



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EFECTO TERAPÉUTICO DEL INHIBIDOR
FARMACOLÓGICO ISO-1 EN UN MODELO DE OJO
SECO CRÓNICO”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

ROSAS GONZÁLEZ KARLA ANDREA

Directora de tesis: Dra. Alicia Vázquez Mendoza

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

2024





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Agradecimientos	5
Dedicatorias	7
1. Introducción	9
1.1 Anatomía y fisiología del ojo	9
1.2 Fisiopatología del Ojo seco	9
1.3 Cuadro clínico	10
1.4 Diagnóstico	10
1.5 Tratamiento	10
1.6 Ojo seco e inflamación	11
2. Justificación	13
3. Hipótesis	14
4. Objetivo general	14
5. Objetivos particulares	14
6. Materiales y métodos	14
6.1 Formulación del Inhibidor de MIF	14
6.2 Ratones	14
6.3 Inducción del modelo murino de ojo seco	15
6.4 Administración de DMSO (vehículo) o inhibidor (ISO-1)	15
6.5 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer	15
6.6 Análisis de la calidad de mucinas conjuntivas por la técnica de ferning	15
6.7 Cultivo celular de bazo y ganglios cervicales	16
6.8 Citometría de flujo	16
6.9 Cultivo celular de córnea y conjuntiva	16
6.12 Amplificación de moléculas por PCR	18
6.13 Electroforesis	20
6.14 Cuantificación de citocinas por ELISA sándwich	20
6.14.1 Sensibilización de la placa	21

6.14.2 Curvas y muestras	21
6.14.3 Revelado	21
6.15 Análisis histopatológico de córnea	21
6.16 Análisis estadístico	22
7. Resultados	23
7.1 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer	23
7.2 Evaluación del patrón de arborización de mucinas por la técnica de ferning	24
7.3 Análisis de la expresión de mediadores inflamatorios y antiinflamatorios en córnea por la técnica de PCR	27
7.4 Cuantificación de citocinas inflamatorias en sobrenadante de cultivo de conjuntiva, córnea y ganglio de ratones con ojo seco	33
7.5 Análisis del porcentaje de linfocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺ por citometría de flujo en ganglio y bazo de ratones experimentales	34
7.6 Análisis histopatológico de córnea en ratones experimentales	37
8. Discusión	38
9. Conclusión	42
10. Perspectivas	43
11. Referencias bibliográficas	44
12. Apéndices	54
12.1 Apéndice 1: Buffer TBE	54
12.2 Apéndice 2: PBS 10x y pH de 7.4	54
12.3 Apéndice 3: PBS-Tween	54
12.4 Apéndice 4: Blocking buffer (solución de bloqueo)	54
12.5 Apéndice 5: Fijador de Zinc	54
12.6 Apéndice 6: Tren de tinción H&E	54

Agradecimientos

A mis profesores de la carrera de Biología.

A mis sinodales:

Dra. Alicia Vázquez Mendoza

Dr. José Luis Reyes Hernández

Dr. José Bustos Arriaga

M. en C. Imelda Juárez Avelar

Dra. María Teresa Ortiz Melo

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

Al laboratorio 18 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED).

Este proyecto se realizó en el laboratorio 18 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) bajo la dirección de la Dra. Alicia Vázquez Mendoza. Fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) a través de la convocatoria de Ciencia Básica y de Frontera con la clave **CBF2023-2024-405**.

Dedicatorias

A mis padres, quienes siempre me apoyaron para cumplir mis sueños y metas. Son mi ejemplo a seguir de dedicación y perseverancia; gracias por jamás permitir que me saliera del camino y por todo lo que han hecho por mí. Los amo.

A mi hermano Santi, no tienes idea de lo mucho que me esfuerzo para ser un buen ejemplo para ti, prometo seguir siendo el adulto que necesitas hoy y siempre.

A mi mejor amiga Pammeli, no sé qué habría hecho sin tus consejos y tus palabras de aliento, siempre estaré eternamente agradecida por haberme cuidado en esa fiesta; te amo tres millones.

A la Dra. Alicia, quien siempre dedicaba parte de su tiempo para responder mis dudas e inquietudes. Jamás permitió que me rindiera y siempre vio un potencial en mí hasta cuando yo dudaba de mi misma, infinitas gracias.

Al Dr. Tona, gracias por ayudarme una y mil veces en la citometría de flujo y en mis dudas.

A Mari y al Dr. JL, mil gracias por siempre responder mis dudas de la mejor manera y por todas las risas dentro del laboratorio.

A mis amigos que hice durante mi pasantía:

- Arturo: Gracias por enseñarme la mayoría de lo que sé en el laboratorio y por siempre mantenerme con los pies en la tierra. Siempre estamos bromeando pero espero que sepas que te tengo un gran cariño.
- Moni: Gracias por tenerme la paciencia para las histologías y con todas las dudas interminables de ojo. Te has convertido en una de mis mejores amistades en tan poco tiempo, agradezco infinitamente las risas compartidas de regreso a casa y los consejos que siempre me brindaste.
- Den: Quiero que sepas que eres una de las personas que más valoro y que espero mas días de feria contigo.

- Val: Gracias por todas las risas y los chismesitos compartidos en vacaciones, te aprecio muchísimo.
- Andy: Gracias por todo tu apoyo en mis experimentos, espero seguir compartiendo videos de perritos contigo como sino hubiera mañana.

A mi preciosa Abi, gracias por siempre desvelarte conmigo durante la carrera mientras hacía mi tarea. Llegaste cuando más lo necesitaba y aunque no alcanzaste a ver este final, quiero que sepas que siempre te tuve presente. Te extraño; te mando un beso al cielo.

A mí tía Inna y mi a prima Adry. Gracias por todo su apoyo y sus consejos, siempre las veré como dos grandes ejemplos en mi vida.

A mis primos tóxicos infieles, no tienen idea de lo mucho que los amo. Siempre estaré agradecida por estar en esta familia poco normal.

A mi Erika, gracias por todos los días que me soportaste hablando de ciencia. Agradezco infinitamente tu apoyo y las veces que sacaste una sonrisa en días tan largos.

1. Introducción

1.1 Anatomía y fisiología del ojo

Los ojos, son órganos simétricos localizados en la porción anterior de la cavidad orbitaria, debajo del cerebro, encima y por fuera de las fosas nasales y tienen un diámetro aproximado de 24 mm (Alemañy & Villar, 2003; Mora, *et al.*2016). De acuerdo a su función, son considerados órganos fotosensibles; ya que permiten el paso de la luz a través de la córnea, el cristalino y varias estructuras refractivas del ojo y, a través de varias capas de células nerviosas y de sostén, que transmiten la información visual por el nervio óptico al cerebro para su procesamiento (Garner & Hiatt, 2002).

Desde el punto de vista clínico, las estructuras oculares se dividen en segmento posterior y anterior, particularmente, la superficie ocular (SO) forma parte del segmento anterior y comprende a la córnea, la conjuntiva, los párpados, las pestañas, las glándulas de Meibomio, la glándula lagrimal principal y accesoria y a la película lagrimal. Todas estas estructuras desempeñan funciones centrales en el mantenimiento de la estabilidad de la SO. En específico, la película lagrimal es un fluido no newtoniano compuesto por tres capas, la porción externa está formada de lípidos producidos principalmente por las glándulas de Meibomio, la segunda, corresponde a la porción acuosa y es secretada por la glándula lagrimal, finalmente la capa interna está formada por las mucinas secretadas por las células caliciformes. La relevancia en el mantenimiento de la estabilidad de la película lagrimal está directamente relacionada con su capacidad para mantener una SO lubricada y lisa que permita la transmisión de la luz, desde la córnea hacia la retina con el objetivo de favorecer el proceso de la visión. En este mismo contexto, también se sabe que en la película lagrimal hay una gran diversidad de péptidos antimicrobianos encargados de eliminar agentes infecciosos y/o sus productos capaces de desencadenar procesos inflamatorios crónicos, que puedan provocar la pérdida de la homeóstasis y favorecer el desarrollo de enfermedades inflamatorias oculares crónica como ojo seco (Craig, *et al.* 2017; De la Torre & Nuñez, 2002).

1.2 Fisiopatología del Ojo seco

Ojo seco (OS) es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular de origen multifactorial, caracterizada por hiperosmolaridad e inestabilidad de la película lagrimal con daños potenciales en la superficie ocular (Craig, *et al.* 2017). La prevalencia oscila entre el 5 al 34%

de la población mundial, diversos estudios han reportado que el riesgo de padecer OS aumenta con la edad, donde las mujeres son más susceptibles debido a la disminución de las estrógenos, andrógenos y prostaglandinas. Además de los factores hormonales, también se ha demostrado que pacientes con enfermedades sistémicas, neurológicas o autoinmunes como: diabetes, Parkinson, síndrome de Sjögren, deficiencias nutricionales, contaminación atmosférica, pueden contribuir al desarrollo o cronicidad de OS (Mendoza- Aldaba & Fortoul, 2021; Pérez, *et al.* 2022).

1.3 Cuadro clínico

Los pacientes con OS a menudo reportan irritación ocular, sensación de cuerpo extraño, sequedad y aspereza, ardor, lagrimeo excesivo, fotofobia, escozor o dolor agudo intermitente y en algunos casos dificultad para abrir los ojos por la mañana. Así mismo, pero con menor frecuencia: visión borrosa que mejora con el parpadeo. Sin embargo, los pacientes pueden presentar todos, algunos o ninguno de estos síntomas (Ginés, 2015).

1.4 Diagnóstico

La exploración de la superficie ocular se los pacientes con OS se basan en tres pilares fundamentales: la disminución en la producción acuosa de la lagrime, el estudio de la estabilidad de la misma y la búsqueda de lesiones de la conjuntiva y/o córnea (Ginés, 2015). Aunque las pruebas más comunes son cuantificación del tiempo de ruptura lagrimal (BUT), la evaluación en el patrón de arborización de mucinas y la cuantificación del volumen lagrimal a través de las pruebas de ferning y Schirmer, respectivamente (Calviño, 2012).

1.5 Tratamiento

El tratamiento más común es el uso de lágrimas artificiales y en algunos casos se prescriben corticoesteroides, sin embargo, el uso prologando de este fármaco puede causar el incremento de la presión intraocular. Recientemente, se han explorado otro tipo de alternativas terapéuticas a través del consumo de omega 3 y 6, luz pulsada o la administración de suero autólogo, suplementos alimenticios, fármacos secretagogos, terapia con células madre o neuromodulación (Gálvez, *et al.* 1998; Calonge, 2001). Aunque algunos de estos tratamientos reducen la sintomatología, desafortunadamente en la mayoría de los casos no se logra modular el proceso inflamatorio característico de esta enfermedad.

1.6 Ojo seco e inflamación

Como se mencionó previamente, OS es una enfermedad inflamatoria crónica de la superficie ocular que resulta en la alteración de los parámetros fisiológicos de la película lagrimal y la superficie ocular (De la Torre & Nuñez, 2002). Hay evidencia de que la liberación de mediadores inflamatorios en la película lagrimal produce cambios en el epitelio conjuntival y corneal, promoviendo la transición patológica del epitelio no queratinizado a queratinizado fenómeno conocido como: metaplasia escamosa. En la conjuntiva, la metaplasia escamosa, es la reducción en el número de células caliciformes, productoras de mucinas. Si bien las mucinas y las queratinas específicas de la córnea y conjuntiva les dan la propiedad a los epitelios de no ser queratinizados y humificables, la falla en la expresión de estos elementos conlleva a la pérdida de la estabilidad de la superficie ocular (Tseng, 1999). Aun cuando se ha reportado un papel relevante de las mucinas: MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC 7, MUC16, MUC19 y MUC20 en la protección de la SO, hasta ahora los resultados obtenidos por diferentes grupos han reportado variaciones considerables en su expresión entre sujetos sanos y pacientes con distintas patologías incluida ojo seco (Fraga & Villa, 2019; Corrales, *et al.* 2003).

Además de los cambios reportados en la expresión de mucinas, también se ha reportado incremento en la producción de mediadores inflamatorios como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) interferón gamma (IFN- γ), IL-1 β , IL-6, IL-17, quimiocinas y metaloproteinasas 1, 3, 6 y 9 (MMP 1, 3, 6,9) y el agravamiento de los signos y síntomas de OS. El incremento de estas moléculas induce el reclutamiento de neutrófilos, monocitos, macrófagos (Mo) y células T que inician y agravan la patología (Yoon *et al.* 2007), (Wilson y Perry. 2007), (Luo *et al.* 2007) y (Kalt *et al.* 2010). En particular se ha demostrado el papel patogénico de las poblaciones celulares Th1 y Th17 ya que promueven metaplasia en tejido escamoso conjuntival, apoptosis de células de conjuntiva y pérdida de células caliciformes a través de la producción de IFN- γ , IL-17A TNF- α e IL-1 β y la producción de (MMP3 y 9) resultando en la alteración del epitelio corneal (De Paiva *et al.* 1999), (De Paiva *et al.* 2009) y (Zhang *et al.* 2011).

Estas observaciones han generado gran interés por entender el papel de la inflamación en ojo seco con el fin de identificar los mecanismos subyacentes de esta enfermedad y posteriormente identificar potenciales blancos terapéuticos (Nayaranan *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 inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en el fluido corneal y conjuntiva, así como 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.* 1998).

En las últimas décadas ha habido un creciente interés por analizar la participación de MIF en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, debido a que 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 MPP 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). Interesantemente, se ha demostrado que la inhibición de MIF reduce significativamente el proceso inflamatorio y atenúa el desarrollo de patologías autoinmunes e inflamatorias (Denkinger *et al.* 2003, Onodera *et al.* 2000; Jong *et al.* 2001).

A nivel ocular se ha reportado la expresión de MIF en células del epitelio pigmentado de la retina, células del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar, iris y córnea de roedores. Aun cuando no se analizó el papel de esta citocina en muestras de pacientes, se sugiere un papel patogénico de MIF en enfermedades inflamatorias oculares (Matsuda *et al.* 1997) y (Matsuda *et al.* 1996).

