500pb, en los carriles 2 a 5. La secuencia de los primers utilizados se muestra en el (Apéndice 1).

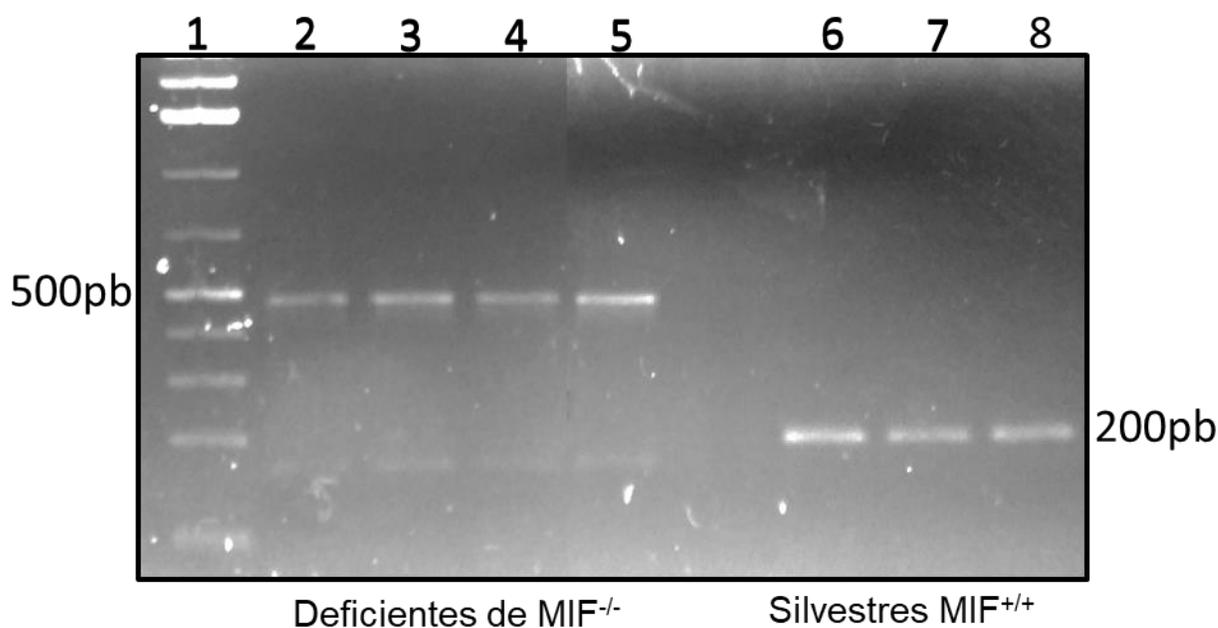


Figura 6. Genotipo de ratones deficientes (MIF<sup>-/-</sup>) carriles 2 a 5 y ratones silvestres (MIF<sup>+/+</sup>) carriles 6 a 8 utilizando PCR. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100pb.

### 7.2-. Evaluación de la película lagrimal (Schirmer, Ferning y citología de impresión)

A fin de confirmar la estabilidad de la superficie ocular en los ratones control y experimentales previo a la inducción de ojo seco se decidió evaluar a través de las pruebas de Schirmer, Ferning y citología de impresión la cantidad y calidad de la película lagrimal.

### 7.2.1 Determinación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer

Con el propósito de determinar el volumen lagrimal producido en ambos grupos de ratones silvestres y deficientes para MIF se realizó la prueba de Schirmer a los 0, 7, 14 y 21, días post inducción de ojo seco, se dejó descansar una semana y se evaluó a la semana siguiente la cantidad de lágrima producida por ambos grupos de ratones.

En la Figura 7 se muestran los valores obtenidos en los diferentes tiempos post-inducción de ojo seco. Como podemos observar, los ratones MIF<sup>+/+</sup> tuvieron una disminución del volumen lagrimal desde el día 7 hasta el día 21 post-inducción de OS, el análisis estadístico reveló diferencias estadísticamente significativas, encontrando que los ratones MIF<sup>+/+</sup> tienen una pérdida del 43.5% del volumen lagrimal, mientras que los ratones MIF<sup>-/-</sup> tuvieron una pérdida del 15.5%. Interesantemente, después de suspender por 7 días la inducción de ojo seco los ratones MIF<sup>-/-</sup> alcanzaron una recuperación del 100% del volumen lagrimal mientras que los ratones MIF<sup>+/+</sup> solo del 83%. Estos resultados muestran que en ausencia de MIF la reducción del volumen lagrimal es menor en comparación con el grupo control.

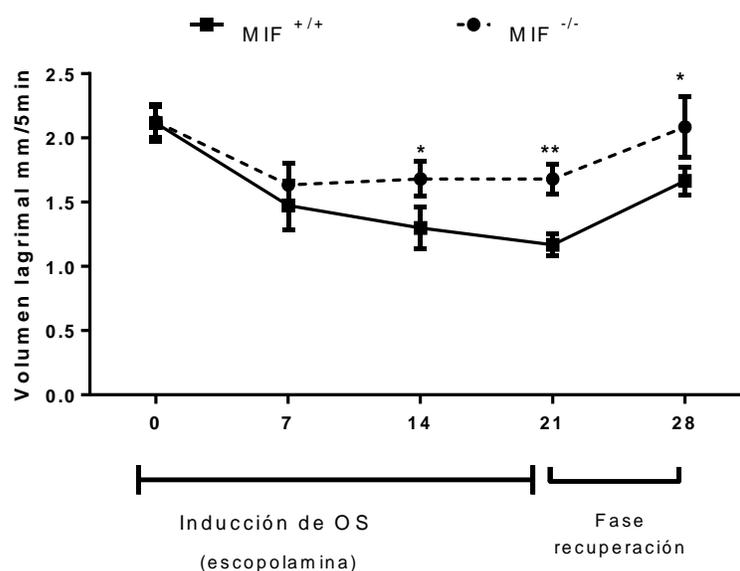
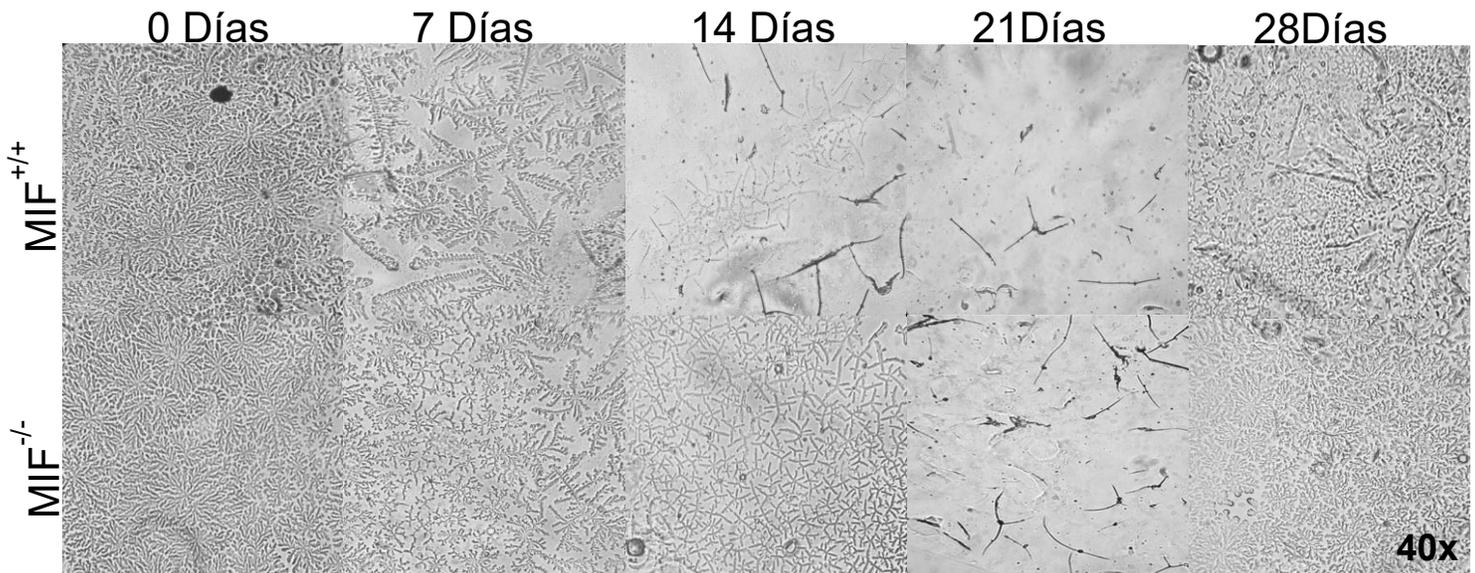


Figura 7. Volumen lagrimal (Schirmer) de ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> a los 0, 7, 14 y 21 dpi, y a los 7 días posteriores a la suspensión de la inducción de ojo seco. Los resultados son el promedio  $\pm$ ES de 15 ratones de 3 experimentos independientes. \*p<0.05 prueba de "t" student (graphpad Prism 6).

