



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**CARRERA DE OPTOMETRÍA**

“Participación de MIF en la expresión de moléculas inflamatorias en la  
superficie ocular de ratones con Ojo seco”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN OPTOMETRÍA

PRESENTA

Arturo Aguilar Garduño

Directora de Tesis: Dra. Alicia Vázquez Mendoza



Tlalnepantla de Baz, 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.

## Abreviaturas

- ACAID - Desviación inmunológica asociada a la cámara anterior
- $\alpha$ -MSH - Hormona estimulante de los melanocitos alfa
- BTX - Toxina Botulínica B
- CALT - Tejido linfoide asociado a conjuntiva
- EALT - Tejido linfoide asociado a ojo
- EPR - Epitelio pigmentado de retina
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogeno
- IL – Interleucina
- IFN- $\gamma$  – Interferón gamma
- LDALT – Tejido linfoide asociado a drenaje nasolagrimal
- MD - Degeneración macular
- MHC II – Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
- MIF – Factor inhibidor de la migración de macrófagos
- Mif<sup>-/-</sup> - Deficientes para MIF
- MMP – Metaloproteinasa
- M $\phi$  - Macrófagos
- MUC - Mucina
- PDL-1 – Ligando de muerte programada 1
- PL – Película Lagrimal
- SO – Superficie Ocular
- TGF- $\beta$  - Factor de crecimiento transformante beta
- TLR – Receptor tipo toll
- TNF- $\alpha$  – Factor de necrosis tumoral alfa
- VCAID - Desviación inmunológica asociada a la cámara vítrea
- VIP – Péptido intestinal vasoactivo
- VRP - Vitrorretinopatía proliferativa
- WT - Silvestres
- Fe – Hierro

- IgA – Inmunoglobulina A
- pDC - Células dendríticas plasmacitoides
- Treg – Linfocitos T reguladores
- CRGP - Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- APC – Célula presentadora de antígeno
- MAPK – Proteína cinasa activada por mitógenos
- PEDF - Factor derivado del epitelio pigmentario
- TSP-1 – Trombospodina 1
- TFOS – Sociedad de la película lagrimal y superficie ocular
- DEWS – Taller internacional sobre el ojo seco
- FESI - Facultad de Estudios Superiores Ixtacala
- OSDI – Índice de enfermedad de la superficie ocular
- CXCL – Ligando de quimiocinas
- CXCR – Receptor de quimiocinas
- VCAM – Molécula de adhesión a células vasculares
- ICAM – Molécula de adhesión intracelular
- Sx – Síndrome

## Agradecimientos

Es complicado poder plasmar en palabras la culminación de un camino tan largo, estresante y de cierto modo confuso, particularmente me es difícil expresar mi gratitud hacia todas las personas que aportaron, aunque sea un pequeño granito de arena a mi formación y desempeño como persona y profesional, sin embargo, creo necesario dedicar unas palabras a aquellos individuos que fueron de vital importancia e influencia en mi vida académica.

A mi madre, quien siempre supo brindarme su cálida compañía, inclusive en mis peores momentos, uno de los principales pilares de mi vida que fundamento las bases de quien es este ser humano hoy en día. No tienes una idea de toda la admiración que siento por ti, agradezco a la vida por permitirme compartir más tiempo contigo y te agradezco tanto por no rendirte jamás, a pesar de todos los contratiempos vividos, siempre tuviste la disposición de seguir aquí y nunca abandonar esa lucha, esto es por ti Perita.

Para el viejito con quien siempre batallo por compartir el mismo carácter, quien a pesar de todas las carencias que la vida le puso, siempre se esmeró por darnos lo mejor y que nunca nos faltara nada. Por toda tu sabiduría que en algunos momentos fue aceptada a regañadientes, esa guía que siempre supo la manera de enderezar hasta el camino más chueco, la persona de carácter inquebrantable. Te agradezco la paciencia y el amor que me brindaste en este proceso, a pesar de que por momentos todo parecía turbio siempre creíste en mí, infinitas gracias Pa.

A quien considero la persona más importante de mi vida, aquel pequeño engendro que desde niños me seguía a todos lados por pena. Esto es para ti Axel, no idealizas lo importante que fuiste en este proceso, todas las noches en las que lograbas calmar mi ansiedad con una simple y calurosa platica, mi pequeño cómplice y adoración en esta y todas las vidas que me restan, me llena de tanto orgullo poder decirme tu hermano, definitivamente me hubiera vuelto loco sin tu presencia, por eso y más cosas, gracias por siempre estar.

Evidentemente no podía omitir a quien llena de felicidad mi vida, mi bebé hermoso Calvin, quien jamás me abandono en aquellas noches en vela redactando esto, definitivamente

jamás sabrás lo agradecido que estoy contigo, pero tratare de darte la mejor de las vidas para que sientas la misma felicidad que siento yo desde tu llegada.

Para aquella persona que a pesar de que siempre me veía “dormido” o “distráido” en sus clases, creyó en el potencial que tenía como persona y profesional, por saberme guiar con sus peculiares, pero extrañamente efectivos métodos. Espero la vida me alcance para poder regresarle todo lo que me ha dado y hacer que se sienta orgullosa de quien formo como alumno.

A quien me enseñó todo lo relacionado con el Lab, por toda la paciencia que empleo en aquellas tardes de enseñanza y clases improvisadas en la puerta del cuarto de cultivo, mil gracias Doc.

Para aquellos que siempre supieron hacerme sentir incluido de la mejor manera en el Lab, por todo el conocimiento que me brindaron, aquellas tardes de basket, convivencias, festejos, conciertos y “seminarios”. Miles de gracias Doc y Mari.

A la que me demostró que en esta vida no hay coincidencias, me tome la libertad de modificar algo que en algún momento me dijiste, por todo lo extraño, lo bueno y lo bonito, tal vez en una de nuestras futuras 7 vidas sí.

Para aquellos amigos que estimo como si fueran hermanos (Cesar, Ana, Karina, Uriel, Karen, Alejandro, Jorge, Paquito, Karla, Yana, Moni), gracias por brindarme su compañía en todo momento.

A mis primos con los que comparto miles de recuerdos de todas nuestras aventuras, aquellas tardes/noches de camino en el Gol, las miles de fiestas y buenos momentos vividos a su lado.

Por último, a todo aquel que supo aportar de manera positiva a mi vida, dejándome una enseñanza y fomentando mi crecimiento, mil gracias a todos ustedes.

¡Es con fe!

# Índice

PORTADA.....	1
1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	10
2.1. Anatomía ocular.....	10
(a) Estructuras externas o accesorias.....	10
(b) Estructuras internas.....	10
2.2 Estructura de la superficie ocular.....	11
(a) Córnea.....	12
(b) Conjuntiva.....	13
(c) Película lagrimal.....	13
2.3 Homeostasis de la superficie ocular.....	16
(a) Componentes de la película lagrimal.....	16
(b) Células caliciformes y tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT): .....	17
(c) Avascularidad en la córnea: .....	17
(d) Epitelio corneal: .....	18
2.4 Definición y clasificación de ojo seco.....	20
2.5 Prevalencia de Ojo seco.....	21
2.6 Cuadro clínico.....	22
2.7 Diagnóstico y tratamiento.....	22
2.7.1 Diagnóstico.....	22
2.7.2 Tratamiento .....	23
2.8 Inflamación y Ojo seco.....	26
2.9 Biología del factor inhibidor de la migración de macrófagos.....	26
2.10 MIF en tejidos Oculares.....	28
3. Objetivos.....	30
3.1 General.....	30
3.2 Particulares.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Materiales y métodos.....	32
5.1 Animales Experimentales.....	32
5.2 Genotipo de los animales experimentales.....	32

5.2.1 Obtención de DNA genómico.....	32
5.2.2 Amplificación del gen.....	33
5.2.3 Electroforesis.....	34
5.3 Inducción del modelo de ojo seco.....	34
5.4 Cuantificación del volumen lagrimal.....	34
5.5 Cuantificación del número de células epiteliales en conjuntiva.....	34
5.6 Evaluación del patrón de arborización de mucinas conjuntivales.....	35
5.7 Análisis de la expresión de transcritos en córnea y conjuntiva.....	35
5.7.1 Extracción de RNA.....	36
5.7.2 Obtención de cDNA.....	36
5.7.3 Amplificación de cDNA.....	37
5.8 Análisis histopatológico de córnea.....	38
6. Resultados.....	39
6.1 Determinación del genotipo.....	39
6.2 Cuantificación del volumen lagrima.....	40
6.3 Cuantificación del número de células epiteliales.....	41
6.4 Determinación del patrón de arborización de mucinas.....	42
6.5 Expresión de transcritos de córnea y conjuntiva.....	43
6.6 Análisis histológico de córnea.....	44
7. Discusión.....	46
8. Conclusión.....	48
9. Perspectivas.....	49
10. Referencias.....	50
11. Anexos.....	61

# 1. Resumen

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina inflamatoria involucrada en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias, entre las que se incluyen patologías oculares como la uveítis y la vitreorretinopatía. Sin embargo, la información acerca de su papel en el desarrollo de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular como ojo seco (OS) es escasa. Con el objetivo de conocer la participación de MIF en el OS, empleamos ratones de la cepa BALB/c, machos de 7 semanas de edad, de los cuales un grupo era silvestre (WT) y otro grupo era deficientes para MIF (*Mif*<sup>-/-</sup>). Inducimos la patología mediante la administración subcutánea de 0.5 mg de escopolamina, tres veces al día por 21 días, seguido de una fase de recuperación con un periodo de 7 días, una vez concluido este, se realizó la eutanasia de nuestros modelos experimentales. Con el fin de evaluar la estabilidad de la película lagrimal (PL) frente a la ausencia de MIF se realizaron diversas pruebas clínicas a los días 0, 7, 14, 21 y en la fase de recuperación, pruebas que nos permitieron conocer la producción de volumen lagrimal (Schirmmer Test), determinar el patrón de arborización de mucinas (Ferning Test) y el número de células epiteliales conjuntivales (Citología de impresión). Una vez realizada la eutanasia, se procedió a enuclear ambos ojos de nuestros modelos experimentales, en donde utilizamos el ojo derecho para realizar un análisis histopatológico de la córnea de nuestros ratones. El ojo izquierdo fue disectado y dividido en córnea y conjuntiva con el objetivo de revisar la expresión de transcritos de citocinas inflamatorias, antiinflamatorias y enzimas.

La evaluación de la estabilidad de la PL evidenció que los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> tuvieron una menor pérdida de: volumen lagrimal, número de células epiteliales y del patrón de arborización de mucinas en comparación con el grupo WT. Además, el análisis histológico de córnea mostró un menor daño histopatológico del epitelio y del estroma corneal en los ratones *Mif*<sup>-/-</sup>. Interesantemente, estos hallazgos se asociaron con la coexpresión de transcritos de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en córnea y conjuntiva, así como una menor expresión de las enzimas *inos* y *nox4*, ambas involucradas en el estrés oxidativo y daño tisular.

En conjunto, nuestros resultados demostraron que la ausencia de MIF favorece la pérdida de la estabilidad de la superficie ocular, mediante una mayor producción lagrimal, un mayor número de células epiteliales, un patrón de arborización normal (de tipo I o II) y a través de la expresión de mediadores inflamatorios en córnea y conjuntiva.

Palabras clave: Inflamación, Ojo Seco, Película Lagrimal, Superficie Ocular, MIF, Salud Ocular Inflamación

Este proyecto fue apoyado por Programa de Apoyo Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA- UNAM-PAPIIT TA200118, DGAPA-UNAM-PAPIIT IN226220 y el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) FICDTEM-20

## 2. Introducción

### Anatomía ocular

El ojo es un órgano sensorial, especializado en la recepción y procesamiento de energía proveniente de la luz del entorno, para generar potenciales de acción en células nerviosas especializadas, los cuales son transportados a través del nervio óptico con el objetivo de interpretar y formar una imagen visual [1, 2].

Dicho órgano se encuentra compuesto de diversos tejidos, por los cuales atraviesa la luz del exterior permitiendo así realizar su función biológica. Anatómicamente puede dividirse en estructuras accesorias o externas y en estructuras internas, particularmente las estructuras internas están divididas en 3 capas principales con subdivisiones compuestas por diversos tejidos:

### Estructuras externas o accesorias

Conformada por los párpados, pestañas, la conjuntiva, la PL y diversas glándulas encargadas de la secreción de sus componentes (Zeiss Krause, Wolfring, lagrimal, Meibomio).

#### a) Estructuras internas

**Capa anterior:** Constituida por un tejido conectivo laxo denominado esclerótica, y un tejido conectivo transparente y avascular conocido como córnea. En conjunto, las estructuras internas de la capa y las estructuras accesorias constituyen la superficie ocular (SO).

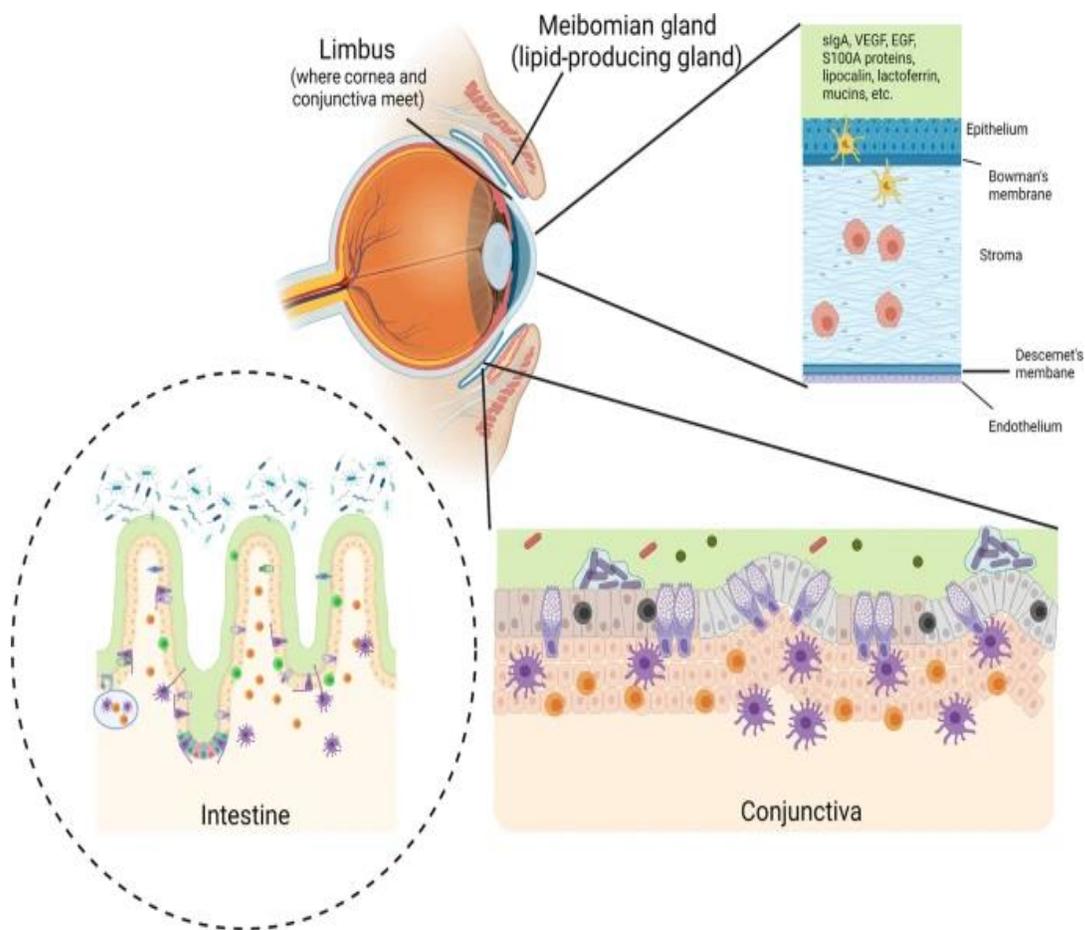
**Capa media:** Tiene la función de brindar vasculatura y nutrición al globo ocular, consta del humor acuoso, el iris, cristalino, procesos ciliares, cuerpo ciliar, zónulas y coroides.