Evidencia reciente demostró 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 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 permitió 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 a 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). Finalmente, estudios independientes han demostrado que la depleción génica o la inhibición farmacológica de MIF, reduce la liberación de mediadores inflamatorios como como TNF- α , IL-1 β e IL-6, el infiltrado celular y en consecuencia los signos característicos de patologías inflamatorias y autoinmunes. Sin embargo, aun cuando hay evidencia del potencial terapéutico de ISO-1 en patologías inflamatorias, su efecto en enfermedades inflamatorias de la superficie ocular como OS se desconoce.

2. Justificación

Hasta el 2017, el DEWS reportó una prevalencia mundial de OS entre el 5 y 50% de la población adulta, sin embargo, estas cifras van en aumento y ahora también se tienen reportes de que no solo afecta a adultos, sino que el uso de dispositivos electrónicos en población escolar ha promovido el desarrollo de esta patología, lo que trae como consecuencia disminución en la calidad de vida de los pacientes. A pesar de que se ha demostrado que hay una asociación entre el agravamiento de OS y la sobreexpresión de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-17, el tratamiento de los pacientes se basa en el uso de lágrimas artificiales y ocasionalmente la administración sistémica de corticosteroides, sin embargo, su uso prolongado de estos puede conllevar al desarrollo de múltiples complicaciones locales y sistémicas. Por tal motivo, y considerando el impacto económico y social que tiene este problema de salud, surge la necesidad de buscar el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos de uso oftálmico que contribuyan a regular el proceso inflamatorio característico de esta enfermedad.

3. Hipótesis

La inhibición farmacológica de MIF a través de la administración oftálmica del ISO-1 reducirá la producción de mediadores inflamatorios en córnea de ratones con ojo seco experimental.

4. Objetivo general

- Analizar el efecto de la administración oftálmica del inhibidor farmacológico de MIF ISO-1 en ratones con ojo seco experimental crónico.

5. Objetivos particulares

- Hacer una formulación oftálmica del inhibidor farmacológico de MIF (ISO-1).
- Inducir ojo seco en ratones Balb/c mediante la administración de escopolamina.
- Cuantificar el volumen lagrimal de ratones experimentales por la técnica de Schirmer.
- Evaluar el patrón de arborización de las mucinas de ratones experimentales por la técnica de ferning.
- Analizar la expresión de mediadores inflamatorios en córnea por la técnica de PCR.
- Cuantificar el nivel de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en cultivo de córnea, conjuntiva y ganglio por la técnica de ELISA.
- Analizar por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ en ganglio y bazo de ratones experimentales.
- Realizar un análisis histopatológico en córnea de ratones experimentales.

6. Materiales y métodos

6.1 Formulación del Inhibidor de MIF

La inhibición de MIF se realizó mediante la administración de 0.5 μ l (1mg/1 μ l) de ISO-1 (4,5-Dihydro-3-(4-hydroxyphenyl)-5-isoxazoleacetic acid methyl ester) en un vehículo de 20 μ l de DMSO al 10 % estéril vía oftálmica 2 veces al día por 18 días.

6.2 Ratones

Para el experimento se utilizaron ratones BALB/c de 9 a 12 semanas de edad silvestre (WT). Todos los ratones fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura (21 - 24 °C)

y humedad. Los ratones fueron divididos en 4 grupos: un grupo 1 control (el cual no recibió ningún tipo de tratamiento), grupo 2 OS (ojo seco), grupo 3 OS+DMSO (ojo seco más administración oftálmica del vehículo) y grupo 4 OS+ISO-1 (ojo seco más administración oftálmica de ISO-1). Todos los animales fueron en apego de la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.3 Inducción del modelo murino de ojo seco

La inducción de ojo seco se hizo mediante la administración de 0.5mg de escopolamina (Sigma-Aldrich) vía subcutánea 3 veces al día por 21 días.

6.4 Administración de DMSO (vehículo) o inhibidor (ISO-1)

La administración se realizó vía oftálmica a los tres días de haber iniciado la inducción de OS. El grupo 3 recibió 5 µl de DMSO al 10%, mientras que al grupo 4 se le administró 1mg/mL de ISO-1 dos veces al día por 18 días, respectivamente.

6.5 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer

El volumen lagrimal se determinó a los 0, 7, 14 y 21 días post-inducción de OS y a los 7 días de haber suspendido la inducción de ojo seco y la administración de DMSO o ISO-1 (fase de observación). Previo a la toma de muestra los ratones fueron anestesiados con xilacina de la marca PROCIN (40mg/kg de peso). Una vez anestesiados, se colocaron tiras de Schirmer (Schirmer strips marca SURGI EDGE) sobre el párpado inferior (conjuntiva temporal) durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, con un vernier digital (Absolute AOS marca Mitutoyo) se midió el volumen lagrimal.

6.6 Análisis de la calidad de mucinas conjuntivas por la técnica de ferning

El análisis del patrón de arborización de mucinas de ratones control y experimentales se realizó utilizando la prueba de ferning. Se obtuvieron 2 microlitros de lágrima con una micropipeta y se colocaron en un portaobjetos, se dejaron secar y se observaron a 40x utilizando un microscopio óptico a fin de identificar el tipo de arborización de mucinas con base en la escala de Rolando; donde el patrón de arborización grado I es una arborización completa, sin espacios, el grado II presenta espacios entre las arborizaciones, en el grado III se observan ramificaciones cortas y los espacios son más grandes, finalmente, el grado IV es totalmente carente de arborizaciones.

6.7 Cultivo celular de bazo y ganglios cervicales

La extracción de bazo y ganglios cervicales se realizó posterior a la fase de observación. En el caso de la extracción de los ganglios cervicales, se disectó al ratón, sin tocar el peritoneo; estos fueron colocados en cajas petri con 1 ml de solución salina. Posteriormente, se maceraron en un *cell strainer* de 100 μm de la marca FALCON®. Se recolectó la solución salina con las células en tubos eppendorf y se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min; una vez recolectado el paquete celular, se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio RPMI suplementado (D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10% SFB y estreptomycin-Gibco).

Por el otro lado, para la extracción del bazo, se abrió el peritoneo en condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo, y se perfundió con solución salina en tubos FALCON™ de 15 ml. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min; se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de solución hemolizante por 5 minutos. Pasados los 5 minutos se detuvo la reacción con 5 ml de medio RPMI suplementado.

Tanto de las muestras de bazo como de ganglio, se determinó la viabilidad celular, para ello se extrajeron 10 μl de estas y se les agregó 10 μl de azul de tripano (Sigma Chemicals co) (dilución 1:1) y se cuantificaron con ayuda del software *Cell Counter CytoSMART*. Posteriormente se realizó el ajuste de las células, $5 \times 10^6/\text{ml}$ en el caso de bazo, $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ en el caso de ganglio y se aforó a 1000 μl con medio RPMI en una placa de 24 pozos de fondo plano marca Corning™. Las placas fueron incubadas en una incubadora marca Ecoshell a 37° C con 5% de CO₂ durante 48 h. Concluido el periodo de incubación, el sobrenadante fue recolectado y almacenado a -70°C hasta su uso.

6.8 Citometría de flujo

Se realizaron citometrías de flujo con las células obtenidas de ganglios cervicales y bazo. Se colocaron los anticuerpos específicos Bioldgend® (CD3 – APC/Cy7; CD4+ - FITC; CD8+ - B. Violet 605 y Ghost Dye 450) para medir linfocitos T. Posteriormente las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo Attune Life Technologies y con ayuda del software *Flowjo*.

6.9 Cultivo celular de córnea y conjuntiva

De la misma manera, posterior a la fase de observación, se enuclearon ambos ojos; el ojo derecho fue para el análisis histopatológico (descrito más adelante) y el ojo izquierdo para disección. Se disectaron la conjuntiva tarsal inferior y la córnea. Ambos tejidos fueron

colocados en tubos eppendorf estériles con 1ml de solución salina. Posteriormente, los tejidos fueron puestos en placas de 96 pozos de la marca Corning™ con 200 µl de medio RPMI. De igual forma, el cultivo se realizó por 48 h en la incubadora Ecoshell y una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su uso. Por otro lado, los tejidos fueron colocados en 100 µl de Trizol® y almacenados a -70° C.

6.10 Extracción de RNA

Reactivos:

- 200 µl de Cloroformo
- 500 µl de Isopropanol (2 propanol)
- 1000 µl de Etanol 75% (en H₂O estéril)
- 20 µl H₂O de DPC libre de nucleasas o MQ

Para la extracción de RNA, las muestras fueron descongeladas y homogenizadas con un homogeneizador de hélice. Se mantuvieron 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 100 µl de cloroformo; posteriormente se agitaron fuertemente durante 15 segundos y se dejaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm por 15 minutos a 2 °C, se recuperó la fase transparente, se agregaron 250 µl de isopropanol (frío) y se mantuvieron por 10 minutos a -20 °C. Después, se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 rpm a 2 °C para obtener la pastilla y decantar el resto. Posteriormente, se agregó 500 µl de etanol al 75%, se mezcló por inversión durante 10 segundos y nuevamente se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 2 °C para decantar el etanol y obtener la pastilla. Finalmente, se dejó evaporar el etanol y se resuspendieron las muestras en 30 µl de H₂O DPC.

6.11 Extracción de cDNA (RNA de doble cadena)

Se colocó en un tubo de PCR de 200 µl:

- 8 µl de RNA total.
- 1 µl de Oligo (dT) 18 prime.
- 3 µl de H₂O libre de nucleasasnuclease-free.

Se metieron las muestras en el termociclador (minuAmplus) con el programa RT-1 (65° por 5 min, 10° C por 1 min). Después, se incubaron a -20° C por 1 minuto y se preparó una reacción por cada muestra:

- 4 µl de 5X Reaction Buffer
- 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)
- 2 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl de RevertAid M-MulV RT (200 U/µL)

Se mezclaron y centrifugaron brevemente las muestras para posteriormente meterlas en el termociclador en los programas RT-2 (42° por 60 minutos, 10° por 1 minuto, 70° C por 5 minutos) y RT-3 (42° por 60 minutos, 70° por 15 minutos, 10° C por 3 minutos). El producto de la reacción de transcripción inversa fue utilizado directamente para aplicaciones de PCR.

6.12 Amplificación de moléculas por PCR

Una vez obtenidos los cDNA, fueron cuantificados con el software *Gen3* y se ajustaron para tener una concentración de 200 ng/µl. Posteriormente, se prepararon las siguientes reacciones para cada muestra:

- Master mix 12.5 µl
- H₂O 9.5 µl
- Forward primer 1 µl
- Reverse primer 1 µl
- Muestra de cDNA 1 µl

Volumen final: 25 µl

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos de los primers para PCR.

Gen	Secuencia de primers	Temperatura (°C)	Tamaño (pb)
keratocan	F: AGGATGCCTTCATTACGGAC	61	490

	R: GCTCATTGTGGTGCTTATGGGG		
decorin	F: CCTTCTGGCACAAGTCTCTTGG	62	151
	R: TCGAAGATGACACTGGCATCGG		
lumican	F: TGCTGTCTCGGCTTCTCTGAAAG	63	567
	R: AACATCCCCCACATTCCCAACC		
IL – 4	F: ATGTGTCATCCTGCTCTTCTTT	59.5	342
	R: GACTGGGACTCATTCATGGTGC		
IL – 6	F: ACAGCCACTCACCTCTTCAG	57	520
	R: CCATCTTTTTCAGCCATCTTT		
IL-1 β	F: AAGCCTCGTGCTGTCGGACC	66	140
	R: TGAGGCCCAAGGCCACAGGT		
IL-17	F: CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	60	69
	R: GGGTCTTCATTGCGGTGG		
IL-18	F: ACTGTACAACCGCAGTAATACGC	61	434
	R: AGTGAACATTACAGATTTATCCC		
IL-22	F: GCTGCCTGCTTCTCATTGC	60	115
	R: AAGGTGCGGTTGACGATGTA		
IL-23	F: AGCCAACTCCTCCAGCCAGA	63	80
	R: CGCTGCCACTGCTGACTAGAA		
Colágena IV	F: GCTCTGGCTGTGGAAAATGT	58.75	102
	R: CTTGCATCCCGGGAAATC		
TNF- α	F: AGAACCAGTTCCAACGCTACC	60	102
	R: TCTGAGTCTCCTTACAGGGGAT		
INF-Y	F: GGTCAACAACCCACAGGTCCAG	63	114

	R: CCGAATCAGCAGCGACTCCTTT		
TGF-B	F: TGCTTCAGCTCCACAGAGAA	60	155
	R: TACTGTGTGTCCAGGCTCCA		
PEDF	F: CGATCCGCTCCTTTGATGAT	59	147
	R: TCCAACCTCGGCCCATCT		
PDL1	F: GCTCCAAAGGACTTGTACGTG	58	238
	R: TGATCTGAAGGGCAGCATTTC		
PDL2	F: CTGCCGATACTGAACCTGAGC	59	126
	R: GCGGTCAAATCGCACTCC		
iNOS	F: CTGGAGGAGCTCCTGCCTCATG	63	440
	R: GCAGCATCCCCTCTGATGGTG		
MMP2	F: ACCTGAACACTTTCTATGGCTG	60	140
	R: CTTCCGCATGGTCTCGATG		
MMP9	F: GGACCCGAAGCGGACATTG	58	139
	R: CGTCGTCGAAATGGGCATCT		
β – actina	F: GCTGTGCTATGTTGCTCTAG	56	117
	R: CGCTCGTTGCCAATAGTG		

6.13 Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x (Apéndice 1) y se agregaron 3 μ l de bromuro de etidio. Se tomaron 8 μ l de cada muestra de la reacción final de la PCR para añadirlo al pozo del gel, además de 3 μ l del marcador de peso molecular (Plus de 50 pb GeneRuler). Las muestras se corrieron primero a 50 voltios durante 5 minutos y a 100 voltios por 30 minutos. Finalmente se capturó la imagen en un fotodocumentador (GelDoc EZ marca Bio Rad).

6.14 Cuantificación de citocinas por ELISA sándwich

La cuantificación de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias se realizó del sobrenadante de cultivo de células de córnea, conjuntiva, bazo y ganglio.

6.14.1 Sensibilización de la placa

Se diluyó el anticuerpo a una concentración de 2 µg/ml en 10 ml de PBS (Apéndice 2), se homogenizó y se colocaron 100 µl por pozo utilizando una micropipeta multicanal (Gilson) en una placa de ELISA con 96 pozos. Se cubrió la placa con aluminio para que se llevara a cabo la reacción de pegado del anticuerpo y se dejó incubar toda la noche a 4° C.

