



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE EN UN MODELO
MURINO DEFICIENTE PARA EL FACTOR INHIBIDOR DE LA
MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF) CON OJO SECO
AGUDO”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

CHAVARRÍA AYALA LUIS GERARDO



Directora de tesis: Dra. Alicia Vázquez
Mendoza

Cd. Mx. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 18 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED). Fue financiado por Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA) No. de proyecto TA200118 e IN226220.

1. Dedicatorias

A mis padres por todo su apoyo y confianza brindada, sobre todo por estar en los momentos donde más necesite que creyeran en mí.

A mi abuelo, quién a pesar de ya no estar con nosotros siempre se preocupó por mi de igual manera que nunca me perdió la fe.

A mi asesora la Dra., Alicia, por guiarme a lo largo del desarrollo de este proyecto y ayudarme a corregir y mejorar la redacción de mi tesis.

Al Dr. Tonathiu por su apoyo y orientación en el desarrollo experimental, así como el análisis de los resultados de citometría de flujo.

A mi buen amigo Armando, por apoyo moral para el desarrollo de la parte experimental y escrita.

A mi amiga Nancy por apoyarme moralmente durante toda esta travesía en todo momento incluso cuando tuvo que viajar a otro país.

A mi amiga Laura, por su apoyo, ya que siempre me animó a seguir adelante incluso en mis peores momentos.

A todo el equipo del laboratorio 18 por sus consejos y por brindarme de su tiempo durante mis ensayos.

Al resto de mis amigos, ya que gracias a sus buenos deseos y gestos de aprecio logré encontrar motivación en muchos momentos.

Agradecimientos

A mis profesores de la Carrera de Biología.

A mis sinodales por todas y cada una de sus observaciones:

Presidente: Dr. José Luis Reyes Hernández

Vocal: Esp. Oscar Antonio Ramos Montes

Secretario: Dra. Alicia Vázquez Mendoza

Suplente: Mtra. Imelda Juárez Avelar

Suplente: Mtra. Marcela López De la Cruz

Al personal del Bioterio de la FES-Iztacala, en particular a la MVZ. Leticia Flores Sánchez y al Biol. Tomas Ernesto Villamar Duque.

índice

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
1. Resumen.....	4
2. Introducción	5
2.1 Morfofisiología ocular.....	5
2.2 Estructura y función de la superficie ocular	10
2.3 Película lagrimal.....	13
3. Definición y prevalencia de Ojo seco	14
3.1 Clasificación.....	15
3.2 Factores de riesgo.....	16
3.3 Cuadro clínico	17
4. Diagnóstico y tratamiento	18
5. Inflamación y Ojo seco	19
5.1 Papel del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) en inflamación.....	20
6. Hipótesis.....	21
7. Objetivos	21
7.1 Objetivo General	21
7.2 Objetivo Particulares	22
8. Materiales y Métodos.....	23
8.1 Obtención del DNA genómico.....	23
8.2 Amplificación del gen	23
8.3 Electroforesis.....	24
8.4 Inducción del modelo murino de ojo seco (OS).....	25
8.5 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer	25
8.6 Análisis del patrón de arborización de mucinas conjuntivas por la técnica de ferning.....	26
8.7 Análisis histopatológico de córnea.....	26
8.8 Cultivo de células de Bazo	27
8.9 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos por ELISA sándwich.....	27
9. Análisis de la expresión de MHC-II en macrófagos por citometría de flujo.....	29
10. Análisis estadístico.....	29
11. Resultados	30
11.1 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer	30

11.2 Análisis del patrón de arborización de mucinas por la técnica de ferning	31
11.3 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de bazo de ratones con ojo seco	35
11.4 Caracterización de poblaciones celulares.....	37
11.5 Análisis histológico de la córnea de ratones con ojo seco.....	40
12. Discusión.....	43
13. Conclusiones	47
14. APÉNDICES.....	48
15. Literatura citada	51

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Estructuras que conforman el segmento anterior y posterior del globo ocular y sus respectivas funciones.....	9
Figura 1. Capas de la córnea (epitelio corneal, membrana de Bowman, estroma y membrana de Descemet.....	12
Tabla 2: Clasificación y ubicación de las mucinas oculares.....	14
Figura 2: Clasificación de la enfermedad de ojo seco.....	16
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos de los primers para PCR.	23
Tabla 4. Reactivos utilizados para la técnica de PCR por muestra de ratón.....	24
Figura 3. Genotipo de ratones silvestres (WT) y deficientes para MIF ($Mif^{-/-}$).	25
Figura 4. Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer.....	30
Figura 5. Patrón de arborización de mucinas por la técnica Ferning.....	32
.....	33
Figura 6. Imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas.....	33
Figura 7. Imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas.....	34
Figura 8. Producción de citocinas inflamatorias y antantiinflamatorias cultivo de bazo	36
Figura 9. Estrategia experimental de citometría	38
Figura 10. Poblaciones de macrófagos en bazo y ganglio cervical.	39
Figura 11. Imágenes representativas del análisis histopatológico de la córnea.....	41
Figura 12. Grosor del epitelio y estroma corneal córnea	42

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 ojo seco (OS). Con el fin de contribuir a establecer la participación de esta molécula en el desarrollo de OS empleamos ratones silvestres (WT) y deficientes para la molécula MIF ($Mif^{-/-}$) a los cuales se les indujo OS durante 7 días. Los resultados obtenidos revelaron que la deficiencia de la citocina inflamatoria MIF atenúa la pérdida del volumen lagrimal, la alteración del patrón de arborización de mucinas y el daño tisular en córnea. Estos hallazgos se asociaron con una menor producción de IL-1 β en cultivo de células de bazo.

Palabras clave: Factor inhibidor de la migración de macrófagos, Ojo seco, inflamación, superficie ocular, citocinas, película lagrimal.

2. Introducción

2.1 Morfofisiología ocular

El ojo es un órgano sensorial par, altamente especializado que se ubica en la cavidad orbitaria cuya función principal es detectar estímulos visuales, concepto conocido como fotorrecepción; además, es responsable de actuar como sensor para enviar información visual al cerebro por medio del nervio óptico. En el cerebro, la información que proviene de los ojos se procesa y finalmente es traducida en una imagen. El ojo humano normal mide aproximadamente de 22 a 27 mm de diámetro anteroposterior y de 69 a 85 mm de circunferencia (Iliya et al., 2018). Consta de múltiples compartimentos con propiedades únicas y especializadas que reflejan la variedad de sus funciones (Henry J. Kaplan., 2007). Se estima que el globo ocular ocupa aproximadamente un tercio o menos del volumen de la órbita, mientras que los otros dos tercios se componen de grasa, músculos, nervios y vasculatura.

Anatómicamente el ojo consta de tres capas, tres compartimentos y tres fluidos, que en conjunto contribuyen al proceso de la visión:

1. Capas del ojo:

(a) Capa fibrosa externa incluye:

- Córnea
- Esclerótica
- Lámina cribrosa.

(b) Capa vascular media ("tracto uveal") conformada por:

- Iris
- Cuerpo ciliar - formado por: pars plicata y pars plana
- Coroides

(c) Capa nerviosa interna formada por:

- Epitelio pigmentario de la retina

- Fotorreceptores retinianos
- Neuronas de la retina.

2. *Compartimentos del ojo:*

(a) *Cámara anterior:* formada por el espacio entre la córnea y el diafragma del iris.

(b) *Cámara posterior:* comprende el espacio triangular entre la porción anterior del iris, el cristalino y zónula posterior del cuerpo ciliar.

(c) *Cámara vítrea:* corresponde al espacio detrás del cristalino.

3. *Fluidos intraoculares:*

(a) *Humor acuoso:* ópticamente es una solución clara, constituida de agua y electrolitos. Una característica distintiva de este fluido es su bajo contenido de proteínas.

(b) *Humor vítreo:* es un gel transparente que consta de una red tridimensional de fibras de colágeno, los espacios intermedios tienen ácido hialurónico y agua. Este gel llena el espacio entre la superficie posterior del cristalino, el cuerpo ciliar y la retina.

(c) *Sangre:* La mayor parte de la sangre dentro del ojo se encuentra en la coroides. El flujo sanguíneo coroideo representa el mayor flujo por unidad de tejido en el cuerpo. El grado de desaturación de la sangre coroidea eferente es relativamente pequeña e indica que la vasculatura coroidea tiene funciones más allá de la nutrición retiniana. Sugiriendo que la coroides es capaz de regular la temperatura de la retina, mediante la absorción de energía cuando la luz incide en el epitelio pigmentario de la retina.

En este mismo contexto, desde el punto de vista clínico, el ojo se estudia y analiza como segmento anterior (todas las estructuras que están por delante del cristalino) y segmento posterior (todas las estructuras localizadas detrás del cristalino) ver tabla 1.

Un aspecto relevante del ojo es que, a diferencia de otros órganos con excepción de la piel, las estructuras que forman parte del segmento anterior están constantemente expuestas a diversos estímulos infecciosos y no infecciosos, provenientes del medio ambiente. Sin embargo y de forma interesante, a pesar de la constante exposición al medio ambiente, este órgano cuenta con diversos mecanismos celulares y moleculares

encargados de brindar humectación y protección con el propósito mantener la homeostasis de la superficie ocular (Villar F.I., et al. 2000).

Segmento anterior	Tejido anatómico	Descripción	Función
	Conjuntiva	Membrana vascularizada transparente formada por epitelio escamoso estratificado columnar y estroma que cubre la superficie interna de los párpados y se curva hacia la superficie anterior del globo ocular, donde se extiende hasta la córnea. Se continúa con la piel en el margen de los párpados y con la córnea en el limbo.	Actúa como una capa protectora y lubricante. Tiene células y moléculas de la respuesta inmune que contribuyen a mantener el privilegio inmunológico ocular.
	Esclerótica	Membrana blanca, gruesa, resistente y rica en fibras de colágeno. Es una capa externa de color blanco opaco que recubre cinco sextos del segmento posterior del ojo.	Dar forma al ojo y proteger los elementos internos.
	Córnea	Es una capa circular transparente que cubre la pupila, iris y la cámara anterior del ojo. El poder refractivo de la córnea es de aproximadamente 43 dioptrías, lo cual la convierte en la estructura refractiva más importante del ojo.	Refracción y transmisión de la luz.

	Iris	Es un órgano interno del ojo, localizado por detrás de la córnea y del humor acuoso. Diferencia el color de los ojos de cada persona.	Su función principal es controlar la cantidad de luz que penetra en el ojo.
	Pupila	Su tamaño está controlado por dos músculos: el esfínter de la pupila y el músculo dilatador.	Regula la cantidad de luz que llega a la retina en la parte posterior del ojo.
	Cuerpo ciliar	Parte situada entre el iris y la retina.	Es la responsable de la producción de humor acuoso. El músculo ciliar permite la acomodación del ojo. Su superficie posterior se enfrenta al cuerpo vítreo y le proporciona glicosaminoglicanos.
	Cristalino	Su aspecto es el de una estructura casi transparente, biconvexa, que se encuentra anterior al cuerpo vítreo y posterior al iris.	Es la lente del ojo, enfoca los rayos luminosos para que formen una buena imagen en la retina, independientemente de la distancia del objeto.
	Ligamento suspensorio del cristalino	Es una trama compleja de fibrillas, que se extienden desde los procesos ciliares hasta el ecuador del cristalino. Estas fibrillas se denominan fibras zonulares.	Estabiliza el cristalino y facilita su acomodación.
	Humor acuoso	Líquido transparente situado en la cámara anterior del ojo.	La función del humor acuoso es nutrir a la córnea y el

			cristalino, los cuales son avasculares.
Segmento posterior	Coroides	Es una capa altamente vascularizada que es responsable de casi el 90% del total de flujo sanguíneo del ojo.	La función de la coroides es proveer la irrigación sanguínea hacia las capas externas de la retina, y también actuar como vía de paso para los vasos sanguíneos que vienen desde la región posterior hacia la región anterior del ojo.
	Retina	Es la capa de tejido sensible a la luz que se encuentra en la parte posterior del globo ocular. Por lo regular luce roja o naranja debido a que hay muchos vasos sanguíneos justo detrás de ella.	La luz que incide en la retina desencadena una serie de fenómenos químicos y eléctricos que se traducen en impulsos nerviosos que son enviados hacia el cerebro por el nervio óptico.
	Humor vítreo	Es un gel transparente que llena la cavidad vítrea del globo ocular.	Mantiene la forma del globo ocular y consigue una superficie de la retina uniforme para que la recepción de las imágenes sea nítida.

Tabla 1: Estructuras que conforman el segmento anterior y posterior del globo ocular y sus respectivas funciones.

2.2 Estructura y función de la superficie ocular

La superficie ocular (SO) es considerada la interfaz entre el ojo y el medio ambiente (Li JJ, *et al.*, 2020). Está formada por párpados, película lagrimal, glándula lagrimal, glándulas de meibomio, glándulas accesorias (Moll, Krause y Zeis) conjuntiva y córnea, cada una de estas estructuras a su vez cuentan con diversos tipos de células y moléculas del sistema inmunológico y no inmunológico, que en conjunto contribuyen a mantener una superficie lubricada y ópticamente lisa, con el objetivo de favorecer el proceso de la visión. Además, todos los componentes de la SO están vinculados funcionalmente por la continuidad de los epitelios, la inervación y la comunicación con los sistemas endocrino, vascular e inmunológico (Ilene K. *et al.*, 2007).