### 7.2.2. Determinación del patrón de arborización de mucinas (Ferning)

Con el objetivo de evaluar y comparar el patrón de arborización de mucinas entre los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> se tomaron 2 µl de lágrima a los 0, 7, 14 y 21 días post-inducción, y a los 7 días de recuperación. La Figura 8, muestra imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas de ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup>. Al día 0 se observa un patrón de arborización de mucinas tipo I en ambos grupos de ratones según la escala de Rolando considerado normal. Sin embargo, a los 7, 14 y 21 días post inducción de OS, los ratones MIF<sup>+/+</sup> presentaron un patrón de arborización tipo tres y cuatro mientras que los ratones MIF<sup>-/-</sup> presentaron alteraciones en el patrón de arborización de mucinas hasta el día 14 y 21 post inducción presentando un patrón tipo II y III respectivamente. Como se mencionó en la metodología los patrones tipos tres y cuatro son considerados alterados. De manera interesante solo los ratones MIF<sup>-/-</sup> tuvieron una reversión en la alteración en el patrón de arborización de mucinas a la semana de haber suspendido la inducción de ojo seco, la evaluación mostro un patrón tipo I, considerado normal según la escala de Rolando. Estos resultados nos sugieren que la deficiencia de MIF retrasa y atenúa la alteración del patrón de arborización de mucinas en comparación con el grupo control MIF<sup>+/+</sup>.



una

Figura 8.- Patrón de arborización de mucinas de ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> a los días 0, 7, 14 y 21 post-inducción de ojo seco y a los 7 días de haber suspendido la inducción, con una magnificación de 40x. Fotografías representativas. (n=15, 3 experimentos).

### 7.2.3 Determinación del número de células caliciformes

Las patologías inflamatorias de la superficie ocular de origen no infeccioso como ojo seco inducen cambios en el número y morfología de células epiteliales y caliciformes. Con el objetivo de determinar si MIF influye en la pérdida y cambios morfológicos de las células epiteliales y caliciformes presentes en conjuntiva, se realizó un análisis a través de la técnica de citología de impresión. Como se describió en la metodología la porción de las tiras de Schirmer que estuvo en contacto con la conjuntiva fueron fijadas y teñidas con PAS-hematoxilina, se observaron y se determinó el número de células caliciformes por mm<sup>2</sup>. La Figura 9, muestra el número de células caliciformes a los 0, 7, 14 y 21 post-inducción de OS, y a los 7 días de haber suspendido el modelo. Podemos observar que ambos grupos desde el día 7 post-inducción tiene pérdida de células caliciformes, sin embargo, solo se observan diferencias estadísticamente significativas a los 7 días, encontrando que los ratones MIF<sup>+/+</sup> pierden el 52.5 % de las células, mientras que los ratones deficientes para MIF solo pierden el 31.4%. Un hallazgo interesante fue que a los 7

días posteriores a la suspensión del modelo de ojo seco observamos que ratones MIF<sup>-/-</sup> recuperaron el 90% de las células, mientras que el grupo control solo recupero el 50%.

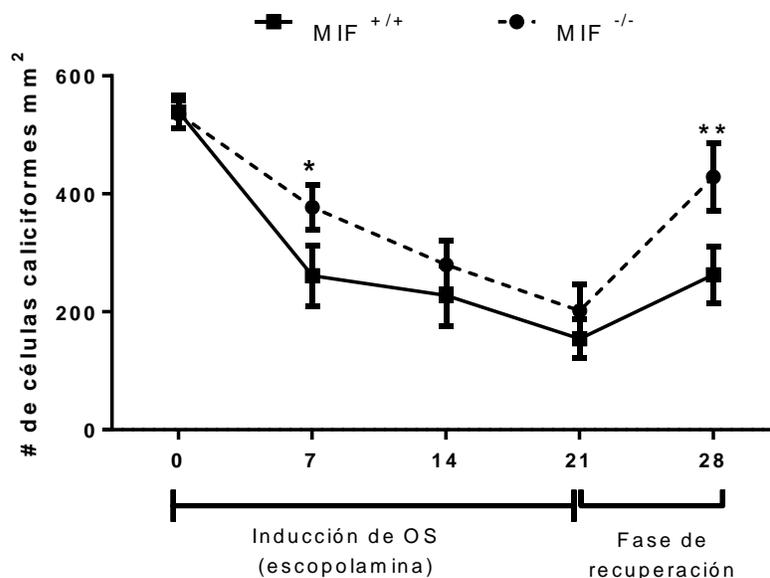
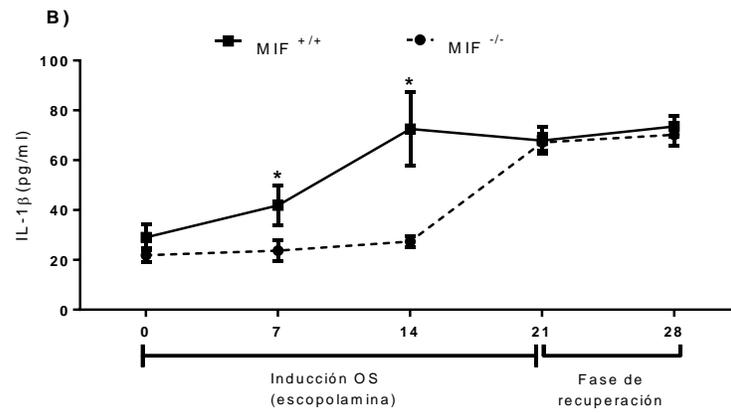
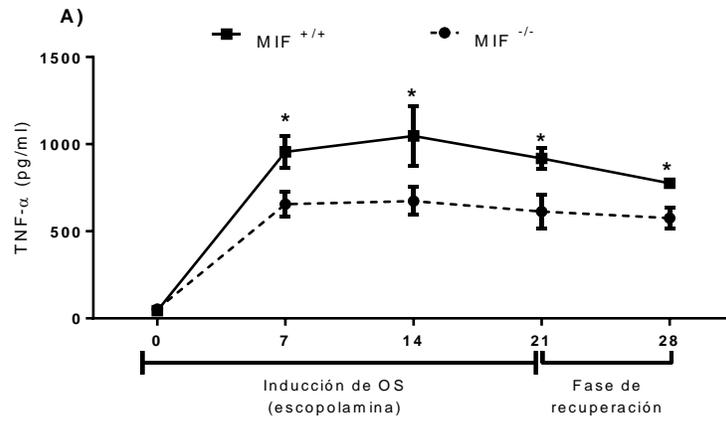


Figura 9.- Número de células caliciformes en muestras de ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> a los 0,7, 14, 21 y a los 8 días de haber suspendido la inducción de ojo seco. Los resultados son el promedio  $\pm$ ES de 5 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  prueba de “t” student (graphpad Prism 6).

#### 7.2.4 Cuantificación de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en suero

Con el objetivo de determinar si MIF favorece la liberación de mediadores inflamatorios (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) o anti-inflamatorios (IL-10), se obtuvo y analizó suero de ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> a los 0, 7, 14, 21 días post inducción de ojo seco y a los 7 días de haber suspendido la inducción del modelo. En la Figura 11 A y B podemos observar que en ausencia de MIF, hay una menor producción de TNF- $\alpha$  en cada uno de los puntos evaluados, mientras que la producción de IL-1 $\beta$  es menor solo los primeros 14 días de inducción de ojo seco en comparación a los ratones MIF<sup>+/+</sup>. En cuanto a la producción de IL-10 la Figura 11C, muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en la producción de esta citocina en ambos grupos de ratones.