6.14.2 Curvas y muestras

Una vez transcurrido el tiempo, se lavó la placa 2 veces con PBS-Tween (Apéndice 3), se secó la placa de manera manual (agitando la placa) y se agregó 200 µl de blocking buffer (Apéndice 4) para el bloqueo del pegado inespecífico. Nuevamente se cubrió con aluminio y se incubaron a temperatura ambiente por 2 h. Posterior a esto, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween y, una vez que la placa se encontró seca, se colocaron 25 µl/pozo de las muestras de sobrenadante a determinar. Para ello, se utilizó una curva control de citocinas recombinante correspondiente a las citocinas de interés, esta curva comenzó en una concentración inicial de 12,000 pg/ml y continuando con diluciones a la mitad de blocking buffer. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C.

6.14.3 Revelado

Las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween, se secaron manualmente y se diluyó el anticuerpo de detección biotinilado a 1 µg/ml en PBS-Blocking buffer, posterior a ello, se agregaron 100 µl/pozo. Las placas fueron cubiertas por aluminio e incubadas a temperatura ambiente por 2 h, posteriormente se lavaron 4 veces con PBS-Tween y se secaron manualmente. Se adicionó 100 µl/pozo la dilución de la avidina en blocking buffer, se cubrieron las placas y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Inmediatamente, se lavaron 5 veces con PBS-Tween, se secaron y se les adicionó 100 µl/pozo del sustrato ABTS recién preparado (Sigma) (0.5% ABTS en 0.1M ácido cítrico anhidro, pH 4.35 con NaOH más 1% H₂O₂ al 3%, todos los reactivos marca Sigma). La densidad óptica se determinó durante los primeros 15 min de la reacción en el lector de placas de ELISA (Pokler Italia, PKL®) a 405 nm.

6.15 Análisis histopatológico de córnea

Los ratones fueron sacrificados posterior a la fase de observación. Se enuclearon ambos ojos; el ojo derecho fue para histología y el ojo izquierdo para disección. En el caso del ojo derecho,

al momento de enuclearlo, se colocó en un cassette, y a su vez, en un fijador de Zinc (Apéndice 5) para posteriormente realizar el proceso de deshidratación con diferentes solventes para la histología:

Solventes	Tiempo
Fijador de Zinc	48 h
Alcohol 70%	48 h
Alcohol 80%	48 h
Alcohol 90%	48 h
Alcohol 100%	2 h
Butanol	2 h
Parafina I	48 h
Parafina II	48 h
Parafina de inclusión	Hasta su uso

} En una estufa de la
marca Ecocell a
57° C

El proceso de inclusión se llevó a cabo en una incluidora CI2013 marca Ludetech, posteriormente se realizaron los cortes histológicos con el microtomo RM2125 de la marca LEICA con un grosor de 5 μ m y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con PolyL-Lysine P8920 marca Sigma-Aldrich. Las laminillas obtenidas se desparafinaron en la estufa por 24 h a 57° C. Finalmente, las muestras fueron teñidas utilizando el tren de tinción hematoxilina-eosina (H&E) (Apéndice 6) y fueron observadas a 40x utilizando el microscopio PreciPoint M8.

6.16 Análisis estadístico

La comparación entre los grupos experimentales será procesada mediante ANOVA de un factor en software GraphPad y Excel.

7. Resultados

7.1 Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer

Con el propósito de determinar si la administración del inhibidor farmacológico ISO-1 modula la pérdida del volumen lagrimal, se cuantificó de forma independiente la producción lagrimal en ambos ojos, por la técnica de Schirmer a los 0, 7, 14, 21 post-inducción y a los 7 días de haber suspendido la inducción de OS (fase de observación). En la figura 1A, 1B y 1C se muestra el volumen lagrimal producido en el ojo izquierdo (OI), ojo derecho (OD) y en ambos ojos (AO), respectivamente. Al día cero todos los grupos de ratones tuvieron una producción lagrimal de alrededor de 1.78mm. A los 7 días post-inducción de (figura. 1C) encontramos una disminución del volumen lagrimal del 26% en el grupo OS y 15% y en los ratones con OS+DMSO. Interesantemente, el grupo tratado con ISO-1 solo mostro una ligera disminución al día 14 en OI. Mientras que los grupos de OS y OS+DMSO presentaron una reducción del 21% y 11%, respectivamente. Es importante resaltar que durante la administración oftálmica del inhibidor farmacológico de MIF hubo una marcada atenuación y retraso de la pérdida del volumen lagrimal como se puede observar en las gráficas. Sin embargo, este efecto se pierde tras la suspensión del tratamiento. Finalmente, en la fase de observación, todos los grupos experimentales mostraron recuperación en la producción de lágrima, un par de hallazgos interesantes, fue que dicha recuperación fue ojo independiente, y que el grupo de OS+DMSO tuvo una recuperación más discreta en comparación con los otros ratones experimentales.

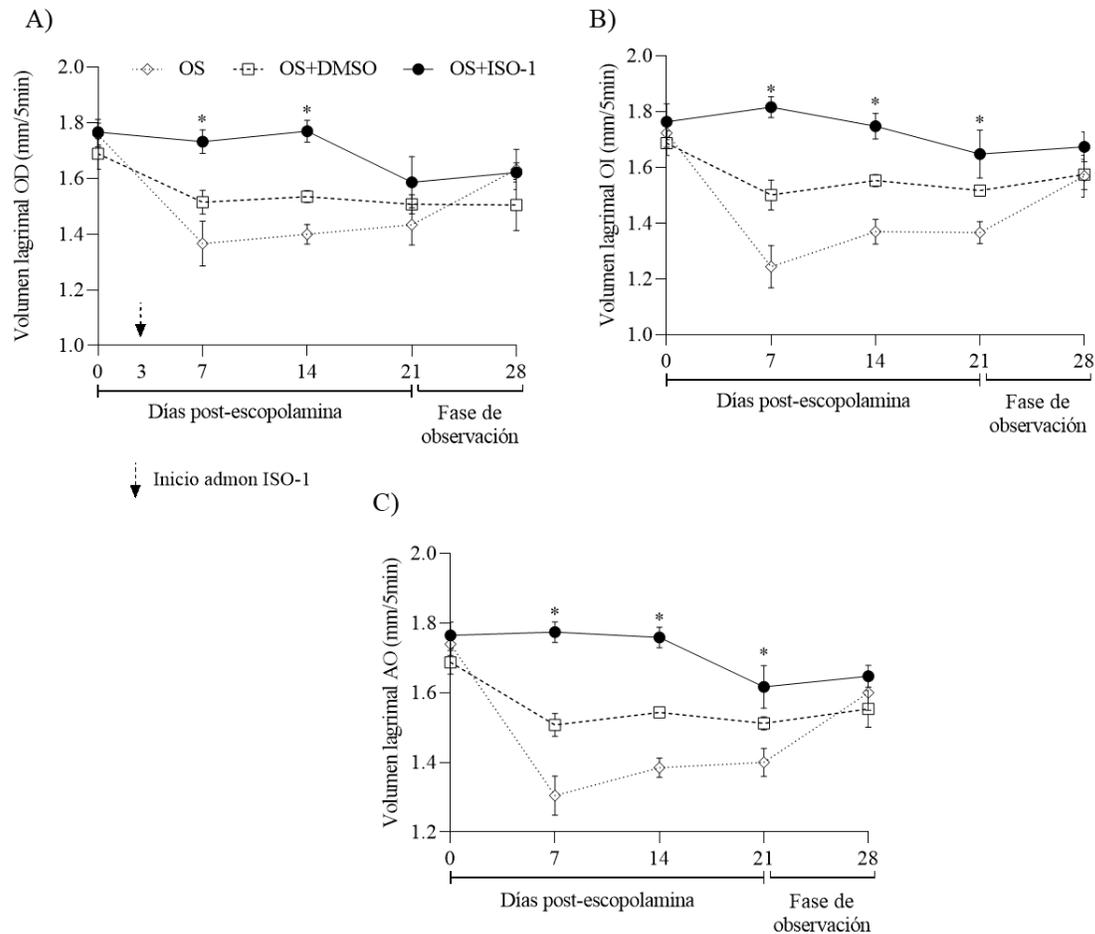


Figura 1. Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer a los 0, 7, 14 y 21 días post-inducción de ojo seco (OS) y en la fase de observación (7 días posteriores a la suspensión de OS y del tratamiento). (A) volumen lagrimal producido en ojo derecho (OD), (B) volumen lagrimal producido en ojo izquierdo (OI). (C) volumen lagrimal producido en ambos ojos (AO). Resultados de 2 experimentos independientes, N=26 ratones, donde * es indicativo de $p < 0.5$ obtenido mediante la prueba de ANOVA.

7.2 Evaluación del patrón de arborización de mucinas por la técnica de ferning

Como previamente se mencionó el proceso inflamatorio asociado a OS promueve pérdida en la estabilidad de los componentes de la película lagrimal. Por tal motivo, otro de los objetivos planteados en este trabajo fue evaluar y comparar el patrón de arborización de mucinas entre los organismos experimentales. Para realizar dicha evaluación, se tomaron 2 μ l de lágrima a los 0, 7, 14, 21 días post-inducción de OS y a los 7 días de la suspensión del modelo. En la figura 2 mostramos las imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas, como podemos observar al día 0 todos los grupos presentaron un patrón de arborización de mucinas tipo I y II, considerado fisiológico de acuerdo a la escala de Rolando. Sin embargo,

a los días 7, 14 y 21 post-inducción, el grupo de OS mostró una pérdida en el patrón de arborización, permaneciendo en un grado III y IV. Por su parte, el grupo OS+DMSO tuvo una pérdida completa del patrón de arborización, categorizada en grado IV. En contraste, el grupo de OS+ISO-1 aun cuando mostró alteraciones en el patrón de arborización, esta fue menor, como se puede observar en la imagen, donde se pueden ver la presencia de helechos correspondientes a un grado II. En la fase de observación, en todos los grupos experimentales se comienza a ver una recuperación del patrón de arborización, si bien en el grupo tratado con ISO-1 no parecen ser substanciales, en los recuadros marcados con rojo, evidenciamos la conservación de algunos de estos.

La representación gráfica de las observaciones antes descritas se muestra de manera más detallada en las figuras 2B, 2C y 2D mostramos el tipo de patrón de arborización observado en OI, OD y AO. Donde podemos ver que, previo a la inducción de OS (día cero) todos los grupos experimentales tenían un patrón de arborización tipo I y II, considerado fisiológico con base en la escala de Rolando. En la figura 2D podemos observar que posterior a la inducción (día siete), los grupos de OS y OS+ISO-1 mostraron una transición de tipo II a III. Para el día 14, la mayoría de los ratones tratados con el inhibidor ISO-1 pasaron de tipo II a III. En contraste, el grupo de OS no tratado en una mayor proporción tuvo una marcada transición de tipo III a IV. Para el día 21, encontramos que el cambio del tipo de patrón de arborización II a III es diferente para ambos ojos en grupos OS+DMSO y OS+ISO-1, mientras que los ratones con OS sin tratamiento en OD presentaron una pérdida completa del patrón de arborización. Posterior a la suspensión de la inducción de OS y/o el tratamiento con ISO-1, observamos que todos los grupos presentaron una ligera recuperación en el patrón de arborización de mucinas, ninguno entra dentro los grados considerados normales. Estos resultados, muestran que el tratamiento con la formulación oftálmica de ISO-1 resulta en un retraso y modulación de la pérdida del patrón de arborización.

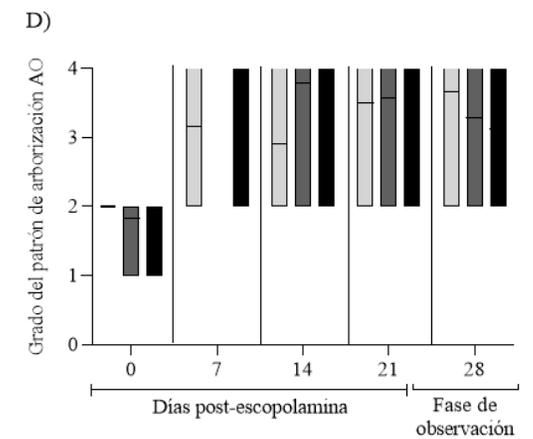
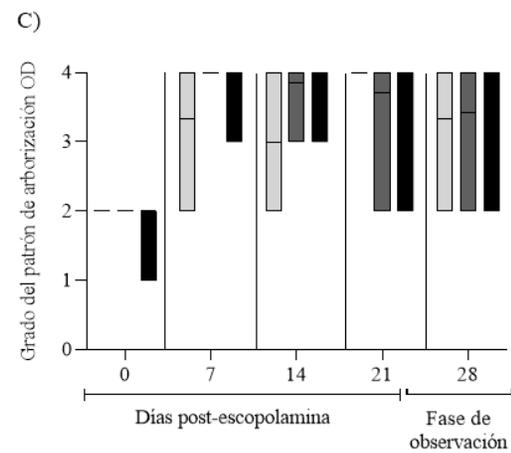
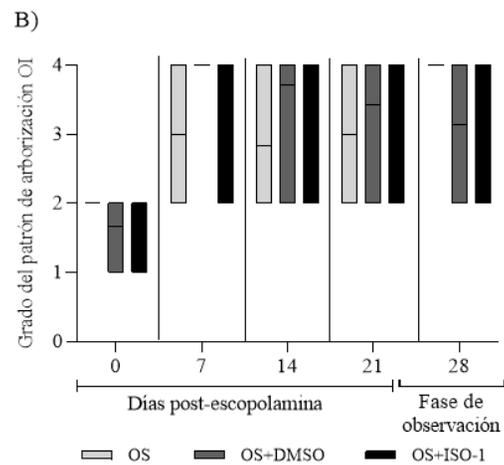
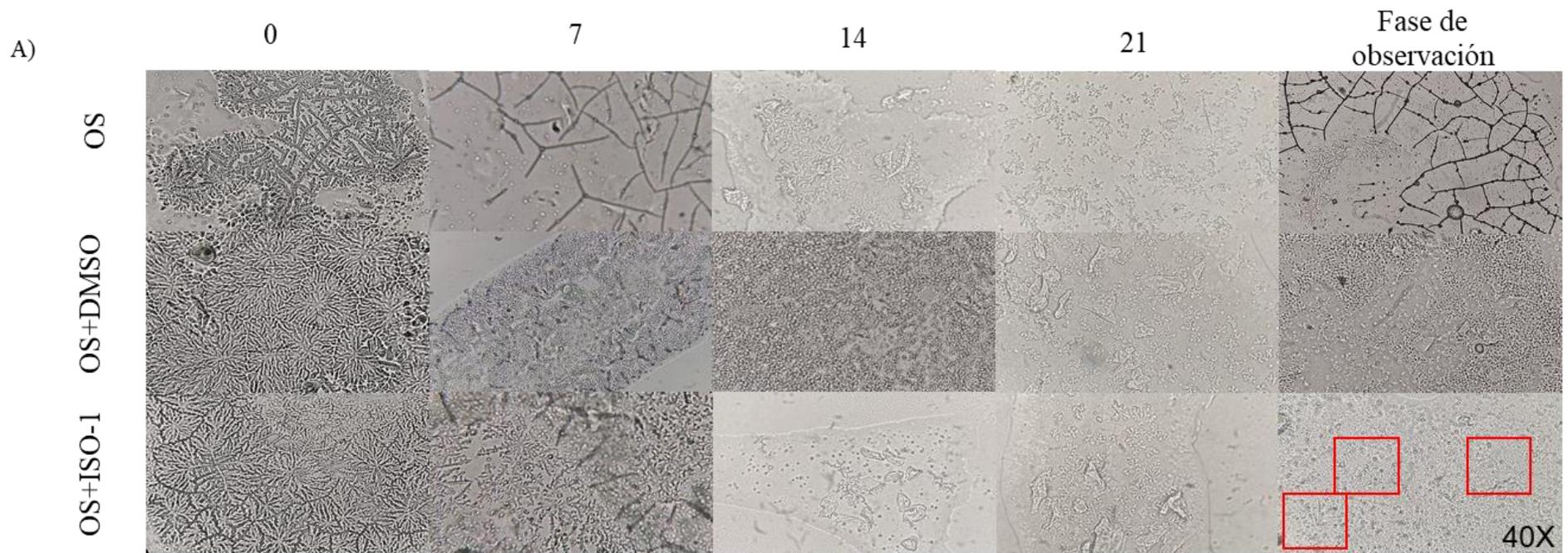