Aunado a la presencia de células y moléculas, la SO cuenta con protección mecánica por parte de los párpados, los cuales se encargan de distribuir la película lagrimal, brindar protección contra traumatismos, cambios de temperatura y favorecen la eliminación de cuerpos extraños y microorganismo a través del parpadeo. Anatómicamente, los párpados están compuestos de 5 capas, la primera es epitelio escamoso estratificado, este epitelio descansa sobre una dermis muy fina. El músculo orbicular de los ojos es un músculo estriado que rodea los márgenes orbitarios. Dentro del orbicular se encuentra el tabique orbitario, debajo del tabique se encuentran los músculos retractores de los párpados. El tarso tiene una consistencia cartilaginosa y está compuesto por tejido conectivo denso que se amolda firmemente a la curvatura del ojo para mantener el párpado en la superficie. Dentro del tarso hay numerosas glándulas sebáceas especializadas llamadas glándulas de Meibomio que se abren en el margen del párpado. Estas glándulas son largas y delgadas, su función es la síntesis y secreción de los lípidos que formaran la capa lipídica de la película lagrimal. En cada folículo de las pestañas se encuentran otro tipo de glándulas sebáceas conocidas como glándulas de Moll y Zeis, respectivamente (Ivan Cher. *et al.*, 2014)

La porción interna de los párpados se encuentra recubierta por conjuntiva, esta se extiende desde el fórnix hasta el limbo de la córnea. La conjuntiva tiene un grosor de 33 micrones y se divide en tres regiones: conjuntiva palpebral o tarsal, conjuntiva

bulbar u ocular y el fondo de saco conjuntival. La porción palpebral se divide en marginal, tarsal y orbitaria.

Por su parte, la conjuntiva bulbar está dividida en escleral y limbal. Finalmente, los fondos de saco conjuntival se dividen en superior, inferior, lateral y medial. Particularmente, la conjuntiva palpebral reviste los párpados mientras que la conjuntiva bulbar se encuentra sobre la esclerótica anterior. Por último, los fondos de saco conjuntival forman la unión entre las conjuntivas palpebral y bulbar. Ésta cubierta protectora, es suelta y flexible, a diferencia de su contraparte bulbar, lo que permite el movimiento del globo ocular y los párpados.

La conjuntiva tiene células caliciformes intercaladas, estas células son más numerosas en el área del fórnix y se encargan de secretar glicoproteínas conocidas como mucinas (MUC), estas moléculas formaran la porción mucinica de la película lagrimal.

Por su parte, la sustancia propia o submucosa conjuntival, está formada por tejido linfoide y fibroso superficial, donde se encuentran diversas poblaciones celulares de la respuesta inmunológica como: linfocitos, mastocitos, células plasmáticas y neutrófilos, mientras que la capa fibrosa más profunda contiene glándulas de Krause, nervios y vasos sanguíneos que proporcionan inervación y suministro de sangre a la conjuntiva.

Finalmente, en el fórnix hay agregados de linfocitos T y B que forman parte del tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT por sus siglas en ingles) el cual tiene un papel central en el mantenimiento del ambiente supresor de la SO contribuyendo a mantener el privilegio inmunológico ocular (Shumway *et al.*, 2021).

La córnea es un tejido transparente que cubre la parte frontal del ojo. Este tejido bordea la esclerótica en el limbo corneal y es el responsable del 65% al 75% de la refracción de la luz cuando pasa a través del ojo. Está compuesta por cinco capas: el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio fig. 1 (Derek W. *et al.*, 2011). El epitelio contiene células epiteliales y una membrana basal, que en conjunto se encargan de prevenir la entrada de objetos, microorganismos o sustancias extrañas. También participa en la absorción de

nutrientes y oxígeno proveniente de la lágrima que pasan por su superficie. La membrana de Bowman está compuesta por una capa delgada y transparente de colágeno.

El estroma es la capa más gruesa de la córnea. Está compuesto principalmente de agua, fibras de colágeno y glucosaminoglucanos (GAG), que en conjunto contribuyen a mantener la forma esférica de la córnea y favorecen el paso y refracción adecuada de la luz en el ojo.

La membrana de Descemet es una capa delgada que tiene una fuerza relativa debido a las fibras de colágeno que la componen. Finalmente, la capa más interna de la córnea es el endotelio, esta capa juega un papel esencial en el mantenimiento de la transparencia corneal, además se encarga de drenar el exceso de líquido desde el estroma. Se sabe que estas células no parecen regenerarse de manera apreciable y su destrucción puede causar una disfunción duradera. Ver fig 1 (Mittanamalli S Sridhar *et al.*, 2018).

Cabe destacar que gran parte de la homeostasis de la córnea depende del ambiente inmunosupresor, el parpadeo y la estabilidad de la película lagrimal.

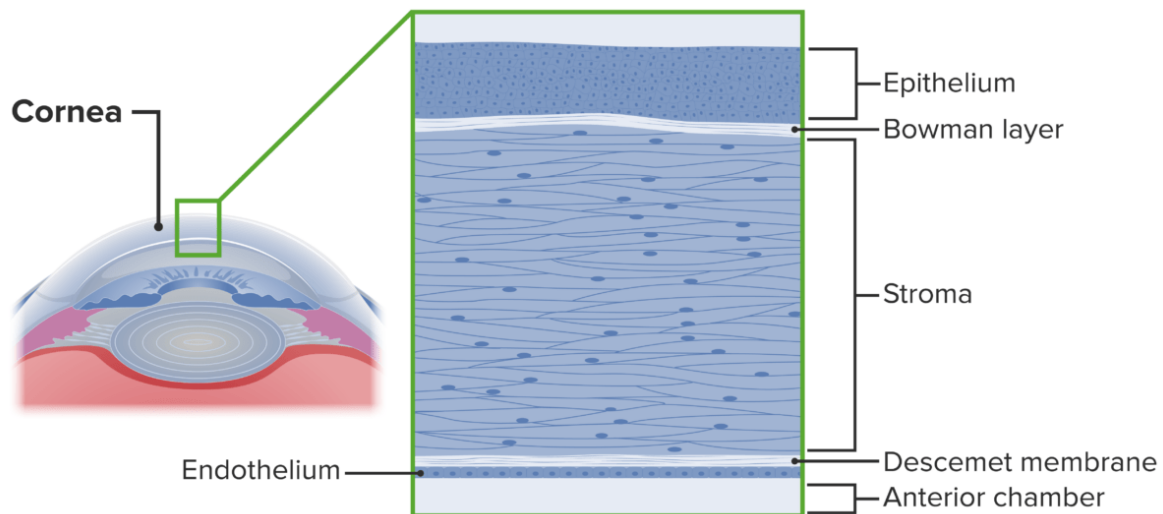


Figura 1. Capas de la córnea (epitelio corneal, membrana de Bowman, estroma y membrana de Descemet. (Tomado de Oiseth *et al.* 2022).

2.3 Película lagrimal

La película lagrimal es considerada una de las primeras líneas de defensa del segmento anterior, debido a la complejidad de su composición. Ya que además de contener agua, electrolitos y mucinas, se ha demostrado la presencia de una amplia variedad de proteínas, lípidos, anticuerpos y péptidos antimicrobianos como: lisozima, lactoferrina y lipocalina. Interessantemente, Zhou y colaboradores reportaron que el fluido lagrimal humano tiene más de 1500 proteínas (Zhou et al., 2012).

Aun cuando la estructura de la película lagrimal sigue siendo estudiada, la evidencia sugiere que está formada por tres capas. La capa más superficial conocida como lipídica está compuesta por secreciones lipídicas provenientes de las glándulas de Meibomio. Esta capa proporciona una barrera importante contra la evaporación de la película lagrimal. La capa intermedia es la porción acuosa, es producida por la glándula lagrimal (GL) y las glándulas lagrimales accesorias del estroma conjuntival. La capa más interna está compuesta de mucinas y, es secretada principalmente por las células caliciformes conjuntivales, aunque también las células epiteliales de la córnea y conjuntiva las sintetizan. De acuerdo con sus características las MUC se clasifican en formadoras de gel, transmembranales y solubles, la diversidad de estas moléculas es lo que permite que puedan funcionar como barrera anti-adhesiva en la SO, además de ejercer un efecto lubricante ver tabla 3. Aunado a las funciones antes mencionadas, las células caliciformes también tienen un papel inmunomodulador importante a través de la producción de citocinas inmunosupresoras como el factor transformante beta (TGF- β) contribuyendo a mantener el privilegio inmunológico ocular. (Shirai *et al.*, 2015).

NOMBRE	TIPO	UBICACIÓN
MUC1	Asociada a membrana	Epitelio conjuntival y corneal y glándula lagrimal
MUC2	Formadora de gel	Epitelio conjuntival y corneal

MUC4	Asociada a membrana	Epitelio conjuntival y corneal y glándula lagrimal
MUC5AC	Formadora de gel	Células caliciformes en conjuntiva
MUC5B	Formadora de gel	Epitelio conjuntival y glándula lagrimal
MUC7	Soluble	Epitelio conjuntival y corneal y glándula lagrimal
MUC16	Asociada a membrana	Epitelio conjuntival y corneal
MUC17	Asociada a membrana	Superficie ocular
MUC21	Asociada a membrana	Superficie ocular
MUC13	Asociada a membrana	Superficie ocular
MUC15	Asociada a membrana	Superficie ocular

Tabla 2: Clasificación y ubicación de las mucinas oculares (Elena Fraga Graells y César Villa Collar., 2019)

Hay evidencia de que diversos factores intrínsecos y extrínsecos pueden desencadenar la pérdida de la homeóstasis de la película lagrimal, promoviendo el desarrollo de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular como Ojo seco (OS). (Craig et al., 2017).

3. Definición y prevalencia de Ojo seco

Ojo seco (OS) es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular caracterizada por incremento de la osmolaridad y pérdida de la homeostasis de la película lagrimal (PL), (Craig *et al.* 2017). En 2010 Kantor y colaboradores reportaron que la prevalencia de OS oscila entre el 5 y el 50% de la población adulta, las mujeres son las más afectadas con un 17.9 % mientras que el 10.5% corresponde a los hombres. Otro estudio, reporto que alrededor de 3.23 millones de mujeres y 1.68 millones de hombres norteamericanos mayores de 50 años sufren de ojo seco. Además, se ha identificado que decenas de millones más tienen síntomas menos severos y manifestaciones episódicas de la enfermedad que se hace notoria con algún factor ambiental como: el descenso en la humedad ambiental o el uso de lentes de contacto (Kantor *et al.*, 2010).

3.1 Clasificación

Considerando la etiopatogenia de ojo seco, ha sido clasificado en dos categorías principales (acuodeficiente y evaporativo) ver fig. 2. El ojo seco acuodeficiente está asociado con la disminución de la secreción de lagrime y puede o no estar relacionado a enfermedades autoinmunes como: Síndrome Sjögren, el cual además puede ser primario o secundario. Por su parte, el ojo seco evaporativo se caracteriza por la evaporación excesiva de la lagrime como consecuencia de la pérdida o disminución en las síntesis de lípidos y ha sido asociado a factores intrínsecos (alteración en la función de las glándulas de meibomio o en la apertura de los párpados) o extrínsecos (uso de lentes de contacto, alergias o deficiencia de vitamina A).

Diversos estudios han demostrado que sin importar el o los factores que desencadenen la enfermedad, los pacientes presentan incremento de la osmolaridad y pérdida de la estabilidad de la película lagrimal, procesos que promueven y perpetúan la inflamación de la superficie ocular (Silva Noceda 2020). Además, en su último reporte el TFOS DEWS II menciona la coexistencia de signos y síntomas de ojo seco tanto acuodeficiente como evaporativo y puede ser la presentación inicial de la enfermedad de ojo seco o producirse conforme avanza el cuadro clínico de la enfermedad inicialmente acuodeficiente o evaporativa (Lyndon Jones *et al.* 2017)

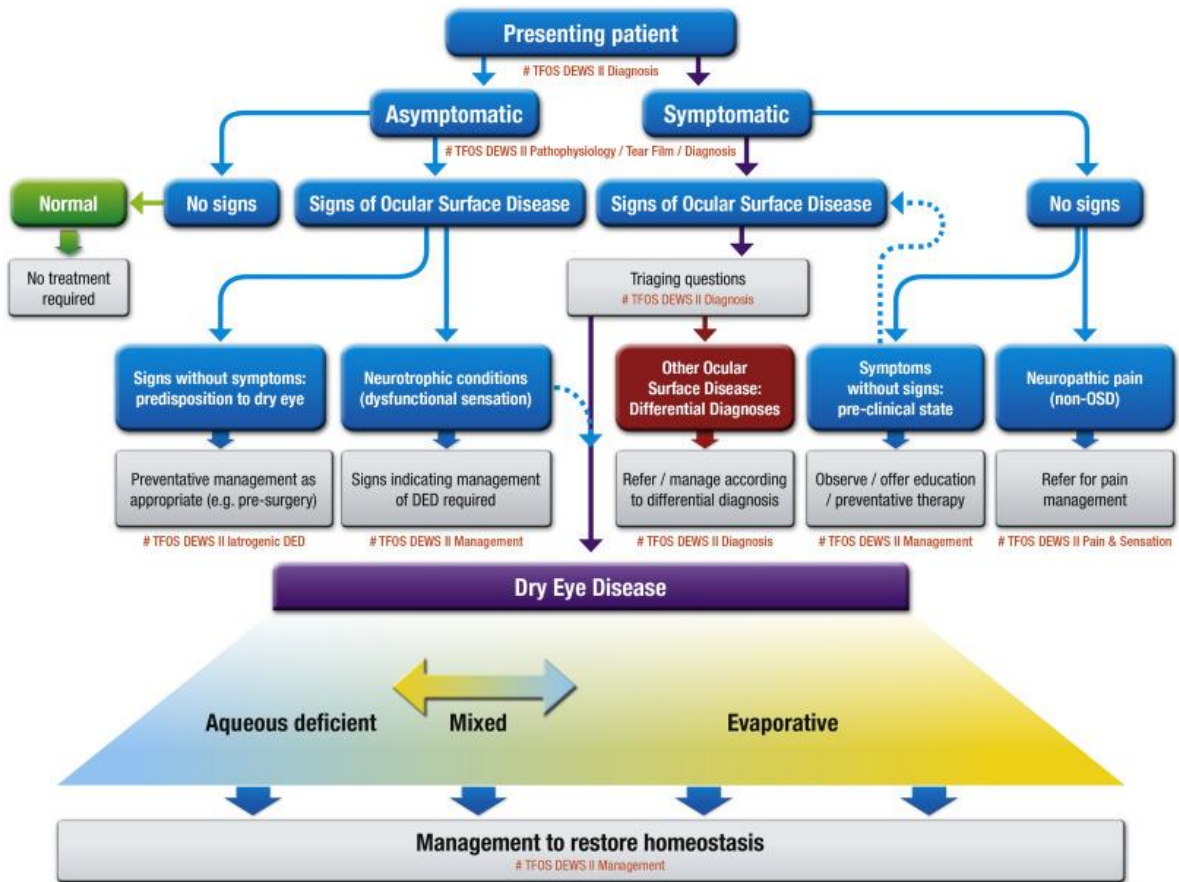


Figura 2: Clasificación de la enfermedad de ojo seco según el informe de DEWS en 2017