**Capa interna:** Conocida como capa sensorial, conformada por la retina, la cual se subdivide en una capa de células fotorreceptoras (células nerviosas de primer orden), células ganglionares (células de segundo orden) y elementos neurogliales

de la retina. Y una capa externa delgada denominada epitelio pigmentario de la retina [3].

### Estructura de la superficie ocular

La superficie ocular (SO) está ubicada en la parte más externa del ojo, está formada por diversos tipos de epitelios los cuales funcionan como barrera física contribuyendo a preservar su integridad y función como medio refringente, permitiendo el enfoque de los rayos de luz en la retina. (Figura 1).



**Figura 1.** Tomado de Paiva, C.S., St. Leger, A.J. & Caspi, R.R. Mucosal immunology of the ocular surface. *Mucosal Immunol* 15, 1143–1157 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00551-6>.

Considerada como la interfaz entre el medio ambiente y el ojo, la SO se compone de diversas estructuras entre las cuales destacan:

### **Córnea:**

Este tejido ocular es el responsable del 65 al 75% de la refracción del ojo. Está formada por componentes celulares como: células epiteliales, queratocitos y células endoteliales y acelulares que incluyen proteínas como: el colágeno de tipo I, IV, V y VI y los glucosaminoglicanos [5, 6]. Anatómicamente, se compone de cinco capas divididas como a continuación se describe.

**Epitelio:** Conformado por alrededor de 5 a 7 capas de células epiteliales y una membrana basal, tiene como funciones principales, impedir la entrada de objetos o sustancias extrañas, actuando como una barrera física y facilitando la absorción de nutrientes provenientes de las lágrimas que pasan por su superficie.

**Membrana de Bowman:** Formada por colágeno tipo I y V, así como por proteoglicanos, no cuenta con capacidad regenerativa y ayuda en el mantenimiento de la anatomía corneal.

**Estroma:** Comprende del 80 al 85% del espesor corneal, comprende funciones mecánicas las cuales son necesarias para la resistencia y mantenimiento de la estructura corneal, dichas funciones son dependientes del ensamblaje de sus componentes. Conformada por queratocitos los cuales se encargan de la producción de colágeno el cual es el principal compuesto de otro de sus componentes, la matriz extracelular. La matriz extracelular está conformada de colágenos (Tipo I, III, V, VI) y glucosaminoglicanos, estos constituyen el queratán sulfato, el condroitín sulfato y el dermatán sulfato, entre sus funciones destaca el envolver a el ultimo componente del estroma, las fibrillas de colágeno. Estas son haces paralelos de colágeno los cuales se encuentran en una capa dispuesta en ángulo recto con respecto a las fibras de las laminillas adyacentes, la capa estromal contiene de 200 a 250 laminillas distintas. Esta distribución define de manera crucial las propiedades refractivas de la córnea, así como el mantenimiento de su

transparencia y la morfología de la misma.

**Membrana de Descemet:** Formada por una capa delgada de fibras de colágeno dispuestas en sección transversal, formando así una red a modo de hexágono, los principales componentes de dicha capa son el colágeno tipo IV y VIII, fibronectina y laminina. Su principal función es de resistencia.

**Endotelio:** Monocapa de células hexagonales metabólicamente activas, las uniones celulares adyacentes del endotelio no son tan oclusivas como las del epitelio, esto permite el paso de líquido, contribuyendo al mantenimiento y manteniendo una hidratación adecuada de la córnea, asegurando así su transparencia [4, 7-9].

## **Conjuntiva**

La conjuntiva es una barrera epitelial mucosa transparente, está dividida en tres regiones, conjuntiva palpebral o tarsal encargada del recubrimiento de los párpados, conjuntiva bulbar ubicada sobre el globo ocular y los fondos de saco o fórnix la cual es el área de unión entre la conjuntiva tarsal y bulbar. Este tejido cuenta con dos capas de gran importancia:

**Epitelio:** Es de tipo escamoso estratificado no queratinizado y formado por 3-5 capas de células epiteliales con células caliciformes intercaladas. Además, tiene presencia de vasos sanguíneos, glándulas accesorias y células del sistema inmune encargadas de mantener el privilegio inmunológico ocular.

**Lamina propia:** También conocida como submucosa conjuntival, en esta capa se encuentran la mayoría de las células del sistema inmune, cuenta con suministro sanguíneo a partir de las arterias ciliares anteriores, la arcada tarsal posterior y la arcada sanguínea laterales [7, 10, 11].

## **Película lagrimal**

Con 3  $\mu\text{m}$  de espesor, la PL es considerada la primera barrera física del ojo, esta

funge como interfaz entre el epitelio de la SO y el medio ambiente. Se encarga de brindar nutrientes, humectar, eliminar residuos y mantener la homeostasis a nivel ocular [12].

Está formada por tres porciones, a continuación, se describen de acuerdo con su ubicación:

**Lipídica:** Es producida por una glándula principal (Glándula de Meibomio) y dos glándulas accesorias (Glándulas de Moll y Zeiss), es la porción más expuesta de la PL, su principal función es evitar la evaporación y conferir una superficie óptica apta y lisa para la refracción corneal. Se encuentra conformada por más de 600 lípidos, de los cuales destacan ésteres de cera, colesterol, ácidos grasos y fosfolípidos.

**Acuosa:** Esta porción es esencial para mantener lubricada y protegida a la SO, se compone de electrolitos, proteínas, metabolitos, oxígeno, glucosa y moléculas capaces de contribuir a la regulación ocular. Es secretada por la glándula lagrimal y las glándulas accesorias de Krause y de Wolfring.

**Mucinica:** Es la porción más interna y es producida por las células caliciformes ubicadas en el epitelio de la conjuntiva. Además, se encuentra formada por urea, sales, inmunoglobulinas y glicoproteínas conocidas como mucinas (MUC). De acuerdo con su estructura las MUC se dividen en tres tipos: transmembranales, formadoras de gel y solubles, en condiciones de homeostasis ocular se encuentran expresadas MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC12, MUC13, MUC16, MUC20, MUC21 y MUC22 [13-17]. Entre sus funciones se destacan la eliminación de patógenos, lubricación, protección, y brindan estabilidad a la capa acuosa (Tabla 1).

**Tabla 1.** Mucinas secretadas en la Superficie Ocular.

Mucina	Tipo	Ubicación	Función
MUC1	Transmembranal	Película lagrimal, epitelio conjuntival, corneal y glándula lagrimal.	Barrera frente a diversos patógenos, antiadherencia y señalización [18].
MUC2	Formadoras de gel	Película lagrimal, epitelio conjuntival, corneal y células caliciformes.	Lubricación [19].
MUC4	Transmembranal	Película lagrimal, conjuntiva, epitelio corneal.	Descamación, regulación en homeostasis, protectora y señalización [20, 21].
MUC5AC	Formadoras de gel	Película lagrimal, epitelio conjuntival/células caliciformes.	Hidratación y barrera [22, 23].
MUC5B	Formadoras de gel	Epitelio conjuntival y glándula lagrimal.	-
MUC7	Soluble	Epitelio conjuntival y glándula lagrimal.	Agente antimicrobiano y antifúngico [19].
MUC16	Transmembranal	Epitelio corneal y conjuntival, células caliciformes y glándula lagrimal.	Forma el glucocálix y contribuye a la homeóstasis [24].

**Datos tomados de:** Martínez-Carrasco R, Argüeso P, Fini ME. Membrane-associated mucins of the human ocular surface in health and disease.

En conjunto todas las estructuras contribuyen a mantener la fisiología del segmento anterior, ya que a diferencia de otros sitios anatómicos, la SO se encuentra continuamente expuesta al medio ambiente y por ende a diversos estímulos patogénicos y no patogénicos, los cuales en la mayoría de las ocasiones son contenidos y/o neutralizados a través de diversos mecanismos inmunológicos, tanto celulares, como moleculares a fin de evitar el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos capaces de comprometer la fisiología ocular.

## 2.1 Homeostasis de la superficie ocular

Al igual que el cerebro, el corazón, el útero y los testículos, el ojo es considerado un órgano inmunológicamente privilegiado ya que tiene la capacidad de desplegar respuestas inmunológicas efectivas, pero empleando medidas regulatorias a fin de evitar respuestas inflamatorias innecesarias capaces de afectar la función vital o biológica de diferentes órganos, preservando así la integridad del mismo [25, 26]. Como previamente se describió, la SO se encuentra formada por un epitelio continuo entre la conjuntiva, el limbo y la córnea, dicho epitelio cuenta con diversos mecanismos celulares y moleculares los cuales le están directamente relacionados con el privilegio inmunológico ocular.

A continuación, se describen los mecanismos implicados en la regulación de la SO:

### Componentes de la película lagrimal

La PL, además de ser considerada una barrera física con funciones de lubricación en la SO, esta contiene diversos mecanismos moleculares antimicrobianos e inmunoreguladores:

**Lisozima:** Secretada por la glándula lagrimal, esta molécula antimicrobiana constituye alrededor del 20 al 40% del total de las proteínas con función antimicrobiana presente en la lagrime. Entre sus funciones se destaca su capacidad para disolver la pared de las bacterias mediante la digestión enzimática de mucopolisacáridos [27, 28].

**Lactoferrina:** Pertenece a la familia de las transferrinas, la lactoferrina es una glicoproteína de unión al hierro (Fe), es decir funciona como sideróforo ya que es capaz de secuestrar el Fe limitando la disponibilidad del mismo y en consecuencia dificulta el crecimiento de bacterias dependiente de Fe. Esta molécula es secretada por la glándula lagrimal, el epitelio corneal y células de la respuesta inmune [29, 30].

**Lipocalina:** Esta proteína es un miembro de la familia de calcinas y está encargada de la remoción de desechos lipídicos microbianos insolubles en la lagrime. Es

secretada por la glándula lagrimal y las glándulas accesorias (Wolf y Krause) [31, 32].

**Inmunoglobulina A (IgA):** Esta glicoproteína se encarga de neutralizar patógenos mediante la interacción directa de sus sitios de unión con antígenos derivados de virus, bacterias y protozoos impidiendo su unión a las células hospederas. Es secretada por células del sistema inmune (células plasmáticas) presentes en la glándula lagrimal y la conjuntiva [33, 34].

### **Células caliciformes y tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT):**

Además de su papel como barrera física, la conjuntiva cuenta con la presencia de mecanismos celulares y moleculares capaces de contribuir a la regulación inmunológica.

**Células caliciformes:** Son células especializadas del epitelio conjuntival, la principal fuente de mucinas para la PL y se encargan de la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Tabla 2).

**CALT:** Este tejido alberga células del sistema inmune tolerogénicas, particularmente, linfocitos T reguladores (Treg) (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) y células presentadoras de antígeno (APC). Las APCs son células residentes de los tejidos, presentan un estado "inmaduro" caracterizado por bajos niveles de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y la ausencia de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86). Las APCs y Treg se caracterizan por producir citocinas inmunoregulatoras como: la interleucina 10 (IL-10) y el factor transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Tabla 2) [35, 36].

### **Avascularidad en la córnea:**

Dado que la función principal de la córnea es servir como medio refringente, este tejido debe permanecer transparente, por ende, entre sus características se encuentra la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos, esto limita la entrada de células del sistema inmune, contribuyendo así con el inmunoprivilegio antiangiogénico. Los mecanismos se encuentran detallados en la tabla 2.

**(a) Epitelio corneal:**

Es considerado la primera línea de la inmunidad ocular, esta barrera física actúa frente a microorganismos y agresiones ambientales, su estructura está formada y mantenida por uniones celulares de diferente tipo, además de esto, se ha descrito en la literatura que estas células tienen un papel importante en cuanto al mantenimiento de la regulación en la SO:

**Uniones celulares:** En el epitelio I, se han identificado cuatro tipos de uniones celulares, estas van desde las uniones estrechas (zonula occludens, unidas mediante complejos proteicos conocidos como ocludinas), desmosomas (macula adherens, complejos proteicos conocidos como cadherinas y nectinas), uniones adherentes (zonula adherens, uniones de cadherinas y filamentos intermedios) y uniones gap (en forma de canales o poros en la membrana lipídica que permiten el paso bidireccional de iones y moléculas pequeñas) en conjunto limitan el ingreso de agentes externos [37, 38].

Además, de los diferentes tipos de uniones celulares, también se ha demostrado, la expresión constitutiva de factores inmunorreguladores, entre ellos, el ligando de muerte programada 1 (PD-L1), Ligando Fas (FasL), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) y trombospodina 1 (TSP-1) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Factores inmunoreguladores implicados en la inmunidad de la superficie ocular.

Tipo	Moléculas	Funciones
Citocinas reguladoras	TGF- $\beta$	El TGF- $\beta$ es una molécula de carácter pleiotrópico, la cual es capaz de inhibir la proliferación de células T efectoras a través de la inducción de Tregs por Foxp3+ [39].
	Antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1R $\alpha$ )	IL-1Ra inhibe competitivamente la unión de IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$ a su receptor, evitando así que estas lleven a cabo sus funciones biológicas [40].
Factores inhibidores	PDL-1	Tanto PD-L1, FasL y TRAIL promueven la apoptosis de células inmunes activadas, limitan la proliferación de células T efectoras y en consecuencia la producción de citocinas inflamatorias [41, 42, 43].
	FasL	
	TRAIL	TSP-1 regula negativamente la angiogénesis y funge como activador de TGF- $\beta$ [44].
	TSP-1	
Neuropéptidos	Hormona estimulante de los melanocitos alfa ( $\alpha$ -MSH)	Suprime la producción de IFN- $\alpha$ por parte de las células T efectoras. Además, promueve la producción de citocinas inmunoreguladoras (IL-10) [45].
	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)	Reduce la producción de moléculas proinflamatorias, promueve la producción de IL-10. También reduce la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86) y MHC-II en monocitos y DC [46].
	Péptido intestinal vasoactivo (VIP)	Disminuye el reclutamiento de células inflamatorias, limita la proliferación de células T y suprime la producción de mediadores proinflamatorios [46].
Factores antiangiogénicos	PEDF	PEDF suprime la expresión de factores angiogénicos [47].

**Datos tomados de:** Foulsham W, Coco G, Amouzegar A, Chauhan SK, Dana R. When Clarity Is Crucial: Regulating Ocular Surface Immunity.

**Células tolerogénicas:** Particularmente, la superficie corneal no cuenta con linfocitos T o B residentes, sin embargo, esta cuenta con células presentadoras de antígenos ubicadas tanto en la periferia corneal como en la zona central, las APCs ubicadas en la zona central son células que se encuentran en un estado "inmaduro" como previamente se mencionó, estas se caracterizan por tener niveles bajos de MHCII y de moléculas coestimuladoras, lo que en consecuencia limita la capacidad para presentar un antígeno y activar a las células de la respuesta inmune adaptativa [48]. Entre las APCs presentes en la SO están las células dendríticas plasmocitoides (pDC), estas células residen en el estroma y en el limbo corneal, se

ha descrito que estas son una fuente importante de factores angiogénicos como la trombospodina (TSP-1) y PDL-1 (Tabla 2) [48].