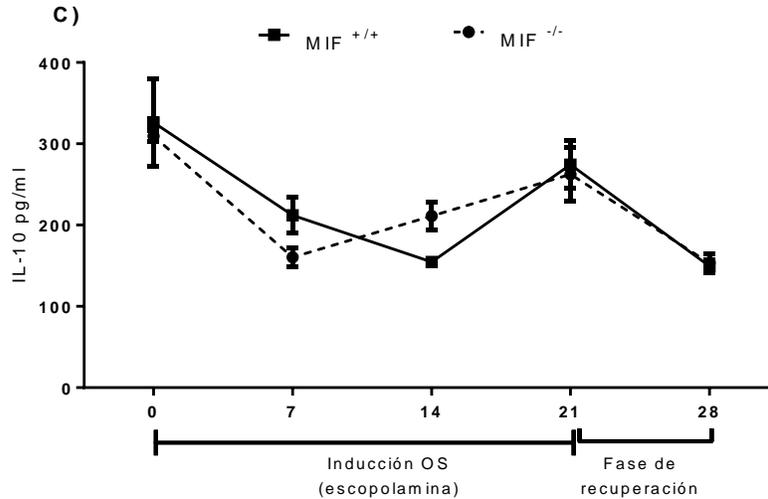


Figura 10.- Producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en suero de ratones MIF<sup>-/-</sup> y MIF<sup>+/+</sup> a los 0, 7, 14 y 21 días post- inducción de OS y en la fase de recuperación (7días), A) TNF- $\alpha$ , B) IL-1 $\beta$  y C) IL-10. Los resultados son el promedio  $\pm$ ES de 15 ratones por grupo, de 3. \*p<0.05 prueba de “t” student (graphpad Prism 6).

### 7.2.5 Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivos de ganglio cervical y bazo

Se sabe que en OS, las APC son las encargadas de migrar de la superficie ocular a los ganglios linfáticos más cercanos para activar y promover la proliferación y diferenciación de linfocitos T CD4, específicamente a los subtipos inflamatorios (Th1 y Th17), los cuales una vez activados migran por la vía eferente hacia la superficie ocular y se encargan de robustecer la respuesta inflamatoria, causando daño en las células caliciformes y epiteliales de la superficie ocular. Con el objetivo de conocer si MIF influye en la polarización de los linfocitos T CD4, obtuvimos el ganglio linfático cervical y el bazo de ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> a los 5 días post-inducción de ojo seco. En la Figura 11 A y B muestra la concentración de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en sobrenadante de ganglio cervical de ambos grupos de ratones, de manera interesante podemos ver que en ausencia de MIF hay una menor producción de IFN- $\gamma$  en comparación con ratones MIF<sup>+/+</sup>. La Figura 11 C y D podemos ver se observar que no hay diferencias estadísticamente significativas en la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en sobrenadante de cultivo de esplenocitos en ambos grupos de ratones.

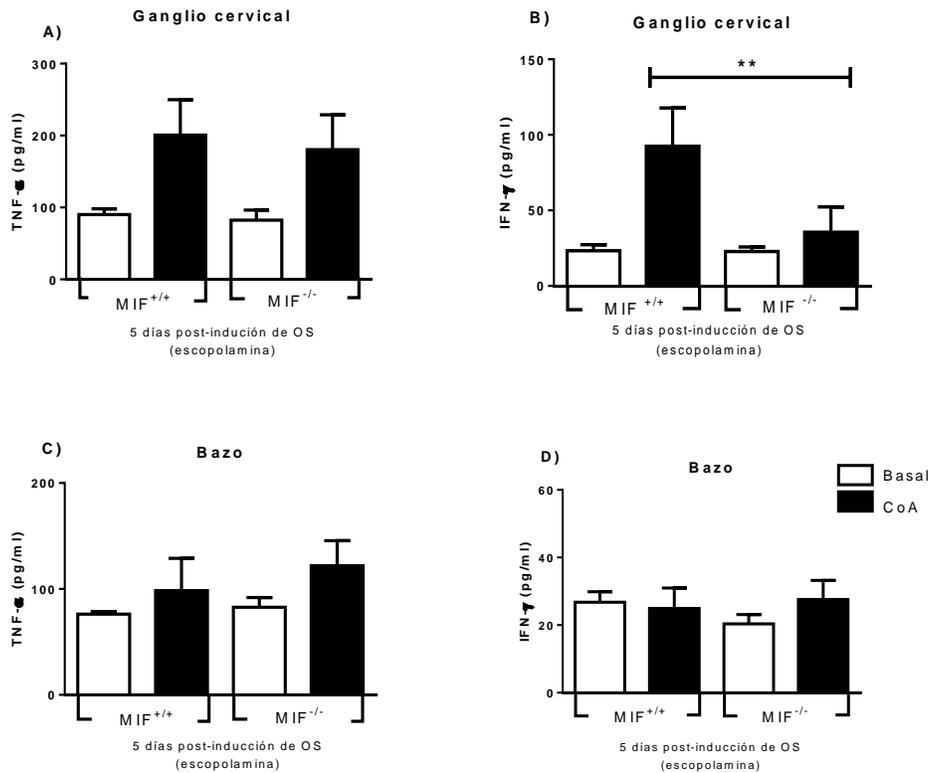


Figura 11. Concentraciones de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en sobrenadante de cultivos de ganglio cervical y bazo, estimuladas 48 horas 1 $\mu$ g de CoA. (A) TNF- $\alpha$  (B) IFN- $\gamma$  (C) TNF- $\alpha$  (D) IFN- $\gamma$ .

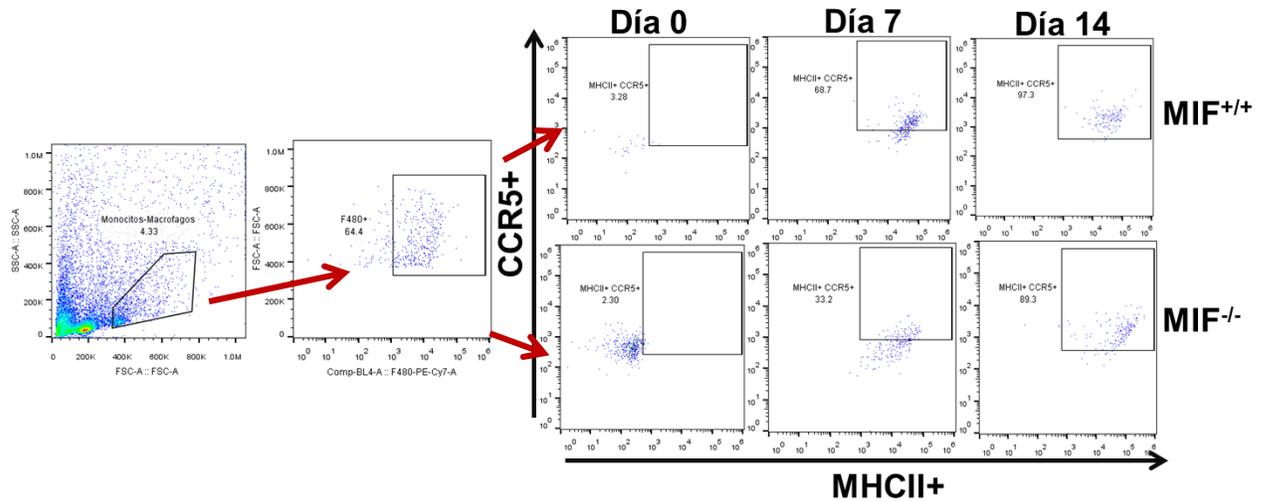
### 7.2.6.- Citometría de flujo

Con el objetivo de determinar si MIF favorece la migración de células del sistema inmune como: macrófagos, neutrófilos, linfocitos T CD4 y CD8, se extrajeron los ganglios linfáticos cervicales de ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> a los 0, 7 y 14 días post inducción, de acuerdo con la técnica descrita en la metodología.

En la Figura 12 se observan macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup> y MHCII<sup>+</sup>) a los 0, 7 y 14 días post inducción, de manera interesante se observa un mayor porcentaje de estas células en el grupo MIF<sup>+/+</sup> a comparación del grupo MIF<sup>-/-</sup> y teniendo un porcentaje similar al día 14. En la figura 12 B se observan los plots representativos con marcadores para neutrófilos a los 0, 7, 14 días post inducción, se puede observar una mayor concentración al día 7 en

ambos grupos de ratones, sin embargo, al día 14 los ratones MIF<sup>-/-</sup> tienen un menor porcentaje de esta población en ganglios linfáticos. Finalmente, en la Figura 12 C se observan los plots representativos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los cuales se aprecia un incremento considerable en ambos grupos a los días 7 y 14 post inducción de ojo seco.