3.2 Factores de riesgo

Entre los principales factores personales asociados con el desarrollo o agravamiento de ojo seco, se encuentran: la etnia, edad, género, uso de lentes de contacto, consumo de tabaco, medicación sistémica por largos periodos, patologías oculares o sistémicas inflamatorias o autoinmunes. En este mismo contexto, se ha demostrado que personas con enfermedades autoinmunes como: artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Sjögren y afecciones crónicas, como anomalías de la tiroides, parálisis de Bell, diabetes, rosácea, hepatitis C y alergias oculares o sistémicas tienen mayor riesgo de padecer OS. De hecho, se ha reportado que pacientes con Parkinson desarrollan esta enfermedad debido a la disminución en el número de parpadeos por minuto (Rouen *et al.* 2018). Además, hay evidencia que la cirugía LASIK puede ser un factor predisponente, además de que se ha postulado que las mujeres tienen más

probabilidades de desarrollar ojo seco, particularmente después de la menopausia, ya que se sabe que el cese de la menstruación está asociado con la disminución en la síntesis de estrógenos provocando modificaciones en la secreción de lágrima (M. Labetoulle *et al.* 2019).

Otros factores relacionados con el desarrollo de esta enfermedad está la baja ingesta de ácidos grasos omega-3 y el uso de dispositivos de presión positiva continua en las vías respiratorias.

Además, el uso crónico de antihistamínicos, betabloqueantes, descongestionantes, diuréticos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, ansiolíticos, antidepresivos, antipsicóticos, anticonceptivos orales, agentes antiparkinsonianos también están asociados con una mayor predisposición a desarrollar OS (Rouen et al. 2018).

Existen muchos programas para la evaluación de pacientes con ojo seco, que comprenden el registro de síntomas y un número variable de observaciones y mediciones, que incluyen la secreción de lágrimas, el aclaramiento de lágrimas, el daño de la superficie ocular, la estabilidad de la película lagrimal, el volumen de lágrimas, la evaluación de la capa lipídica, y la osmolaridad lagrimal. Existen muchos cuestionarios de síntomas de la superficie ocular. El índice de enfermedades de la superficie ocular consta de 12 preguntas y es un instrumento validado y muy utilizado para medir la gravedad subjetiva de la enfermedad del ojo seco (RJ Buckley et al., 2018).

3.3 Cuadro clínico

3.3.1 Signos

Al inicio de la enfermedad es común que los pacientes presenten blefaritis, disminución del menisco lagrimal, presencia de restos orgánicos y secreción blanquecina. También, se pueden observar irregularidades en el borde palpebral y enrojecimiento. Además de los signos antes mencionados, se reconoce que uno de los signos característico de ojo seco es la queratitis punteada, la cual se suele observar frecuentemente en el tercio inferior de la córnea y comúnmente va acompañada de

hiperemia conjuntival, epífora, visión borrosa y secreción mucosa blanquecina (Gálvez Tello JF *et al.*, 1998).

3.4.2 Síntomas

Entre los principales síntomas se encuentran: la sensación de cuerpo extraño, sequedad ocular, prurito, escozor y fotofobia. Cabe mencionar que dichos aparezcan o se agraven cuando el paciente se expone a ambientes con calefacción, aire acondicionado, espacios con humo. (Gálvez Tello JF *et al.*, 1998).

4. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de OS está fundamentado en pruebas cualitativas y cuantitativas. Las primeras se basan en la aplicación de cuestionarios como: el OSDI, Mc Monnies, DQ5, etc. Estos cuestionarios permiten conocer el tipo de sintomatología que el paciente presenta. Mientras que las pruebas cuantitativas, permiten determinar el: tiempo de ruptura lagrimal (BUT), volumen lagrimal o el patrón de arborización de mucinas a través de las pruebas de Schirmer y Ferning, respectivamente. Cabe destacar que, dado que la prueba de BUT utiliza tiras de fluoresceína además de cuantificar el tiempo de ruptura lagrimal, también permite evidenciar lesiones o desepitelización en córnea (Macías Torres., 2020).

En los últimos años, diversos grupos de investigación han explorado nuevas terapéuticas con el objetivo de modular el proceso inflamatorio y promover la secreción o prevenir la evaporación de la lagrime a través del uso de: suplementos alimenticios, fármacos secretagogos, luz pulsada, oclusión del punto lagrimal, terapia con células madre o neuromodulación (Calonge, M. *et al.* 2001). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por mejorar el tratamiento de OS, actualmente el uso de lágrimas artificiales constituye una de las principales terapéuticas para el manejo de la sintomatología de OS. es común que el manejo de los pacientes este centrado fundamentalmente, en reducir la sintomatología a través del uso de lágrimas artificiales o el uso prolongado de corticoesteroides. Sin embargo, hay evidencia de que el uso por periodos prolongado de corticoesteroides es un factor de riesgo para desarrollar glaucoma. (De la torre M. *et al.*, 2007).

5. Inflamación y Ojo seco

Se ha reportado la asociación entre el agravamiento de los signos y síntomas de OS y la sobreexpresión de quimiocinas, metaloproteinasas 1, 3, 6 y 9 (MMP 1, 3, 6,9) y mediadores inflamatorios como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), interleucina 1 beta IL-1 β , interleucina 6 (IL-6), interleucina 17 (IL-17) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). El incremento de estas moléculas promueve el reclutamiento de neutrófilos, monocitos, macrófagos (Mo) y células T que inician y agravan la patología (Yoon *et al.* 2007), (Wilson y Perry. 2007), (Lou *et al.* 2004) y (Kalt *et al.* 2010).

Estas observaciones han generado interés por entender el papel de la inflamación en el desarrollo o agravamiento de ojo seco con el propósito de identificar y comprender los mecanismos subyacentes a esta enfermedad a fin de que en un futuro se puedan desarrollar agentes terapéuticos eficaces (Nayaraman *et al.* 2006). En este contexto, el uso de modelos murinos para estudiar esta patología han demostrado ser una herramienta útil para establecer la participación de diversas citocinas pro-inflamatorias como IL- β , IL-6, TNF- α y MIF en el fluido lagrimal y conjuntiva, así como la infiltración de células de la respuesta innata y adaptativa (e.g. neutrófilos, macrófagos, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (De Paiva *et al.* 2007), (Pflugfelder *et al.* 1999) y (Stern *et al.* 1999).

Las células del sistema inmune innato, específicamente los macrófagos, son determinantes durante las diferentes etapas de la respuesta inmune. En la fase temprana, estas células pueden detectar señales de peligro tanto externas (derivadas de patógenos, PAMPs, como lipopolisacáridos (LPS), así como internas (liberadas durante procesos de muerte celular, DAMPs, como (ATP), de esta manera son activadas y pueden eliminar tanto patógenos como células muertas (Zhuo *et al.* 2012).

Los macrófagos son células de la respuesta inmune altamente versátiles, se caracterizan por su plasticidad y diversidad funcional. Dos estados de activación son ampliamente aceptados: macrófagos clásicamente activados (M1), los cuales se caracterizan por producir citocinas pro-inflamatorias. Mientras que Mo alternativamente activados (M2) producen citocinas antiinflamatorias. Además de su

función efectora, los Mo activan y polarizan a las células T, dependiendo del estado de activación (M1 versus M2) estas células amplifican la respuesta inmune adaptativa polarizando a los linfocitos hacia un perfil Th1 o Th2 (Zhuo *et al.* 2012).

En particular se ha demostrado que los linfocitos T tipo Th1 y Th17 promueven metaplasia, apoptosis de células de la conjuntiva y pérdida de células caliciformes mediado por la producción de IFN- γ , IL-17A, TNF- α IL-1 β y la producción de (MMP3 y 9) resultando en la alteración del epitelio corneal. (De Pavia *et al.* 1999), (De Pavia *et al.* 2009) y (Zhang *et al.* 2011).

5.1 Papel del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) en inflamación

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina inflamatoria y un potente modulador de la respuesta inmune innata, capaz de inducir la producción de otros mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IFN- γ MMP 6 y 9, ciclooxigenasa 2 y prostaglandina E2, además incrementa la expresión del receptor tipo toll 4 (TLR-4) y la actividad de p53, (Calandra y Roger. 2003). Es producido por una amplia variedad de células del sistema inmune (e. g neutrófilos, monocitos, macrófagos y células T) en respuesta a varios estímulos como endotoxina y rayos ultravioleta. Diversos estudios en enfermedades inflamatorias y autoinmunes han demostrado que la inhibición de MIF reduce significativamente el proceso inflamatorio y atenúa el desarrollo de diversas patologías (Denkinger *et al.* 2003), (Onodera *et al.* 2000) y (Jong *et al.* 2001).

Estudios pioneros, reportaron la expresión de MIF en células del epitelio pigmentado de la retina, cuerpo ciliar, iris y córnea de roedores. Aun cuando no se dilucidó la función de esta molécula, los autores sugirieron un papel patogénico en enfermedades inflamatorias oculares (Matsuda *et al.* 1997) y (Matsuda *et al.* 1996).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo contribuye a la progresión de enfermedades inflamatorias de retina como: la degeneración macular y la vitrorretinopatía proliferativa (VRP) como resultado de la pérdida de soporte y nutrición mediado por

las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) (Nowak *et al.* 2003), (Cicik *et al.* 2003) y (Cai *et al.* 2000).

Recientemente Ko JA y colaboradores demostraron que el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) induce un incremento en la expresión de RNAm y la proteína de MIF en lisados o sobrenadante de células del epitelio pigmentado de la retina de humano (ARPE19). Además, observaron que la inhibición de MIF reduce la expresión de proteínas asociadas con el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT). Los resultados obtenidos por este grupo les permitieron concluir que MIF tiene un papel importante en la patogénesis de la VRP (Ko J. *et al.* 2017).

Otro estudio reportó un incremento en la expresión de MIF en glándulas lagrimales y lágrimas en respuesta al tratamiento con Toxina Botulínica B (BTX) (Park *et al.* 2007). Por su parte Lee HS y colaboradores, por inmunohistoquímica y citometría de flujo demostraron un mayor infiltrado de CD CD11c⁺ CD207⁺ y Mo en córnea de ratones a los 7 y 14 días post-inducción de ojo seco con escopolamina. Interesantemente, por PCR confirmaron que los Mo presentaban un fenotipo M1, caracterizado por incremento en la expresión de TNF- α e iNOs Lee *et al.* (2017). Considerando los antecedentes antes mencionados nuestro proyecto se centra en analizar si MIF favorece el desarrollo de ojo seco a través de la producción de citocinas inflamatorias. Para confirmar dicho planteamiento se utilizaron ratones silvestres (WT⁺) y deficientes para la molécula MIF (Mif^{-/-}).

6. Hipótesis

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) favorece la producción de mediadores inflamatorios a nivel sistémico que contribuyen al desarrollo y agravamiento de los signos de ojo seco experimental.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Evaluar si MIF promueve la liberación de mediadores inflamatorios a nivel sistémico en etapas tempranas de ojo seco experimental en ratones silvestres y deficientes para la molécula MIF.

7.2 Objetivo Particulares

- Inducir un modelo agudo de ojo seco a ratones silvestres (WT) y deficientes ($Mif^{-/-}$).
- Evaluar y comparar la estabilidad y calidad de la película lagrimal en ratones experimentales.
- Cuantificar el nivel de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en suero y cultivo de esplenocitos de ratones WT y $Mif^{-/-}$.
- Determinar el porcentaje de macrófagos en bazo de ratones experimentales.
- Realizar un análisis histopatológico en córnea de ratones experimentales.

8. Materiales y Métodos

8.1 Obtención del DNA genómico

De manera rutinaria en el laboratorio realizamos el genotipo de los ratones experimentales a fin de confirmar que cumplan con la característica de silvestre (WT) o deficientes para MIF ($Mif^{-/-}$). Se obtuvieron 0.5 cm del ápice de la cola de cada uno de los ratones, el tejido se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml a los cuales se les adiciono 500 μ l de buffer de lisis y 20 μ l de proteinasa K (marca Thermo) para llevar a cabo la digestión del tejido, los tubos fueron incubados toda la noche a 55 ° C. Las muestras se centrifugaron a 13,000rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos con 500 μ l de isopropanol frío, se homogenizo suavemente hasta observar el precipitado de DNA. Se centrifugo a 10,000 rpm por 10 minutos para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en etanol frio al 75% en el mismo tubo, las muestras se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 10 minutos, se decantaron y se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 50 μ l de agua inyectable estéril.