Como ya se describió, el ojo cuenta con diversas estrategias celulares y moleculares, las cuales trabajan de manera conjunta y coordinada para evitar y/o contener el desarrollo y la perpetuación de procesos inflamatorios crónicos. Sin embargo, diversos grupos han demostrado que la pérdida o desregulación de estos mecanismos promueve el desarrollo de diversas patologías inflamatorias oculares, las cuales causan disminución de la agudeza visual y en casos graves ceguera. Particularmente, en las últimas dos décadas ha crecido el interés por comprender los mecanismos inmunológicos subyacentes a una enfermedad de la superficie ocular conocida como ojo seco, debido al incremento en la incidencia y prevalencia en la población a nivel mundial, así como las consecuencias en la calidad de vida de los pacientes que lo padecen.

## 2.4 Definición y clasificación de ojo seco

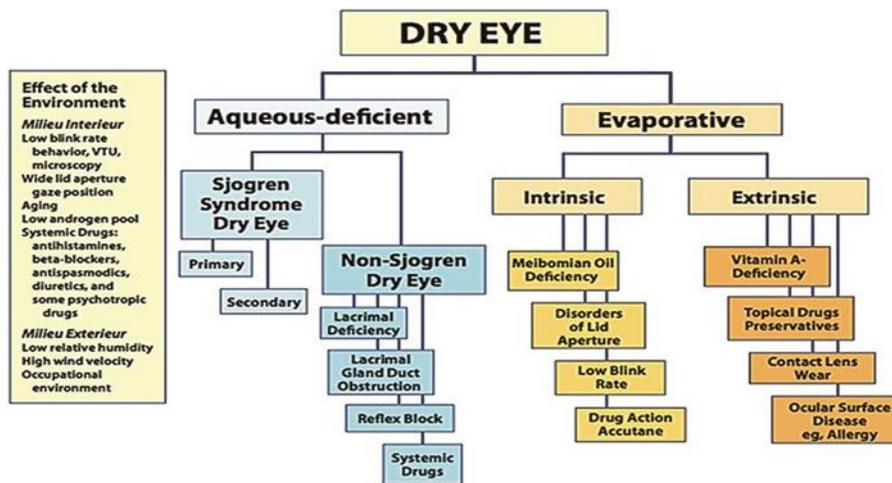
La primera definición de ojo seco (OS) se dio en 1995 por el Instituto Nacional del Ojo. Sin embargo, fue hasta el 2007 que OS fue catalogado como enfermedad por el subcomité de Definición y Clasificación del Taller Internacional de Ojo Seco (DEWS). Para el 2017 (DEWS II), el subcomité integrado por más de 50 especialistas, redefinen a OS como una enfermedad inflamatoria de la SO, de origen multifactorial, caracteriza por pérdida de la homeostasis de la PL como consecuencia del incremento de la osmolaridad de la lágrima, acompañada de signos y síntomas oculares como hiperemia, sensación de cuerpo extraño, prurito, disminución de la agudeza y alteraciones neurosensoriales [49].

Actualmente, la clasificación de OS se fundamenta en un sistema basado en las etiologías predominantes de la patología, y se ha dividido en dos grandes categorías:

**Acuodeficiente:** Se caracteriza por la deficiencia de la porción acuosa por parte de la glándula lagrimal. Su origen puede estar asociado a enfermedades

autoinmunes, sistémicas o condiciones ambientales [50].

**Evaporativo:** Está relacionado con la deficiencia en la capa lipídica de la PL. Comúnmente se asocia a factores intrínsecos (disfunción de las glándulas de Meibomio o en la apertura palpebral) y extrínsecos (deficiencia de vitamina A, alergias o uso de lentes de contacto) [51].



**Figura 2.** Clasificación de Ojo Seco, tomada de Craig, J. P., Nichols, K. K., Akpek, E. K., Caffery, B., Dua, H. S., Joo, C. K., Liu, Z., Nelson, J. D., Nichols, J. J., Tsubota, K., & Stapleton, F. (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report.

## 2.5. Prevalencia de Ojo seco

En el 2017 Stapleton y colaboradores, realizaron un meta-análisis sobre la prevalencia de OS, en este estudio los autores reportaron que entre el 5 y el 50% de la población adulta a nivel mundial padecen esta patología [52]. En este mismo contexto, un estudio realizado en población estadounidense reportó que aproximadamente 16.4 millones de personas padecen OS, además observaron una mayor incidencia en las mujeres, con un estimado de 11.1 millones, mientras que la población masculina alcanzo los 5.3 millones [53, 54].

Aun cuando la prevalencia de esta enfermedad en la mayoría de los estudios se ha reportado que afecta principalmente a la población adulta y que las mujeres son el género más afectado. Recientemente, un par de estudios realizados en población

mexicana, específicamente en estudiantes de la Universidad de Monterrey, y pacientes que acudieron a la clínica de Optometría de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) se encontró la presencia de signos y síntomas de OS. En ambos estudios se encontró que personas entre 21 y 40 años presentaron signos y síntomas de la enfermedad [55, 56].

## **2.6 Cuadro clínico**

Se sabe que, sin importar la etiología de OS, una de las características centrales de la enfermedad es la pérdida de la estabilidad de la PL como consecuencia del incremento en la osmolaridad de la lagrimal y el consecuente desarrollo y perpetuación de un proceso inflamatorio crónico. Dicho proceso inflamatorio está orquestado por la producción de mediadores inflamatorios, la expresión de metaloproteinasas, enzimas asociadas al estrés oxidativo y la infiltración de poblaciones celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa. En conjunto todos estos elementos celulares y moleculares derivaron en la aparición y agravamiento de signos y síntomas de los pacientes.

Desafortunadamente, hasta ahora no hay un signo patognomónico de OS, en general quienes padecen la enfermedad pueden referir sensación de cuerpo extraño, dolor, visión borrosa, prurito (comezón), fotofobia (sensibilidad a la luz), hiperemia conjuntival (ojo rojo), etc. Por lo tanto, el diagnóstico de la enfermedad se fundamenta en el uso de pruebas subjetivas y objetivas a fin de identificar la sintomatología, los cambios en la composición de la PL y/o los cambios morfológicos en el epitelio corneal y conjuntival [49, 57, 58].

## **2.7 Diagnóstico y tratamiento**

### **2.7.1 Diagnóstico**

El diagnóstico de esta patología se basa principalmente en el uso de pruebas subjetivas (cuestionarios) con el objetivo de identificar la presencia de la sintomatología. Sin embargo, esta no siempre determinará la presencia y/o cronicidad de la enfermedad, dado que muchos pacientes son asintomáticos o en

algunos casos otras condiciones patológicas presentes en la SO pueden mimetizar la sintomatología de OS, haciendo aún más complicado su diagnóstico de la misma [49, 59, 60].

Actualmente el diagnóstico se fundamenta tanto en el uso de pruebas subjetivas basadas en la aplicación de cuestionarios como el índice de enfermedad de la superficie ocular (OSDI por sus siglas en inglés), dicho cuestionario consta de 12 ítems que evalúan síntomas, limitaciones funcionales y factores, ambientes relacionados con OS [61, 62].

Entre las pruebas cuantitativas, se encuentra la prueba de Schirmer, la cual permite cuantificar el volumen lagrimal; mientras que la prueba de ferning permite, determinar el tipo de patrón de arborización de mucinas y la cuantificación del número de células epiteliales y caliciformes se hace mediante citología de impresión [63-65]. En conjunto, estas pruebas permiten evaluar la estabilidad, producción y calidad de la PL.

### **2.7.2 Tratamiento**

En general el tratamiento de OS está dirigido a atenuar los signos y síntomas a través del uso de lágrimas artificiales y en algunos casos la administración de corticoesteroides por periodos prolongados. Sin embargo, se ha reportado que el uso prolongado de corticoesteroides puede generar efectos adversos. En la última década, diversos grupos de investigación han explorado y reportado el posible efecto beneficio de otros tratamientos como: la luz pulsada, el uso de tapones lagrimales, la aplicación de suero autólogo, suplementos alimenticios o distintos fármacos, entre los que se encuentra Lifitegrast (Tabla 3). Desafortunadamente, hasta ahora el acceso a estos tratamientos es limitado debido a su costo elevado [66, 67].

**Tabla 3.** Tratamientos para el manejo de Ojo seco.

<b>Fármaco</b>	<b>Descripción</b>	<b>Función</b>
Lagrimas Artificiales	Alcohol polivinílico, ácido hialurónico, derivados de la celulosa, hidroxipropilguar, povidona.	Favorece la estabilidad lagrimal Promueve la migración epitelial Mejora la calidad óptica.
Corticoesteroides Tópicos	Loteprednol: instiladas en un periodo de 2 a 4 semanas mejora la sintomatología del OS.	Inducción de proteínas inhibitoras de la fosfolipasa A2.
	Ciclosporina A: incrementa la producción lagrimal, es un medicamento aprobado por la FDA como tratamiento del OS.	Reduce la transcripción de citocinas activadoras de linfocitos T (IL-2).
	Tracolisum: genera efectos similares a la ciclosporina A, utilizado en pacientes que no toleran la ciclosporina.	Inhibe la transcripción de citocinas activadoras de linfocitos T (IL-2).
Tetraciclinas	Bacteriostáticos con efecto antiinflamatorio.	Reducen la síntesis de metaloproteinasas, la producción de IL-1.
Macrólidos	Azitromicina: se utiliza al 1% normalizando el perfil lipídico de las glándulas de Meibomio.	Inhibición de la biosíntesis de proteínas bacterianas.
Ácidos grasos omega	Esenciales en la homeóstasis de la superficie ocular.	Bloquean eicosanoides proinflamatorios y reducen citocinas proinflamatorias.
Vitamina A	Juega un papel importante en la producción de la porción mucínica, su deficiencia se asocia a la pérdida de esta capa y atrofia de células caliciformes.	Las gotas de vitamina A protegen los ojos de los radicales libres, toxinas, alérgenos e inflamación.
Luz pulsada intensa	Lámpara que emite una fuente de luz policromática incoherente de alta intensidad con el objetivo de producir fototermólisis selectiva [68].	Mejoría en parámetros clínicos asociados a la disfunción de la glándula de Meibomio, incluida la calidad del mismo y su producción. Así es capaz de reducir la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) [69].
Antagonistas de los Linfocitos (LFA-1)	Lifitegrast: Administrado en una solución oftálmica al 5%, es capaz de reducir la inflamación mediada por el sistema inmune [70].	Se une a LFA-1, integrina presente en linfocitos efectores, inhibiendo así la interacción con su ligando ICAM, reprimiendo la migración linfocitos T y reduciendo la producción de mediadores proinflamatorios [71, 72].
Suero autólogo	Considerado un colirio el suero autólogo es una deriva de la sangre, en el que el donante y el receptor son el mismo [73].	Sus componentes son casi idénticos a los de las lágrimas, ya que contiene lactoferrina, glutatión y vitamina C y en mayor concentración, albúmina, fibronectina, inmunoglobulinas (IgM

		<p>e IgG), lisozima y factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-<math>\beta</math>1) y el factor de crecimiento epidérmico [74, 75].</p>
--	--	---

**Datos tomados:** de Mondal H, Kim HJ, Mohanto N, Jee JP. A Review on Dry Eye Disease Treatment: Recent Progress, Diagnostics, and Future Perspectives. Pharmaceuticals.

Independientemente del tratamiento, también se les recomienda a los pacientes eliminar cualquier factor ambiental como: ambientes húmedos, evitar el humo del cigarro, exposición a aires acondicionados y el uso prolongado de dispositivos electrónicos, ya que se sabe que estos pueden agravar la patología [76].

## 2.8 Inflamación y Ojo seco

La DEWS en su informe del 2017, reportó que la inestabilidad de la PL trae consigo un incremento en la osmolaridad de la lagrime [49]. Dicha hiperosmolaridad induce estrés disecante en el microambiente de la superficie ocular, trayendo como consecuencia cambios morfofuncionales en las células residentes, activando la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) como las cinasa N-terminales c-Jun y p38, su activación dará como resultado la traslocación de factores de transcripción al núcleo promoviendo la transcripción de diversos genes relacionados con el estrés celular y la producción de mediadores citocinas inflamatorias y MMP, principalmente, en la PL se ha identificado MMP-9 [77, 78, 79].

Se ha reportado que la activación de la vía de las MAPK promueve un incremento en la síntesis de citocinas inflamatorias como: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) así como de las quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCR3 en lagrime de pacientes con OS [80, 81].

El incremento de estas moléculas induce la activación de las APC residentes de la superficie ocular, mismas que migran a los órganos linfoides secundarios, una vez

ahí estas se encargan de la activación y diferenciación de los linfocitos T efectores, particularmente los subtipos Th1 y Th17. Estas poblaciones contribuyen a perpetuar el proceso inflamatorio a través de la producción de las citocinas IL-6, IL-12, IL-23, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , una vez diferenciadas estas células migran hacia el sitio de acción mediante una vía eferente, al llegar a la SO, estas células incrementan la presencia de citocinas inflamatorias, lo cual favorece el daño tisular tanto en córnea como conjuntiva, promoviendo la producción de MMP y generando así un círculo de retroalimentación.

En conjunto estos mecanismos, contribuyen a la patogénesis del OS, promoviendo la disfunción de la glándula lagrimal, las glándulas de meibomio y los tejidos de la SO. Estas evidencias han incentivado el interés por comprender los mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de OS. En este sentido el uso de modelos experimentales, han permitido evidenciar y demostrar el papel patogénico que tiene la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 [82-85]. Recientemente, nosotros demostramos que ratones genéticamente deficientes para la citocina inflamatoria MIF tienen signos atenuados de OS. Estos antecedentes fundamentan el estudio de esta citocina en el contexto de inflamación ocular [86].

## **2.9 Biología del factor inhibidor de la migración de macrófagos**

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) se reportó por primera vez en 1960 y fue clasificado como una citocina proinflamatoria con funciones pleiotrópicas. Es producida y almacenada como mediador preformado por diversas poblaciones celulares, tanto del sistema inmunológico como no propias del mismo (epiteliales, endoteliales y endocrinas) [87, 88]. La producción y secreción de MIF, esta estimulada por moléculas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y la endotoxina bacteriana conocida como lipopolisacárido (LPS). Además, la anafilatoxina C5a producto resultante de la activación de la vía del complemento, es capaz de inducir la producción de esta molécula en sepsis experimental [89-92]. Una vez secretada, MIF estimula la producción de otros mediadores inflamatorios como las MMP-1, 3 y 9, diversas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12), y las

moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 [93-96].

Su señalización puede ser regulada tanto por mecanismos extracelulares como intracelulares. La primera esta mediada por los receptores CD74 y CD44. MIF se une a CD74 y posteriormente recluta a CD44 formando un complejo de receptores los cuales mediaran la señalización río abajo, a través de vías como PI3K/Akt y ERK1/2, resultando en proliferación celular y la producción de prostaglandina E2 [97, 98]. Además del complejo de receptores CD74/CD44, también se ha demostrado que MIF es capaz de unirse a los receptores de quimiocinas CXCR2 CXCR4 y CXCR7, permitiendo que MIF actúe como quimiocina. Dichos receptores son capaces de formar complejos con CD74 dando como resultado la regulación de la inflamación, favoreciendo la migración y adhesión celular mediante la activación de las vías PI3K/Akt y ERK1/2 [99-101].