Figura 2. Patrón de arborización de mucinas por la técnica de Ferning los 0, 7, 14 y 21 días post-inducción de OS y a los 7 días de haber suspendido las inducciones y el tratamiento (fase de observación), con una magnificación de 40x. Fotografías representativas (N=26, 2 experimentos independientes). 2B ojo izquierdo (OI), 2C ojo derecho (OD), 2D ambos ojos (AO). Análisis estadístico ANOVA.

7.3 Análisis de la expresión de mediadores inflamatorios y antiinflamatorios en córnea por la técnica de PCR

Estudios realizados en pacientes y modelos murinos han demostrado la asociación entre el agravamiento de OS y el incremento de mediadores inflamatorios (Craig, et al. 2017; De la Torre & Nuñez, 2002; Yoon et al. 2007). Considerando estas evidencias, así como los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo, donde observamos que la deficiencia genética o la inhibición farmacológica de la citocina inflamatoria MIF, retrasó y atenúo los signos de ojo seco en un modelo agudo (Rivera et al. 2023). El presente estudio, hizo un análisis más minucioso por RT-PCR de la expresión de transcritos de moléculas inflamatorias, antiinflamatorias y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en córnea de ratones con OS crónico tratados y no tratados con el inhibidor de MIF (ISO-1). Para dar alcance a este objetivo, a los 7 días posteriores a la suspensión de la inducción de OS y la administración de ISO-1, los ratones se sacrificaron y se realizó la enucleación del ojo a fin de disectar la córnea. A las 48 hrs de haber cultivado el tejido ocular se extrajo RNA, sintetizamos cDNA y realizamos el análisis de cada una de las moléculas de interés en los grupos experimentales. Como se muestra en las gráficas, encontramos una menor producción de *il-1 β* y *tnf- α* (figura 3, B y D) en los grupos de OS+DMSO y OS+ISO-1 en comparación con el grupo de OS. Sin embargo, llama la atención la expresión elevada de *il-18* (figura 4, F) en los ratones tratados con el inhibidor farmacológico ISO-1, lo que sugiere una posible activación del inflamósoma NLRP3. De manera interesante, a pesar de haber observado una mayor expresión de citocinas asociadas a inflamación crónica (*il-17* e *il-23*) (figura 4, E y H) en el grupo tratado, también encontramos mayor expresión de *il-22* (figura 4, G) sugiriendo su participación tanto en la regulación del proceso inflamatorio, como en la reparación tisular (Woo et al., 2017). Además, observamos más expresión de *tgf- β* (figura 4, I) en los ratones tratados con ISO-1, este resultado es relevante, ya que se sabe que esta citocina tiene un papel central en la inmunomodulación del microambiente ocular (Hachana & Larrivé, 2022).

Además del papel patogénico que ejercen las citocinas inflamatorias, también se ha demostrado que las MMP contribuyen a exacerbar el proceso inflamatorio característico de OS, particularmente MMP2 y MMP-9 han sido relacionadas con la degradación de colágena, uno de los principales componentes del estroma corneal (Kim & Lim, 2022; Park et al., 2021). A fin de conocer si el tratamiento con ISO-1 inhibe o promueve la expresión de las

MMP antes mencionadas, analizamos su expresión en córnea de los animales experimentales. En análisis reveló una baja expresión de ambas en los grupos de OS+DMSO y OS+ISO-1 en comparación con los ratones no tratados (figura 5, J y K). De igual forma, se sabe que gran parte de la organización estructural de las fibras de colágena en el estroma corneal está mediada por la expresión de colágena tipo IV, por tal motivo, analizamos su expresión. El análisis mostró que posterior a la inducción de OS se redujo su expresión en los grupos de OS y OS+DMSO (figura 5, M). Además, se ha reportado que, la inflamación crónica puede provocar lesiones en la córnea como consecuencia de la inhibición del proceso de reparación tisular asociada a niveles elevados de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Sun et al., 2024). Los resultados de su análisis mostraron una mayor expresión en la córnea de ratones con OS no tratados (figura 5, L).

Finalmente, se ha demostrado que la inflamación crónica promueve la hipoxia y con ello la pérdida del equilibrio en la angiogénesis, que, en el caso particular de la córnea resultaría en un proceso de neovascularización y la consecuente opacidad de este tejido comprometiendo su función en el proceso de la visión. Considerando lo antes expuesto, otro de nuestros objetivos particulares fue analizar si ISO-1 es capaz de inhibir la angiogénesis. Para dar respuesta a esta interrogante medimos la expresión del factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) (figura 6, N), dado que es una molécula con función antiangiogénica y se expresa de manera constitutiva en el tejido corneal. De manera interesante, encontramos que los ratones tratados ISO-1 tuvieron una mayor expresión en comparación al grupo de OS. Otro de los mecanismos inmunoreguladores en el microambiente ocular está sustentado en la expresión de ligandos de muerte programada como PDL-1 y PDL-2, estas moléculas son capaces de inhibir la función de células T patogénicas, por lo que su función es esencial para mantener el equilibrio entre la activación de las células T y la tolerancia (Keir et al., 2008). Sin embargo, el análisis no mostró expresión de *pdl-2* en ningún grupo experimental, ni tampoco diferencias en la expresión de *pdl-1* entre los grupos experimentales (figura 6, Ñ).

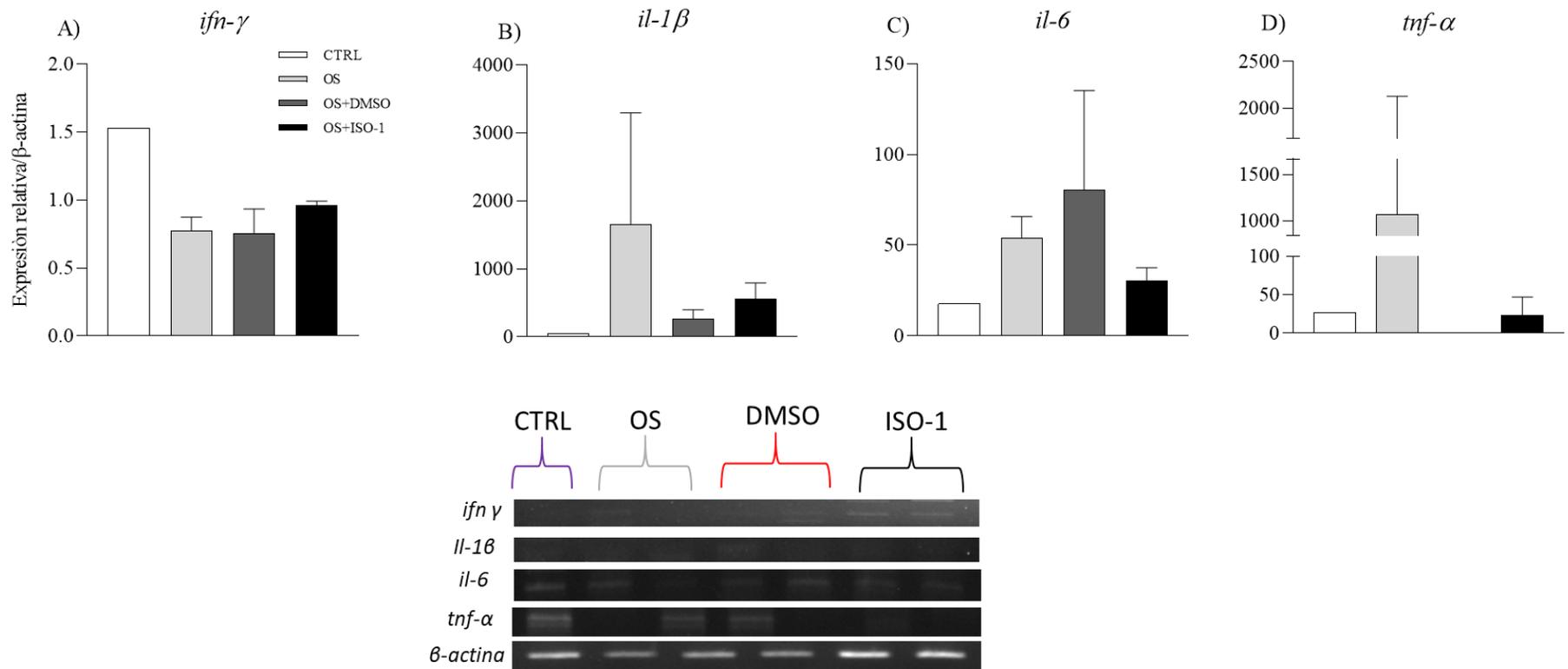


Figura 3. Análisis de la producción de citocinas proinflamatorias en córnea. (A) *ifn-γ*, (B) *il-1β*, (C) *il-6*, (D) *tnf-α*. Electroforesis de fragmentos amplificados por RT-PCR posterior a la semana de observación (Día 28). Resultados de un experimento N=14.

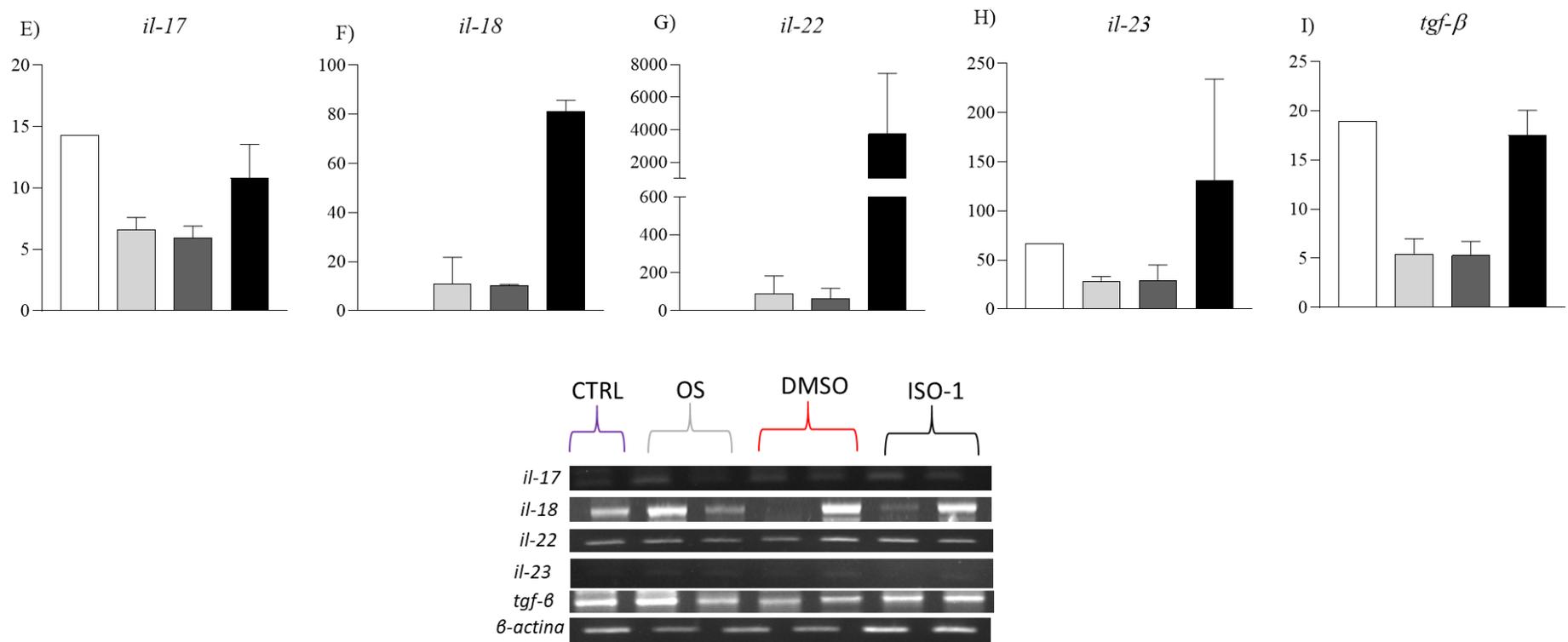


Figura 4. Análisis de la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en córnea. (E) *il-17*, (F) *il-18*, (G) *il-22*, (H) *il-23*, (I) *tgf-β*. Electroforesis de fragmentos amplificados por RT-PCR posterior a la semana de observación (Día 28). Resultados de un experimento N=14.