8.2 Amplificación del gen

Gene	Secuencias de oligonucleótidos	Pares de bases	tm	Peso molecular
MIF F	AGACCACGTGCTTAGCTGAG	20	59° C	200
MIF R	GCATCGCTACCGGTGGATAA	20		
NEO F	ATTGAACAAGATGGATTGCAC	21	59° C	500
NEO R	CGTCCA GAT CAT CCT GAT C	19		

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos de los primers para PCR.

Una vez obtenido el DNA genómico de los ratones WT y $Mif^{-/-}$ se utilizó para la amplificación del gen *mif* o *neo*. se utilizó Taq DNA Polymerase Master Mix RED (marca Ampliqon), además de los primer para MIF y NEO, con la finalidad saber si los ratones eran homocigotos, heterocigotos o knockout para MIF.

REACTIVO	Volumen
Master Mix	12.5 μ l
MIF F	1.0 μ l
MIF R	1.0 μ l
NEO F	1.0 μ l
NEO R	1.0 μ l
Muestra	1.0 μ l
H ₂ O	7.5 μ l
Volumen Final	25 μ l

Tabla 4. Reactivos utilizados para la técnica de PCR por muestra de ratón.

8.3 Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador de TBE 1x se agregaron 3 μ l de bromuro de etidio. Se tomaron 10 μ l de cada muestra de la reacción final de la PCR para añadirlo en el pozo del gel además de 2 μ l se usó el marcador de peso molecular (Plus de 100 bp GeneRuler) y como control positivo se utilizó el volumen total de reactivos para PCR sin muestra usado en ratones WT y como control negativo el volumen total de reactivos para PCR sin muestra usado en ratones Mif^{-/-}. Las muestras se corrieron a 100 voltios durante 30 minutos. Se capturó una imagen en un fotodocumentador (GelDoc EZ imager marca Bio Rad). En la figura 3 se muestra un gel de agarosa con la amplificación del gen de Mif para los ratones WT y la amplificación de Neo para los ratones Mif^{-/-}.

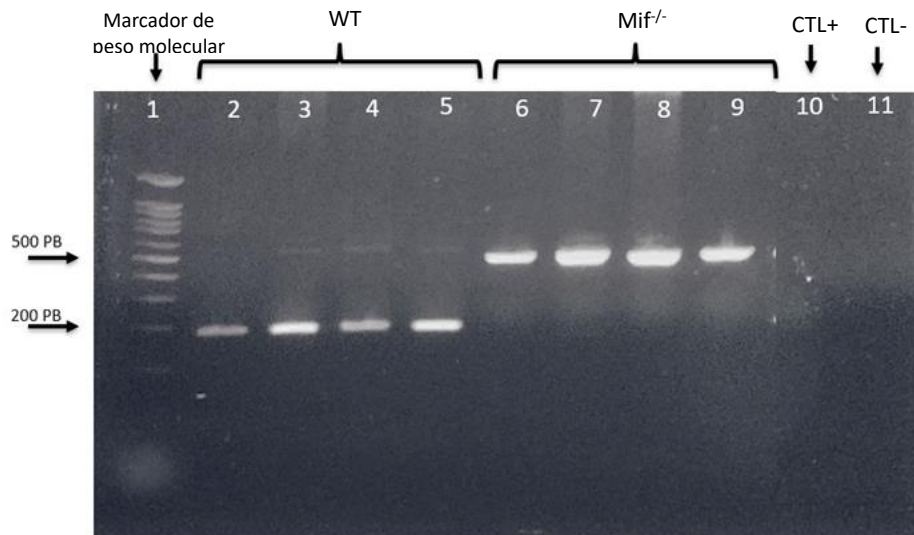


Figura 3. Genotipo de ratones silvestres (WT) y deficientes para MIF (Mif^{-/-}). Electroforesis en gel de agarosa donde se muestran los productos amplificados por PCR para el gen de Mif y Neomicina (Neo). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, los carriles 2 a 5 corresponden al amplificado de *Mif* con un peso de (200pb), en los carriles 6 a 9 se muestra el amplificado NEO con un peso de (500pb). Los carriles 10 y 11 corresponden a los controles positivo y negativo respectivamente.

8.4 Inducción del modelo murino de ojo seco (OS)

Ratones Balb/c machos entre 6-9 semanas de edad, silvestres (WT) y deficientes para MIF (Mif^{-/-}) fueron divididos en 2 grupos; grupo 1 (control) y grupo 2 (ojo seco). La inducción de ojo seco (OS) se realizó mediante la administración de 0.5mg de escopolamina (Sigma-Aldrich) vía subcutánea 3 veces al día por 10 días. Todos los ratones mantuvieron se bajó condiciones constantes de temperatura (21 a 24°C) y humedad, y en apego a la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

8.5 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer

El volumen lagrimal se cuantificó determinó a los 0, 5 y 10 días post-inducción de OS. Para realizar esta prueba se colocaron tiras de Schirmer (Schirmer strips marca SURGI EDGE) sobre el párpado inferior (conjuntiva temporal) durante 5 min. Posteriormente, se retiraron las tiras y se midió el volumen lagrimal con un vernier digital (Absolute AOS marca Mitutoyo).

8.6 Análisis del patrón de arborización de mucinas conjuntivas por la técnica de ferning

Previo a la determinación del patrón de arborización de mucinas los ratones control y experimentales fueron anestesiados con 40 mg/kg de peso con Xilacina (PROCIN-PISA). Posteriormente, con una micropipeta se colectaron 2 μ l de lágrima y se colocaron en un portaobjetos, la muestra se dejó secar por 5 min. Transcurrido este tiempo, con ayuda de un microscopio óptico (MOTIC) las muestras se observaron a 10 y 40X, con el propósito de identificar el tipo patrón de arborización de mucina a través de la escala de Rolando; donde el tipo I, es una arborización completa, sin espacios; en la tipo II, los espacios entre las arborizaciones son visibles; la tipo III, presenta ramificaciones más cortas y los espacios son más grandes, finalmente, la tipo IV, es totalmente carente de arborizaciones (Masmali et al.,2014).

8.7 Análisis histopatológico de córnea

A los 10 días post-escopolamina, se llevó a cabo la eutanasia de los ratones experimentales con el objetivo de realizar la enucleación y fijación del ojo izquierdo en 10 ml de fijador de zinc por 48 h (Apéndice 1). Previo al proceso de inclusión, los tejidos se deshidrataron utilizando un tren de alcoholes con concentraciones ascendentes (70, 80, 90 y 100%), en los primeros tres alcoholes, las muestras permanecieron 48 h y dos horas en alcohol al 100% y butanol, respectivamente. Posteriormente, los tejidos fueron embebidos en parafina I y II por 48 h a 57° en una estufa (marca Ecocell). La inclusión de los tejidos se realizó utilizando una incluidora (CI2013 marca Ludetech). Una vez obtenidos los bloques con ayuda de un microtomo (RM2125 marca LEICA) se realizaron cortes histológicos con un grosor de 5 micrómetros y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-Lysine (P8920- marca Sigma-Aldrich). Posteriormente, las laminillas se desparafinaron en la estufa por 24 h a 57° C. Para la observación de cambios morfológicos y/o la presencia de infiltrado inflamatorio, las muestras fueron teñidas utilizando el tren de tinción hematoxilina-eosina (H&E) (Apéndice 2). Finalmente, para documentar la presencia de cambios morfológicos, las muestras fueron observadas a 10 y 40x utilizando un microscopio óptico (marca Motic).

8.8 Cultivo de células de Bazo

En condiciones de esterilidad se obtuvo y colocó el bazo de animales experimentales en cajas Petri previamente etiquetadas. La obtención de los esplenocitos se realizó por el método de perfusión utilizando 5 ml de medio RPMI suplementado (D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10% SFB y estreptomycin- Gibco). El sobrenadante se colectó en tubos Falcon estériles de 15ml (Nalgen, Nunc Int) y se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 3 ml de solución hemolizante y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, se agregaron 3 ml de solución salina para detener la reacción. Nuevamente, los tubos se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 5 ml de medio RPMI suplementado. Con una cámara Neubauer y azul tripano (Sigma Chemicals co) se determinó la viabilidad celular, se realizó el conteo y ajuste de las células a 5×10^6 /ml y se agregaron 100 μ l/pozo de la suspensión celular en una placa de 96 pozos fondo plano (B.D Falcon) quedando una concentración final de 5×10^5 células. Posteriormente, las células se estimularon con 2.5 μ g de concanavalina A (CoA) y se incubaron en una incubadora (marca Ecoshell) a 37° C con 5% de CO₂ durante 48 h. Concluido el periodo de incubación, el sobrenadante fue colectado y almacenado a -70° C hasta su uso posterior.

8.9 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos por ELISA sándwich

La cuantificación de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias se realizó en sobrenadante de cultivo células de bazo (esplenocitos) a los 10 días post-inducción de OS.

8.9.1 Sensibilización de la placa

Se diluyó el anticuerpo de captura en 10ml de buffer de pegado, se homogenizó y se colocaron 100 μ l por pozo utilizando una micropipeta multicanal (Gilson) en la placa de ELISA por 96 pozos. Para que se llevara a cabo la reacción de pegado del

anticuerpo a la placa, ésta última fue cubierta con papel aluminio y se puso a incubar a una temperatura de 4°C por una noche.

8.9.2 Muestras y curva

Al día siguiente la placa fue retirada del refrigerador y se lavó 3 veces con solución de lavado, después se secó de manera manual agitando la placa, después se bloqueó el pegado inespecífico con 300µl de solución de bloqueo y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Posterior a esto, las placas se lavaron tres veces y fueron secadas nuevamente. Una vez que la placa se encontró seca, se colocaron las muestras en sus respectivos pozos, para poder extrapolar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la correspondiente citocina recombinante con las diluciones al doble para cada una de las placas, se utilizaron las 2 primeras filas de la placa. Las curvas se iniciaron con una concentración de 6000pg, y finalmente se volvió a incubar las placas a 4°C por una noche.

8.9.3 Revelado

Las placas se llevaron a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces con solución de lavado y posteriormente se secaron de manera manual agitando las placas. En canaletas se prepararon soluciones de 10ml de PBS-SBA y se añadió una alícuota de citocina de detección y se mezclaron bien. En cada poso de cada placa se añadieron 100µl de su respectiva solución. Posteriormente se dejaron incubar durante 2 horas en un lugar libre de luz. Luego de incubar, las placas se lavaron 5 veces y después se secaron de forma manual, se preparó una nueva solución en cada canaleta, la cual consistió en 10ml de PBS-SBA y 5µl de HRP, en cada placa se colocaron 100µl por pozo, posteriormente se dejaron incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se lavaron las placas 6 veces con solución de lavado y se secaron. En las canaletas se preparó una solución con 100µl de peróxido de hidrógeno al 3% con un alícuota de ABTS y se homogenizó cuidadosamente. Por último, se agregaron 100µl de la solución a cada pozo y se leyeron inmediatamente en un lector de placas de Elisa (marca PKL Pokler ITALIA).

9. Análisis de la expresión de MHC-II en macrófagos por citometría de flujo

La expresión de MHC-II se realizó en células de bazo de ratones control y experimentales a los 10 días post-escopolamina. Para realizar la citometría, se utilizaron 1×10^6 células de bazo. Las muestras fueron transferidas a tubos eppendorf y se les añadieron 500 μ l de buffer de FACS. Para identificar la población de macrófagos y la expresión de MHC-II, se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para ratón F4/80-APC y MHC-II-APC-Cy7, a una concentración 0.2 μ g por 1×10^6 y como control de viabilidad se usó 7AAD (marca BioLegend; San Diego, CA, USA.). Las muestras se incubaron en oscuridad a 4 °C por 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron y centrifugaron dos veces a 2500 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 300 μ l de buffer de FACS y 200 μ l paraformaldehído al 4% para su posterior análisis en el citómetro de flujo (Attune life technologies).

10. Análisis estadístico

La comparación entre los grupos WT y *Mif*^{-/-} se hizo mediante una prueba de T de Student's no pareada con un valor de P <0.05 considerado como significativo. Los datos fueron procesados en el software GraphPad Prism 7.

11. Resultados

11.1 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer

Con el propósito de determinar si MIF promueve la pérdida temprana de la estabilidad de la película lagrimal, se cuantificó la producción de lagrime mediante la técnica de Schirmer en ratones WT y *Mif*^{-/-} a los 0, 5 y 10 días post inducción de OS. La figura 4A y 4B muestran el volumen lagrimal producido por el ojo derecho (OD) e izquierdo (OI), respectivamente. Como se puede observar, al día cero los ratones WT tuvieron mayor producción de lagrime (1.7mm OD y 1.65 mm OI) en comparación al grupo *Mif*^{-/-} (1.39 mm OD y 1.56 mm OI). Sin embargo, tras la inducción de OS, solo los ratones WT mostraron una disminución del volumen lagrimal en ambos ojos, encontrando que al día 5, la producción de lagrime en OD se reduce un 17.7% y 8.5% en OI, mientras que al día 10, el OI tuvo una reducción del 26.7% y el OD del 11.8%. Interesantemente, tras la inducción de OS, los ratones *Mif*^{-/-} solo mostraron disminución del volumen lagrimal en OI equivalente al 9 y 7.7 % al día 5 y 10 post-escopolamina. En conjunto, estos resultados muestran que la disminución del volumen lagrimal se da de manera independiente en ambos ojos; y que la deficiencia genética de MIF resulta en una menor pérdida del volumen lagrimal.