A)



A-1)

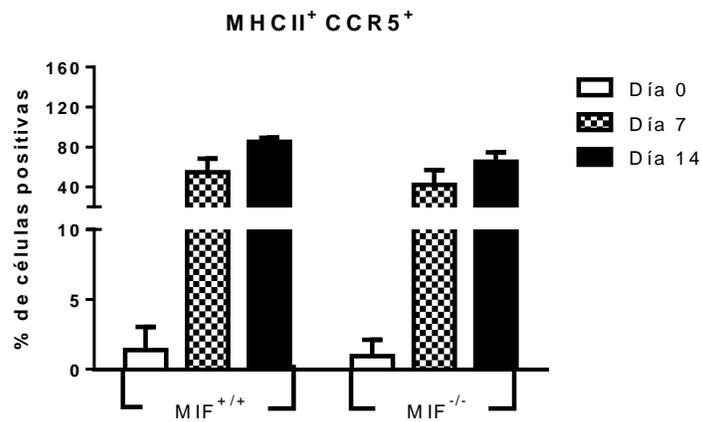


Figura 12.- Panel de plots representativos del análisis por citometría de flujo de las células obtenidas de ganglios linfáticos cervicales de ambos grupos de ratones a los 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco. A) plots representativos de macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup> y MHCII<sup>+</sup>). A-1) Grafica representativa de los porcentajes de células activadas a los días 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco.

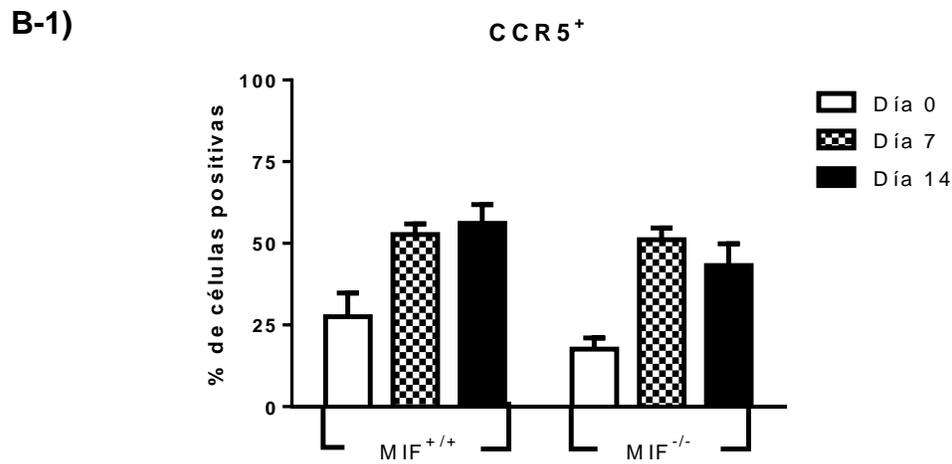
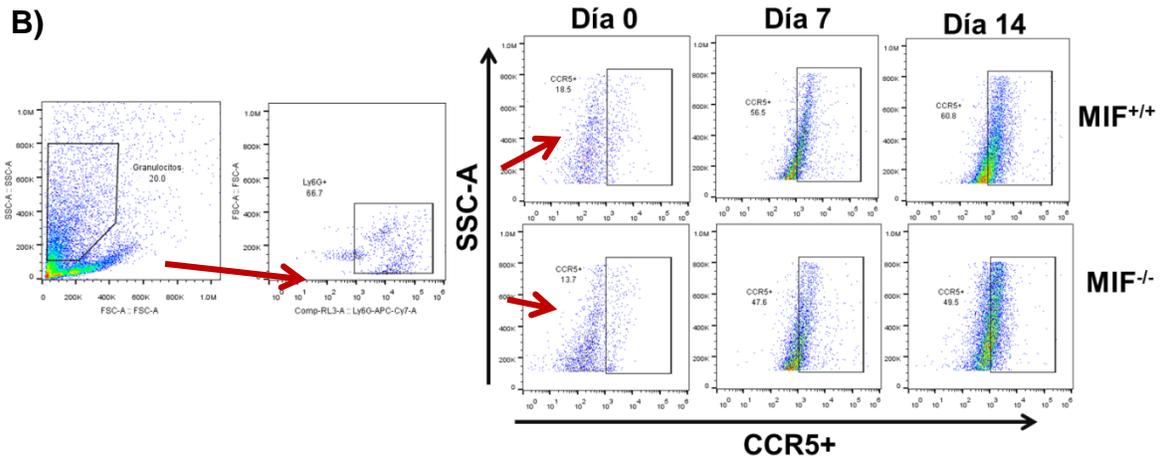
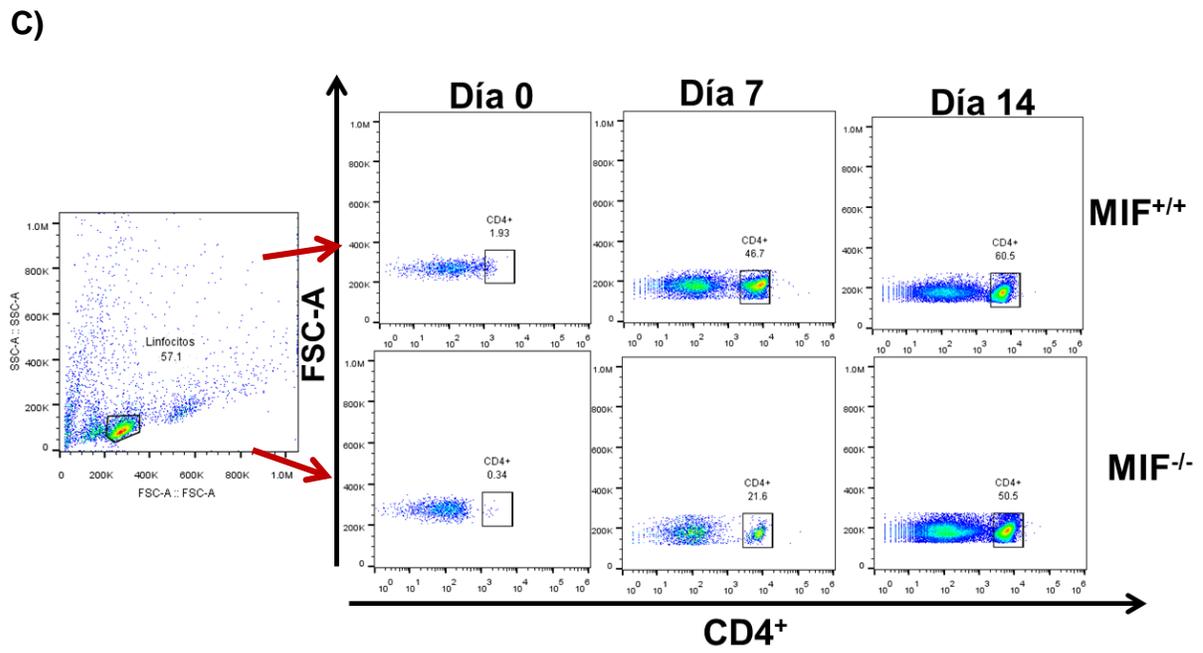


Figura 13.- Panel de plots representativos del análisis por citometría de flujo de las células obtenidas de ganglios linfáticos cervicales de ambos grupos de ratones a los 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco. A) plots representativos de macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup> y MHCII<sup>+</sup>). B1) Grafica representativa de los porcentajes de células activadas a los días 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco. Resultados representativos de 3 experimentos independientes de 3 ratones cada uno.