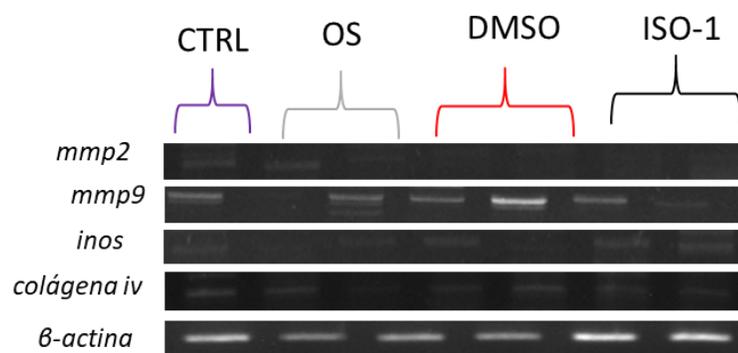
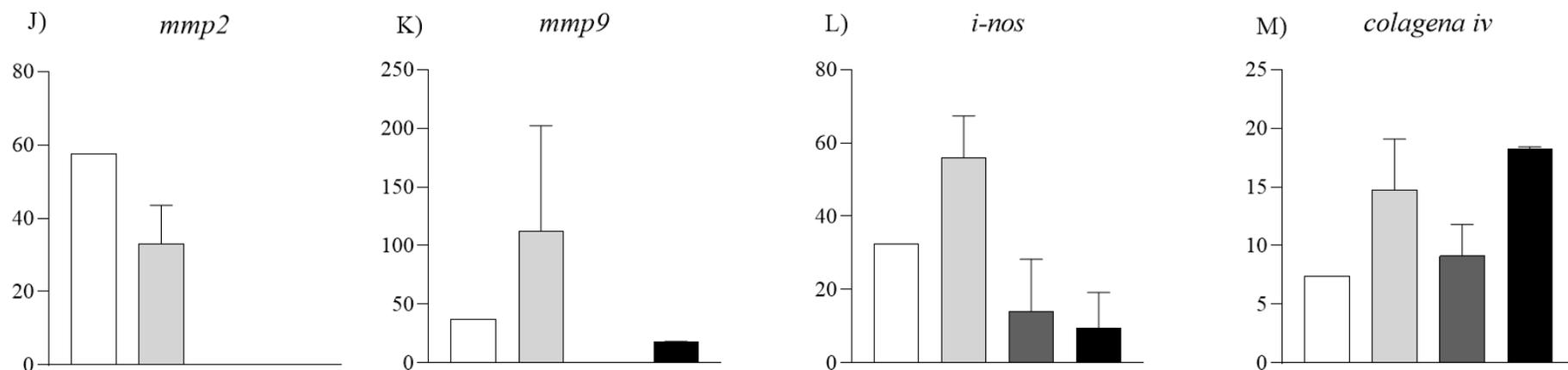


Figura 5. Análisis de la producción de MMPs, enzimas y colágeno en córnea. (J) *mmp-2*, (K) *mmp-9*, (L) *inos*, (M) *colágena IV*. Electroforesis de fragmentos amplificados por RT-PCR posterior a la semana de observación (Día 28). Resultados de un experimento N=14.

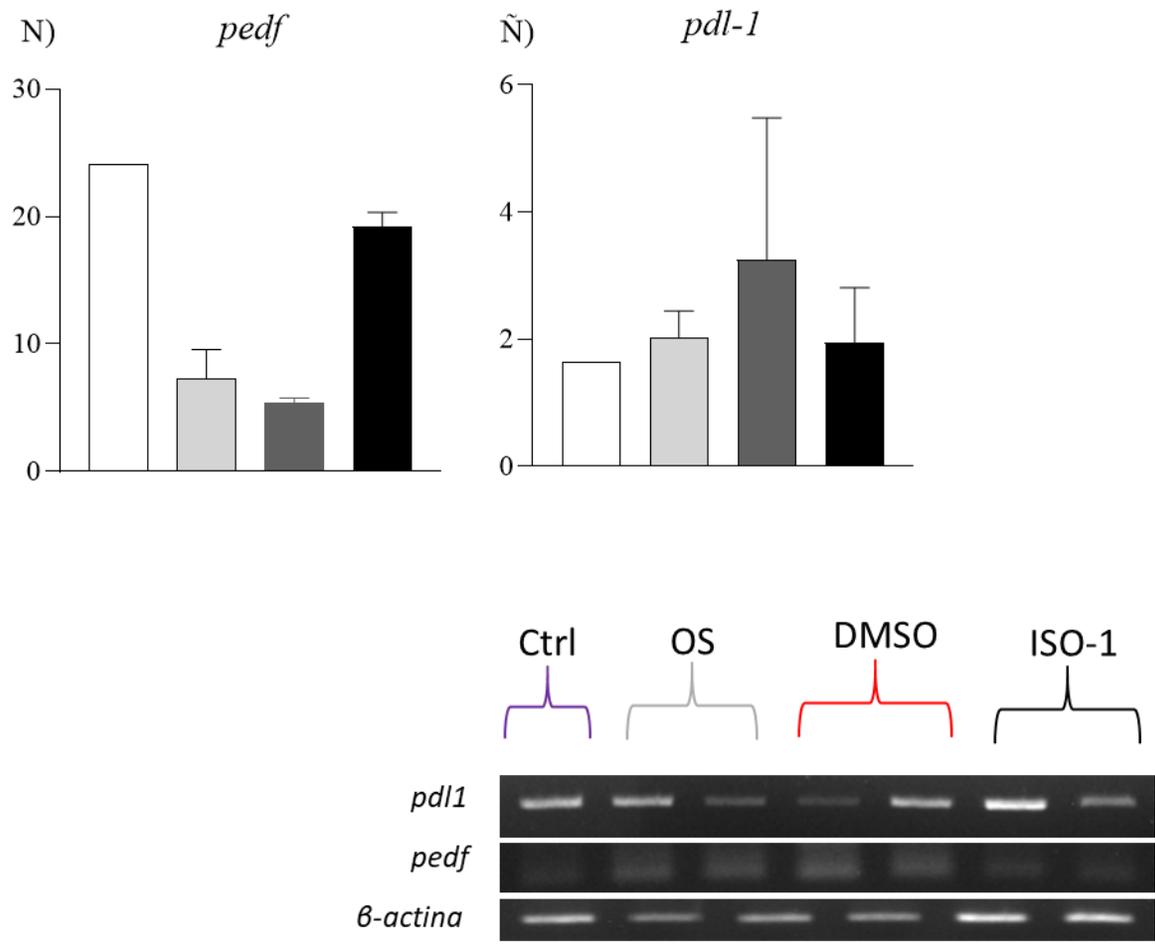


Figura 6. Análisis de la producción de (N) *pedf* (Ñ) *pdl-1* en córnea. Electroforesis de fragmentos amplificados por RT-PCR posterior a la semana de observación (Día 28). Resultados de un experimento N=14.

7.4 Cuantificación de citocinas inflamatorias en sobrenadante de cultivo de conjuntiva, córnea y ganglio de ratones con ojo seco

Con base en las observaciones obtenidas en el análisis de la expresión de transcritos de citocinas, cuantificamos la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-13 en sobrenadante de cultivos de conjuntiva, córnea y ganglio cervical a los siete días de haber suspendido la inducción de OS y el tratamiento a fin de determinar si el inhibidor farmacológico ISO-1 regula la síntesis de estos mediadores en el microambiente ocular y en órganos linfoides secundarios. Como se puede observar en conjuntiva encontramos un microambiente mixto de citocinas en todos los grupos experimentales (figura 7-A). Mientras que en la córnea observamos una menor producción de TNF- α , interesantemente esta misma citocina no se detectó en ganglio cervical en los ratones tratados con ISO-1 (figura 7-B y C). Estos resultados demuestran que la administración oftálmica del inhibidor farmacológico de MIF regula la expresión y producción de citocinas patogénicas implicadas en el daño tisular en la superficie ocular.

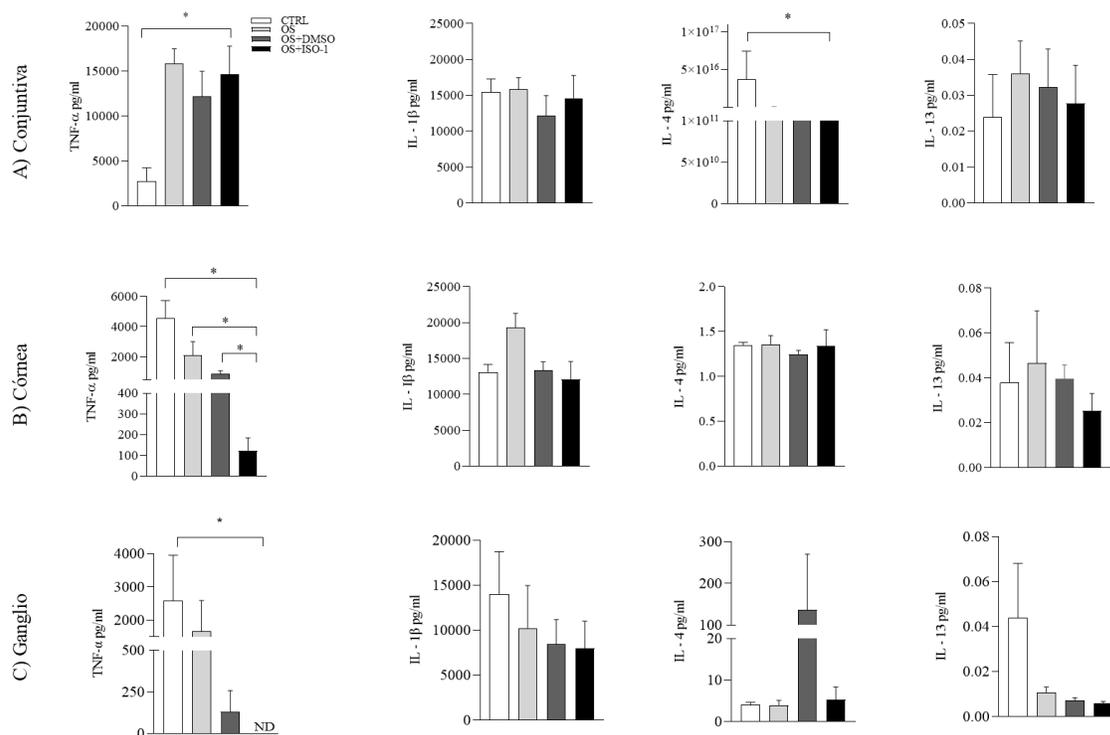


Figura 7. Producción de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en cultivo de conjuntiva, córnea y ganglios cervicales, posterior a la fase de recuperación. A) Citocinas en cultivo de conjuntiva, B) Citocinas en cultivo de córnea y C) Citocinas en cultivo de ganglio cervical. Resultado de dos experimentos independientes. N=26 ratones donde * es indicativo de $p < 0.5$ obtenido mediante la prueba de ANOVA.

7.5 Análisis del porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo en ganglio y bazo de ratones experimentales

Se ha demostrado que las células T tienen un papel clave tanto en el mantenimiento de la homeostasis ocular, como en el desarrollo de OS (Chen, 2021). Por tal motivo, evaluamos si la administración oftálmica del inhibidor farmacológico ISO-1 promueve la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Para responder esta pregunta, analizamos por citometría de flujo a ambas poblaciones celulares en bazo y ganglio cervical al día 28 (fase de observación). En la figura 8 mostramos la estrategia experimental empleada para la selección y análisis de las poblaciones de interés. Una vez seleccionada la región de linfocitos T, analizamos el porcentaje de CD4⁺ y CD8⁺ en células de bazo, como se puede observar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las poblaciones analizadas figura 9.

Por su parte, el análisis en células de ganglio cervical (figura 10), mostró un menor porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en los ratones tratados con ISO-1 en comparación con los otros grupos experimentales. Estos resultados, por un lado, confirman la relación inmunológica que tienen los órganos linfoides con el microambiente ocular en condiciones de homeostasis o de inflamación. Además, evidencian el efecto que tuvo la administración del inhibidor farmacológico de MIF sobre las células T, particularmente en las CD8⁺. Sin embargo, es necesario replicar el experimento y realizar un análisis más minucioso de ambas poblaciones celulares a fin de determinar si la atenuación de los signos de OS, fue resultado de una activación diferencial de las células CD4⁺ o si los linfocitos CD8⁺ son citotóxicos o reguladores. Además, el análisis en la expresión de receptores de quimiocinas también podría explicar si las células están egresando del órgano al sitio de acción.

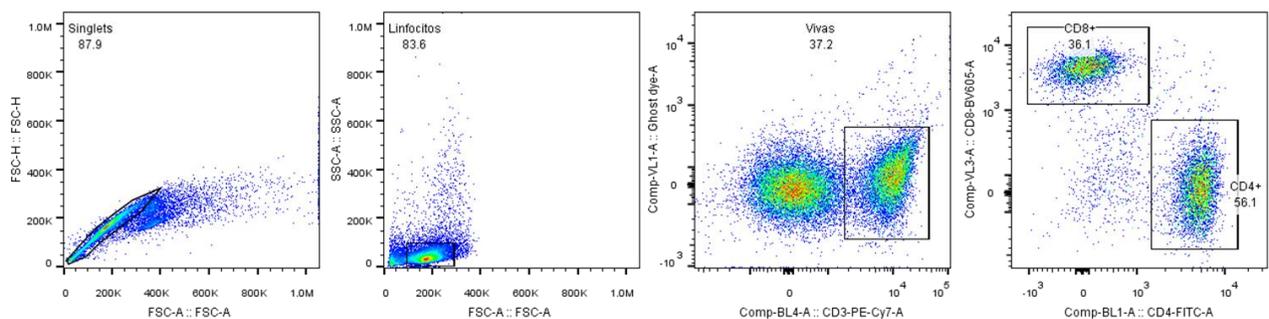


Figura 8. Plots representativos de la estrategia experimental para la selección de linfocitos en ganglio y bazo; Singlets, identificación de células T CD3⁺ y su viabilidad, células CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺.