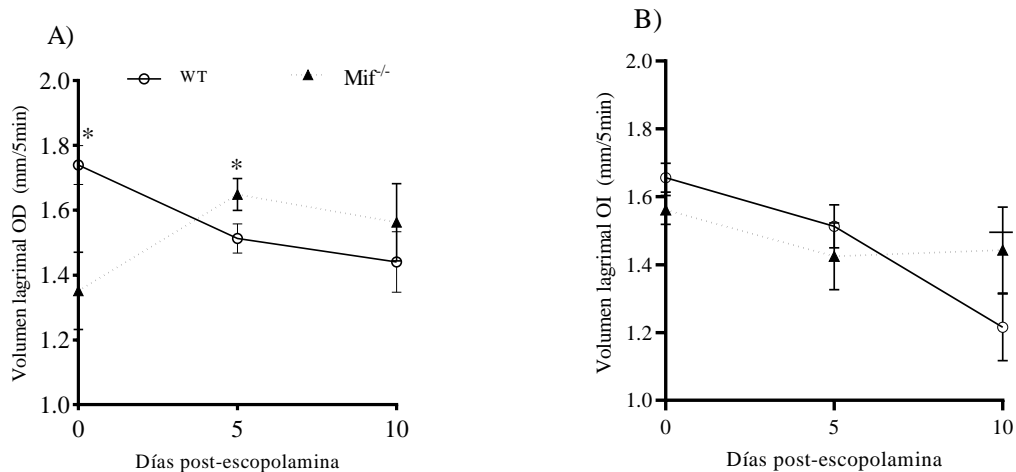


Figura 4. Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer en ratones WT y *Mif*^{-/-} a los 0, 5 y 10 días post-inducción de ojo seco (OS). (A) volumen lagrimal producido en ojo derecho, (B) volumen lagrimal producido en ojo izquierdo. Resultados de 1 experimento (n=10 ratones) con *p<0.05.

11.2 Análisis del patrón de arborización de mucinas por la técnica de ferning

Se sabe que la pérdida de la estabilidad de la superficie ocular está íntimamente relacionada con un microambiente ocular inflamatorio, el cual trae como resultado la alteración en la composición de la película lagrimal, por tal motivo y con el propósito de evaluar si la citocina inflamatoria MIF promueve la pérdida del patrón de arborización de mucinas, se tomaron 2µl de lagrime a los 0, 5 y 10 días post-inducción de OS. Para la identificación del tipo de patrón de arborización, las muestras se colocaron en un portaobjetos, se dejaron secar y se observaron con un microscopio óptico a 10 y 40x. Posteriormente, la categorización se hizo con base en la escala de Rolando; donde el tipo I, es una arborización completa, sin espacios; en la tipo II, los espacios entre las arborizaciones son visibles; la tipo III, presenta ramificaciones más cortas y los espacios son más grandes, finalmente, la tipo IV, es totalmente carente de arborizaciones (Masmali *et al.*,2014).

En la figura 5A y 5B mostramos el tipo de patrón de arborización de mucinas observado en OD y OI, respectivamente, como se puede observar previo a la inducción de OS (día cero) ambos grupos de ratones tenían un patrón de arborización de mucinas tipo I considerado normal. En la figura 5A podemos observar que a los 5 días post-inducción de OS, el 66.6% de los ratones WT y Mif^{-/-} presentaron un patrón tipo III, pero solo el 14.28% de los ratones Mif^{-/-} tuvieron un patrón tipo II. De manera interesante, a los 10 días, observamos que el 66.6% de los ratones WT perdieron por completo el patrón de arborización, es decir presentaron un grado IV, mientras que ese mismo porcentaje de ratones Mif^{-/-} mantuvieron un grado III. En este mismo contexto, la figura 5B muestra que a diferencia de lo observado en OD, al día 5, el 71.4% de los ratones Mif^{-/-} tuvieron un patrón tipo IV, mientras que solo el 33.3% de los ratones WT entraron en esa categoría. Sin embargo, de igual manera encontramos que a los 10 días post-inducción de OS, un mayor número de ratones WT (66.6%) tuvieron ausencia del patrón de arborización de mucinas en comparación con los Mif^{-/-} (33.3%). Adicionalmente, las figuras 6 y 7 muestran imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas observado en ambos grupos de ratones. Estos resultados nos muestran que la pérdida del patrón de arborización de mucinas ocurre de manera independiente en cada ojo y que la ausencia de MIF protege de la pérdida

completa del patrón de arborización de mucinas en más del 50% de los animales experimentales.

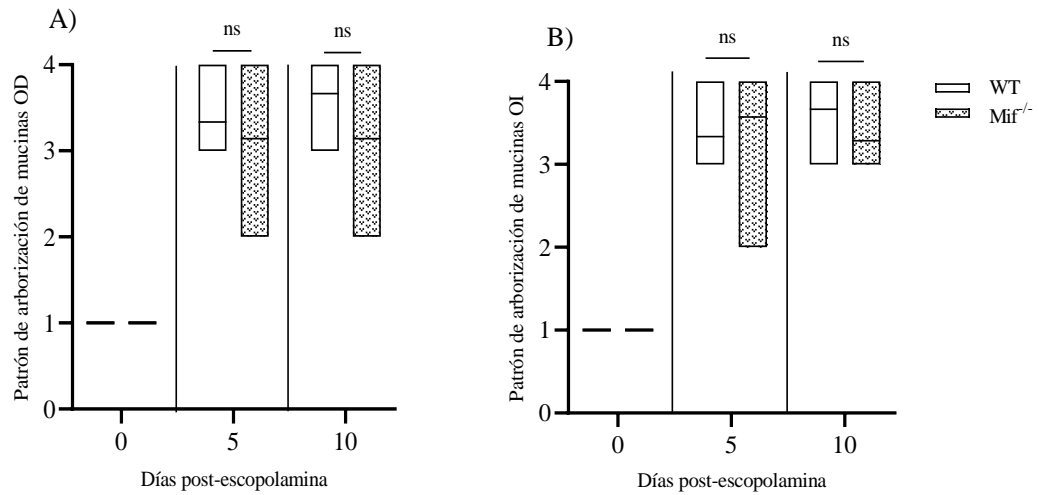


Figura 5. Patrón de arborización de mucinas por la técnica Ferning ojo derecho (A), ojo izquierdo (B) de ratones WT y *Mif*^{-/-} a los 0, 5 y 10 días post-inducción de OS Resultados de 1 experimento (n=10 ratones) con *p<0.05

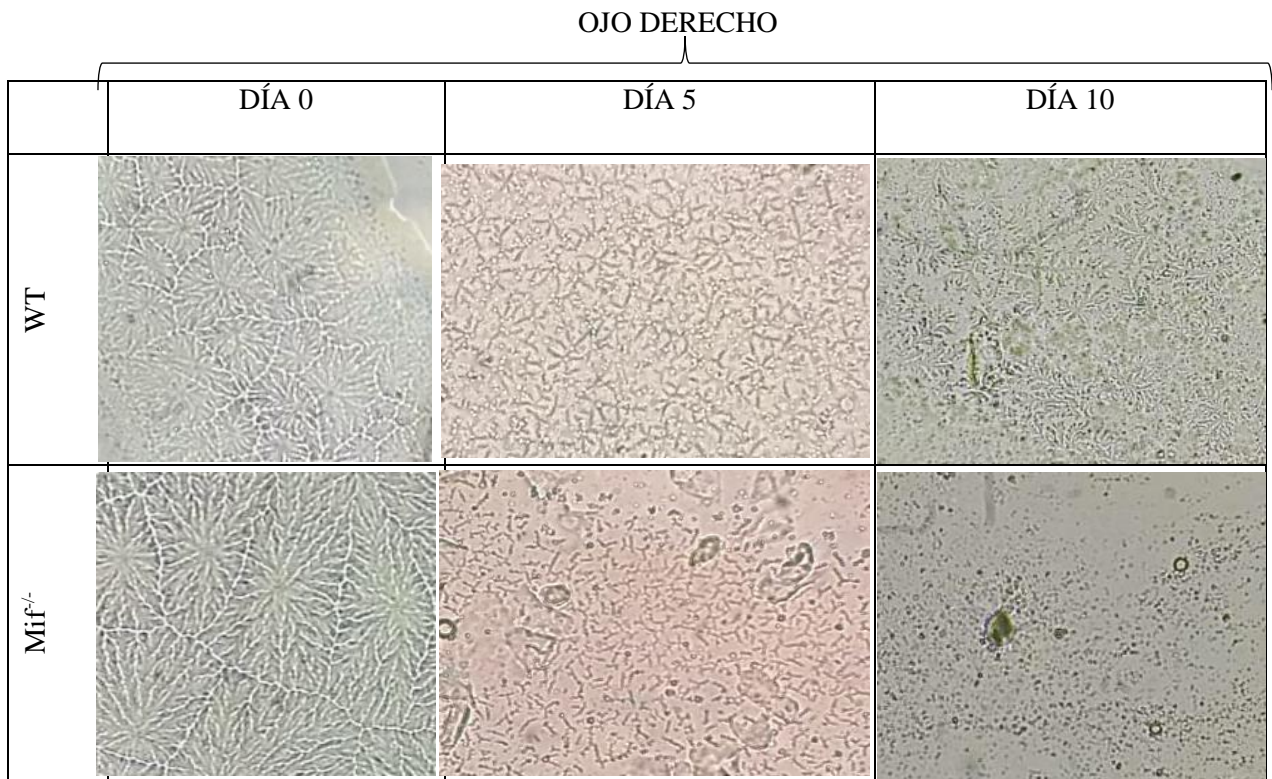


Figura 6. Imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas del OD de ratones WT y Mif^{-/-} a los 0, 5 y 10 días post- inducción de OS. Magnificación de 40x . Resultados de 1 experimento (n=10 ratones).

OJO IZQUIERDO

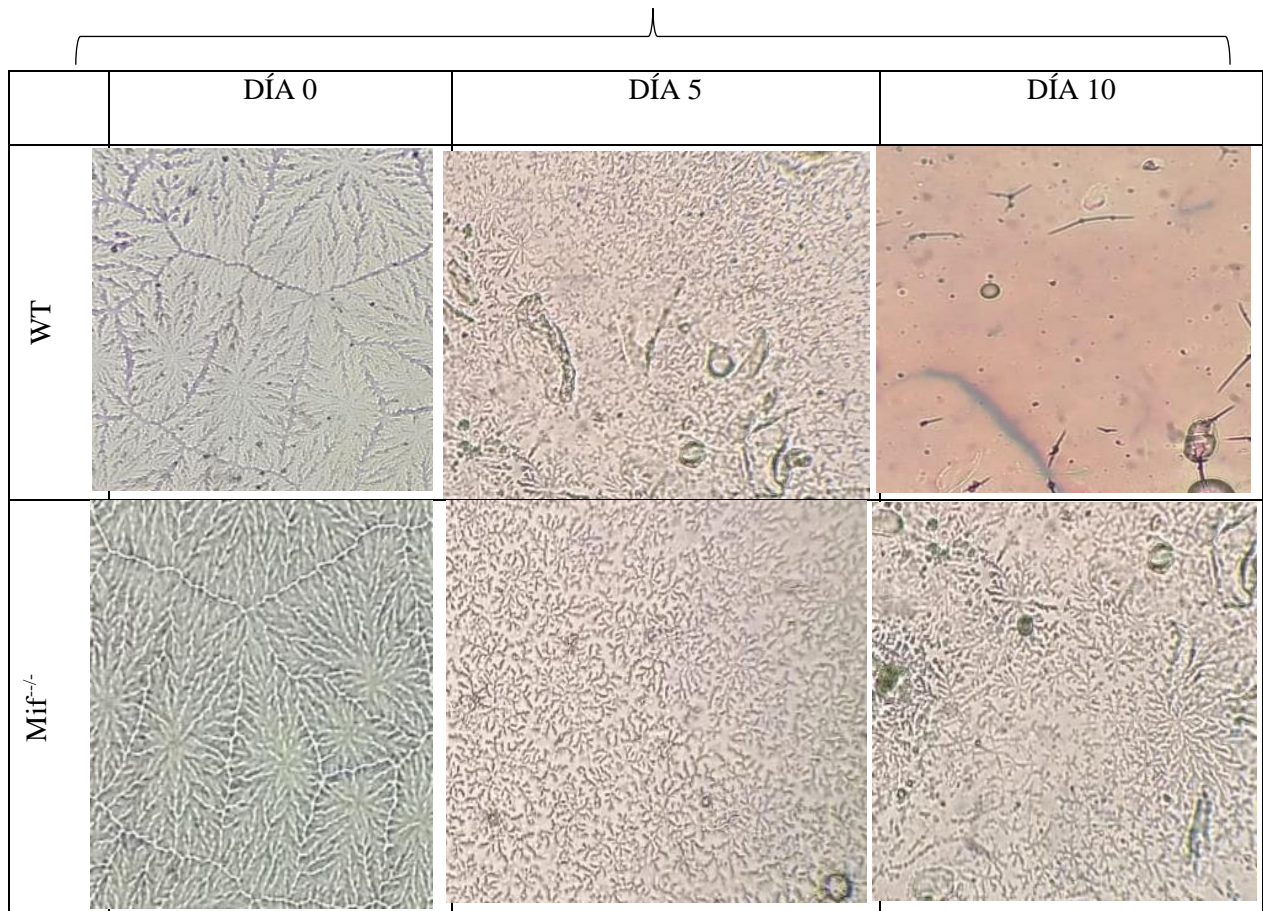


Figura 7. Imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas del OI de ratones WT y Mif^{-/-} a los 0, 5 y 10 días post- inducción de OS. Magnificación de 40x. Resultados de 1 experimento (n=10 ratones).