Además de las funciones biológicas mediadas por receptores extracelulares, MIF ejerce funciones a nivel intracelular debido a que se encuentra almacenado en vesículas en el citosol y puede ser endocitado a través de mecanismos dependientes de clatrina [102]. También hay evidencia de que puede unirse a diversas proteínas intracelulares y modular funciones relacionadas con la supervivencia celular, muerte celular programada e inflamación [103, 104]. En 1999 Hudson *et al.* demostraron que MIF puede inhibir la actividad de la proteína supresora de tumores p53, promoviendo la proliferación celular y el desarrollo de tumores [105].

Todas las características antes descritas, evidencian que MIF es una molécula capaz de desencadenar respuestas inmunológicas que dependiendo del contexto pueden proteger o desencadenar efectos deletéreos en el hospedero. En este sentido, diversos estudios han reportado el papel protector de MIF, frente a infecciones por parásitos protozoos como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* y *Plasmodium* [106-108].

Por el contrario, su papel patogénico ha sido demostrado en enfermedades sistémicas y locales de origen autoinmune y/o inflamatorio [109-111].

## 2.10 MIF en tejidos Oculares

En los años 90's Matsuda, A *et al* reportaron por primera vez la expresión constitutiva de MIF en tejidos oculares como: la retina, el epitelio pigmentado, el iris y la córnea de humano y ratón [112-114]. Posteriormente, se evidenció la expresión y producción de esta citocina en botones esclerocorneales y en sobrenadante de cultivos de malla trabecular de donadores sanos, en este mismo estudio se demostró que la estimulación de dichos tejidos con la recombinante de MIF (rMIF) indujo la producción de moléculas inflamatoria [115]. A pesar de estas evidencias, hasta ahora se desconoce la función o funciones que ejerce MIF en el microambiente ocular, los autores sugirieron un posible efecto inhibitor en la función citotóxica de las células natural Killer (NK) en condiciones de homeostasis y un papel deletéreo en enfermedades inflamatorias oculares.

En este contexto, Mitamura *et al* reportaron niveles elevados de MIF en muestras de humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa (RDP). Además, los autores demostraron un incremento en la expresión y producción del factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF) en células de Müller tratadas con rMIF [116]. A esta evidencia, se suman los resultados obtenidos de estudios en pacientes con Síndrome de Sjögren (SS), donde también se observaron niveles incrementados de esta citocina en muestras de suero, orina y saliva [117, 118]. Estas evidencias han incentivado el interés por comprender el papel de MIF en la patogénesis de enfermedades oculares a través del uso de modelos experimentales. En este sentido, el análisis de 46 genes relacionados con cambios morfométricos en la vasculatura retiniana, reveló un incremento significativo en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular alfa (VEGF $\alpha$ ), del factor inducible por hipoxia-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y de MIF en retina de ratas Zucker con diabetes [119].

Estudios independientes en modelos murinos de OS también han reportado incremento en la expresión y producción de MIF y otros mediadores inflamatorios en suero y lagrime [120, 121]. Nosotros recientemente demostramos que la deficiencia genética o la inhibición farmacológica de MIF resulta en signos atenuados de OS y una menor producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [86].

Sin duda, estos resultados confirman el papel patogénico de MIF en enfermedades oculares como OS. Sin embargo, aún es necesario determinar qué células o moléculas (citocinas y quimiocinas) están implicadas en la activación, el reclutamiento y la polarización de estas poblaciones celulares en córnea, conjuntiva y glándula lagrimal. Por tal motivo, el presente trabajo busca contribuir a la generación de conocimiento acerca de la participación de MIF en el microambiente ocular, analizamos la expresión de transcritos de moléculas inflamatorias, antiinflamatorias y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en ratones WT y *Mif*<sup>-/-</sup> con OS experimental.

### 3. Objetivos

#### 3.1 General

- Determinar si MIF promueve la expresión de moléculas inflamatorias (*inos*, *tnf- $\alpha$*  y *il-1 $\beta$* ), anti-inflamatorias (*il-4*, *il-13* y *tgf- $\beta$* ) y las enzimas *cox2* y *nox4* en córnea y conjuntiva en un modelo murino de OS.

#### 3.2 Particulares

- Inducir ojo seco a ratones macho de la cepa BALB/c silvestres (WT) y deficientes para MIF (*Mif*<sup>-/-</sup>) mediante la administración de escopolamina.
- Evaluar y comparar la estabilidad de la película lagrimal a través de la cuantificación del volumen lagrimal, el número de células epiteliales y el tipo de patrón de arborización de mucinas.
- Realizar un análisis semicuantitativo de transcritos de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias.
- Realizar un análisis histopatológico de córnea de ratones experimentales.

## **4.Hipótesis**

El factor inhibidor de la migración de macrófagos promueve la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal a través de la expresión de transcritos de citocinas inflamatorias y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en córnea y conjuntiva de ratones con ojo seco experimental.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Animales Experimentales**

Para realización de este trabajo se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c de 7 semanas de edad silvestres (WT) y deficientes para la citocina MIF (*Mif<sup>-/-</sup>*). Todos los organismos se mantuvieron en micro aisladores de policarbonato sin restricción de agua o alimento. El manejo de los animales se llevó a cabo según lo estipulan los lineamientos NOM-062-ZOO-1999 para el uso de animales de experimentación.

### **5.2 Genotipo de los animales experimentales**

#### **5.2.1 Obtención de DNA genómico**

La obtención de DNA genómico se hizo a partir de un pequeño fragmento de tejido. Se cortaron de 2 a 4 mm del ápice de la cola de cada ratón y se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml debidamente etiquetados. La digestión del tejido se hizo mediante la adición de 500 µl de buffer de lisis y 4 µl de Proteinasa K (Invitrogen), las muestras se incubaron a 56° durante 24 horas.

Una vez digerido el tejido, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles y se les adicionaron 500 µl de isopropanol frío, se homogenizo hasta que observar la precipitación del material genético. Nuevamente se centrifugó Se centrifugo a 13,000 rpm durante 10 minutos para concentrar el DNA. Se decantó el sobrenadante, y la pastilla se resuspendió en etanol frío al 75%. Una vez más se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, se decantó el etanol y se dejaron las muestras en la campana a temperatura ambiente por 1 hora con el objetivo de que se evaporaran los restos de etanol. Finalmente, se resuspendieron las muestras en 50 µl de agua inyectable libre de DNAsas y RNAsas.

## 5.2.2 Amplificación del gen

**Tabla 4.** Secuencia de oligonucleótidos de los primers de PCR

Gen	Secuencia	Temperatura	Peso Molecular
MIF F	AGACCACGTGCTTAGCTGAG	59°	200 pb
MIF R	GCATCGCTACCGGTGGATAA		
NEO F	ATTGAACAAGATGGATTGCAC	59°	500 pb
NEO R	CGTCCA GAT CAT CCT GAT C		

Se utilizaron primers específicos para la amplificación del gen *neomicina* y *mif* (UniParts) en una concentración de 100  $\mu$ M así mismo utilizamos la enzima Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon) en una concentración de 1.5 mM. Los cuales fueron colocados en tubos Eppendorf nuevos y estériles de 0.2 ml, se llevó a un volumen final de 25  $\mu$ l con los siguientes reactivos.

**Tabla 5.** Reactivos empleados para PCR

Reactivo	Volumen
Master Mix	12.5 $\mu$ l
MIF F	1 $\mu$ l
MIF R	1 $\mu$ l
NEO F	1 $\mu$ l
NEO R	1 $\mu$ l
Muestra	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7.5 $\mu$ l
Volumen Final	25 $\mu$ l

Una vez llevadas al volumen final, las muestras se colocaron en el termociclador (Biosystems), siguiendo el siguiente protocolo.

**Tabla 6.** Protocolo de desnaturalización en el Termociclador

STAGE 1	STAGE 2			STAGE 3
95° C (1:04:00)	95° C (0:00:30)	59° C (0:00:40)	72° C (0:00:30)	72° C (0:05:00)
1X	34X			1X

### **5.2.3 Electroforesis**

Se realizó un gel de agarosa al 3% en un Buffer de TBE con 2 µl de bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis con un peine de 12 pozos. Se dejó a temperatura ambiente hasta que este se solidificó. En el primer y último pozo se agregaron 2 µl de marcador de peso molecular (Cleaver 100 pb), en los pozos restantes se colocaron 8 µl de las muestras previamente preparadas. Las muestras se corrieron a 100 voltios durante 30 minutos. La imagen del gel se capturó utilizando un fotodocumentador (GelDoc EZ Imager – Bio Rad).

### **5.3 Inducción del modelo de ojo seco**

La inducción de OS se realizó mediante la administración subcutánea de 0.5 mg de escopolamina (Sigma-Aldrich) en un vehículo de 60 µl de solución salina estéril 3 veces al día por 21 días.

### **5.4 Cuantificación del volumen lagrimal**

La cuantificación de volumen lagrimal se hizo mediante la técnica de Schirmer a los 0, 7 y 14 días post inducción de OS y a los 7 días de haber suspendido el modelo (fase de recuperación). La prueba consistió en colocar tiras Schirmer (Ophthalmic Strips) en el párpado inferior en ambos ojos del ratón por 5 minutos, transcurrido el tiempo las tiras fueron retiradas y se midió la cantidad de lagrime secretada (mm) con un vernier digital. Los datos fueron registrados y analizados. Las tiras fueron almacenadas en tubos eppendorf con alcohol al 96% con el objetivo de fijar las células epiteliales, para su tinción con PAS-Hematoxilina, para su análisis posterior.

### **5.5 Cuantificación del número de células epiteliales en conjuntiva**

La cuantificación de las células epiteliales se realizó a partir de las tiras de Schirmer utilizadas anteriormente. Se cortó la porción que estuvo en contacto con la conjuntiva palpebral y se fijó en alcohol al 96%, posteriormente se tiñeron con PAS-Hematoxilina. Una vez teñidas, las tiras se colocaron en el portaobjetos para determinar el número de células/mm<sup>2</sup>. Se utilizó la clasificación de Nelson, donde el grado 0 es considerado normal con abundantes células caliciformes (>500

células/mm<sup>2</sup>) presencia de células epiteliales pequeñas, sin espacios entre ellas. El grado 1, ligeramente alterado, con células epiteliales con morfología poligonal, presencia de espacios, se observa disminución en el número de células caliciformes (350-500 células/mm<sup>2</sup>). El grado 2 (considerado alterado) se caracteriza por tener células epiteliales de mayor tamaño y pérdida de células caliciformes (100-350 células/mm<sup>2</sup>). Finalmente, el grado 3, se observa una marcada alteración, las células epiteliales son muy grandes y poligonales con diversas alteraciones (células binucleadas, núcleos picnóticos o ausentes, queratinizadas o no, las células caliciformes están marcadamente disminuidas (<100 células/mm<sup>2</sup>) [60].

## **5.6 Evaluación del patrón de arborización de mucinas conjuntivales**

La evaluación del tipo de patrón de arborización de mucinas se realizó mediante la técnica de ferning. Previo a la toma de la muestra, los ratones se anestesiaron con 40 µl de xilacina (PiSAS) se tomaron 2 µl de lágrima de cada ojo a los 0, 7, 14 y 21 días post inducción de OS y a los siete días de haber suspendido el modelo (fase de recuperación). La muestra de lagrima se colocó en un portaobjetos, se dejó secar a T° ambiente y se observó en un microscopio óptico a 4, 10 y 40x. El análisis del patrón de arborización de mucinas se hizo con base en la escala de Rolando. Dicha escala considera que los grados I y II corresponden a un patrón de arborización de mucinas normal, mientras que, los grados III y IV pertenecen a un patrón de mucinas alterado de la PL [109].

## **5.7 Análisis de la expresión de transcritos en córnea y conjuntiva**

### **5.7.1 Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA, los tejidos fueron descongelados y se les agregaron 200 µl de cloroformo grado molecular (J.T Baker). Posteriormente se mezclaron en el vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (fase transparente) y se agregó 500 µl de isopropanol: Se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, fueron centrifugados a 14000rpm por 15

minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió y se lavó lavada dos veces con etanol al 70%, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendió en 40 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, se agregaron 10 µl de inhibidor de RNAsas (RNase inhibitor. Cat15518-012). Finalmente, el RNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro (marca Implen).

### 5.7.2 Obtención cDNA

En un tubo de PCR de 200 µl de tapa plana se agregaron 8 µl del RNA total y 1 µl de oligo(dT) 18 primer el cual se aforó a 12 µl con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Posteriormente, se colocaron en el termociclador con el programa RT- 1 (65° 5 min, 10° C 1 min) y se incubó a -20° por un minuto para después añadir una reacción preparada con un volumen total de 20 µl con: 4 µl de 5X Reaction Buffer + 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl) + 2 µl 10 mM dNTP Mix + 1 µl de RevertAid MMuLV RT (200 U/ µl).

### 5.7.3 Amplificación de cDNA

Se utilizaron 200ng de cDNA de cada una de las muestras para realizar el análisis semicuantitativo de la expresión relativa de transcritos de las *citocinas il-1β, il-4, il-13, tnf-α, tgf-β* y las enzimas *inos, nox 4 y cox 2*, en córnea y conjuntiva de ratones con OS. Utilizamos como control de carga beta-actina. Brevemente, las reacciones se prepararon en tubos de 0.2 ml. nuevos libres de DNAsas. La amplificación de los productos se realizó utilizando un termociclador (miniAmplus).

La secuencia y las temperaturas de alineación específicas para cada primer, se muestran en la (tabla 7). Para la amplificación de cDNA se utilizó la enzima Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED en los siguientes volúmenes por reacción: 12/µl de Taq 2x Master Mix.

- 5 µl cDNA a una concentración de 200 ng/µl
- 6 µl PCR-grade H<sub>2</sub>O
- 1 µl de primer reverse
- 1 µl de primer forward.