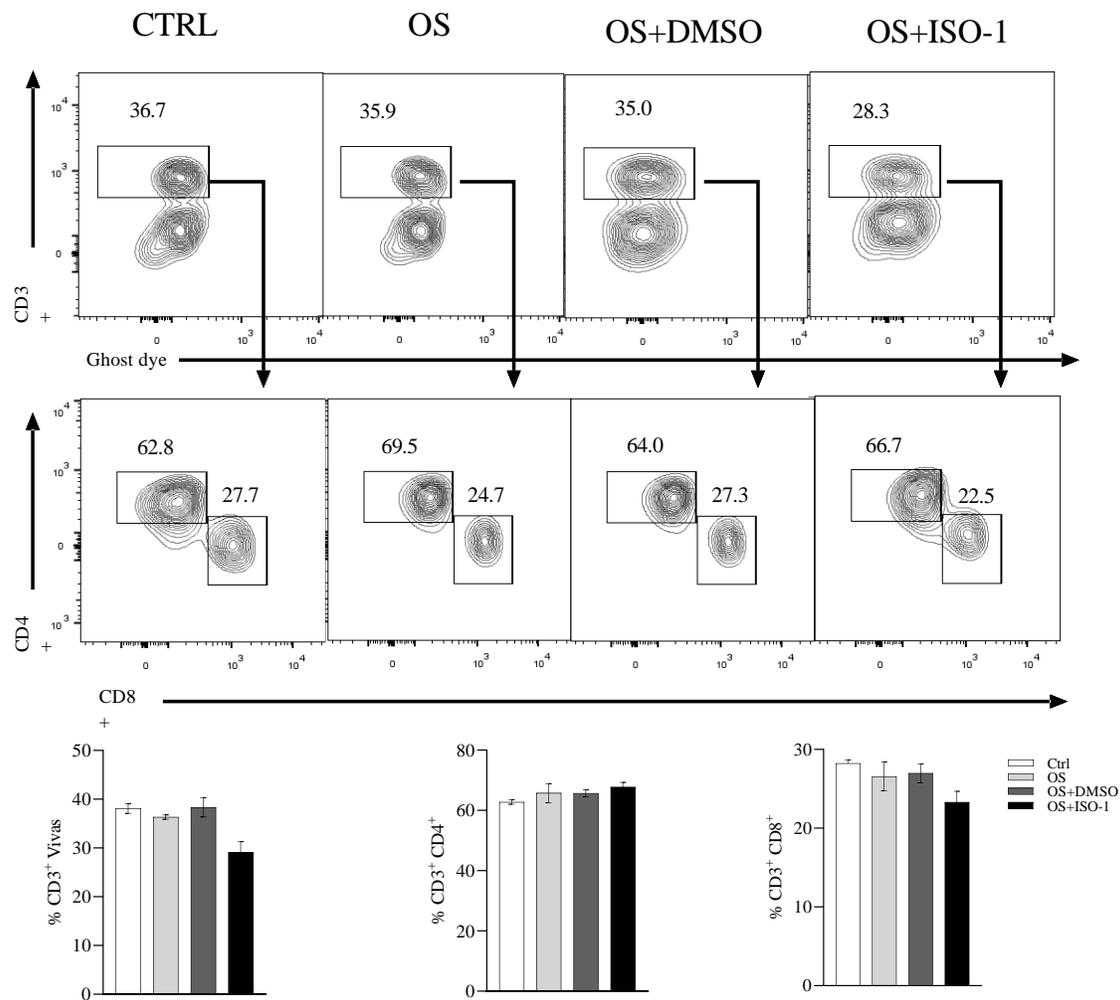


Figura 9. Plots representativos de la citometría de flujo de la selección de linfocitos T de bazo y graficas del porcentaje de viabilidad, linfocitos CD3⁺ CD4⁺ y CD4⁺ CD8⁺. Resultados posteriores a la semana de observación de un experimento N=14. Análisis estadístico ANOVA.

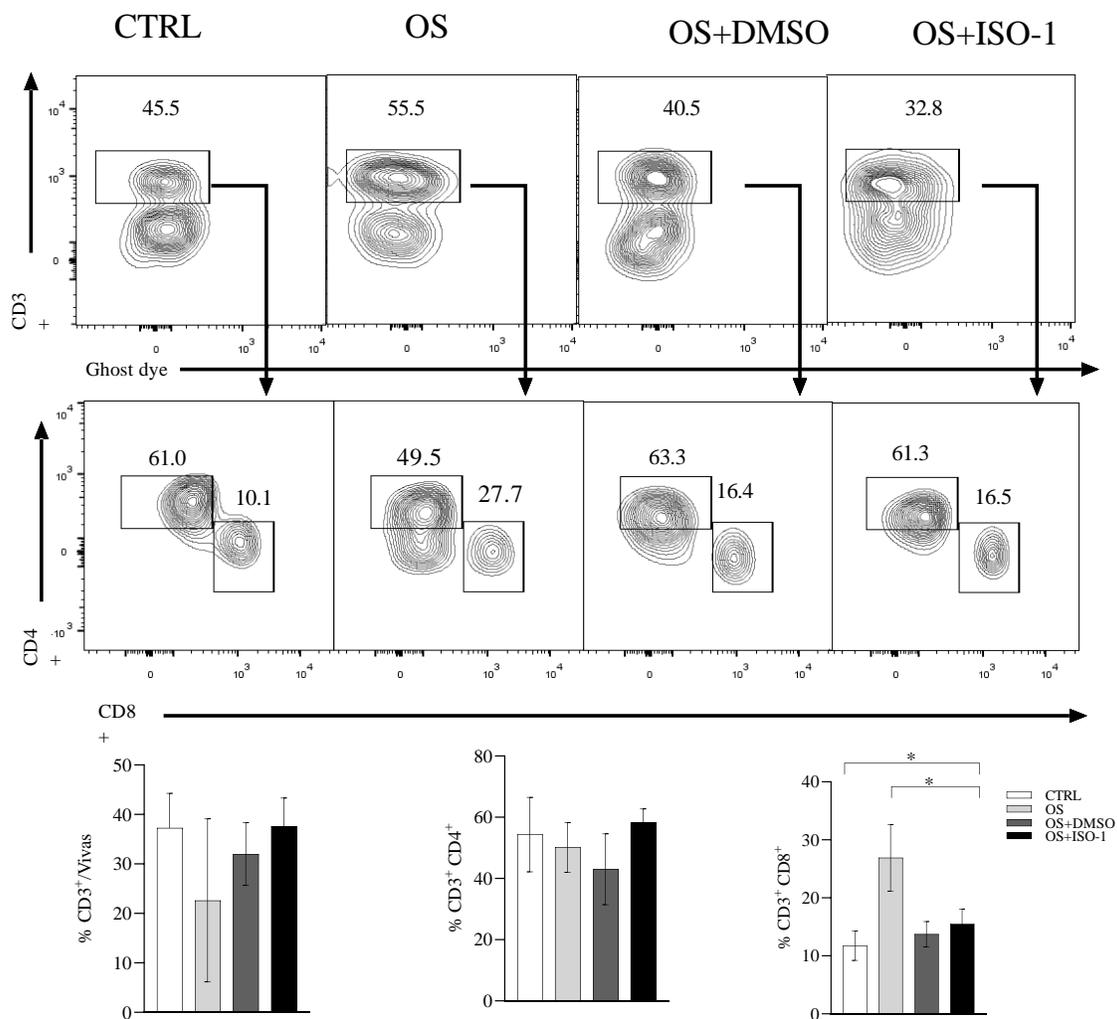


Figura 10. Plots representativos del análisis por citometría de flujo de linfocitos T en ganglio cervical y graficas del porcentaje de viabilidad, linfocitos CD3⁺ CD4⁺ y CD4⁺ CD8⁺ de ratones experimentales. Resultados posteriores a la semana de observación de un experimento N=14 donde * es indicativo de p<0.5 obtenido mediante la prueba de ANOVA.

7.6 Análisis histopatológico de córnea en ratones experimentales

Dado que los procesos inflamatorios crónicos en la superficie ocular causan cambios morfofisiológicos en la córnea, y con ello, disminución de la agudeza visual. Realizamos un análisis histopatológico del ojo derecho de los ratones experimentales. En la figura 11 A, mostramos imágenes representativas de la porción central de la córnea, donde se puede observar los grupos de OS y OS+DMSO presentaron cambios en el espesor del epitelio, desarreglo de las fibras de colágena y pérdida en el número y distribución de queratocitos en comparación a los ratones tratados con ISO-1 en los cuales se conservó significativamente la arquitectura del tejido corneal figuras 11 B y C. Aun cuando es necesario analizar si el uso oftálmico del inhibidor farmacológico de MIF es capaz de modular la expresión otras moléculas implicadas en la fisiología de la córnea, hasta ahora estas observaciones nos sugieren que el uso oftálmico de ISO-1 es una terapia promisoriosa para el manejo de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular como OS.

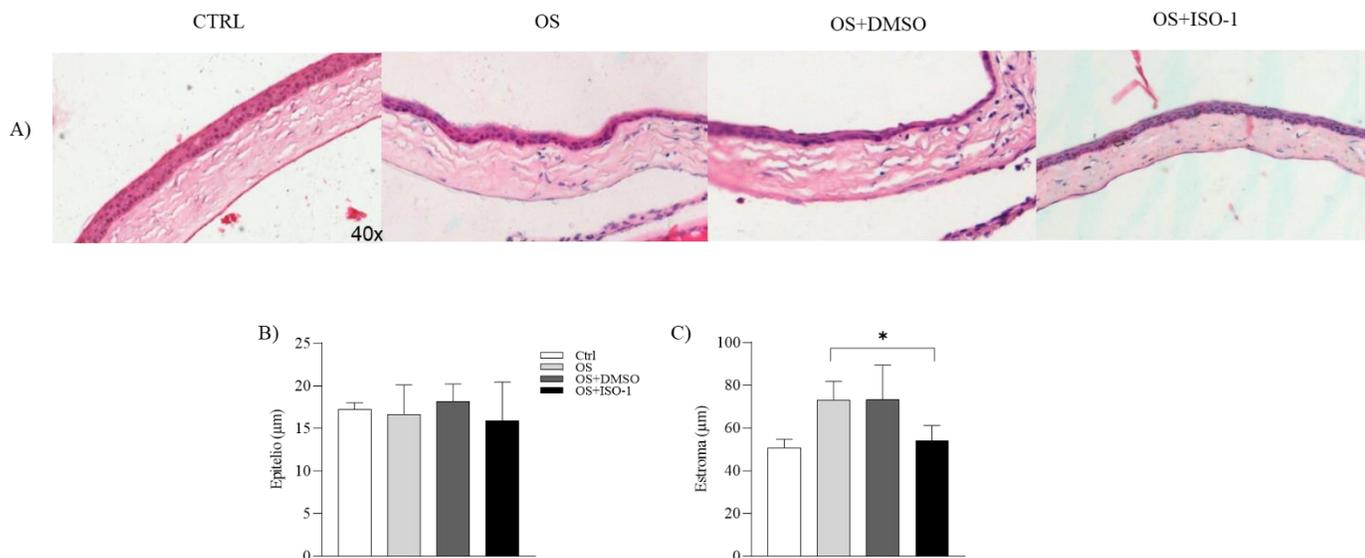


Figura 11. Imágenes representativas del análisis histopatológico de córnea posterior a la semana de recuperación. Resultados de dos experimentos independientes N=26 ratones donde * es indicativo de $p < 0.5$ obtenido mediante la prueba de ANOVA.

8. Discusión

El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por pérdida de la homeostasis de la película lagrimal, se acompaña de síntomas oculares, en los que la inestabilidad, la hiperosmolaridad de la película lagrimal y la inflamación crónica exacerban el daño de la superficie ocular (Craig *et al.*, 2017). El incremento en la osmolaridad de la lágrima promueve la producción de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 y MIF (Calandra & Roger, 2003; Yoon *et al.* 2007; Wilson & Perry, 2007). En las últimas décadas ha incrementado el interés por analizar el papel de MIF en enfermedades inflamatorias oculares, dado que, en condiciones de homeostasis, se expresa de manera constitutiva en distintos tejidos oculares, sugiriendo su participación en el mantenimiento del privilegio inmunológico ocular (Matsuda *et al.* 1997 & Matsuda *et al.* 1996). Pero se ha reportado niveles elevados de esta citocina en lágrima, suero y humor vítreo de pacientes y animales experimentales con OS (Park *et al.* 2007; Ko, *et al.* 2017; Khalfaoui *et al.* 2009; Abu *et al.* 2019; & Zeng *et al.* 2019).

Por tal motivo, a fin de contribuir al entendimiento acerca del papel que tiene MIF en el desarrollo de esta enfermedad. El presente proyecto, se enfocó en evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de MIF en ratones con ojo seco a través de la administración oftálmica de ISO-1. La evaluación de la estabilidad de la película lagrimal mostró que la administración oftálmica de ISO-1, reduce la pérdida del volumen lagrimal, la alteración en el patrón de mucinas y el daño tisular en la córnea, nuestros resultados robustecen las evidencias obtenidas previamente por nuestro grupo de investigación (Rivera *et al.* 2023). Además, estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Kim y colaboradores, estos autores demostraron que la inyección intraperitoneal de ISO-1 redujo la gliosis en un modelo de desprendimiento de retina (Kim *et al.* 2017).

Dado que el proceso inflamatorio crónico subyacente a OS conduce a la pérdida de la transparencia corneal (Chen *et al.* 2023). Analizamos la expresión de moléculas implicadas en el mantenimiento del privilegio inmunológico, el control de la angiogénesis y la pérdida de la matriz extracelular en córnea de los animales experimentales. Dicho análisis reveló que la conservación de la arquitectura de la córnea estuvo relacionada con una mayor expresión de *pedf* y *tgf- β* , y una menor expresión de *mmp-2*, *mmp-9*. La relevancia en la expresión de

las mmp, se fundamenta en los antecedentes, ya que se ha demostrado que en condiciones patológicas la *mmp-2* participa en la remodelación del colágeno y la reparación del estroma, mientras que *mmp-9* favorece la degradación de la membrana basal epitelial facilitando el desarrollo de úlceras corneales (García-López *et al.* 2023). También se ha reportado que lisan una amplia variedad de sustratos, entre los que se incluyen proteínas de unión encargadas de mantener la función del epitelio corneal (Luo *et al.* 2004; Kantarcioglu *et al.* 2022; Sternlicht *et al.* 2001).