11.3 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de bazo de ratones con ojo seco

Con el objetivo de determinar si MIF promueve la liberación de mediadores inflamatorios en órganos linfoides secundarios en ratones con ojo seco experimental. Se cuantificó la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-13 en sobrenadante de cultivo de células de bazo de ratones WT y Mif^{-/-} a los diez días de haber suspendido la inducción de OS. En la figura 8A podemos observar que los niveles de TNF- α son muy bajos en ambos grupos, por otro lado, en la figura 8B, mostramos que los ratones WT tienen mayor producción de IL-1 β en comparación con los ratones Mif^{-/-}. Cabe destacar, que aun cuando no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-4 e IL-13, los ratones WT tuvieron mayor producción de ambas citocinas, figura 8C y 8D, respectivamente. En conjunto estas evidencias, nos muestran que durante la fase aguda de OS hay un microambiente de citocinas mixto en órganos linfoides secundarios como el bazo, por lo que es conveniente medir estos mismos mediadores durante la fase crónica de la enfermedad.

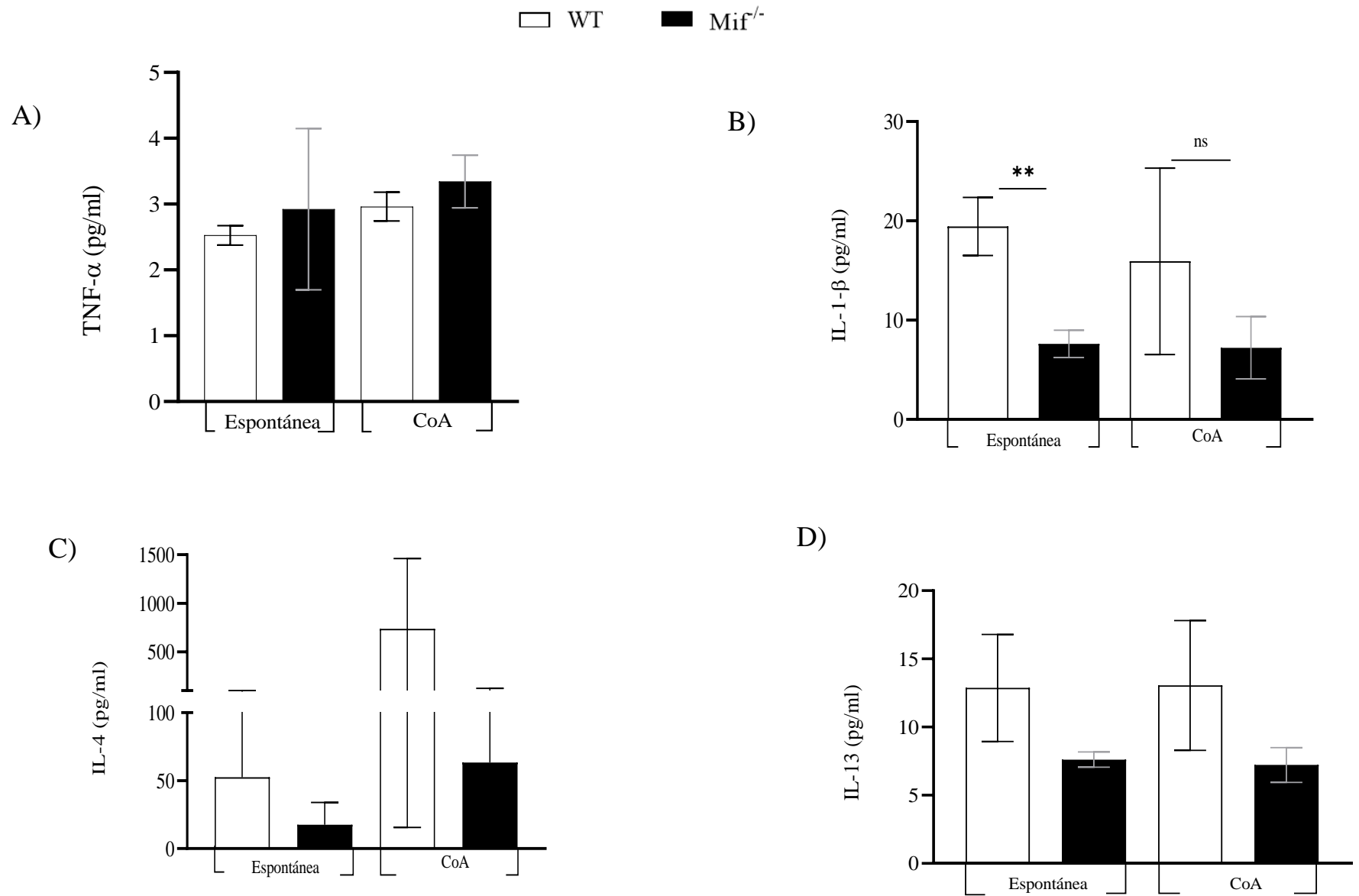


Figura 8. Producción de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias cultivo de bazo de ratones WT y *Mif*^{-/-} basal y estimuladas con un mitógeno (CoA), a los días 0, 5 Y 10 post-inducción de OS. (A) TNF- α , B) IL-1 β , C) IL-4, D) IL-13. Resultados de 1 experimento (n=10 ratones) con *p<0.05.

11.4 Caracterización de poblaciones celulares

MIF es una citocina capaz de promover la activación de poblaciones de la respuesta inmune innata como los macrófagos, los cuales desempeñan funciones centrales a través de la síntesis de citocinas y la presentación de antígeno, por tal motivo uno de los objetivos de este trabajo fue analizar por citometría de flujo la expresión de MHC-II en macrófagos de ganglio cervical y bazo de ratones WT y *Mif*^{-/-} con OS. En la figura 9 se muestra la estrategia experimental que se siguió para obtener la región de células viables y que por tamaño y granularidad correspondieran a macrófagos. Una vez seleccionada la región se analizó el porcentaje de células F480⁺MHC-II⁺ en bazo y ganglio cervical (figura 10 A y C). En la figura 10 B, podemos ver que a los 10 días post-inducción de OS hay un incremento en el porcentaje de macrófagos en ambos grupos de ratones, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células MHC-II⁺. Interesantemente, el análisis de esta misma población en ganglio cervical evidencio un incremento del 10% de células MHC-II⁺ en ratones WT, mientras que en los *Mif*^{-/-} hubo una reducción del 13.03% (figura 10 D). Aun cuando estos resultados nos muestran diferencia en el porcentaje de células F480⁺MHC-II⁺ entre ratones WT y *Mif*^{-/-}, es necesario realizar un análisis minucioso con el objetivo de determinar si en ausencia de MIF hay una menor proliferación y/o activación de macrófagos o bien, si estas células están migrando hacia la superficie ocular y están contribuyendo a regular el microambiente ocular.

Estrategia experimental

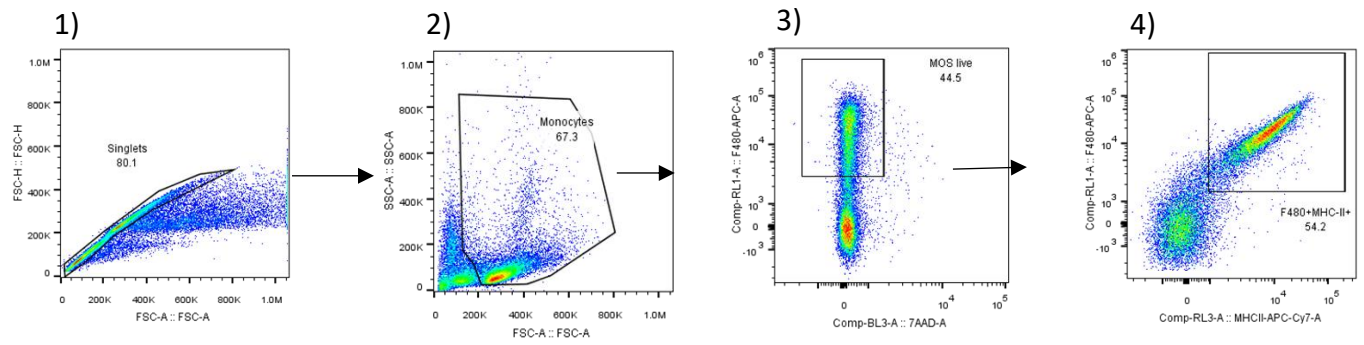


Figura 9. Estrategia experimental de citometría. 1) singlets, 2) células inmunes determinadas por tamaño y granularidad 3) Identificación de macrófagos vivos mediante F480-APC-A+ Y 7AAD-A-). 4) Identificación de macrófagos activados F480⁺MHC-II⁺.

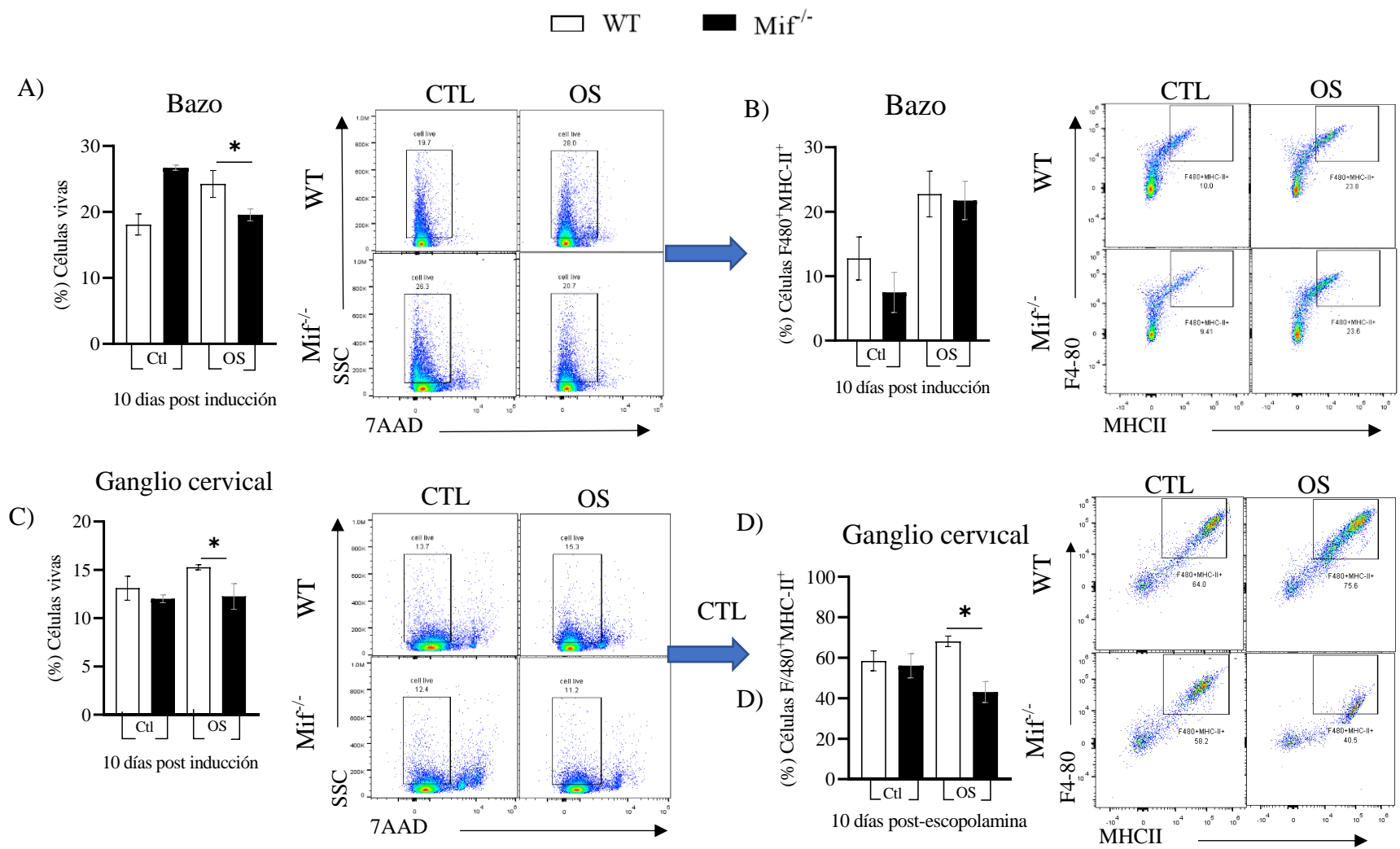


Figura 10. Poblaciones de macrófagos en bazo y ganglio cervical de ratones WT y *Mif*^{-/-} con OS. A) Células vivas de bazo. B) Células vivas de ganglio. C) Células F480⁺MHC-II⁺ en bazo. D) Células F480⁺MHC-II⁺ en ganglio.

11.5 Análisis histológico de la córnea de ratones con ojo seco

Con la finalidad de analizar si MIF promueve cambios morfológicos y la presencia de infiltrado inflamatorio en córnea de ratones con OS, se realizó un análisis histológico de la córnea ratones WT y Mif^{-/-} a los 10 días de haber iniciado el modelo. En la figura 11, se muestran imágenes representativas de cortes histológicos de ratones WT y Mif^{-/-} control y experimentales, donde podemos observar que, tras la inducción de OS, los ratones WT presentaron edema endotelial, desarreglo de las fibras de colágena y mayor pérdida de queratinocitos, en comparación con los ratones deficientes para MIF. La figura 10 A y B, muestran el grosor del epitelio y estroma, como se puede observar no hubo diferencias estadísticamente significativas en el grosor del epitelio entre los grupos experimentales. Sin embargo, en el estroma corneal encontramos un aumento de 47 y 22.9 micrómetros en los ratones WT y Mif^{-/-}, respectivamente. Estas evidencias dejan ver que la deficiencia genética de MIF atenúa el daño tisular en córnea característico de OS.