**Tabla 7.** Secuencia de primers y temperaturas de alineación.

<b>Primers</b>	<b>Secuencia 5' 3'</b>	<b>Temperatura de Alineación</b>	<b>Producto PCR (pb)</b>
<b><i>il-1β</i></b>	F:5'-AAGCCTCGTGCTGTCGGACC-3' R:5'-TGAGGCCCAAGGCCACAGGT-3'	66	140
<b><i>il-4</i></b>	F:5'-ATGTGTCATCCTGCTCTTCTTT-3' R:5'-GACTGGGACTCATTATGGTGC-3'	60	342
<b><i>il-13</i></b>	F:5'-GCAACGGCAGCATGGTATGGAG-3' R:5'-TGGTATAGGGGAGGCTGGAGAC-3'	63	161
<b><i>tnf-α</i></b>	F:5'-AGAACCAGTTCACACGCTACC-3' R:5'-TCTGAGTCTCCTTACAGGGGAT-3'	60	102
<b><i>tgf-β</i></b>	F:5'-TGCTTCAGCTCCACAGAGAA-3' R:5'-TACTGTGTGTCCAGGCTCCA-3'	60	155
<b><i>inos</i></b>	F:5'-CTGGAGGAGCTCCTGCCTCATG-3' R:5'-GCAGCATCCCCTCTGATGGTG-3'	63	440
<b><i>nox 4</i></b>	F:5'TGAACTACAGTGAAGATTTTCTTGAAC-3' R:5'GACACCCGTCAGACCAGGAA-3'	58	81
<b><i>cox 2</i></b>	F:5'-GCACAGTCCCTTTGGAGTTAAGTC-3' R:5'-ACACACTCTATCACTGGCACC-3'	57	274
<b><i>β-actina</i></b>	F:5'-GCTGTGCTATGTTGCTCTAG-3' R:5'-CGCTCGTTGCCAATAGTG-3'	56	117

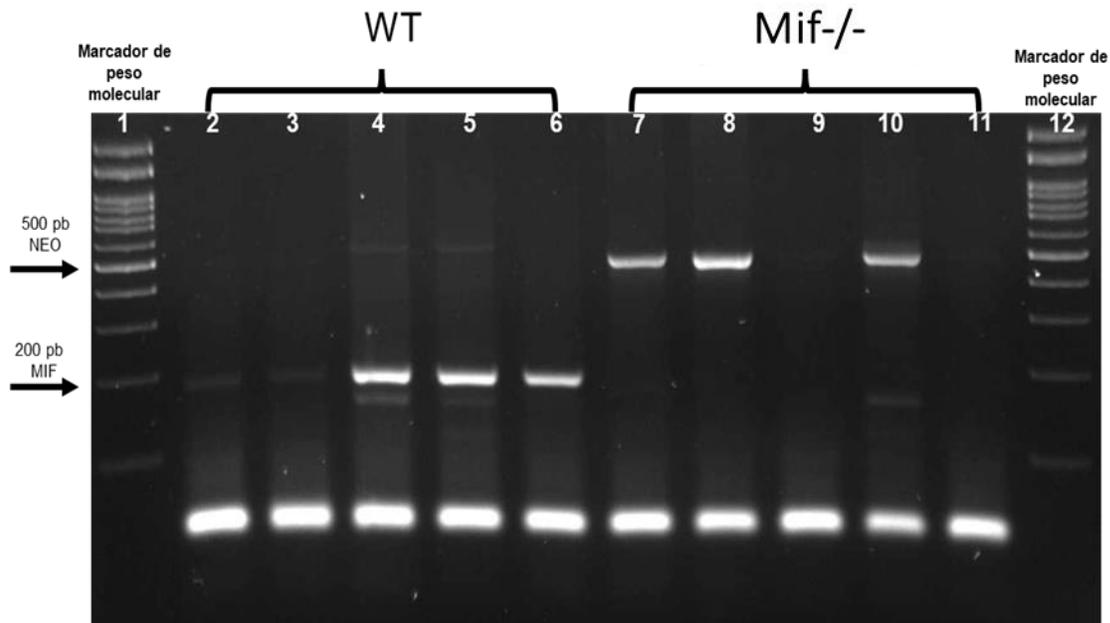
## **5.8 Análisis histopatológico de córnea**

El análisis histológico de la córnea se hizo mediante la enucleación del ojo izquierdo de cada uno de los ratones control y experimentales. Una vez obtenida la córnea se colocó en 10 ml de fijador de zinc por 48 horas. Posteriormente se deshidrataron utilizando un tren de alcoholes con concentraciones ascendentes (70, 80, 90 y 100%) en los primeros tres alcoholes las muestras permanecieron por 48 horas y 2 horas en alcohol al 100%; posteriormente fueron colocados en butanol por 2 horas. Una vez concluido este proceso, los tejidos fueron embebidos en parafina I y parafina II por 48 horas, respectivamente. Finalmente, los tejidos fueron llevados al centro de inclusión de parafina, con el fin de prepararlos para la obtención de cortes histológicos de 5 micrómetros mediante el uso de un micrótomo (LEICA). Una vez obtenidos los cortes se colocaron en laminillas las cuales posteriormente se desparafinaron y se tiñeron con H&E. La identificación de cambios morfológicos se hizo mediante la observación de las laminillas con ayuda de un microscopio óptico (marca Motic) a 10x y 40x.

## 6.- Resultados

### Determinación del genotipo

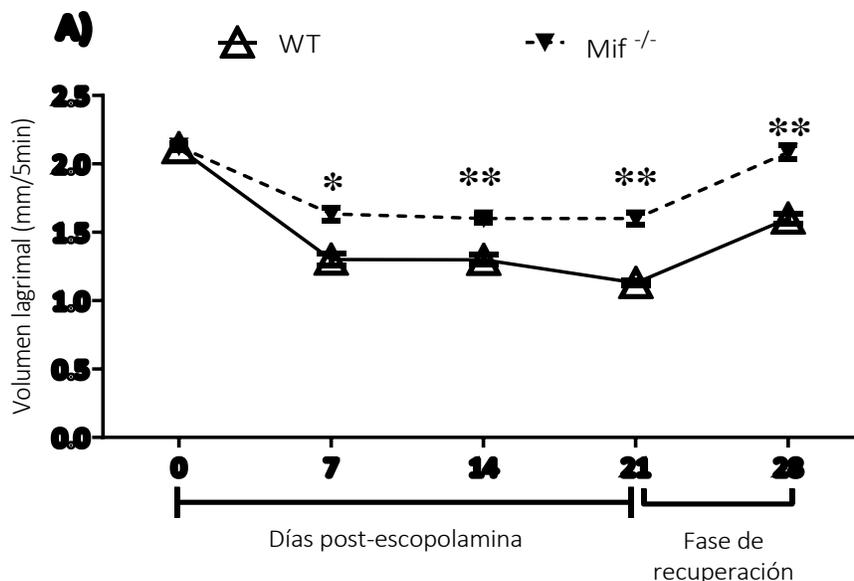
El genotipo es una herramienta esencial a la hora de la identificación de organismos con variaciones genéticas, ya sean inserciones o eliminaciones genéticas. En el laboratorio realizamos la genotipificación de nuestros animales experimentales de manera rutinaria, con el objetivo de confirmar que los ratones sean silvestres (WT) y deficientes para la citocina MIF ( $Mif^{-/-}$ ). En la figura 3, mostramos un gel de agarosa donde podemos observar en los carriles 2-6, la amplificación de fragmentos para MIF con un peso molecular de 200 pb. Del carril 7-11 podemos visualizar los amplificados para el gen de inserción de neomicina (NEO) con un peso de 500 pb.



**Figura 3.** Genotipo de ratones WT y  $Mif^{-/-}$ . Imagen de la electroforesis de los transcritos amplificados para el gen de MIF (200pb) y Neo (500pb).

## 6.1 Cuantificación del volumen lagrimal

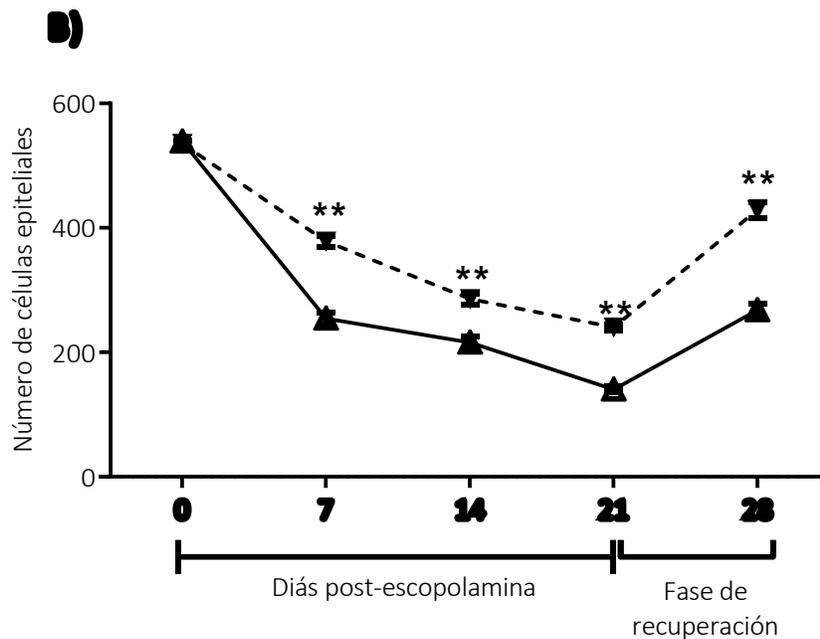
Uno de los signos de OS es la pérdida del volumen lagrimal como consecuencia del incremento en la osmolaridad de la lágrima y el proceso inflamatorio. Por tal motivo, uno de los objetivos particulares de nuestra investigación fue determinar si la citocina inflamatoria MIF favorece la pérdida del volumen lagrimal en ratones con OS. En la figura 4 se muestra el volumen de lágrima en ratones WT y *Mif*<sup>-/-</sup> a los 0, 7, 14 y 21 días post-escopolamina y a los siete días de haber suspendido el modelo (fase de recuperación). Se observó previo a la inducción de OS (día 0) que ambos grupos experimentales produjeron en promedio 2.11 mm de lágrima (valores normales). Sin embargo, a los 7, 14 y 21 días post-escopolamina, los ratones WT tuvieron una mayor pérdida del volumen lagrimal en comparación a los ratones *Mif*<sup>-/-</sup>. Es de interés que, aunque en la fase de recuperación ambos grupos de ratones recuperaron la producción de lagrime, solo los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> alcanzaron una producción similar a la observada al día 0.



**Figura 4.** Volumen lagrimal (Schirmer) de ratones WT y *Mif*<sup>-/-</sup> a los 0, 7, 14 y 21 post-inducción de OS y a los 7 días posteriores a la suspensión de la inducción del modelo. Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de 10 ratones por grupo.

## 6.2 Cuantificación del número de células epiteliales

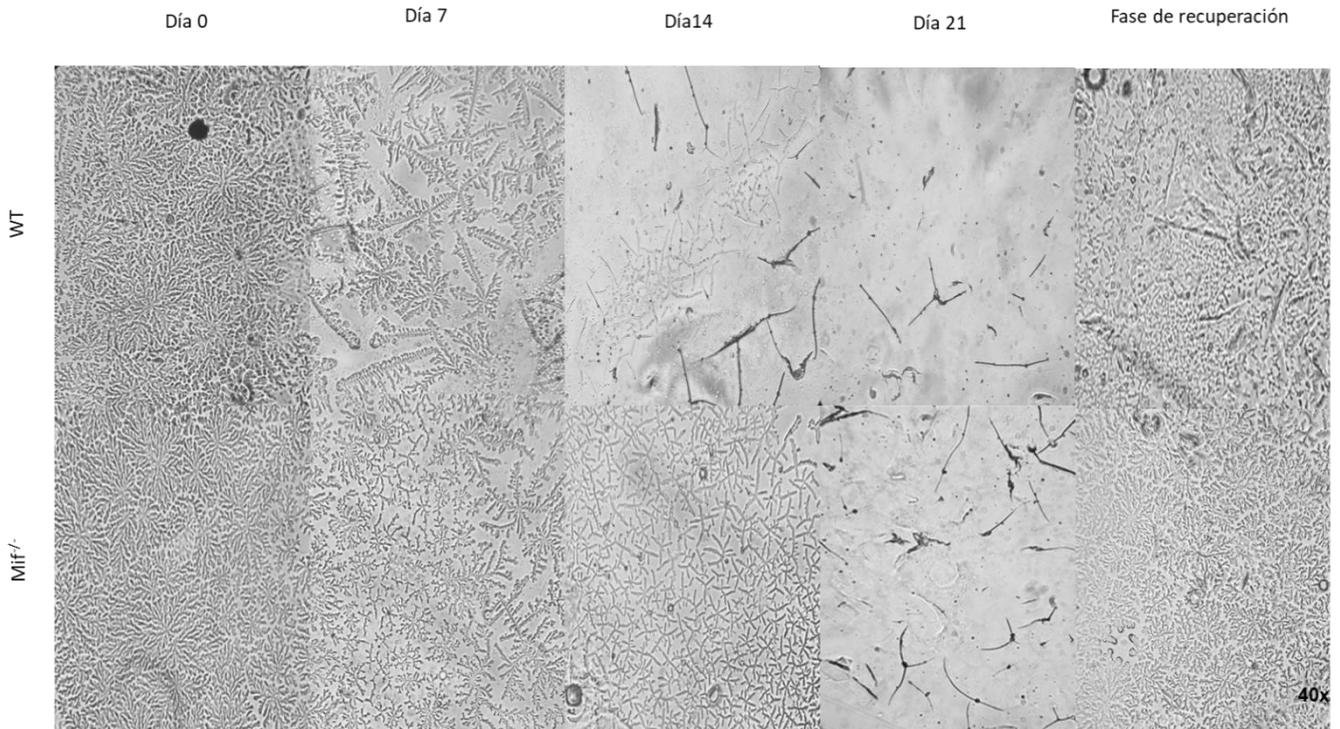
El epitelio conjuntival juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad de la superficie ocular, ya que además de funcionar como una barrera física, estas células se encargan de secretar mucinas contribuyendo a la formación de la porción mucínica de la PLI. Por tal motivo, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si MIF promueve la pérdida de esta población celular en ratones con OS. Se observó que al día cero ambos grupos experimentales tuvieron en promedio 560 células por  $\text{mm}^2$ . Tras la inducción de OS, es decir a los 7, 14 y 21 días post-escopolamina observamos que los ratones WT tuvieron una marcada pérdida de esta población celular en comparación con los ratones  $\text{Mif}^{-/-}$ , que correspondió al 74 y 56%, respectivamente (Figura 5). De manera similar a la recuperación observada en el volumen lagrimal durante la fase de recuperación, encontramos que en ambos grupos hay una recuperación del número de células epiteliales, pero esta es mayor en los ratones  $\text{Mif}^{-/-}$ .



**Figura 5.** Cuantificación de células epiteliales en conjuntiva (citología de impresión) de ratones WT y  $\text{Mif}^{-/-}$  a los 0, 7, 14 y 21 post-inducción de OS y a los 7 días posteriores a la suspensión de la inducción del modelo. Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de 10 ratones por grupo.

### **6.3 Determinación del patrón de arborización de mucinas**

Como se mencionó previamente una de las funciones del epitelio corneal y conjuntival es la síntesis de mucinas implicadas en la formación de la porción mucínica de la PL. Por tal motivo, uno de los objetivos de este proyecto fue evaluar y comparar el patrón de arborización de mucinas entre los ratones WT y *Mif<sup>-/-</sup>* a los 0, 7, 14 y 21 días post- inducción, y a los 7 días de haber suspendido la inducción de OS. La figura 6 muestra imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas de ambos grupos experimentales. Al día 0 observamos que ambos grupos de ratones tienen un patrón de arborización de mucinas tipo I considerado fisiológico según la escala de Rolando. Sin embargo, a los 7, 14 y 21 días post inducción de OS, los ratones WT presentaron un patrón tipo III y IV, respectivamente. Mientras que los ratones *Mif<sup>-/-</sup>* presentaron pérdida del patrón de arborización hasta el día 14 y 21, correspondiente a un patrón tipo II y III respectivamente. De manera interesante solo los ratones *Mif<sup>-/-</sup>* tuvieron una reversión en la alteración en el patrón de arborización de mucinas durante la fase de recuperación de OS, la evaluación mostró un patrón tipo I. En conjunto, los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad de la PL (volumen lagrimal, número de células caliciformes y patrón de arborización de mucinas) nos sugieren que la deficiencia de MIF retrasa y atenúa el desarrollo de los signos de OS.