**C1)**

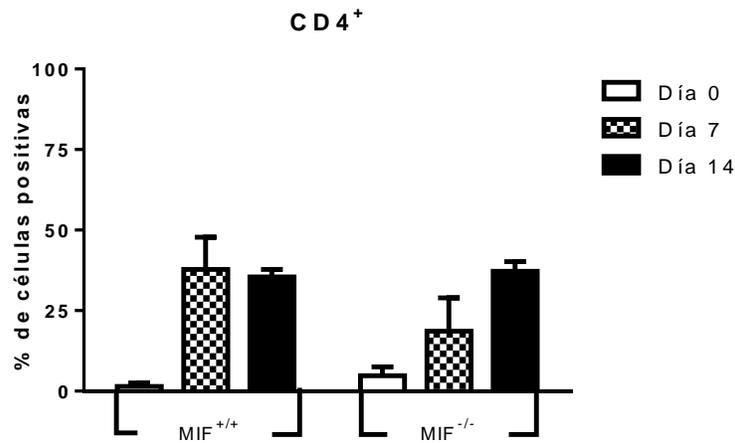
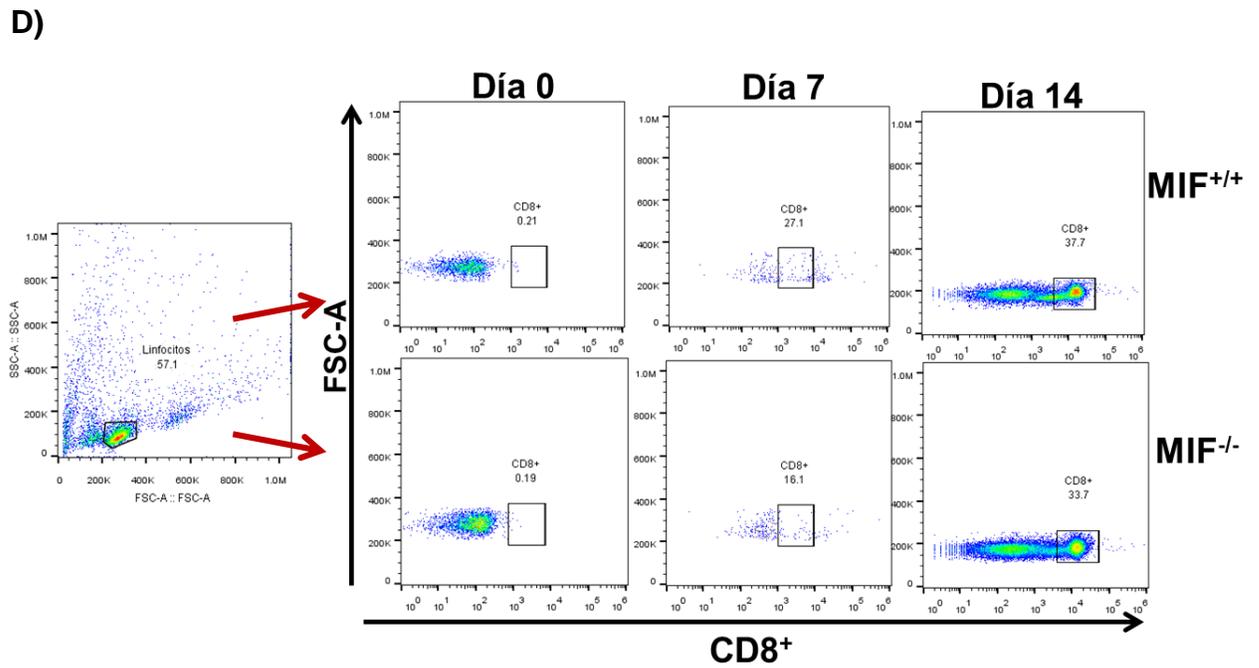


Figura 14.- Panel de plots representativos del análisis por citometría de flujo de las células obtenidas de ganglios linfáticos cervicales de ambos grupos de ratones a los 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco. A) plots representativos de macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup> y MHCII<sup>+</sup>). C1) Gráfica representativa de los porcentajes de células activadas a los días 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco. Resultados representativos de 3 experimentos independientes de 3 ratones cada uno.



D-1)

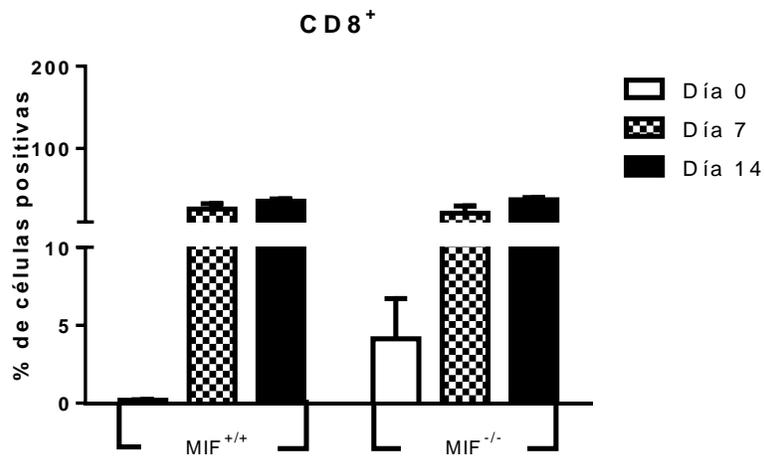


Figura 15.- Panel de plots representativos del análisis por citometría de flujo de las células obtenidas de ganglios linfáticos cervicales de ambos grupos de ratones a los 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco. D) Plots representativos de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. C1) Grafica representativa de los porcentajes de células activadas a los días 0, 7 y 14 días post inducción de ojo seco. Resultados representativos de 3 experimentos independientes de 3 ratones cada uno.

## 8.- Discusión

Ojo seco (OS) es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, la cual afecta, dependiendo la técnica diagnóstica, entre el 5% al 50% de la población mundial [57]. Aun cuando hay evidencia de que el proceso inflamatorio crónico subyacente en esta patología puede ocasionar disminución de la agudeza visual y en casos graves ceguera, actualmente no se cuenta con un tratamiento eficaz [58]. De ahí que haya un creciente interés por analizar el efecto de la inhibición de diferentes citocinas inflamatorias, a fin de contar con nuevas y mejores terapias.

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina inflamatoria, la cual se encuentra preformada en una amplia variedad de células de la respuesta inmune y es capaz de regular la función de macrófagos y células T, mediante la liberación de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estudios en modelos murinos de enfermedades inflamatorias oculares como: uveítis, retinopatía y ojo seco han reportado niveles incrementados de esta citocina sugiriendo una posible participación en el agravamiento de estas patologías [41, 53, 59, 60]. Aun cuando, se ha evidenciado el papel deletéreo de esta citocina, en general se desconocen los mecanismos por los cuales contribuye al desarrollo de enfermedades inflamatorias oculares como ojo seco. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo se centra en establecer la participación de MIF en un modelo murino de ojo seco acuodeficiente inducido con escopolamina, a través de la caracterización de la respuesta inmune en ratones silvestres y deficientes para esta molécula.

Dado que se ha establecido que el desarrollo y agravamiento de OS se caracteriza por incremento de la osmolaridad en la película lagrimal, acompañado de pérdida del volumen lagrimal, número de células caliciformes y alteración en el patrón de arborización de mucinas [30]. Nosotros evaluamos estos signos en ambos grupos de ratones, a fin de determinar si MIF pudiera tener alguna participación. Nuestros resultados mostraron que ambos grupos de ratones desarrollan la patología, sin embargo, los ratones deficientes para MIF tienen una menor pérdida del volumen lagrimal (15.5%) y número de células caliciformes (31.4%) en comparación a los ratones control, los cuales presentaron una pérdida del (43.5%) y (52.5%), respectivamente (**Figuras 7 y 9**).

Interesantemente, encontramos que la pérdida observada en el número de células caliciformes en los ratones control, se asoció con un patrón de arborización de mucinas tipo III y IV ambos considerados patológicos según la escala de Rolando, mientras que los ratones deficientes para MIF presentaron un el patrón de arborización mucinas tipo III al día 14 post-inducción (**Figura 8**). Interesantemente, observamos que solo los ratones deficientes para MIF tuvieron una reversión completa en los signos de OS. Nuestros resultados son congruentes con estudios previos donde se ha reportado que la pérdida de células caliciformes compromete la homeostasis de la superficie ocular, debido a que una de las principales funciones de estas células es la producción de mucinas, particularmente MUC-1, 2, 4, 5AC, 7, 16, 17 y 18 [61-65]. Los resultados obtenidos en la evaluación de la calidad de la película lagrimal muestran que la ausencia de MIF atenúa el desarrollo y agravamiento de los signos de OS, sin embargo, es necesario realizar futuras investigaciones utilizando este mismo modelo, a fin de determinar si existe una correlación entre la reducción del número de células caliciformes y la expresión diferencial de mucinas en ambos grupos de ratones, debido a que estudios realizados en pacientes y en modelos murinos de enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorrectal y enfermedad obstructiva pulmonar se sabe que presentan alteraciones en la producción MUC1, MUC2, MUC5AC y MUC6 donde además algunos autores lo relación con un mal pronóstico de estas patologías [66-68] .

Hay evidencias claras de que, la persistencia y exacerbación de los signos clínicos de OS y el agravamiento de esta patología, están asociados a un ambiente inflamatorio crónico caracterizado principalmente por la secreción IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 y la producción de MMP 3 y 9 [69-71]. Considerando estos antecedentes, nosotros decidimos analizar la producción de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en suero de ratones inducidos con OS durante 21 días y a los 7 días de haber suspendido la inducción con escopolamina. Dicha determinación mostro que, los ratones MIF<sup>-/-</sup> producen en promedio 300 pg/ml menos de TNF- $\alpha$  en todos los puntos evaluados, en comparación con los ratones silvestres. En cuanto a la producción de IL-1 $\beta$ , observamos un fenómeno similar a TNF- $\alpha$ , particularmente a los 7 y 14 dpi. Sin embargo, las diferencias estadísticamente significativas se pierden al día 21 post-inducción y a los 7 días de haber suspendido el modelo (**Figura 10 A y B**). Estos resultados reproducen las observaciones reportadas en

estudios de casos control de pacientes con ojo seco acuodeficiente y en modelos murinos [72-74]. Por su parte, y a pesar de que IL-10 es central en la inmunorregulación, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (**Figura 10 C**).