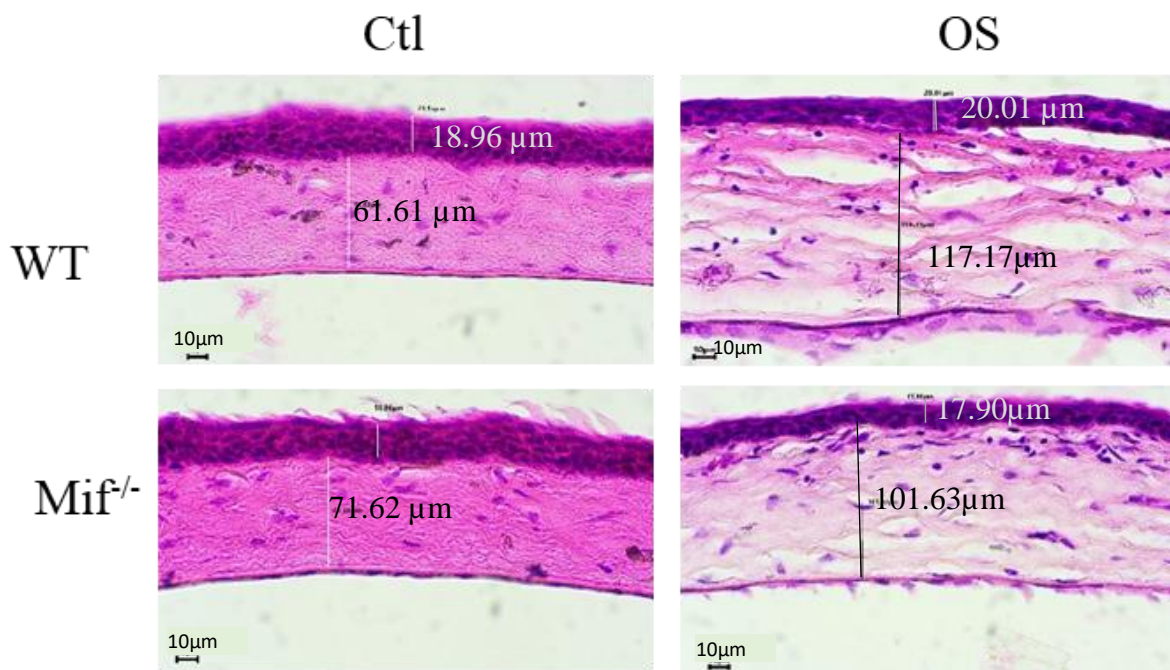


Figura 11. Imágenes representativas del análisis histopatológico de la córnea de ratones WT y Mif^{-/-} a los 10 días del inicio de la inducción del modelo de OS. Podemos observar queratocitos, fibras del colágeno en el estroma, presencia de edema.

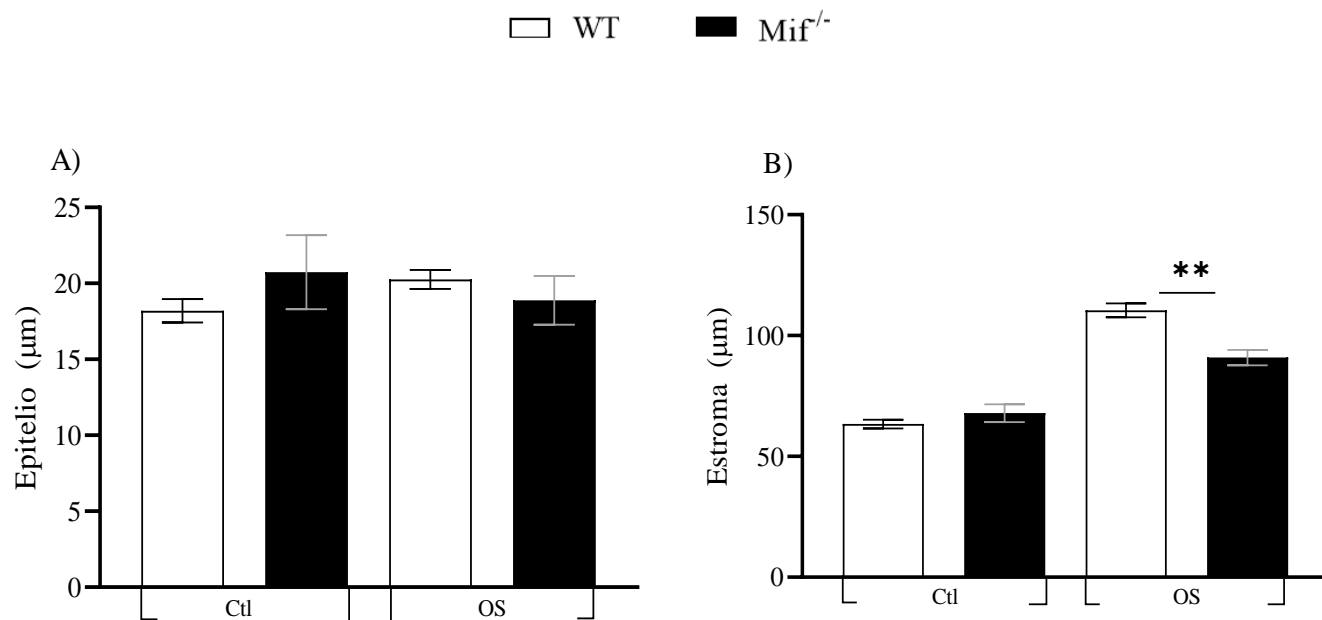


Figura 12. Grosor del epitelio y estroma corneal córnea de ratones WT y *Mif*^{-/-} 10 días post-inducción de OS. Resultados de 1 experimento (n=10 ratones)

12. Discusión

Ojo seco es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, caracterizada por la inestabilidad de la película lagrimal como consecuencia del incremento en la osmolaridad de la lagrime y la producción de citocinas inflamatorias como: TNF- α , IL-1 β , IL-17 y MIF (Craig *et al.* 2017). Aun cuando se ha evidenciado la estrecha relación entre el proceso inflamatorio y el agravamiento de los signos y síntomas de esta enfermedad, hasta ahora el uso de lágrimas artificiales, es el principal manejo terapéutico de los pacientes (De la torre M. *et al.*, 2007). Sin embargo, los componentes de estas, solo atenúan la sintomatología, pero no modulan el proceso inflamatorio ni previenen el daño tisular en córnea y conjuntiva.

En las últimas décadas se ha evidenciado el papel patogénico de MIF en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, de hecho, estudios preclínicos han demostrado que la inhibición de esta citocina reduce significativamente el proceso inflamatorio subyacente a estas enfermedades (Denkinger *et al.* 2003), (Onodera *et al.* 2000) y (Jong *et al.* 2001). En este mismo contexto, estudios en pacientes y modelos murinos con enfermedades inflamatorias oculares como uveítis, vitreoretinopatía proliferativa y ojo seco, han reportado niveles elevados de MIF en muestras de suero, saliva y lagrime, sin embargo, la información acerca de su participación en la inmunopatología es escasa (Pflugfelder *et al.* 1999) y (Stern *et al.* 1999). Por tal motivo, y con el fin de contribuir a entender el papel de esta citocina en OS, evaluamos la participación de MIF en el desarrollo de ojo seco inducido con escopolamina en ratones silvestres (WT) y deficientes (Mif^{-/-}).

Diversos estudios han demostrado que, sin importar el factor asociado con el desarrollo de OS, los pacientes presentaran inestabilidad de la película lagrimal como consecuencia del incremento en la osmolaridad de la lagrime. Este microambiente hiperosmolar a su vez promueve la disminución del volumen lagrimal, la alteración del patrón de arborización de mucinas y la pérdida de células epiteliales (Craig *et al.*, 2017) (Willcox *et al.*, 2017) (Zhang *et al.*, 2017). Estas observaciones son consistentes con nuestros resultados, ya que encontramos que, tras la inducción de ojo seco, ambos grupos de ratones presentaron disminución del volumen lagrimal

(fig. 4) y pérdida del patrón de arborización de mucinas (fig. 5). Sin embargo y de manera interesante, los ratones *Mif*^{-/-} presentaron signos atenuados de la enfermedad en comparación con los ratones WT.

El estudio de la respuesta inmune en órganos inmunológicamente privilegiados como el ojo, ha permitido comprender que la homeostasis de la superficie ocular depende de un conjunto de mecanismos de regulación mediados por poblaciones celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa, donde la participación de órganos linfoides secundarios como el bazo y la estrecha relación con la cámara anterior del ojo (eje camero-esplénico) desempeñan un papel central, a través de la activación y diferenciación de linfocitos T reguladores (de La Torre et al., 2002).

La contribución de esta población celular al mantenimiento del privilegio inmune ocular se da a través de la secreción de TGF- β e IL-10, citocinas indispensables para mantener en un estado inmaduro a las células presentadoras de antígeno que residen en la superficie ocular e inhibir la función efectora de células T patogénicas (De Pavia *et al.* 1999), (De Pavia *et al.* 2009) y (Zhang *et al.* 2011). Sin embargo, en ojo seco, se ha evidenciado que este microambiente inmunomodulador se pierde, como consecuencia del incremento en la osmolaridad de la lagrime, de hecho, la hiperosmolaridad actualmente se reconoce como uno de los principales detonadores del daño tisular en córnea y conjuntiva, debido a que promueve la activación del arco neurosensorial, la secreción de la glándula lagrimal, la inflamación neurogénica y la producción de citocinas inflamatorias y metaloproteasas (Yoon *et al.* 2007). Particularmente, se ha demostrado que el daño tisular en la superficie ocular (pérdida de células caliciformes, epiteliopatía y disminución del volumen lagrimal) son consecuencia de la perpetuación del proceso inflamatorio mediado principalmente por linfocitos Th1 y Th17 (Schaumburg *et al.*, 2011, Garcia-Posadas *et al.*, 2016)).

Considerando estos antecedentes, así como el papel central que tiene el eje camero-esplénico en la homeostasis de la superficie ocular y que se sabe que MIF es capaz de promover la activación de los linfocitos T, determinamos si esta citocina influye en el tipo de citocinas producidas en bazo de ratones con OS agudo. Interesantemente, encontramos que a los 10 días post-escopolamina, la producción espontánea de

TNF- α e IL-1 β fue menor a los 5 y 30 pg, respectivamente en ambos grupos. Contrario a lo esperado, observamos que los ratones WT producen más IL-4 e IL-13, aunque la producción de ambas citocinas también fue menor a los 50 y 15 pg, respectivamente (fig. 8).

Aun cuando estos resultados parecen no explicar la atenuación de los signos de OS observada en los ratones Mif^{-/-}, nosotros consideramos que esto pudo estar relacionado con el hecho de que la cuantificación de estos mediadores se hizo en un modelo de OS agudo, motivo por el cual es probable que la activación de poblaciones celulares de la respuesta inmune adaptativa como los linfocitos T se encuentre en proceso. Sin embargo, para confirmar o rechazar esta hipótesis, otro integrante del grupo de investigación cuantificará la producción de estas citocinas y otras implicadas en el daño tisular como son IFN- γ e IL17 en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones con OS crónico, con el objetivo de robustecer los resultados.

Este mismo sentido, se sabe que la amplificación y perpetuación de la respuesta inflamatoria en OS son resultado de la activación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ a través de la presentación de antígeno. Este proceso requiere de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) como los macrófagos (Stern *et al.* 1999) (Zhuo *et al.* 2012). Por tal motivo, analizamos la expresión de moléculas MHC clase II en macrófagos de ratones WT y Mif^{-/-} con OS. De manera intrigante encontramos que a los 10 días post-escopolamina, ambos grupos de ratones tuvieron un porcentaje similar de células F4/80⁺ MHC-II⁺ en bazo. Sin embargo, este mismo análisis en células de ganglio cervical mostró que los ratones WT tienen 35% más células F4/80⁺ MHC-II⁺ en comparación con los ratones deficientes para MIF (fig. 10). Estos resultados nos sugieren que, durante la fase aguda de la enfermedad, el ganglio cervical es uno de los principales órganos linfoides secundarios involucrados en la respuesta inmunológica en OS. Por otro lado, evidencia reciente, sugiere una conexión funcional entre la expresión de MIF y moléculas MHC-II⁺. Dicha conexión ha sido asociada a las diferentes funciones de la molécula CD74, ya que además de ser uno de los receptores de MIF, también funciona como una molécula chaperona

intracitoplásmica para MCH-II⁺ (Koch *et al.*, 2022) (Meza-Romero *et al.*, 2016). Estas evidencias, nos apoyan para explicar porque los ratones deficientes para MIF tuvieron un menor porcentaje de células F4/80⁺ MHC-II⁺.

Finalmente, cuando se hizo el análisis histopatológico de la córnea de ratones WT y Mif^{-/-} no encontramos diferencias en el grosor del epitelio entre los grupos experimentales. Sin embargo, observamos que la deficiencia de MIF redujo de forma significativa la pérdida de la arquitectura del estroma corneal (fig. 11 y 12). La relevancia de nuestros resultados reside en que, diversos estudios han demostrado que el incremento en la osmolaridad de la lagrime induce la producción de mediadores inflamatorios, metaloproteinasas y la infiltración de células patogénicas en la superficie ocular, eventos que en conjunto promueve el daño tisular de la córnea (De Pavia *et al.* 2009). trayendo como consecuencia disminución de la agudeza visual y en casos graves ceguera. (Zhang *et al.* 2011).

En conjunto, nuestros resultados, se suman a las evidencias reportadas por otros grupos de investigación, donde se ha establecido que independientemente del factor asociado al desarrollo de ojo seco, el proceso inflamatorio juega un papel importante en la inmunopatogenesis de esta enfermedad. Además, también evidencian el papel patogénico de MIF, por lo que su neutralización puede representar un potencial blanco terapéutico en el tratamiento de enfermedades la superficie ocular.