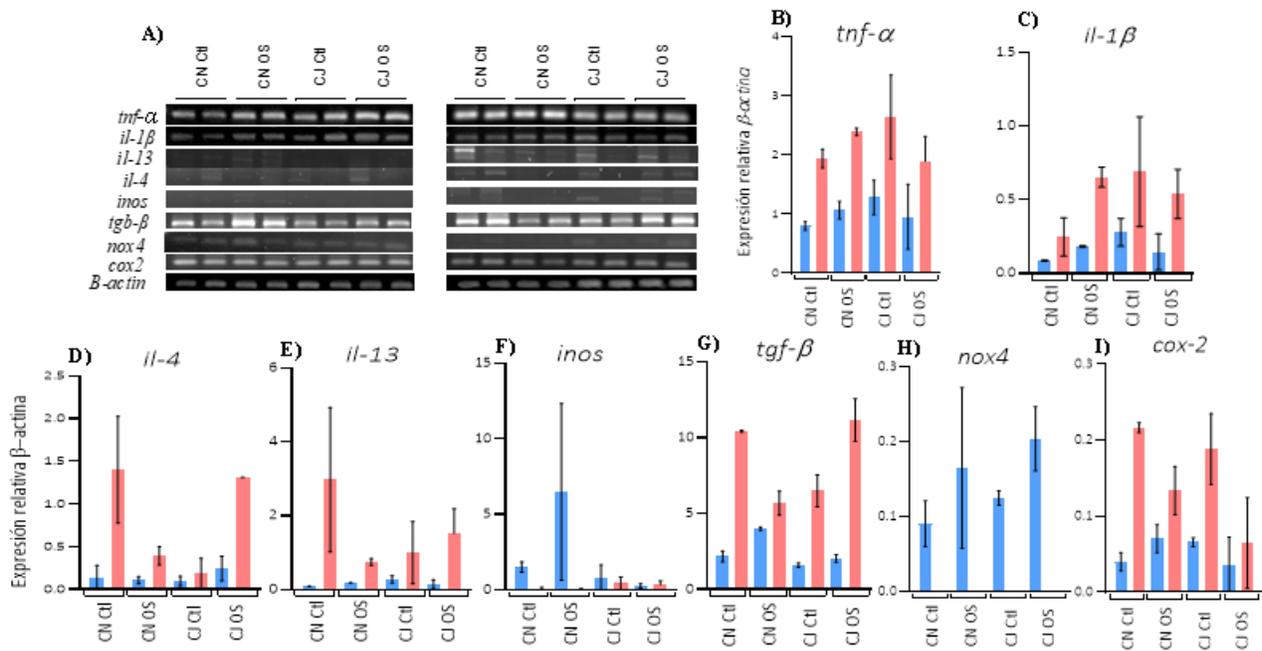


**Figura 6.** Imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas de ratones WT y *Mif<sup>-/-</sup>* a los 0, 7, 14 y 21 días post- inducción de OS con escopolamina y a los 7 días de haber suspendido el modelo (fase de recuperación) con una magnificación 40x, n= 15, 5 ratones por grupo

#### 6.4 Expresión de transcritos de córnea y conjuntiva

Evidencia científica señala que la inestabilidad de la superficie ocular es consecuencia de un microambiente hiperosmolar e inflamatorio en la SO [122-124]. Con el objetivo de determinar si los resultados obtenidos en la evaluación de la calidad y estabilidad de la PL pudiera estar relacionada con el incremento en la expresión de mediadores inflamatorios en la superficie ocular. Se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de transcritos por RT-PCR de citocinas inflamatorias, anti-inflamatorias y enzimas asociadas al estrés oxidativo en córnea (CN) y conjuntiva (CJ) de ratones WT y *Mif<sup>-/-</sup>* con OS. La figura 7-A muestra fragmentos de geles de agarosa con los productos amplificados. El análisis de las moléculas inflamatorias y anti-inflamatorias reveló una mayor expresión de *tnf- $\alpha$* , *il-1 $\beta$* , *il-4*, *il-13* y *tgf- $\beta$*  en CN y CJ de ratones *Mif<sup>-/-</sup>* en comparación con los ratones WT (figuras 7 B-G). También se analizó la expresión de las enzimas como *cox2*, *inos* y *nox4* dado el papel que tienen en el metabolismo del oxígeno y nitrógeno

respectivamente. Interesantemente, el análisis de la expresión de estas enzimas revelo que los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> solo expresan *cox2* en ambos tejidos oculares (figuras F, H, I). Estos resultados demuestran que la ausencia de MIF promueve un microambiente ocular mixto, caracterizado por la expresión de mRNA de moléculas inflamatorias y antiinflamatorias.

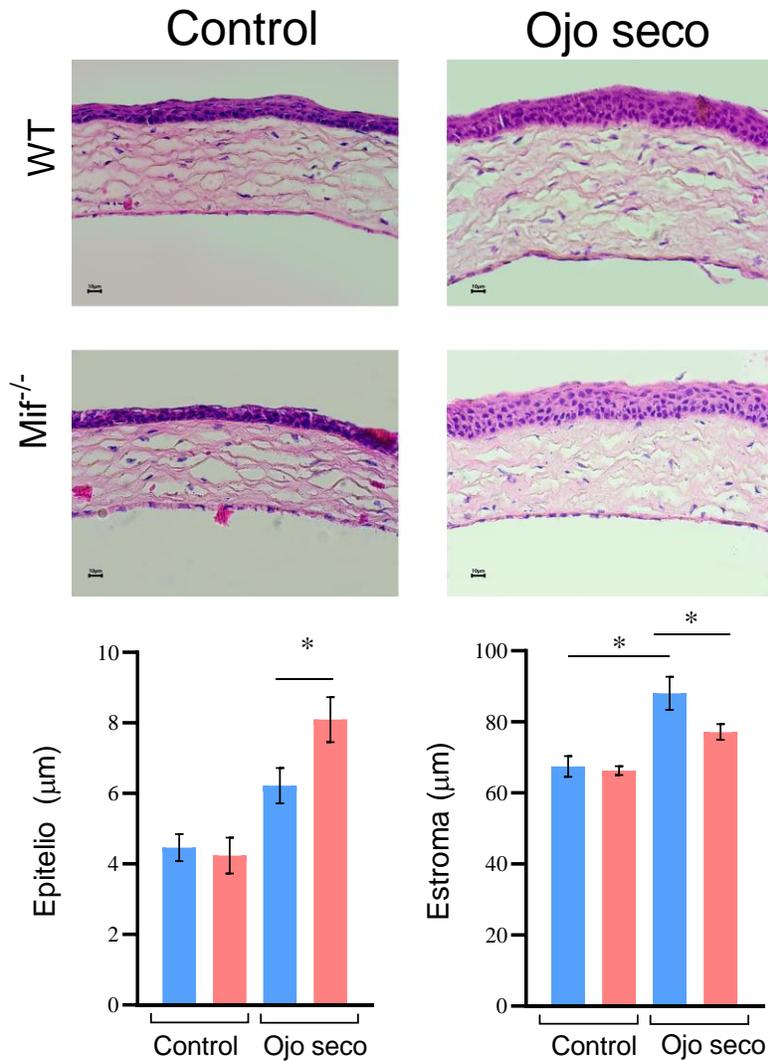


**Figura 7.** Análisis de la expresión de genes inflamatorios y antiinflamatorios en córnea y conjuntiva de ratones con OS. (A) Electroforesis de fragmentos amplificados por RT-PCR a los 21 días post-inducción de OS. Donde se analizó la expresión de *tnf-α* (B), *il-1β* (C), *il-4* (D), *il-13* (E), *inos* (F), *tgf-β* (G), *nox4* (H) y *cox2* (I).

## 6.5 Análisis histológico de córnea

Hay evidencia que señala a los procesos inflamatorios crónicos en la superficie ocular como una causa de cambios morfofisiológicos potencialmente deletéreos en la córnea, trayendo como consecuencia disminución de la agudeza visual y en casos graves ceguera. Por tal motivo, y dado que MIF es una citocina inflamatoria implicada en el desarrollo y cronicidad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, uno de nuestros objetivos particulares fue analizar si esta molecula promueve el daño en la córnea de ratones WT y *Mif*<sup>-/-</sup> con OS. En la figura 8 se muestran imágenes representativas del análisis histológico de córnea, donde se observa que a los siete días de haber suspendido la inducción de OS (fase de

recuperación) los ratones WT presentaron un mayor longitud de edema y un marcado desarreglo de las fibras de colágeno, principalmente en los dos primeros tercios del estroma en comparación con los ratones *Mif*<sup>-/-</sup>. Estos resultados junto con las observaciones obtenidas del análisis de la expresión de transcritos de moléculas inflamatorias y enzimas asociadas al estrés oxidativo confirman el papel patogénico de MIF.



**Figura 8.** Análisis histopatológico de córnea de ratones WT y *Mif*<sup>-/-</sup> con OS. A) Imágenes representativas de córnea de ratones control y experimentales. B) Grosor del epitelio y estroma de córnea.

## 7. Discusión

OS es una enfermedad inflamatoria crónica de la superficie ocular, que afecta entre el 5% al 50% de la población mundial [49]. Estudios independientes han reportado un incremento en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y MIF en muestras de saliva y suero de pacientes con OS autoinmune y no autoinmune. Aun cuando hay evidencia de que el proceso inflamatorio crónico subyacente a OS puede ocasionar disminución de la agudeza visual y ceguera, actualmente no se cuenta con un tratamiento eficaz [29]. En particular, nosotros estamos interesados por analizar el papel de la citocina MIF en el desarrollo de OS, debido a que favorece la síntesis de mediadores inflamatorios, además de promover la activación, diferenciación y la migración de poblaciones celulares patogénicas, que en conjunto exacerban y perpetúan el proceso inflamatorio.

Estudios en modelos murinos de enfermedades inflamatorias oculares como: uveítis, retinopatía y OS han reportado niveles incrementados de MIF, sugiriendo una posible participación en el agravamiento de estas patologías [92-115]. A pesar de las evidencias acerca del papel deletéreo de MIF, en general se desconocen los mecanismos por los cuales contribuye al desarrollo de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular como OS. Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó que ratones deficientes para MIF tienen una menor inestabilidad de la PL en comparación con los ratones silvestres [86]. Considerando estas evidencias, el objetivo de este trabajo se centró en analizar si induce la expresión de mediadores inflamatorios en el microambiente ocular (córnea y conjuntiva) en ratones con OS.

Tras la inducción de OS con escopolamina evaluamos la estabilidad de la PL a través de la cuantificación del volumen lagrimal, el patrón de arborización de mucinas y la cuantificación de células epiteliales, por las técnicas de Schirmer, ferning y citología de impresión, respectivamente. La evaluación de estos parámetros mostró que los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> tiene una menor pérdida del volumen lagrimal (27%) y número de células epiteliales (56%) en comparación a los ratones WT, los cuales presentaron una pérdida del (53%) y (76%), respectivamente (Figuras 4 y 5). Nuestros resultados son consistentes con otros reportes donde se

ha demostrado que el desarrollo y/o agravamiento de OS se caracteriza por incremento de la osmolaridad en la PL, acompañado de pérdida del volumen lagrimal, número de células caliciformes y alteración en el patrón de arborización de mucinas [116].

Se encontró que la pérdida de células epiteliales en los ratones WT, está asociada con un patrón de arborización de mucinas tipo III y IV ambos considerados patológicos según la escala de Rolando, mientras que el grupo *Mif*<sup>-/-</sup> presentó un patrón de arborización de mucinas tipo III al día 14 post-inducción (Figura 7). Además, observamos que los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> tuvieron recuperación del patrón de arborización de mucinas. Nuestros resultados son congruentes con estudios previos, donde se ha reportado que la pérdida de células epiteliales y caliciformes compromete la homeostasis de la superficie ocular, debido a que ambas poblaciones celulares participan en la síntesis de mucinas, particularmente MUC-1, 2, 4, 5AC, 7, 16, 17 y 18 [117-121]. En conjunto, los resultados obtenidos reproducen las observaciones previamente reportadas por nuestro grupo de investigación.

Con el objetivo de contribuir a la comprensión de los mecanismos por los cuales MIF contribuye al desarrollo de OS. Realizamos un análisis semicuantitativo de la expresión de transcritos en la córnea y conjuntiva de los animales experimentales a fin de determinar si la atenuación de los signos de OS observada en los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> está asociado con la expresión diferencial de citocinas y enzimas asociadas al estrés oxidativo en el microambiente ocular. Interesantemente, encontramos que la deficiencia de MIF resulta en la coexpresión de genes inflamatorios (*tnf- $\alpha$* , *il-1 $\beta$* ) y anti-inflamatorios (*il-4*, *il-13* y *tgf- $\beta$* ). Además, observamos que solo los ratones WT tuvieron expresión de las enzimas *inos* y *nox4*, mientras que los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> solo expresaron *cox2* (Figura 8 A-I). Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por Zhu L *et al*, los autores observaron que la inducción de OS con toxina botulínica promueve la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en células epiteliales de córnea y conjuntiva de ratones [121]. Por otro lado, se ha demostrado que IL-4 es capaz de contrarrestar y reprimir la función de citocinas inflamatorias y la actividad de enzimas como *inos* [122, 123]. Estos hallazgos explican el menor daño tisular observado en los cortes histológicos de la córnea de los ratones *Mif*<sup>-/-</sup> (Figura 8).

## **8. Conclusión**

El factor inhibidor de la migración de macrófagos exacerba la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal y promueve el daño tisular en córnea de ratones con ojo seco, a través de la expresión de citocinas inflamatorias y enzimas asociadas con el estrés oxidativo.

## 9. Perspectivas

Considerando los resultados obtenidos en este proyecto y con el objetivo de confirmar si la atenuación de los signos de OS y la menor expresión de moléculas inflamatorias observada en el microambiente ocular de los ratones deficientes para MIF pudiera estar relacionada con la modulación de vías de señalización.

Se plantea que en los próximos experimentos:

1.- Se analicen los niveles de expresión de ERK1/2, p38 y NF- $\kappa$ B por Western Blot en muestras de conjuntiva y córnea de animales experimentales.

2.- Por inmunohistoquímica se determine:

- El tipo de células inflamatorias infiltradas en la córnea.
- La presencia y/o ausencia de glucosaminoglicanos implicados en la homeostasis del estroma corneal.
- La presencia y/o ausencia de mucinas implicadas en la homeostasis del epitelio conjuntival.