Por su parte, la expresión de citocinas proinflamatorias mostró que la administración del inhibidor farmacológico redujo la expresión de TNF- α e IL-1 β . Como se mencionó anteriormente, la expresión de estas citocinas se asocia con la amplificación de la respuesta inflamatoria en OS, dado que promueven la maduración de las APC, participan en la apoptosis celular y la activación de otras poblaciones celulares (Kumar *et al.* 2023) En conjunto, estos procesos celulares inducen daño tisular, que de no ser controlado puede provocar discapacidad visual y ceguera (Ji *et al.* 2017).

Otro hallazgo interesante fue que los ratones tratados tuvieron una mayor expresión de IL-17, IL-22 e IL-23. En particular, IL-17 e IL-23 se han asociado con la inducción de inflamación de la superficie ocular en OS (Chen *et al.* 2022; Li-Ran *et al.* 2019; Zhong *et al.* 2020). En contraste, se sabe que IL-22 es capaz de regular la inflamación y promover la reparación tisular, lo que sugiere un papel protector de esta citocina. Además, se le atribuye una función inmunorreguladora en la supresión de la inflamación de la mucosa inducida por IL-17 en ojo seco, ya que se ha reportado que tanto las células acinares, como las células del sistema inmune ocular son fuente de IL-22 (Ji *et al.* 2016).

Es importante destacar que los ratones tratados con el inhibidor farmacológico ISO-1 tuvieron una menor expresión de IL-6 en comparación con el grupo de OS no tratado. Además, estos últimos, presentaron una baja expresión de TGF- β . Hay evidencia de que la coexistencia de ambas moléculas promueve la diferenciación de células Th17 por lo que estos resultados sugieren que el tratamiento con ISO-1 modula la expresión de moléculas patogénicas implicadas en el desarrollo de OS (Li-Ran *et al.* 2019). También, se ha demostrado que IL-6 contribuye a exacerbar el proceso inflamatorio, ya que incrementa la permeabilidad vascular y estimula la angiogénesis (Funatsu *et al.* 2003 & Feng *et al.* 2018).

En contraste, PEDF es una glicoproteína importante en el mantenimiento del privilegio inmune ocular, ya que ejerce funciones neuroprotectoras, neutróficas, antiangiogénicas, antiinflamatorias y antioxidantes (Kaštelan *et al.* 2020). El análisis de esta molécula en los animales experimentales evidenció una marcada expresión en el grupo tratado con ISO-1. Adicionalmente, encontramos una menor expresión de iNOS, este resultado es interesante, debido a que esta enzima promueve la angiogénesis y la apoptosis (Figuroa-Vega *et al.* 2008). Estas observaciones, son consistentes con otros reportes, donde el control de la neovascularización y el daño tisular está asociado con una menor expresión de IL-6, TGF- β e iNOS (Zahir-Jouzani *et al.* 2017; Sharif & Sharif 2019; Lu *et al.* 2012).

Aunque no estaba contemplado dentro de los objetivos de este proyecto, la sobre expresión de IL-18 observada en el grupo tratado con ISO-1, que, si bien fue menor en comparación con el grupo de OS, aun se expresa en grandes cantidades. Por lo que se sugiere, que la administración oftálmica de ISO-1 no modula la activación del inflamosoma NLRP3 a pesar de que MIF es requerido para la activación de este complejo proteico implicado en la maduración de IL-18 e IL-1 β (Fu & Wu, 2023; Zheng *et al.* 2015).

Considerando los resultados obtenidos del análisis por RT-PCR, el siguiente paso fue cuantificar la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-13 en sobrenadante de conjuntiva, córnea y ganglio cervical cultivados a los 7 días de haber suspendido la inducción de OS y la administración de ISO-1. De manera consistente con los hallazgos en la expresión de transcritos, observamos que ISO-1 redujo sustancialmente o inhibió la producción de TNF- α en córnea y ganglio cervical, respectivamente. Este resultado, explica la menor pérdida del volumen lagrimal y del patrón de arborización de mucinas observada en el grupo tratado. Además, es coherente con reportes previos donde se ha demostrado que niveles elevados de esta citocina resulta en la apoptosis de las células caliciformes y en consecuencia compromete la secreción de mucinas (Zhang *et al.* 2017; Rivera *et al.* 2023).

En el marco teórico mencionamos que las células T tienen un papel relevante en la inmunopatogénesis de OS, en particular las poblaciones Th1 y Th17 (Yoon *et al.* 2007; Wilson y Perry. 2007; Luo *et al.* 2007 y Kalt *et al.* 2010). En este contexto, el análisis del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo, solo mostró un menor porcentaje de CD8⁺ en ganglio cervical de ratones tratados con ISO-1. Aunque no contamos

con la caracterización del fenotipo de dicha población, estos resultados sugieren que estas células pueden estar contribuyendo a la regulación del proceso inflamatorio. Sin embargo, es indispensable conocer si ISO-1 favorece la polarización hacia un fenotipo regulador.

El conjunto de resultados demuestra, que el tratamiento oftalmológico con ISO-1 reduce la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal a través de la modulación del proceso inflamatorio y el daño tisular. Por lo que, este estudio sienta las bases sobre el potencial terapéutico que tiene la inhibición farmacológica de MIF en patologías inflamatorias de la superficie ocular como ojo seco.

9. Conclusión

La administración oftálmica del inhibidor farmacológico ISO-1 reduce la inestabilidad de la película lagrimal y el daño tisular a través de regulación de la expresión y producción de mediadores inflamatorios, factores angiogénicos y enzimas asociadas al estrés oxidativo.

10. Perspectivas

Considerando los resultados de este proyecto y con el objetivo de esclarecer el o los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la administración oftálmica de inhibidor farmacológico de MIF (ISO-1) reduce la inestabilidad de la película lagrimal y el daño tisular, proponemos:

- Analizar por Western Blot si la administración de ISO-1 modula la activación de p30, ERK1/2 y NF- κ B en muestras de córnea y conjuntiva de grupos experimentales.
- Por inmunohistoquímica determinar la presencia o ausencia de glucosaminoglicanos implicados en la homeostasis del estroma corneal.
- Caracterizar por citometría de flujo el fenotipo de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ en ganglio cervical y bazo.

11. Referencias bibliográficas

- Al-Abed, Y. & VanPatten, S. (2011). MIF as a disease target: ISO -1 as a proof-of-concept therapeutic. *Future Science*, 3(1), 45 – 63.
- Abu El-Asrar, AM., Ahmad, A., Siddiquei, MM., De Zutter, A., Allegaert, E., Gikandi, PW., De Hertogh, G., Van Damme, J., Opdenakker, G. & Struy, S. (2019). Proinflammatory and Proangiogenic Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Potential Regulator in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*, doi:10.3389/fimmu.2019.02752. PMID: 31866994; PMCID: PMC6904364
- Aleman, J. & Villar, R. (2003). Oftalmología. Ciencias Médicas.
- Calandra, T. & Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 3(10):791-800. doi: 10.1038/nri1200.
- Calviño, B. (2012). Estudio de la película lagrimal y la superficie conjuntival después de la escisión del pterigión. Universidad Politécnica de Catalunya.
- Calonge, M. (2001). The treatment of dry eye. *Surv Ophthalmol*. 45 Suppl 2: S227-39. doi: 10.1016/s0039-6257(00)00205-8.
- Chen, S., Joven, M. F., Chakravarti, S. & Birk, D. E. (2014). Interclass small leucine-rich repeat proteoglycan interactions regulate collagen fibrillogenesis and corneal stromal assembly. *Matrix Biol*, 35 , 103–111.
- Chen, Y., Wang, S., Alemi, H., Dohlman, T. & Dana, R. (2022). Immune regulation of the ocular surface. *Experimental Eye Research*, 218; doi: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.1090007>.
- Cheng, K. & Al-Abed, Y. (2006). Critical modifications of the ISO-1 scaffold improve its potent inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase activity. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 16, 3376 – 3379. doi:10.1016/j.bmcl.2006.04.038
- Cicik, E., Tekin, H., Akar, S., Ekmekçi, Ö. B., Donma, O., Koldaş, L., & Özkan, Ş. (2003). Interleukin-8, nitric oxide and glutathione status in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic research*, 35(5), 251-255.

Colucci, M., Maione, F., Bonito, M. C., Piscopo, A., Di Giannuario, A. & Pieretti, S. (2008). New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacological Research*, 57, 419 – 425. doi:10.1016/j.phrs.2008.04.004

Coronato, S., Laguens, G., & Di Girolamo, V. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *MEDICINA*, 72, 495 – 502. ISSN 0025-7680.

Corrales, R. M., Galarreta, D. J., Herrera, J. M., Calonge, M. & Chaves, F. J. (2003). Expresión de los genes de mucinas MUC13, MUC15, MUC16 y MUC17 en el epitelio conjuntival normal humano in vivo. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7), 375 – 381.

Craig, J. P., Nichols, K. K., Nichols, J. J., Caffery, B., Dua, H. S., Akpek, E. K., Tsubota, K., Joo, C. K., Liu, Z., Nelson, D. & Stapleton, F. (2017). The ocular surface. *Elsevier*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.008>

Dagia, N. M., Kamath, D. V., Bhatt, P., Gupte, R., D., Dadarkar, S. S., Fonseca, L., Agawal, G., Chetrapal-Kunwar, A., Balachandran, S., Srinivasan, S., Bose, J., Pari, K., B-Rao, C., Parkale, S. S., Gadekar, P. K., Rodge, A. H., Mandrekar, N., Vishwakarma, R. A. & Sharma, S. (2009). A fluorinated analog of ISO-1 blocks the recognition and biological function of MIF and is orally efficacious in a murine model of colitis. *European Journal of Pharmacology*, 607, 201 – 212. doi:10.1016/j.ejphar.2009.02.031

Daneshmandi, S. Pourfathollah, A. A., Karimi, M. H., Emadi-Baygi, M. (2015). PDL-1/PDL-2 blockade in mice dendritic cells by RNAi techniques to induce antitumor immunity. *Immunotherapy*, 7(11):1145-58. doi: 10.2217/imt.15.80. PMID: 26599163.

Denko, C. W., Goodman, R. M., Miller, R. & Donovan, T. (1967). Distribution of dimethyl sulfoxide-35S in the rat. *Ann NY Acad Sci*, 141, 770–84

Daza, L. C., Sánchez, R. H., Márquez, M. L. & Baarrios, J. J. (2022). Reproducibilidad de la escala de Masmali en la valoración de la calidad lagrimal. *Revista UstaSalud*, 1(21) 1 – 8.

De la Torre, A. & Nuñez, M. X. (2002). Inmunología ocular: síndrome de ojo seco. *Colombia Medica*, 33(3), 113 – 122.

De Paiva, C. S., Villarreal, A. L., Corrales, R. M., Rahman, H. T., Chang, V. Y., Farley, W. J., Stern, M. E., Niederhorn, J. Y., Li, D. Q., & Pflugfelder, S. C. (2007). Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon- γ . *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(6), 2553-2560.

De Paiva, C., Chotikavanich, S., Pangelinan, S. B., Pitcher Iii, J. D., Fang, B., Zheng, X., Ma, P., Farley, W. J., Siemasko, K. F., Niederhorn, J. Y., Stern, M. E., Li, D. Q. & Pflugfelder, S. C. (2009). IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal immunology*, 2(3), 243-253.

Denkinger, C. M., Denkinger, M., Kort, J. J., Metz, C., & Forsthuber, T. G. (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. *Immunol.* 170(3):1274-82. doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1274.

Ji, Y. W., Mittal, S. K., Hwang, H. S., Chang, E. J., Lee, J. H., Seo, Y., Yeo, A., Noh, H., Lee, H. S., Chauhan, S. K & Lee, H. K. (2017). Lacrimal gland-derived IL-22 regulates IL-17-mediated ocular mucosal inflammation. *Mucosal Immunology*, 10(5); doi: <https://doi.org/10.1038/mi.2016.119>.

Elisia, I., Nakamura, H., Lam, V., Hofs, E., Cederberg, R., Cait, J., Hughes, M. R., Lee, L., Jia, W., Adomat, H. H., Guns, E. S., McNagny, K. M., Samudio, I. & Krystal, G. (2016). *Plos one*, 1 – 24. DOI:10.1371/journal.pone.0152538

Feng, S., Yu, Y., Geng, Y., Li, D., Yang, C., Lv, Q., Lu, L., Liu, T., Li, G., Yuan, L. (2018). Levels of Inflammatory Cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, and TNF- α IN Aqueous Humour of Patients with Diabetic Retinopathy. *J Diabetes Res*. doi:10.1155/2018/8546423. PMID: 29850610; PMCID: PMC5904804

Fraga, E. (2019). Cambios en las mucinas, células Goblet y citoquinas en condiciones de ojo seco. *Gaceta de Optometría*. (552), 40 – 48.

Figueroa-Vega, N., Majano, P., Larrañaga, E., Bravo, J., Rodríguez-Ramos, R., González-Amaro, R. & Marazuela, M. (2008). Expresión de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible

en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias. *Endocrinología y nutrición*, 55(8), DOI: 10.1016/S1575-0922(08)72794-3

Fu, J., & Wu, H. (2023). Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annu Rev Immunol*, 26;41:301-316. doi: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207.

Funatsu, H., Yamashita, H., Ikeda, T., Mimura, T., Eguchi, S. & Hori, S. (2003). Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. doi:10.1016/S0161-6420(03)00568-2.PMID:13129863

Gálvez, J. F., Lou, M. J. & Andreu, E. (1998). Ojo seco: diagnóstico y tratamiento. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(5), 117 – 122.

García-López, C., Rodríguez-Calvo-de-Mora, M., Borroni, D., Sánchez-González, J. M., Romano, V., Rocha-de-Lossada, C. (2023). The role of matrix metalloproteinases in infectious corneal ulcers. *Surv Ophthalmol*, Doi: 10.1016/j.survophthal.2023.06.007. PMID: 37352980.

Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. (2002). *Texto Atlas de Histología*. Mc Graw Hill.