Además, los hallazgos observados en los ratones deficientes para MIF son consistentes con las investigaciones hechas en modelos murinos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como: diabetes tipo I, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal, donde se ha demostrado que la inhibición de MIF retarda o atenúa el desarrollo de estas patologías [75, 76]. Este mismo fenómeno ha sido demostrado en enfermedades inflamatorias oculares, en particular Kim B *et al*, reportaron que la inhibición de MIF en un modelo murino de desprendimiento de retina, redujo significativamente la apoptosis de las células fotorreceptoras, el adelgazamiento de la capa nuclear externa (ONL) y la gliosis retiniana [76]. En este mismo contexto, Choi W *et al*, demostraron que la inhibición de TNF- $\alpha$ , resulta en una menor producción de mediadores inflamatorios y la atenuación de los signos de OS [77]. Estos hallazgos resultan interesantes dado que pudimos observar que la atenuación de los signos de OS coinciden con una menor producción de mediadores inflamatorios en los ratones deficientes para MIF.

Considerando las diferencias observadas tanto en la evaluación de los signos, como en la producción de citocinas sistémicas, estos resultados nos sugieren un papel central de MIF en la respuesta inmune en ojo seco, principalmente a través de la inducción de otros mediadores inflamatorios involucrados en la activación y diferenciación de otras poblaciones celulares como los linfocitos T, específicamente hacia un perfil Th1. Tomando en cuenta lo antes expuesto se analizó la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en sobrenadante de cultivos de ganglio cervical en ratones silvestres y deficientes para MIF a los 5dpi, como se puede observar en la **Figura 11A**, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la producción de TNF- $\alpha$  ambos grupos. Sin embargo, encontramos una menor producción de IFN- $\gamma$  en las células de ratones deficientes para MIF estimuladas con 1 $\mu$ g de CoA en comparación al grupo control (**Figura 11B**). Respecto a la producción de estas citocinas en cultivo de bazo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**Figuras 11 C y D**). Estas observaciones son congruentes con algunos

estudios, donde se ha evidenciado que MIF es capaz modular la activación y proliferación de linfocitos T [78, 79].

Está bien establecido que los linfocitos Th1, son la fuente principal de IFN- $\gamma$ , y que esta citocina ejerce funciones diversas en la respuesta inmune, a través del control transcripcional de diferentes genes promoviendo el crecimiento, diferenciación y activación de distintas poblaciones celulares, que en conjunto intensifican la respuesta inflamatoria. Particularmente en macrófagos promueve su diferenciación hacia un fenotipo inflamatorio también conocido como (M1) [80-82]. Si bien es cierto que IFN- $\gamma$  contribuye a robustecer la respuesta inmunológica, también se ha demostrado su papel patogénico en diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias como: síndrome de Steven-Johnson, síndrome de Sjögren y ojo seco [83, 84]. Evidencias adicionales del papel patogénico de esta citocina en modelos murinos de ojo seco han reportado una estrecha relación entre niveles incrementados de IFN- $\gamma$  con metaplasia escamosa y apoptosis de células caliciformes y [70, 85]. Estos antecedentes sustentan nuestros resultados ya que encontramos una menor producción IFN- $\gamma$  en sobrenadante de cultivos de ganglio cervical en ratones deficientes para MIF, los cuales presentaron atenuación de los signos de ojo seco caracterizado por una menor pérdida del: volumen lagrimal, número de células caliciformes y alteración del patrón de arborización de mucinas.

Finalmente, los resultados del ensayo de citometría de flujo de ganglio cervical de ratones silvestres y deficientes para MIF a los 7 y 14 dpi, mostraron que los ratones silvestres tienen en promedio un 10% más macrófagos CCR5<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup> y un 20% más de neutrófilos CCR5<sup>+</sup> en comparación a los ratones deficientes (**Figuras 12A y B**). La relevancia de estos resultados es que se sabe que las quimiocinas son capaces de atraer y activar a diferentes poblaciones celulares y que la unión con sus receptores promueve su diferenciación, en particular hay evidencia de que CCR5 se expresa en linfocitos T tipo Th1, los cuales contribuyen a robustecer procesos inflamatorios agudos o crónicos [86]. En OS, Gulati A, *et al*, reportaron un incremento en la expresión de CCR5 en muestras de epitelio conjuntival de pacientes con diagnóstico de ojo seco acuodeficiente o evaporativo [87].

En este mismo ensayo analizamos el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>; dicho análisis mostro un incremento del 20% y 10% en los ratones silvestres, a los 7 y 14 dpi, respectivamente. Estas observaciones son interesantes y consideramos necesario realizar en futuros trabajos, donde podamos realizar una tinción intracelular con el objetivo de confirmar el subtipo de T helper.

En cuanto a los linfocitos CD8<sup>+</sup>, no observamos diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos en ambos grupos (**Figuras 12 C y D**). Aun cuando nosotros no pudimos demostrar la presencia de estas poblaciones celulares en la superficie ocular, no descartamos que ocurra, puesto que hay evidencia que hay una conexión entre la circulación sistémica, humor acuoso y órganos linfoides secundarios como ganglio cervical y bazo, a través de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior (ACAID) [88, 89]. Además, existen investigaciones hechas en modelos murinos de OS que han documentado el papel patogénico de los linfocitos T, particularmente los subtipos Th1 y Th17, incluso se ha demostrado que la transferencia de estas poblaciones celulares a ratones sanos, resulta en el desarrollo de esta patología [90-92]. Estos hallazgos son congruentes con resultados observados en muestras de pacientes con ojo seco asociado y no asociado a síndrome de Sjögren, donde la amplificación de la respuesta inflamatoria se asocia con la presencia de linfocitos T [93].

En resumen, nuestros resultados permitieron observar que la deficiencia de MIF retarda y atenúa los signos de ojo seco; dichas observaciones se asociaron con una menor producción de mediadores inflamatorios sistémicos y en cultivo de ganglio cervical el infiltrado de linfocitos, particularmente CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, aún es necesario tipificar de manera precisa sí coexisten ambos subtipos de linfocitos o sí una población domina respecto a la otra. no.

## **9.- Resumen de resultados**

- 1.-** Los ratones MIF<sup>-/-</sup> son menos susceptibles a desarrollar ojo seco acuodeficiente.
- 2.-** Los ratones MIF<sup>-/-</sup> tuvieron menor pérdida del volumen lagrimal, más número de células caliciformes y un patrón de arborización de mucinas más conservado.
- 3.-** Ratones MIF<sup>+/+</sup> producen más mediadores TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a nivel sistémico en comparación con los ratones MIF<sup>-/-</sup>.
- 4.-** Los ratones MIF<sup>+/+</sup> producen más TNF- $\alpha$  en sobrenadante de cultivos de ganglio cervical y bazo a los a los 5 dpi.
- 5.-** Los ratones MIF<sup>-/-</sup> presentaron un menor porcentaje de macrófagos CCR5<sup>+</sup>/MHC<sup>+</sup> y células T CD4<sup>+</sup> a los 7 y 14 post-inducción de OS.
- 6.-** Los ratones MIF<sup>-/-</sup> mostraron una mayor recuperación una vez suspendida la inducción de ojo seco con escopolamina, ya que presentaron incremento en el volumen lagrimal, un mayor número de células caliciformes y un patrón de arborización de mucinas tipo I.

## **10.- Conclusiones**

- 1.-** El factor inhibidor de la migración de macrófagos juega un papel importante en el desarrollo de ojo seco acuodeficiente inducido con escopolamina, su deficiencia resulta en la atenuación de los signos de ojo seco.
- 2.-** La susceptibilidad observada en los ratones MIF<sup>+/+</sup> se debe a su capacidad de producir más citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) en suero y sobrenadante de ganglio cervical.
- 3.-** Las pruebas de Schirmer, Ferning y citología de impresión permitieron confirmar que los niveles reducidos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  encontrados en suero y cultivos de ganglio cervical en los ratones deficientes para MIF, se asoció con una menor pérdida de la estabilidad de la película lagrimal.
- 4.-** La presencia de MIF es clave en la activación y reclutamiento de poblaciones celulares tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa, ya que los ratones MIF<sup>-/-</sup> presentan un menor porcentaje de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), en ganglio linfático cervical en comparación con ratones silvestres.
- 5.-** La deficiencia de MIF parece ser clave en la reversión de los signos de OS, principalmente a través de una menor producción de mediadores inflamatorios, así como activación y reclutamiento de poblaciones celulares inflamatorias.