## 10. Referencias bibliográficas

1. Ludwig PE, Jessu R, Czyz CN. Physiology, Eye. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470322/>
2. Kels BD, Grzybowski A, Grant-Kels JM. Human ocular anatomy. Clin Dermatol. 2015 Mar-Apr;33(2):140-6. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.006. PMID: 25704934.]
3. Malhotra A, Minja FJ, Crum A, Burrowes D. Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. Semin Ultrasound CT MR. 2011 Feb;32(1):2-13. doi: 10.1053/j.sult.2010.10.009. PMID: 21277487.]
4. Ludwig PE, Lopez MJ, Sevensma KE. Anatomy, Head and Neck, Eye Cornea. [Updated 2023 Aug 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470340/>
5. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Oct;48(10):4390; 4391-8. doi: 10.1167/iovs.07-0770. PMID: 17898256; PMCID: PMC2886589.
6. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. Braz J Med Biol Res. 2003 Aug;36(8):1037-46. doi: 10.1590/s0100-879x2003000800009. Epub 2003 Jul 23. PMID: 12886457
7. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian J Ophthalmol. 2018 Feb;66(2):190-194. doi: 10.4103/ijjo.IJO\_646\_17. PMID: 29380756; PMCID: PMC5819093.
8. Jirsova, K. (2017). The Cornea, Anatomy and Function. In: Light and Specular Microscopy of the Cornea. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48845-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48845-5_1)
9. Espana EM, Birk DE. Composition, structure and function of the corneal stroma. Exp Eye Res. 2020 Sep;198:108137. doi: 1-0.1016/j.exer.2020.108137. Epub 2020 Jul 11. PMID: 32663498; PMCID: PMC7508887.]
10. Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. Eur J Pharm Biopharm. 2005 Jul;60(2):227-40. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.12.007. PMID: 15939235.
11. Shumway CL, Motlagh M, Wade M. Anatomy, Head and Neck, Eye Conjunctiva. [Updated 2022 Aug 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519502/>
12. Van Haeringen NJ. Clinical biochemistry of tears. Surv Ophthalmol. 1981 Sep-Oct;26(2):84-96. doi: 10.1016/0039-6257(81)90145-4. PMID: 7034254
13. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. Exp Eye Res. 2020 Aug;197:108115. doi: 10.1016/j.exer.2020.108115. Epub 2020 Jun 16. PMID: 32561483; PMCID: PMC7483968.
14. Tiffany JM. The normal tear film. Dev Ophthalmol. 2008;41:1-20. doi: 10.1159/000131066. PMID:

18453758.

15. Chang AY, Purt B. Biochemistry, Tear Film. [Updated 2023 Jun 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572136/>
16. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucins. *Vet Ophthalmol.* 2004 Mar-Apr;7(2):71-7. doi: 10.1111/j.1463-5224.2004.00325.x. PMID: 14982585; PMCID: PMC7169288.
17. Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk MR, Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res.* 2014 Feb;55(2):289-98. doi: 10.1194/jlr.M044826. Epub 2013 Nov 28. PMID: 24287120; PMCID: PMC3886667.]
18. Hilkens J, Vos HL, Wesseling J, Boer M, Storm J, van der Valk S, Calafat J, Patriarca C. Is episialin/MUC1 involved in breast cancer progression? *Cancer Lett.* 1995 Mar 23;90(1):27-33. doi: 10.1016/0304-3835(94)03674-8. PMID: 7720039.
19. Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008 Oct;8(5):477-83. doi: 10.1097/ACI.0b013e32830e6b04. PMID: 18769205;
20. Carraway KL, Perez A, Idris N, Jepson S, Arango M, Komatsu M, Haq B, Price-Schiavi SA, Zhang J, Carraway CA. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, in cancer and epithelia: to protect and to survive. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002;71:149-85. doi: 10.1016/s0079 6603(02)71043-x. PMID: 12102554.
21. Lomako WM, Lomako J, Soto P, Carraway CA, Carraway KL. TGFbeta regulation of membrane mucin Muc4 via proteosome degradation. *J Cell Biochem.* 2009 Jul 1;107(4):797-802. doi: 10.1002/jcb.22177. PMID: 19388004; PMCID: PMC2745306.
22. Shiv Ram Krishn, Koelina Ganguly, Sukhwinder Kaur, Surinder K Batra, Ramifications of secreted mucin MUC5AC in malignant journey: a holistic view, *Carcinogenesis*, Volume 39, Issue 5, May 2018, Pages 633–651, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy019>
23. Bhattacharya D, Yu L, Wang M. Expression patterns of conjunctival mucin 5AC and aquaporin 5 in response to acute dry eye stress. *PLoS One.* 2017 Nov 7;12(11):e0187188. doi: 10.1371/journal.pone.0187188. PMID: 29112967; PMCID: PMC5675386
24. Blalock TD, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Heimer SR, Gilmore MS, Ramesh V, Gipson IK. Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Oct;48(10):4509-18. doi: 10.1167/iovs.07-0430. PMID: 17898272
25. Hong S, Van Kaer L. Immune privilege: keeping an eye on natural killer T cells. *J Exp Med.* 1999 Nov 1;190(9):1197-200. doi: 10.1084/jem.190.9.1197. PMID: 10544192; PMCID: PMC2195673.
26. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol.* 1977;25:1-54. PMID: 345773
27. Farris RL. Tear analysis in contact lens wearers. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1985;83:501-45. PMID: 3914131; PMCID: PMC1298711.

28. Milder B. The lacrimal apparatus. In: Moses RA, Hart WM, editors. *Adler's Physiology of the eye*. 8th ed. St Louis: Mosby; 1987. p. 15/35
29. Regueiro U, López-López M, Varela-Fernández R, Otero-Espinar FJ, Lema I. Biomedical Applications of Lactoferrin on the Ocular Surface. *Pharmaceutics*. 2023 Mar 7;15(3):865. doi: 10.3390/pharmaceutics15030865. PMID: 36986726; PMCID: PMC10052036.
30. Vagge A, Senni C, Bernabei F, Pellegrini M, Scordia V, Traverso CE, Giannaccare G. Therapeutic Effects of Lactoferrin in Ocular Diseases: From Dry Eye Disease to Infections. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 12;21(18):6668. doi: 10.3390/ijms21186668. PMID: 32932574; PMCID: PMC7554921.
31. Ubels JL, Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Van Dyken RE, Hatton MP. Gene expression in human accessory lacrimal glands of Wolfring. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Oct 1;53(11):6738-47. doi: 10.1167/iovs.12-10750. PMID: 22956620; PMCID: PMC4113189.
32. Glasgow BJ. Tear Lipocalin and Lipocalin-Interacting Membrane Receptor. *Front Physiol*. 2021 Aug 19;12:684211. doi: 10.3389/fphys.2021.684211. PMID: 34489718; PMCID: PMC8417070
33. O'Sullivan NL, Montgomery PC. Ocular Mucosal Immunity. *Mucosal Immunology*. 2015:1873–97. doi: 10.1016/B978-0-12-415847-4.00099-9. Epub 2015 Mar 13. PMCID: PMC7173532.
34. de Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel)*. 2019 Dec 5;8(4):57. doi: 10.3390/antib8040057. PMID: 31817406; PMCID: PMC6963396.
35. Mantelli F, Mauris J, Argüeso P. The ocular surface epithelial barrier and other mechanisms of mucosal protection: from allergy to infectious diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;13(5):563-8. doi: 10.1097/ACI.0b013e3283645899. PMID: 23974687; PMCID: PMC3858173.
36. Yi X, Wang Y, Yu FS. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Dec;41(13):4093-100. PMID: 11095601.
37. Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):562-71. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.12.015. Epub 2008 Jan 14. PMID: 18206110; PMCID: PMC2276178.
38. Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Jul;1(1):a002576. doi: 10.1101/cshperspect.a002576. PMID: 20066080; PMCID: PMC2742079.]
39. Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D, Streilein JW. Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991 Jul;32(8):2201-11. PMID: 2071334
40. Okanobo A, Chauhan SK, Dastjerdi MH, Kodati S, Dana R. Efficacy of topical blockade of interleukin-1 in experimental dry eye disease. *Am J Ophthalmol*. 2012 Jul;154(1):63-71. doi: 10.1016/j.ajo.2012.01.034. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22541929; PMCID: PMC3378826.
41. Shen L, Jin Y, Freeman GJ, Sharpe AH, Dana MR. The function of donor versus recipient programmed death-ligand 1 in corneal allograft survival. *J Immunol*. 2007 Sep 15;179(6):3672-9. doi: 10.4049/jimmunol.179.6.3672. PMID: 17785803.
42. Stuart PM, Yin X, Plambeck S, Pan F, Ferguson TA. The role of Fas ligand as an effector molecule

- in corneal graft rejection. *Eur J Immunol.* 2005 Sep;35(9):2591-7. doi: 10.1002/eji.200425934. PMID: 16114107.
43. Xie L, Shi W, Guo P. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in corneal transplantation. *Transplantation.* 2003 Dec 15;76(11):1556-9. doi: 10.1097/01.TP.0000089242.86443.40. PMID: 14702523.]
44. Saban DR, Bock F, Chauhan SK, Masli S, Dana R. Thrombospondin-1 derived from APCs regulates their capacity for allosensitization. *J Immunol.* 2010 Oct 15;185(8):4691-7. doi: 10.4049/jimmunol.1001133. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20844200; PMCID: PMC3090006
45. Taylor AW, Lee D. Applications of the role of  $\alpha$ -MSH in ocular immune privilege. *Adv Exp Med Biol.* 2010;681:143-9. doi: 10.1007/978-1-4419-6354-3\_12. PMID: 21222267; PMCID: PMC3329275.
46. Sabatino F, Di Zazzo A, De Simone L, Bonini S. The Intriguing Role of Neuropeptides at the Ocular Surface. *Ocul Surf.* 2017 Jan;15(1):2-14. doi: 10.1016/j.jtos.2016.10.003. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27840126.
47. Foulsham W, Coco G, Amouzegar A, Chauhan SK, Dana R. When Clarity Is Crucial: Regulating Ocular Surface Immunity. *Trends Immunol.* 2018 Apr;39(4):288-301. doi: 10.1016/j.it.2017.11.007. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29248310; PMCID: PMC5880704
48. Chen Y, Wang S, Alemi H, Dohlman T, Dana R. Immune regulation of the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2022 May;218:109007. doi: 10.1016/j.exer.2022.109007. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35257715; PMCID: PMC9050918.]
49. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K, Stapleton F. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf.* 2017 Jul;15(3):276-283. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.008. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28736335
50. Donthineni PR, Doctor MB, Shanbhag S, Kate A, Galor A, Djalilian AR, Singh S, Basu S. Aqueous-deficient dry eye disease: Preferred practice pattern guidelines on clinical approach, diagnosis, and management. *Indian J Ophthalmol.* 2023 Apr;71(4):1332-1347. doi: 10.4103/IJO.IJO\_2808\_22. PMID: 37026265; PMCID: PMC10276701
51. Findlay Q, Reid K. Dry eye disease: when to treat and when to refer. *Aust Prescr.* 2018 Oct;41(5):160-163. doi: 10.18773/austprescr.2018.048. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30410213; PMCID: PMC6202299.
52. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, Na KS, Schaumberg D, Uchino M, Vehof J, Viso E, Vitale S, Jones L. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf.* 2017 Jul;15(3):334-365. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.003. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28736337.]
53. Farrand KF, Fridman M, Stillman IÖ, Schaumberg DA. Prevalence of Diagnosed Dry Eye Disease in the United States Among Adults Aged 18 Years and Older. *Am J Ophthalmol.* 2017 Oct;182:90-98. doi: 10.1016/j.ajo.2017.06.033. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28705660.
54. McCann P, Abraham AG, Gregory DG, Hauswirth S, Ifantides C, Liu SH, Saldanha IJ, Li T. Prevalence and incidence of dry eye in the USA: a systematic review protocol. *BMJ Open.* 2021 Nov

- 23;11(11):e056203. doi: 10.1136/bmjopen-2021-056203. PMID: 34815292; PMCID: PMC8611449
55. Garza-León M, Valencia-Garza M, Martínez-Leal B, Villarreal-Peña P, Marcos-Abdala HG, Cortéz-Guajardo AL, Jasso-Banda A. Prevalence of ocular surface disease symptoms and risk factors in group of university students in Monterrey, Mexico. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2016 Dec;6(1):44. doi: 10.1186/s12348-016-0114-z. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27864795; PMCID: PMC5116015.
56. Navarro Luna P, Vázquez Mendoza A, Alonso Trujillo J, González Aragón Pineda ÁÉ y Ramos Montes ÓA. Prevalencia de ojo seco en pacientes que acuden a la Clínica de Optometría de la FESI, UNAM. *Cienc Tecnol Salud Vis Ocul*. 2019;(1): 11-18. doi: <https://doi.org/10.19052/sv.vol17.iss1.1>
57. Mohamed HB, Abd El-Hamid BN, Fathalla D, Fouad EA. Current trends in pharmaceutical treatment of dry eye disease: A review. *Eur J Pharm Sci*. 2022 Aug 1;175:106206. doi: 10.1016/j.ejps.2022.106206. Epub 2022 May 11. PMID: 35568107.
58. Dunn JD, Karpecki PM, Meske ME, Reissman D. Evolving knowledge of the unmet needs in dry eye disease. *Am J Manag Care*. 2021 Mar;27(2 Suppl):S23-S32. doi: 10.37765/ajmc.2021.88625. PMID: 33856159.
59. Golden MI, Meyer JJ, Patel BC. Dry Eye Syndrome. [Updated 2023 Apr 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470411/>
60. Tavares Fde P, Fernandes RS, Bernardes TF, Bonfioli AA, Soares EJ. Dry eye disease. *Semin Ophthalmol*. 2010 May;25(3):84-93. doi: 10.3109/08820538.2010.488568. PMID: 20590418.]
61. Dougherty BE, Nichols JJ, Nichols KK. Rasch analysis of the Ocular Surface Disease Index (OSDI). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Nov 7;52(12):8630-5. doi: 10.1167/iovs.11-8027. PMID: 21948646; PMCID: PMC3230285.
62. Guarnieri A, Carnero E, Bleau AM, Alfonso-Bartolozzi B, Moreno-Montañés J. Relationship between OSDI questionnaire and ocular surface changes in glaucomatous patients. *Int Ophthalmol*. 2020 Mar;40(3):741-751. doi: 10.1007/s10792-019-01236-z. Epub 2019 Dec 7. PMID: 31813109
63. Masmali AM, Purslow C, Murphy PJ. The tear ferning test: a simple clinical technique to evaluate the ocular tear film. *Clin Exp Optom*. 2014 Sep;97(5):399-406. doi: 10.1111/cxo.12160. PMID: 25138744.
64. Brott NR, Ronquillo Y. Schirmer Test. 2023 May 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32644585.
65. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea*. 1988;7(1):71-81. PMID: 3280239.
66. Verjee MA, Brissette AR, Starr CE. Dry Eye Disease: Early Recognition with Guidance on Management and Treatment for Primary Care Family Physicians. *Ophthalmol Ther*. 2020 Dec;9(4):877-888. doi: 10.1007/s40123-020-00308-z. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33090327; PMCID: PMC7708574.
67. Aragona P, Giannaccare G, Mencucci R, Rubino P, Cantera E, Rolando M. Modern approach to the treatment of dry eye, a complex multifactorial disease: a P.I.C.A.S.S.O. board review. *Br J*