13. Conclusiones

1. Los animales deficientes para MIF presentaron signos atenuados de OS, caracterizados por una menor pérdida del volumen lagrimal y del patrón de arborización de mucinas en comparación a los animales WT.
2. La deficiencia de MIF resultó en un menor porcentaje de macrófagos MHCII⁺ en ganglio cervical tras la inducción de ojo seco agudo.
3. Los ratones deficientes para MIF presentaron un menor desarreglo de las fibras de colágena y edema en córnea en comparación con los ratones WT.

14. APÉNDICES

Tinción histológica H&E

No.	Solvente	Tiempo
1	Xilol 1	5 min
2	Xilol 2	5 min
3	Alcohol etílico 100%	5 min
4	Alcohol etílico 90%	5 min
5	Alcohol etílico 80%	5 min
6	Alcohol etílico 70%	5 min
7	Agua corriente	5 min
8	Hematoxilina	5 min
9	Agua corriente	10 seg
10	Alcohol ácido	5 seg
11	Agua corriente	Enjuague
12	Agua amoniacal	30 seg
13	Agua destilada	Enjuague
14	Eosina	3 min
15	Agua destilada	Enjuague
16	Alcohol etílico 96%	Lavado
17	Alcohol absoluto 100%	30 seg
18	Xilol	5 min
19	Montaje	

Fijador de Zinc (Preparación de 200ml)

Para la preparación del fijador de zinc se realizó la solución A (tabla 3). Posteriormente se ajustó a un pH de 7.2-7.4 y se aforo a 200ml. Posteriormente se añadieron el Acetato de Zinc y el Cloruro de zinc (tabla 4). La solución se observa transparente

Reactivos	Peso
Tris Base	2.12 g
Acetato de Calcio	0.1 g
H ₂ O destilada	160 ml

Solución A del fijador de Zinc

Reactivos	Peso
Acetato de Zinc	1 g
Cloruro de Zinc	1 g

Reactivos del fijador de zinc

Apéndice 2. Receta para la preparación del fijador de zinc

Solución hemolizante

Se preparó dos soluciones por separado (solución A y B), Para preparar 500ml de la solución hemolizante.

Solución A

1. Cloruro de amonio (CLN₄, 0.16M).....3.48gr

2. H₂O destilada.....400 ml

Solución B

1. Tris Base 0.17M.....2.05 gr
 2. H₂O destilada.....100 ml
- Tomar 4 partes de la solución A (400 mL) y 1 parte de la solución B (100 mL).
Se ajustó el PH a 7.4.

Apéndice 3. Receta para la preparación de solución hemolizante

Soluciones para Elisa

PBS 1X: 80.0g NaCl, 11.6 gr Na ₂ HPO ₄ , 2.0 gr KH ₂ PO ₄ , 2.0 gr KCl; aforar a 10 L a pH de 7.0

PBS/Tween: 0.5 mL of Tween en1 litro de H ₂ O.

Apéndice 4: Soluciones utilizadas en la técnica de ELISA

15. Literatura citada

Sridhar MS (2018). Anatomía de la córnea y superficie ocular. *Revista india de oftalmología* , 66 (2), 190-194.

Meek, KM y Boote, C. (2004). La organización del colágeno en el estroma corneal. *Investigación ocular experimental* , 78 (3), 503-512.

Rüfer, Florian MD; Schröder, Anke MD; Erb, Carl MD. (abril de 2005). Diámetro corneal blanco a blanco : valores normales en humanos sanos obtenidos con el sistema de topografía Orbscan II. *Córnea*, 24, 259-261.

Usama Fares Ahmad Muneer Otri Mouhamed Ali Al-Aqaba Harminder S.. (Febrero de 2012). Correlación del grosor corneal central y periférico en córneas sanas. *Contact Lens and Anterior Eye*, 35, 39-45.

Gipson IK (2007). La superficie ocular: el desafío de habilitar y proteger la visión: la conferencia de Friedenwald. *Oftalmología investigadora y ciencias visuales* , 48 (10), 4390–4398.

DelMonte, Derek W. MD; Kim, Terry MD * Anatomía y fisiología de la córnea., *Journal of Cataract & Refractive Surgery*: marzo de 2011 - Volumen 37 - Número 3 - p 588-598 doi: 10.1016 / j.jcrs.2010.12.037

Boote, C., Dennis, S., Newton, RH, Puri, H. y Meek, KM (2003). Las fibrillas de colágeno aparecen más juntas en la córnea prepupilar: implicaciones ópticas y biomecánicas. *Oftalmología investigadora y ciencias visuales* , 44 (7), 2941-2948.

Fares, U., Otri, A. M., Al-Aqaba, M. A., & Dua, H. S. (2012). Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Contact Lens and Anterior Eye*, 35(1), 39-45.

Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2004; 78:503–512

Oliveira-Soto, L. y Efron, N. (2001). Morfología de los nervios corneales mediante microscopía confocal. *Córnea*, 20 (4), 374-384.

Cher, I. (2013). Ocular surface concepts: development and citation. *The ocular surface*, 12(1), 10-13.

De Paiva CS, et al. (2007). Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon-gamma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 48:2553-2560.

Craig JP, et al. (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The ocular surface.*; 15:276-283.

Matsuda A, Kotake S, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. (1996). Detection and immunolocalization of macrophage migration inhibitory factor in rat iris and ciliary epithelium. *Immunology letters.*;53:1-5.

Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. (1997). Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *Investigative ophthalmology & visual science.*; 38:1555-1562.

Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *The Journal of biological chemistry.*; 275:444-450.

Denkinger CM, Denkinger M, Kort JJ, Metz C, Forsthuber TG. (2003). In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of encephalitogenic T cells to the central nervous system. *Journal of immunology.*; 170:1274-1282.

Cicik E, et al. (2003). Interleukin-8, nitric oxide and glutathione status in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic research.*; 35:251-255.

Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P, Jr., Jones DP. (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in retinal and eye research.*; 19:205-221.

Foster CS. Advances in the Diagnosis and Treatment of Uveitis. . ARVORetinal Disease and Uveitis.

Jabs DA, et al. (2000). Guidelines for the use of immunosuppressive drugs in patients with ocular inflammatory disorders: recommendations of an expert panel. *Am J Ophthalmol.*; 130:492-513.

Luo L, Li DQ, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. (2004). Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 45:4293-4301.

Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2015 Jan 30;112(5):71-81; quiz 82. doi: 10.3238/arztebl.2015.0071. PMID: 25686388; PMCID: PMC4335585.

Yeh S, Song XJ, Farley W, Li DQ, Stern ME, Pflugfelder SC. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jan;44(1):124-9. doi: 10.1167/iovs.02-0581. PMID: 12506064.

Ferreruela, Rafael (2007). La visión y el ojo. *Apunts Educación Física y Deportes*, (88), 8-14. [Fecha de Consulta 18 de Agosto de 2021]. ISSN: 1577-4015.

Kauski, J. J. (1992). *Oftalmología clínica*. Ediciones Doyma.

Ivanov, IV, Mappes, T., Schaupp, P., Lappe, C. y Wahl, S. (2018). El estrés oxidativo por radiación ultravioleta afecta la salud ocular. *Revista de biofotónica* , 11 (7), e201700377.

Rouen PA, White ML. Dry Eye Disease: Prevalence, Assessment, and Management. *Home Healthc Now.* 2018 Mar/Apr;36(2):74-83. doi: 10.1097/NHH.0000000000000652. PMID: 29498987.

Labetoulle, M., Baudouin, C., Calonge, M., Merayo - Lloves, J., Boboridis, KG, Akova, YA, ... y Benítez - del - Castillo, J. (2019). Papel de los nervios corneales en la homeostasis y la enfermedad de la superficie ocular. *Acta ophthalmologica* , 97 (2), 137-145.

Buckley, RJ (2018). Evaluación y manejo de la enfermedad del ojo seco. *Ojo* , 32 (2), 200-203.

Monteserín Matesanz, M., García Chías, B., Jiménez Vidal, N., Cerero Lapiedra, R., & Esparza Gómez, G. C. (2014). Síndrome de Sjögren. Revisión e implicaciones en el ámbito de la salud oral. *Cient Dent*, 11(1).

Ogawa, Y. (2018). Síndrome de Sjögren, síndrome de no sjögren y ojo seco relacionado con la enfermedad de injerto contra huésped. *Oftalmología investigadora y ciencias visuales* , 59 (14), DES71-DES79.

Calandra T, Roger T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews Immunology.*; 3:791-800.

Bilborrow, JB, Doherty, E., Tilstam, PV y Bucala, R. (2019). Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) como diana terapéutica para la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. *Opinión de expertos sobre dianas terapéuticas* , 23 (9), 733-744.

Lang, T., Foote, A., Lee, JP, Morand, EF y Harris, J. (2015). MIF: implicaciones en la patoetiología del lupus eritematoso sistémico. *Fronteras en inmunología* , 6 , 577.

Denkinger, CM, Denkinger, M., Kort, JJ, Metz, C. y Forsthuber, TG (2003). El bloqueo in vivo del factor inhibidor de la migración de macrófagos mejora la encefalomiелitis autoinmune experimental aguda al alterar el desplazamiento de las células T encefalitogénicas al sistema nervioso central. *Revista de inmunología* , 170 (3), 1274-1282.

De Jong, YP, Abadia-Molina, AC, Satoskar, AR, Clarke, K., Rietdijk, ST, Faubion, WA, ... y Terhorst, C. (2001). El desarrollo de colitis crónica depende de la citocina MIF. *Inmunología de la naturaleza* , 2 (11), 1061-1066.

Ko, JA, Sotani, Y. y Kiuchi, Y. (2017). Análisis funcional del MIF en el epitelio pigmentario de la retina humana por estrés oxidativo. *Oftalmología de investigación y ciencia visual* , 58 (8), 591-591.

Kim, HR, Park, MK, Cho, ML, Yoon, CH, Lee, SH, Park, SH, ... y Kim, HY (2007). El factor inhibidor de la migración de macrófagos regula al alza los factores angiogénicos y se correlaciona con medidas clínicas en la artritis reumatoide. *Revista de reumatología* , 34 (5), 927-936.

Lee HS, Amouzegar A, Dana R. (2017). Kinetics of Corneal Antigen Presenting Cells in Experimental Dry Eye Disease. *BMJ open ophthalmology.*; 1:e000078.

Li JJ, Yi S, Wei L. Ocular Microbiota and Intraocular Inflammation. *Front Immunol.* 2020; 11:609765. Published 2020 Dec 23. doi:10.3389/fimmu.2020.609765

Shumway CL, Motlagh M, Wade M. Anatomy, Head and Neck, Eye Conjunctiva. 2021 Jul 26. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 30137787.

Shirai K, Saika S. Ocular surface mucins and local inflammation--studies in genetically modified mouse lines. *BMC Ophthalmol.* 2015;15 Suppl 1(Suppl 1):154. Published 2015 Dec 17. doi:10.1186/s12886-015-0137-5

Vicario-de-la-Torre, M., Herrero-Vanrell, R., Benítez-del-Castillo, J. M., & Molina-Martínez, I. T. (2007). Nuevas formulaciones para el tratamiento del ojo seco. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 82(7), 395-396.

Macías Torres, R. (2020). Actualización en el diagnóstico del ojo seco.

JF, G. T., MJ, L. R., & Yela, A. (1998). Ojo seco: diagnóstico y tratamiento. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 22, 117-22.

Encarnación, N. Y. G., Solórzano, E. D. D., Zambrano, M. J. Z., & García, A. M. S. LA CONJUNTIVA (marzo 2021).

Cruz, L. F., & Athó, F. C. (2006). Reconocimiento del iris. *Universidad Nacional de Trujillo Perú*.

Galvis, V., Tello, A., & Carreño, N. (2008). El cristalino para el médico general. MedUNAB, 11(3), 225-230.

Silva Noceda, C. (2020). Síndrome del ojo seco en farmacia comunitaria y en ópticas.

Calonge, M. (2001). El tratamiento del ojo seco. Encuesta de oftalmología , 45 , S227-S239.

Villar, F. L. (2000). Anatomía Ocular. Obtenido de UNMSM: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/libros/Medicina>.

Masmali, A. M., Purslow, C., & Murphy, P. J. (2014). The tear ferning test: a simple clinical technique to evaluate the ocular tear film. *Clinical and Experimental Optometry*, 97(5), 399-406.

Yoon KC, et al. (2008). Expression of Th-1 chemokines and chemokine receptors on the ocular surface of C57BL/6 mice: effects of desiccating stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2007; 48:2561-2569.

Wilson SE, Perry HD. (2007). Long-term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. *Ophthalmology*.; 114:76-79.

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877, 173090.

Willcox, M. D. P., Argüeso, P., Georgiev, G. P., Holopainen, J. M., Laurie, G. W., Millar, T. J., Papas, E. B., Rolland, J. P., Schmidt, T. A., Stahl, U., Suarez, T., Subbaraman, L. N., Uçakhan, Ö. Ö., & Jones, L. (2017). TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocular Surface*, 15(3), 366-403.

de La Torre, A., & Núñez, M. X. (2002). Inmunología ocular: síndromes de ojo seco. *Colombia Médica*, 33(3), 113-122.

Schaumburg, CS, Siemasko, KF, De Paiva, CS, Wheeler, LA, Niederkorn, JY, Pflugfelder, SC y Stern, ME (2011). Las APC de la superficie ocular son necesarias para la queratoconjuntivitis lagrimal autoinmune experimental mediada por células T autorreactivas. *The Journal of Immunology* , 187 (7), 3653-3662.

García-Posadas, L., Hodges, RR, Li, D., Shatos, MA, Storr-Paulsen, T., Diebold, Y. y Dartt, DA (2016). Interacción de IFN- γ con agonistas colinérgicos para modular la función de las células caliciformes de rata y humana. *Inmunología de las mucosas* , 9 (1), 206-217.