Ginés, J. C. (2015). Síndrome del ojo seco. *Revista Paraguaya de Reumatología*, 1(1), 49 – 55.

Graue, E. (2009). *Oftalmología en la práctica de la medicina general*. Mc Graw Hill.

Hachana, S. & Larrivé, B. (2022). TGF- β Superfamily Signaling in the Eye: Implications for Ocular Pathologies. *Cells*, 11(15). doi: 10.3390/cells11152336. PMID: 35954181; PMCID: PMC9367584.

Hollebeeck, S., Rass, T., Piront, N., Schneider, Y. J., Toussaint, O., Larondelle, Y. & During, A. (2011). Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model. *Toxicology Letters*, 206, 268 – 275. doi:10.1016/j.toxlet.2011.08.010

Horwath, J., Ettinger, K., Bachernegg, M., Bodner, E. & Schmut, O. (2001). Ocular Ferning test – effect of temperature and humidity on tear Ferning patterns. *Ophthalmologica*, 215(2), 102 – 107.

Huang, S., Wu, C., Chen, S., Sytwu, H. & Lin, G. (2020). Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide. *Immunobiology*, 1 – 6. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151906>.

Jacob, S. W. & Herschler, R. (1986). Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*. 23, 14–27.

Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A., Mizoguchi, E., Metz, C. N., Alsahli, M., Hove, T., Keates, A. C., Lubetsky, J. B., Farrell, R. J., Michetti, P, van Deventer, S. J., Lolis, E., David, J. R., Bhan, A. K., Terhorst, C. (2001). Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol*. 2(11):1061-1066. doi: 10.1038/ni720.

Kalt, W., Hanneken, A., Milbury, P. y Tremblay, F. (2010). Investigaciones recientes sobre los polifenoles en la visión y la salud ocular. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 58(7), 4001-4007.

Kantarcioglu, B., Darki, A., Siddiqui, F., Krupa, E., Mehmet, M. D., Murat, M. D., Hoppensteadt, P., Iqbal, O., Jeske, W., Walenga, J., Adiguzel, C. & Fareed, J. (2022). Predictive role of blood cellular indices and their relationship with endogenous glycosaminoglycans as determinants of inflammatory biomarkers in pulmonary embolism. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 28. doi: 10.1177/10760296221104801.

Kim, MH. & Lim, SH. (2022). Matrix metalloproteinases and Glaucoma. *Biomolecules*, 12(10), <https://doi.org/10.3390/biom12101368>

Khalfaoui, T., Lizard, G., Beltaief, O., Colin, D., Ben HJ., Errais, K., Ammous, I., Zbiba, W., Tounsi, L., Zhioua, R., Anane, R., Ouertani-Meddeb, A. (2009). Immunohistochemical analysis of cellular adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and VEGF in fibrovascular membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy: preliminary study. *PatholBiol*, doi:10.1016/j.patbio.2008.07.021

Kubo, E., Shibata, S., Shibata, T., Sasaki, H. & Singh, D.P. (2022). Role of Decorin in the Lens and Ocular Diseases. *Cells*, 12(1):74. doi: 10.3390/cells12010074. PMID: 36611867; PMCID: PMC9818407.

Kaštelan, S., Orešković, I., Bišćan, F., Kaštelan, H. & Gverović, A. (2020). Inflammatory and angiogenic biomarkers in diabetic retinopathy. *Biochem Med (Zagreb)*, 30(3). doi: 10.11613/BM.2020.030502.

Ko, J. A., Sotani, Y., Ibrahim, D. G., Kiuchi, Y. (2017). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the effects of oxidative stress on human retinal pigment epithelial cells. *Cell Biochem Funct.* 35(7):426-432. doi: 10.1002/cbf.3292.

Kolb, K. H., Janicke, G., Kramer, M., Schulze, P. E. & Raspe, G. (1967). Absorption, distribution and elimination of labelled dimethyl sulfoxide in man and animals. *Ann NY Acad Sci*, 141, 85–95.

Kumar, N. R., Praveen, M., Narasimhan, R., Khamar, P., D'Souza, S., Sinha-Roy, A., Sethu, S., Shetty, R. & Ghosh, A. (2023). Tear biomarkers in dry eye disease: Progress in the last decade. *Indian J Ophthalmol*, 71(4):1190-1202. doi: 10.4103/IJO.IJO_2981_22.

Lee, H.S., Amouzegar, A., Dana, R. (2017). Kinetics of Corneal Antigen Presenting Cells in Experimental Dry Eye Disease. *BMJ Open Ophthalmol.* 29(1). doi: 10.1136/bmjophth-2017-000078

Li-Ran, H., Xiao-Feng, L., Chong, G., Lei, C., Zi-Yan, H. & Hong, G. (2019). Th17/Treg cell level and clinical characteristics of peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome complicated with primary biliary cirrhosis. *Medicine* 98(24): DOI: 10.1097/MD.00000000000015952

Luo, L., Li, D. Q., & Pflugfelder, S. C. (2007). Hyperosmolarity-induced apoptosis in human corneal epithelial cells is mediated by cytochrome c and MAPK pathways. *Cornea*, 26(4), 452-460.

Lu, P., Li, L., Liu, G., Baba, T., Ishida, Y., Nosaka, M., Kondo, T., Zhang, X. & Mukaida, N. (2012). Critical role of TNF- α -induced macrophage VEGF and iNOS production in the

experimental corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53(7). doi: 10.1167/iovs.10-5548. PMID: 22570350.

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. *Immunol Lett.* 53(1):1-5. doi: 10.1016/0165-2478(96)02600-4.

Mejía, A. T. (2023). Prueba de Ferning y Meibografía como herramientas de diagnóstico en superficie ocular. *Ciencia Unisalle.* <https://ciencia.lasalle.edu.co/optometria/1933>

Mendoza – Aldaba, I. I. & Fortoul, T. I. (2021). Síndrome de ojo seco. Una revisión de la literatura. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM,* 64(5), 46 – 54.

Mora, M. A., Bernal, J. D. & Paneso, J. E. (2016). Anatomía quirúrgica del ojo: Revisión anatómica del ojo humano y comparación con el ojo porcino. *Morfología,* 8(3), 21 – 44.

Narayanan, S., Miller, W. L., & McDermott, A. M. (2006). Conjunctival cytokine expression in symptomatic moderate dry eye subjects. *Investigative ophthalmology & visual science,* 47(6), 2445-2450.

Neill, T., Schaefer, L. & Iozzo, R.V. (2012). Decorin: A guardian from the Matrix. *Am. J. Pathol,* 181, 380–387

Ohkawara, T., Okubo, N., Maehara, O., Nishihira, J. & Takeda, H. (2021). Protective effect of ISO-1 with inhibition of RIPK3 up-regulation and neutrophilic accumulation on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicology Letters,* 339, 51 – 59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.12.015>

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. *Biol Chem.* 275(1):444-50. doi: 10.1074/jbc.275.1.444.

Park, CY., Zhuang, W., Lekhanont, K., Zhang, C., Cano, M., Lee, WS., Gehlbach, PL, & Chuck, RS. (2007). Lacrimal gland inflammatory cytokine gene expression in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model. *Mol Vis.* 29;13:2222-32.

- Park, S., Jung, S.E., Jin, H., Kim, S.J., Ryu, Y., Lee, K.J., Kim, B., Shin, H.J. & Won, K.J. (2021). Bioluminescence Imaging of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Activities in Ethanol-injured Cornea of mince. *In Vivo*, 35(3):1521-1528. doi: 10.21873/invivo.12405. PMID: 33910830; PMCID: PMC8193309.
- Pérez, A., Suárez, I., Zazo, R. M., González, J. & Batista, M. (2022). Enfermedad del ojo seco. *Revista Cubana de Oftalmología*, 35(3), 1 – 14.
- Pflugfelder SC., Jones D., Ji Z., Afonso A. & Monroy D. (1999). Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.*, 19(3), 201-11. doi: 10.1076/ceyr.19.3.201.5309.
- Rivera, L.A., Hernández, P.E., Vannan, D.T., Reyes, J.L., Rodríguez, T., Sánchez-Barrera, Á., González, M.I., Bustos, J., Ramos, O. A., Juárez, I., Rodríguez-Sosa, M., & Vázquez, A. (2023). Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a Key Player in Dry Eye Disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 21:1-15. doi: 10.1080/09273948.2023.2290624.
- Rodríguez, M. F. (2005). El síndrome de ojo seco: ¿un proceso inflamatorio crónico? *Cienc Tecnol Salud Vis Ocul.*, 3(4), 47-52.
- Sharif, Z & Sharif, W. (2019). Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. *Rom J Ophthalmol.* 63(1). PMID: 31198893; PMCID: PMC6531773.
- Seen S, Tong L. Dry eye disease and oxidative stress. *Acta Ophthalmol.* 2018;96(4):e412–e420. doi:10.1111/aos.13526.
- Stern, M. E., Beuerman, R. W., Fox, R. I., Gao, J., Mircheff, A. K., & Pflugfelder, S. C. (1998). The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea*, 17(6), 584-589.
- Sternlicht, M. D., Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:463–516.

Sun, Z., Lu, K., He, Q., Tang, Y., Li, H., Pazo, EE., Hu, L. & Wei, R. (2024). INOS ablation promotes corneal wound healing via activation of Akt signaling. *Experimental Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109886>

Tseng, S. (1999). Visión integrada y nuevas perspectivas de las enfermedades lagrimales y de la superficie ocular. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 1-26.

Tsui, M. C., Liu, H.Y., Chu, H.S., Chen, W.L., Hu, F.R., Kao, W.W. & Wang, I.J. (2023). The versatile roles of lumican in eye diseases: A review. *Ocul Surf*, 29:388-397. doi: 10.1016/j.jtos.2023.06.012. PMID: 37327869.

Willeke, P., Gaubitz, M., Schotte, H., Maaser, C., Domschke, W., Schlüter, B. & Becker, H. (2007). Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 9(2), doi: 10.1186/ar2182

Wilson, S. E., & Perry, H. D. (2007). Long-term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. *Ophthalmology*, 114(1), 76-79.

Woo, Y., Mittal, SK., Hwang, HS., Chang, EJ., Lee, JH., Seo, Y., Yeo, A., Noh, L., Lee, HS. Chauhan, SK., Lee, HK. (2017). Lacrimal gland-derived IL-22 regulates IL-17 mediated ocular mucosal inflammation. *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/mi.2016.119.

Yoon, K. C., Jeong, I. Y., Park, Y. G., & Yang, S. Y. (2007). Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Levels in Tears of Patients With Dry Eye Syndrome. *Cornea* 26(4), 431- 437. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31803dcda2

Zahir-Jouzdani, F., Atyabi, F. & Mojtabavi, N. (2017). Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiology*, 24(3). doi: 10.1016/j.pathophys.2017.05.005. PMID: 28629694.

Zeng, Y.,Cao, D., Yu, H., Hu, Y., He, M., Yang, D., Zhuang, X., Zhang, L. (2019). Comprehensive analysis of vitreous humor chemokines in type 2 diabetic patients with and without diabetic retinopathy. *Acta Diabetol*. doi: 10.1007/s00592-019-01317-6. PMID: 30911832.

Zhang, X., Chen, W., De Paiva, C. S., Volpe, E. A., Gandhi, N. B., Farley, W. J., Li, D. Q., Niederkorn, J. Y., Stern, M. E. & Pflugfelder, S. C. (2011). Desiccating stress induces CD4+ T-Cell-mediated Sjögren's syndrome-like corneal epithelial apoptosis via activation of the extrinsic apoptotic pathway by interferon- γ . *The American journal of pathology*, 179(4), 1807-1814.

Zhang, X., Jeyalatha, V., Qu, Y., He, X., Ou, S., Bu, J., Jia, C., Wang, J., Wu, H., Liu, Z. & Li, W. (2017). Dry Eye Management: Targeting the Ocular Surface Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(7), 1398; <https://doi.org/10.3390/ijms18071398>.

Zheng, Q., Yueping, R., Reinach, P., Bing, X., Huihui, L., Yirui, Z., Jia, Q. & Wei, C. (2015). Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. *Experimental Eye Research*, 134; <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.013>

Zhong, Z., Su, G., Kijlstra, A. & Yang, P. (2021). Activation of the interleukin-23/interleukin-17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis. *Prog Retin Eye Res.* 80:100866. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100866.

12. Apéndices

12.1 Apéndice 1: Buffer TBE

- Tris base (890mM) (Sigma-Chemicals).
- Ácido bórico (890mM) (J.T Baker).
- 40 ml de 0.5 M de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico (J.T Baker).
- Se ajusta el pH a 8.0 y se afora a 500ml con agua destilada.

12.2 Apéndice 2: PBS 10x y pH de 7.4

- 80 g Cloruro de sodio (NaCl) (J. T Baker)
- 2 g Fosfato de sodio monobásico (KH₂PO₄) (J. T Baker)
- 11.6 g Fosfato de disodio (Na₂HPO₄) (J. T Baker)
- 2 g Cloruro de potasio (KCl) (ICN Biomedicals Inc)

12.3 Apéndice 3: PBS-Tween

- 0.5 ml de Tween 20 en 1 L de PBS

12.4 Apéndice 4: Blocking buffer (solución de bloqueo)

- 100 ml de PBS más 1% de albumina sérica bovina (ASB)

12.5 Apéndice 5: Fijador de Zinc

- 2.12 g Tris base
- 0.1 g Acetato de calcio (C₄H₆CaO₄)
- Mezclar en 160 ml de agua destilada
- Ajustar pH 7.4
- 1 g Acetato de zinc (Zn (CH₃COOO)₂ (H₂O)₂)
- 1 g Cloruro de zinc (ZnCl₂)

12.6 Apéndice 6: Tren de tinción H&E

Solvente	Tiempo
Xilol I	1 minuto
Xilol II	1 minuto

Alcohol 100%	5 minutos
Alcohol 90%	5 minutos
Alcohol 80%	5 minutos
Alcohol 70%	5 minutos
Agua de la llave	5 minutos
Hematoxilina	3 minutos
Agua de la llave	5 minutos
Alcohol ácido	30 segundos
Agua de la llave	10 segundos
Agua amoniacal	30 segundos
Agua destilada	5 minutos
Eosina	1.5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Alcohol 96%	1 minuto
Alcohol 100%	1 minuto
Xilol	5 minutos
Montaje	