## 11.- Bibliografía

1. A.K., A., *Inmunología celular y molecular* 2018.
2. Romero, L.P., Jiménez, M.D., & Eugenia, G.A. , *Inmunología molecular, celular y traslacional*. 2016.
3. de Jong, Y.P., et al., *Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1061-6.
4. Kim, K.W. and H.R. Kim, *Macrophage migration inhibitory factor: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis*. Korean J Intern Med, 2016. **31**(4): p. 634-42.
5. Nobre, C.C., et al., *Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer*. Pathol Oncol Res, 2017. **23**(2): p. 235-244.
6. Razzaque, M.S., C.S. Foster, and A.R. Ahmed, *Role of macrophage migration inhibitory factor in conjunctival pathology in ocular cicatricial pemphigoid*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(4): p. 1174-81.
7. L, C.-R., *Immunomodulatory cross-talk between conjunctival goblet cells and dendritic cells*. PLO'S-ONE, 2015.
8. Dartt, D.A., *Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells*. Prog Retin Eye Res, 2002. **21**(6): p. 555-76.
9. Díaz-Valle, D., et al., *Enfermedades sistémicas no infecciosas y uveítis*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 2008. **31**: p. 97-110.
10. Hori, J., J.L. Vega, and S. Masli, *Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye*. Ocul Immunol Inflamm, 2010. **18**(5): p. 325-33.
11. Gipson, I.K., *The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(10): p. 4390; 4391-8.
12. Keino, H., S. Horie, and S. Sugita, *Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 1679197.
13. Taylor, A.W. and T.F. Ng, *Negative regulators that mediate ocular immune privilege*. J Leukoc Biol, 2018.
14. Clayton, J.A., *Dry Eye*. N Engl J Med, 2018. **379**(11): p. e19.
15. Corfield, A.P., *Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(1): p. 236-52.
16. Fouces Gutiérrez, Y., et al., *Enfermedades inflamatorias de la úvea*. MEDISAN, 2010. **14**: p. 754-760.
17. Knop, N. and E. Knop, *Regulation of the inflammatory component in chronic dry eye disease by the eye-associated lymphoid tissue (EALT)*. Dev Ophthalmol, 2010. **45**: p. 23-39.
18. Hattrop, C.L. and S.J. Gendler, *Structure and function of the cell surface (tethered) mucins*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 431-57.
19. Tukler Henriksson, J., et al., *IL-13 Stimulates Proliferation and Expression of Mucin and Immunomodulatory Genes in Cultured Conjunctival Goblet Cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(8): p. 4186-97.

20. McMonnies, C.W., *Conjunctival Tear Layer Temperature, Evaporation, Hyperosmolarity, Inflammation, Hyperemia, Tissue Damage, and Symptoms: A Review of an Amplifying Cascade*. *Curr Eye Res*, 2017. **42**(12): p. 1574-1584.
21. Braun, R.J., et al., *Dynamics and function of the tear film in relation to the blink cycle*. *Prog Retin Eye Res*, 2015. **45**: p. 132-64.
22. Chhadva, P., R. Goldhardt, and A. Galor, *Meibomian Gland Disease: The Role of Gland Dysfunction in Dry Eye Disease*. *Ophthalmology*, 2017. **124**(11S): p. S20-S26.
23. Bron, A.J., et al., *Functional aspects of the tear film lipid layer*. *Exp Eye Res*, 2004. **78**(3): p. 347-60.
24. Dilly, P.N., *Structure and function of the tear film*. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **350**: p. 239-47.
25. Chotikavanich, S., et al., *Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**(7): p. 3203-9.
26. Koh, S., et al., *Effects of tear film dynamics on quality of vision*. *Br J Ophthalmol*, 2018. **102**(12): p. 1615-1620.
27. Craig, J.P., et al., *TFOS DEWS II Report Executive Summary*. *Ocul Surf*, 2017. **15**(4): p. 802-812.
28. Willcox, M.D.P., et al., *TFOS DEWS II Tear Film Report*. *Ocul Surf*, 2017. **15**(3): p. 366-403.
29. Yu, J., C.V. Asche, and C.J. Fairchild, *The economic burden of dry eye disease in the United States: a decision tree analysis*. *Cornea*, 2011. **30**(4): p. 379-87.
30. Wolffsohn, J.S., et al., *TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report*. *Ocul Surf*, 2017. **15**(3): p. 539-574.
31. Garza-Leon, M., et al., *Prevalence of ocular surface disease symptoms and risk factors in group of university students in Monterrey, Mexico*. *J Ophthalmic Inflamm Infect*, 2016. **6**(1): p. 44.
32. Navarro Luna, P., Vázquez Mendoza, A., Alonso Trujillo, J., González Aragón Pineda, Á. É., & Ramos Montes, Ó. A. , *Prevalencia de ojo seco en pacientes que acuden a la Clínica de Optometría de la FESI, UNAM*. . *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular*, 20019.
33. Pflugfelder, S.C., et al., *Aqueous Tear Deficiency Increases Conjunctival Interferon-gamma (IFN-gamma) Expression and Goblet Cell Loss*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015. **56**(12): p. 7545-50.
34. Schirmer, O., *Studien zur Physiologie und Pathologie der Tranenabsonderung und Tranenabfuhr*. *Arch Klin Exp Ophthalmol* 1903.
35. Rolando, M., M.F. Refojo, and K.R. Kenyon, *Increased tear evaporation in eyes with keratoconjunctivitis sicca*. *Arch Ophthalmol*, 1983. **101**(4): p. 557-8.
36. Nelson, J.D., *Impression cytology*. *Cornea*, 1988. **7**(1): p. 71-81.
37. Nelson, J.D., V.R. Havener, and J.D. Cameron, *Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states*. *Arch Ophthalmol*, 1983. **101**(12): p. 1869-72.

38. Rhee, M.K. and F.S. Mah, *Inflammation in Dry Eye Disease: How Do We Break the Cycle?* Ophthalmology, 2017. **124**(11S): p. S14-S19.
39. Kodati, S., et al., *CCR7 is critical for the induction and maintenance of Th17 immunity in dry eye disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(9): p. 5871-7.
40. Liu, R., et al., *Analysis of Th17-associated cytokines and clinical correlations in patients with dry eye disease*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0173301.
41. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 791-800.
42. Lue, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease*. Microbes Infect, 2002. **4**(4): p. 449-60.
43. Santos, L.L. and E.F. Morand, *Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis*. Clin Chim Acta, 2009. **399**(1-2): p. 1-7.
44. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
45. Rosado Jde, D. and M. Rodriguez-Sosa, *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(9): p. 1239-56.
46. Taguchi, C., et al., *Macrophage migration inhibitory factor in ocular fluids of patients with uveitis*. Br J Ophthalmol, 2001. **85**(11): p. 1367-71.
47. Wistow, G.J., et al., *A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(4): p. 1272-5.
48. Kim, B., et al., *MIF Inhibitor ISO-1 Protects Photoreceptors and Reduces Gliosis in Experimental Retinal Detachment*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14336.
49. Kotake, S., N. Kitaichi, and S. Ohno, *Macrophage migration inhibitory factor in uveitis*. Int Ophthalmol Clin, 2002. **42**(1): p. 99-103.
50. Matsuda, A., et al., *Expression of macrophage migration inhibitory factor in rat retina and its immunohistochemical localization*. J Neuroimmunol, 1997. **77**(1): p. 85-90.
51. Vitoux, M.A., et al., *Formaldehyde Gas Exposure Increases Inflammation in an In Vitro Model of Dry Eye*. Toxicol Sci, 2018. **165**(1): p. 108-117.
52. Warcoin, E., et al., *Hyperosmolarity and Benzalkonium Chloride Differently Stimulate Inflammatory Markers in Conjunctiva-Derived Epithelial Cells in vitro*. Ophthalmic Res, 2017. **58**(1): p. 40-48.
53. Yang, H., et al., *Modulating of ocular inflammation with macrophage migration inhibitory factor is associated with notch signalling in experimental autoimmune uveitis*. Clin Exp Immunol, 2016. **183**(2): p. 280-93.
54. Wang, J., et al., *Absence of macrophage migration inhibitory factor reduces proliferative retinopathy in a mouse model*. Acta Diabetol, 2017. **54**(4): p. 383-392.
55. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(15): p. 4293.
56. Rodríguez, M.F., Juyo, A., Rojas, A., *Descripción de la metaplasia escamosa por citología de impresión en pacientes con ojo seco*. Ciencia y tecnología para la Salud visual y ocular, 2007.

57. Craig, J.P., et al., *TFOS DEWS II Definition and Classification Report*. Ocul Surf, 2017. **15**(3): p. 276-283.
58. Jones, L., et al., *TFOS DEWS II Management and Therapy Report*. Ocul Surf, 2017. **15**(3): p. 575-628.
59. Bacher, M., et al., *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7849-54.
60. Zhu, L., et al., *Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulium toxin B induced murine dry eye model*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 250-8.
61. Hori, Y., *Secreted Mucins on the Ocular Surface*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018. **59**(14): p. DES151-DES156.
62. Jumblatt, M.M., R.W. McKenzie, and J.E. Jumblatt, *MUC5AC mucin is a component of the human precorneal tear film*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(1): p. 43-9.
63. McKenzie, R.W., J.E. Jumblatt, and M.M. Jumblatt, *Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(3): p. 703-8.
64. Spurr-Michaud, S., P. Argueso, and I. Gipson, *Assay of mucins in human tear fluid*. Exp Eye Res, 2007. **84**(5): p. 939-50.
65. Ablamowicz, A.F. and J.J. Nichols, *Concentrations of MUC16 and MUC5AC using three tear collection methods*. Mol Vis, 2017. **23**: p. 529-537.
66. Byrd, J.C. and R.S. Bresalier, *Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 77-99.
67. Walsh, M.D., et al., *Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype*. Mod Pathol, 2013. **26**(12): p. 1642-56.
68. Sheng, Y.H., et al., *Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(1): p. 28-38.
69. Jackson, D.C., et al., *Tear Interferon-Gamma as a Biomarker for Evaporative Dry Eye Disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(11): p. 4824-4830.
70. Zhang, X., et al., *Interferon-gamma exacerbates dry eye-induced apoptosis in conjunctiva through dual apoptotic pathways*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(9): p. 6279-85.
71. Enriquez-de-Salamanca, A., et al., *Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 862-73.
72. Zhao, H., et al., *Tear Luminex Analysis in Dry Eye Patients*. Med Sci Monit, 2018. **24**: p. 7595-7602.
73. Mrugacz, M., et al., *Pro-inflammatory cytokines associated with clinical severity of dry eye disease of patients with depression*. Adv Med Sci, 2017. **62**(2): p. 338-344.
74. Lin, Z., et al., *A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride*. Mol Vis, 2011. **17**: p. 257-64.
75. Korf, H., et al., *MIF inhibition interferes with the inflammatory and T cell-stimulatory capacity of NOD macrophages and delays autoimmune diabetes onset*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187455.

76. Al-Abed, Y. and S. VanPatten, *MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic*. *Future Med Chem*, 2011. **3**(1): p. 45-63.
77. Choi, W., et al., *The Effect of TNF-alpha Blocker HL036337 and Its Best Concentration to Inhibit Dry Eye Inflammation*. *Korean J Ophthalmol*, 2016. **30**(4): p. 302-8.
78. Sanchez-Zamora, Y.I., et al., *Altered Macrophage and Dendritic Cell Response in Mif-/- Mice Reveals a Role of Mif for Inflammatory-Th1 Response in Type 1 Diabetes*. *J Diabetes Res*, 2016. **2016**: p. 7053963.
79. Alibashe-Ahmed, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor regulates TLR4 expression and modulates TCR/CD3-mediated activation in CD4+ T lymphocytes*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 9380.
80. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 749-95.
81. Carnaud, C., et al., *Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(9): p. 4647-50.
82. Finkelman, F.D., et al., *IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses*. *J Immunol*, 1988. **140**(4): p. 1022-7.
83. Ogawa, Y., E. Shimizu, and K. Tsubota, *Interferons and Dry Eye in Sjogren's Syndrome*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(11).
84. Charli-Joseph, Y., et al., *Genetic association of IFN-gamma +874T/A polymorphism in Mexican patients with drug-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis*. *Arch Dermatol Res*, 2013. **305**(4): p. 353-7.
85. Garcia-Posadas, L., et al., *Interaction of IFN-gamma with cholinergic agonists to modulate rat and human goblet cell function*. *Mucosal Immunol*, 2016. **9**(1): p. 206-17.
86. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(2): p. 108-15.
87. Gulati, A., et al., *Chemokine receptor CCR5 expression in conjunctival epithelium of patients with dry eye syndrome*. *Arch Ophthalmol*, 2006. **124**(5): p. 710-6.
88. Wilbanks, G.A. and J.W. Streilein, *Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). 1. Evidence that an antigen-specific, ACAID-inducing, cell-associated signal exists in the peripheral blood*. *J Immunol*, 1991. **146**(8): p. 2610-7.
89. Vendomele, J., Q. Khebizi, and S. Fisson, *Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1686.
90. Lieberman, S.M., P.A. Kreiger, and G.A. Koretzky, *Reversible lacrimal gland-protective regulatory T-cell dysfunction underlies male-specific autoimmune dacryoadenitis in the non-obese diabetic mouse model of Sjogren syndrome*. *Immunology*, 2015. **145**(2): p. 232-41.

91. Jiang, G., et al., *A new model of experimental autoimmune keratoconjunctivitis sicca (KCS) induced in Lewis rat by the autoantigen Klk1b22*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(5): p. 2245-54.
92. Meadows, J.F., K. Dionne, and K.K. Nichols, *Differential Profiling of T-Cell Cytokines as Measured by Protein Microarray Across Dry Eye Subgroups*. Cornea, 2016. **35**(3): p. 329-35.
93. Stern, M.E., et al., *Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(8): p. 2609-14.

## **12.- APÉNDICE 1**

### **Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) para 10 Lts y pH 7.4**

80 gr Na Cl (J.T Baker)

11.6 gr Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T Baker)

2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T Baker)

2 gr KCl (ICN Biomedicals Inc)

### **Buffer de lisis (Laid W.P et.al 1991 Simplified mammalian DNA isolation procedure**

Nucleic Acids Research Vol.19 Num 15, 4393)

200 mM NaCl (J.T Baker)

5mM de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) (J.T Baker)

0.2% Dodecil Sulfato de sodio (SDS) (J.T Baker)

100Mm Tris HCl, ph 8.5 (ICN Biomedicals Inc.)

Aforar a 1 Lt con agua destilada

### **Solución hemolizante**

Tris base 0.17 M (ICM Biomedicals Inc)

NH<sub>4</sub>Cl 0.16 M (J.T Baker)

Se prepara para 300ml.

**Buffer TBE 10x**

Tris base (890mM) (Sigma- Chemicals)

Ácido Bórico (890Mm) (J.T Baker)

40 ml de 0.5 M ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico (J.T Baker)

Se ajusta todo a pH 8.0 Y se afora a 500 ml. Con agua destilada

**Buffer de pegado (ELISA)**

0.1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T Baker)

Para 1 Lt con agua destilada

**Solución de pegado de (ELISA)**

1000ml de PBS más 0.5% tween 20 (Promega Co.)

**Solución de bloqueo (ELISA)**

100ml de PBS más 1% de albumina sérica bovina (ICN Biochemicals)

**Sustrato ABTS para revelado (ELISA)**

Adicionar 150mg ABTS (ICN Biochemicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con Na OH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11 ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

### **Tren de tinción de citología de impresión PAS-Hematoxilina**

Alcohol 96%	1 min
H <sub>2</sub> O Destilada	Enjuague
Ac. Peryodico	10 min
H <sub>2</sub> O Destilada	5 min
Hematoxilina	30 seg
H <sub>2</sub> O Amoniacal 1%	Enjuague
Alcohol 70%	5 min
Alcohol 96%	5 min
Xilol 1	11 min
Xilol 2	11 min
Xilol 3	11 min

## APÉNDICE 2

Gen	Secuencias	Producto	T alineación	Ciclos
MIF	(F) AgACCACgtgCtTAgCTgAg  (R) gCATCgCTACCggTggATAA	<b>200 pb</b>	<b>60°C</b>	<b>35</b>
NEO	(F) ATTgAACAAgATggATTgCAC  (R) CgTCCAgATCATCCTgATC	<b>500 pb</b>	<b>60°C</b>	<b>35</b>