- Ophthalmol. 2021 Apr;105(4):446-453. doi: 10.1136/bjophthalmol-2019-315747. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32703782; PMCID: PMC8005804.
68. Babilas P, Schreml S, Szeimies RM, Landthaler M. Intense pulsed light (IPL): a review. *Lasers Surg Med.* 2010 Feb;42(2):93-104. doi: 10.1002/lsm.20877. PMID: 20166155
69. Choi M, Han SJ, Ji YW, Choi YJ, Jun I, Alotaibi MH, Ko BY, Kim EK, Kim TI, Nam SM, Seo KY. Meibum Expressibility Improvement as a Therapeutic Target of Intense Pulsed Light Treatment in Meibomian Gland Dysfunction and Its Association with Tear Inflammatory Cytokines. *Sci Rep.* 2019 May 21;9(1):7648. doi: 10.1038/s41598-019-44000-0. PMID: 31113979; PMCID: PMC6529521
70. Holland EJ, Jackson MA, Donnenfeld E, et al. Efficacy of Lifitegrast Ophthalmic Solution, 5.0%, in Patients With Moderate to Severe Dry Eye Disease: A Post Hoc Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Ophthalmol.* 2021;139(11):1200–1208. doi:10.1001/jamaophthalmol.2021.3943
71. Haber SL, Benson V, Buckway CJ, Gonzales JM, Romanet D, Scholes B. Lifitegrast: a novel drug for patients with dry eye disease. *Ther Adv Ophthalmol.* 2019 Aug 22;11:2515841419870366. doi: 10.1177/2515841419870366. PMID: 31489402; PMCID: PMC6710705.
72. Donnenfeld ED, Perry HD, Nattis AS, Rosenberg ED. Lifitegrast for the treatment of dry eye disease in adults. *Expert Opin Pharmacother.* 2017 Oct;18(14):1517-1524. doi: 10.1080/14656566.2017.1372748. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28841079
73. Higuchi A. Autologous Serum and Serum Components. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Nov 1;59(14):DES121-DES129. doi: 10.1167/iovs.17-23760. PMID: 30481816
74. Vazirani J, Sridhar U, Gokhale N, Doddigarla VR, Sharma S, Basu S. Autologous serum eye drops in dry eye disease: Preferred practice pattern guidelines. *Indian J Ophthalmol.* 2023 Apr;71(4):1357-1363. doi: 10.4103/IJO.IJO\_2756\_22. PMID: 37026267; PMCID: PMC10276663.
75. Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2008 Nov-Dec;71(6 Suppl):47-54. PMID: 19274411
76. Marshall LL, Roach JM. Treatment of Dry Eye Disease. *Consult Pharm.* 2016 Feb;31(2):96-106. doi: 10.4140/TCP.n.2016.96. PMID: 26842687.
77. Pflugfelder SC, de Paiva CS. The Pathophysiology of Dry Eye Disease: What We Know and Future Directions for Research. *Ophthalmology.* 2017 Nov;124(11S):S4-S13. doi: 10.1016/j.optha.2017.07.010. PMID: 29055361; PMCID: PMC5657523.
78. Rao SK, Mohan R, Gokhale N, Matalia H, Mehta P. Inflammation and dry eye disease-where are we? *Int J Ophthalmol.* 2022 May 18;15(5):820-827. doi: 10.18240/ijo.2022.05.20. PMID: 35601175; PMCID: PMC9091897.
79. Hessen M, Akpek EK. Dry eye: an inflammatory ocular disease. *J Ophthalmic Vis Res.* 2014 Apr;9(2):240-50. PMID: 25279127; PMCID: PMC4181208
80. Luo L, Li DQ, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Dec;45(12):4293-301. doi: 10.1167/iovs.03-1145.

PMID: 15557435.

81. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol.* 2012 Jan;130(1):90-100. doi: 10.1001/archophthalmol.2011.364. PMID: 22232476; PMCID: PMC3677724.
82. Yoon KC, Jeong IY, Park YG, Yang SY. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea.* 2007 May;26(4):431-7. doi: 10.1097/ICO.0b013e31803dcda2. PMID: 17457192.
83. Lio CT, Dhanda SK, Bose T. Cluster Analysis of Dry Eye Disease Models Based on Immune Cell Parameters - New Insight Into Therapeutic Perspective. *Front Immunol.* 2020 Sep 29;11:1930. doi: 10.3389/fimmu.2020.01930. PMID: 33133058; PMCID: PMC7550429.
84. Kelagere Y, Scholand KK, DeJong EN, Boyd AI, Yu Z, Astley RA, Callegan MC, Bowdish DM, Makarenkova HP, de Paiva CS. TNF is a critical cytokine in age-related dry eye disease. *Ocul Surf.* 2023 Aug 25;30:119-128. doi: 10.1016/j.jtos.2023.08.004. Epub ahead of print. PMID: 37634571.
85. Okanobo A, Chauhan SK, Dastjerdi MH, Kodati S, Dana R. Efficacy of topical blockade of interleukin-1 in experimental dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 2012 Jul;154(1):63-71. doi: 10.1016/j.ajo.2012.01.034. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22541929; PMCID: PMC3378826.
86. Rivera LA, Hernández PE, Vannan DT, Reyes JL, Rodríguez T, Sánchez-Barrera Á, González MI, Bustos J, Ramos OA, Juárez I, Rodríguez-Sosa M, Vázquez A. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a Key Player in Dry Eye Disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 2023 Dec 21:1-15. doi: 10.1080/09273948.2023.2290624. Epub ahead of print. PMID: 38127798.
87. Voss S, Krüger S, Scherschel K, Warnke S, Schwarzl M, Schrage B, Girdukas E, Meyer C, Blankenberg S, Westermann D, Lindner D. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Expression Increases during Myocardial Infarction and Supports Pro-Inflammatory Signaling in Cardiac Fibroblasts. *Biomolecules.* 2019 Jan 23;9(2):38. doi: 10.3390/biom9020038. PMID: 30678084; PMCID: PMC6406883.
88. Roger T, Glauser MP, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res.* 2001;7(6):456-60. PMID: 11753217
89. Roger T, Froidevaux C, Martin C, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Endotoxin Res.* 2003;9(2):119-23. doi: 10.1179/096805103125001513. PMID: 12803886.
90. Rossi AG, Haslett C, Hirani N, Greening AP, Rahman I, Metz CN, Bucala R, Donnelly SC. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest.* 1998 Jun 15;101(12):2869-74. doi: 10.1172/JCI1524. PMID: 9637721; PMCID: PMC508878.
91. Riedemann NC, Guo RF, Gao H, Sun L, Hoesel M, Hollmann TJ, Wetsel RA, Zetoune FS, Ward PA. Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J*

- Immunol. 2004 Jul 15;173(2):1355-9. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1355. PMID: 15240730.
92. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):791-800. doi: 10.1038/nri1200. PMID: 14502271; PMCID: PMC7097468.
93. Amin MA, Haas CS, Zhu K, Mansfield PJ, Kim MJ, Lackowski NP, Koch AE. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2252-61. doi: 10.1182/blood-2005-05-2011. Epub 2005 Nov 29. PMID: 16317091; PMCID: PMC1472703.
94. Rheumatoid arthritis. *J Biol Chem*. 2000 Jan 7;275(1):444-50. doi: 10.1074/jbc.275.1.444. PMID: 10617637.
95. Morel JC, Park CC, Zhu K, Kumar P, Ruth JH, Koch AE. Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):34679-91. doi: 10.1074/jbc.M206337200. Epub 2002 Jul 8. PMID: 12105209.
96. de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alsahli M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol*. 2001 Nov;2(11):1061-6. doi: 10.1038/ni720. Erratum in: *Nat Immunol* 2002 Apr;3(4):407. Sahli MA [corrected to Alsahli M]. PMID: 11668338.
97. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*. 2006 Oct;25(4):595-606. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.020. PMID: 17045821; PMCID: PMC3707630.
98. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem*. 1999 Jun 18;274(25):18100-6. doi: 10.1074/jbc.274.25.18100. PMID: 10364264
99. Alampour-Rajabi S, El Bounkari O, Rot A, Müller-Newen G, Bachelier F, Gawaz M, Weber C, Schober A, Bernhagen J. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J*. 2015 Nov;29(11):4497-511. doi: 10.1096/fj.15-273904. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26139098.
100. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*. 2007 May;13(5):587-96. doi: 10.1038/nm1567. Epub 2007 Apr 15. PMID: 17435771.
101. Tarnowski M, Grymula K, Liu R, Tarnowska J, Drukala J, Ratajczak J, Mitchell RA, Ratajczak MZ, Kucia M. Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates

- tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer Res.* 2010 Oct;8(10):1328-43. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0288. Epub 2010 Sep 22. PMID: 20861157; PMCID: PMC2974061
102. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 May;19(5):313-326. doi: 10.1038/nrm.2017.132. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29410531
103. Song, S., Xiao, Z., Dekker, F.J. et al. Macrophage migration inhibitory factor family proteins are multitasking cytokines in tissue injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 105 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04038-8>
104. Noe JT, Mitchell RA. MIF-Dependent Control of Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2020 Nov 25;11:609948. doi: 10.3389/fimmu.2020.609948. PMID: 33324425; PMCID: PMC7724107
105. Mantovani, F., Collavin, L. & Del Sal, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ* 26, 199–212 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>].
106. Satoskar AR, Bozza M, Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun.* 2001 Feb;69(2):906-11. doi: 10.1128/IAI.69.2.906-911.2001. PMID: 11159984; PMCID: PMC97968.
107. Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I, Gómez-García L, Snider H, Satoskar AR, Rodríguez-Sosa M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 2006 Jun;74(6):3170-9. doi: 10.1128/IAI.01648-05. PMID: 16714544; PMCID: PMC1479264.
108. Salazar-Castañón VH, Juárez-Avelar I, Legorreta-Herrera M, Rodriguez-Sosa M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to immunopathogenesis during *Plasmodium yoelii* 17XL infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Aug 24;12:968422. doi: 10.3389/fcimb.2022.968422. Erratum in: *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Dec 15;12:1106479. PMID: 36093199; PMCID: PMC9449124.
109. Sánchez-Zamora YI, Rodriguez-Sosa M. The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2014;2014:804519. doi: 10.1155/2014/804519. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24527464; PMCID: PMC3910331.
110. Fagone P, Mazzon E, Cavalli E, Bramanti A, Petralia MC, Mangano K, Al-Abed Y, Bramati P, Nicoletti F. Contribution of the macrophage migration inhibitory factor superfamily of cytokines in the pathogenesis of preclinical and human multiple sclerosis: In silico and in vivo evidences. *J Neuroimmunol.* 2018 Sep 15;322:46-56. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.06.009. Epub 2018 Jun 15. PMID: 29935880.
111. Wang R, Yang Y, Liu X, Lei L, Qi X. Abnormal índrome of CXCL13, MIF and IL-35 in patients with primary Sjögren's índrome and its relationship with disease severity. *Cent Eur J Immunol.* 2023;48(2):144-149. Doi: 10.5114/ceji.2023.127536. Epub 2023 May 25. PMID: 37692029; PMCID: PMC10485687
112. Matsuda A, Tagawa Y, Yoshida K, Matsuda H, Nishihira J. Expression of macrophage

- migration inhibitory factor in rat retina and its immunohistochemical localization. *J Neuroimmunol.* 1997 Jul;77(1):85-90. Doi: 10.1016/s0165-5728(97)00061-1. PMID: 9209272.
113. Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human cornea. *FEBS Lett.* 1996 May 6;385(3):225-8. doi: 10.1016/0014-5793(96)00386-9. PMID: 8647256.
114. Matsuda A, Kotake S, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. Detection and immunolocalization of macrophage migration inhibitory factor in rat iris and ciliary epithelium. *Immunol Lett.* 1996 Oct;53(1):1-5. doi: 10.1016/0165-2478(96)02600-4. PMID: 8946210
115. Takase H, Sugita S, Rhee DJ, Imai Y, Taguchi C, Sugamoto Y, Tagawa Y, Nishihira J, Russell P, Mochizuki M. The presence of macrophage migration inhibitory factor in human trabecular meshwork and its upregulatory effects on the T helper 1 cytokine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Aug;43(8):2691-6. PMID: 12147604
116. Abu El-Asrar AM, Ahmad A, Siddiquei MM, De Zutter A, Allegaert E, Gikandi PW, De Hertogh G, Van Damme J, Opdenakker G, Struyf S. The Proinflammatory and Proangiogenic Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Potential Regulator in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Front Immunol.* 2019 Dec 4;10:2752. doi: 10.3389/fimmu.2019.02752. PMID: 31866994; PMCID: PMC6904364.
117. Vincent FB, Lang T, Kandane-Rathnayake R, Downie-Doyle S, Morand EF, Rischmueller M. Serum and urinary macrophage migration inhibitory factor (MIF) in primary Sjögren's syndrome. *Joint Bone Spine.* 2019 May;86(3):393-395. doi: 10.1016/j.jbspin.2018.07.001. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30025957.
118. Wang R, Yang Y, Liu X, Lei L, Qi X. Abnormal expression of CXCL13, MIF and IL-35 in patients with primary Sjögren's syndrome and its relationship with disease severity. *Cent Eur J Immunol.* 2023;48(2):144-149. doi: 10.5114/ceji.2023.127536. Epub 2023 May 25. PMID: 37692029; PMCID: PMC10485687.
119. Wohlfart P, Lin J, Dietrich N, Kannt A, Elvert R, Herling AW, Hammes HP. Expression patterning reveals retinal inflammation as a minor factor in experimental retinopathy of ZDF rats. *Acta Diabetol.* 2014 Aug;51(4):553-8. doi: 10.1007/s00592-013-0550-2. Epub 2014 Jan 30. PMID: 24477469; PMCID: PMC4127441.
120. Park CY, Zhuang W, Lekhanont K, Zhang C, Cano M, Lee WS, Gehlbach PL, Chuck RS. Lacrimal gland inflammatory cytokine gene expression in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model. *Mol Vis.* 2007 Nov 29;13:2222-32. PMID: 18087241.
121. Zhu L, Shen J, Zhang C, Park CY, Kohanim S, Yew M, Parker JS, Chuck RS. Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulium toxin B induced murine dry eye model. *Mol Vis.* 2009;15:250-8. Epub 2009 Jan 30. PMID: 19190733; PMCID: PMC2633460
122. Hiroi M, Sakaeda Y, Yamaguchi H, Ohmori Y. Anti-inflammatory cytokine interleukin-4

inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:369693. doi: 10.1155/2013/369693. Epub 2013 Dec 29. PMID: 24459328; PMCID: PMC3891534.

123. Linehan JD, Kolios G, Valatas V, Robertson DA, Westwick J. Immunomodulatory cytokines suppress epithelial nitric oxide production in inflammatory bowel disease by acting on mononuclear cells. *Free Radic Biol Med.* 2005 Dec 15;39(12):1560-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.019. Epub 2005 Aug 19. PMID: 16298681..

## 11. Anexos



OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

# Arturo Aguilar Garduño

Por su participación como ponente en la 1er. Jornada Interuniversitaria  
de Intercambio de Experiencias de Investigación CLIO 2022



Eddy Augusto López León  
Miembro Fundador  
Ecuador  
cli-o.org

MSc. Manuel Salvador Pérez Arriola  
PRESIDENTE CLIO

Laura Brusi  
SECRETARIA CLIO



Facultad de Estudios Superiores  
**IZTACALA**



**DIVISIÓN DE  
INVESTIGACIÓN Y  
POSGRADO**



**COLOQUIO DE  
INVESTIGACIÓN**

**LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
A TRAVÉS DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
AGRADECE A:**

**ARTURO AGUILAR GARDUÑO**

Por su participación con el trabajo estudiantil titulado "Participación de MIF en la expresión de moléculas inflamatorias en la superficie ocular de ratones con Ojo seco" en el XLI Coloquio de Investigación celebrado del 02 al 04 de agosto del presente.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Los Reyes Iztacala, a 1 de septiembre de 2023

Dr. Hibrain Adán Pérez Mendoza  
Jefe de la División de Investigación y Posgrado





Facultad de Estudios Superiores  
**IZTACALA**



DIVISIÓN DE  
INVESTIGACIÓN Y  
POSGRADO



**XLI** COLOQUIO DE  
INVESTIGACIÓN

**LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
A TRAVÉS DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
OTORGA EL PRESENTE RECONOCIMIENTO A:**

## **ARTURO AGUILAR GARDUÑO**

Por haber obtenido el primer lugar en el certamen de trabajos estudiantiles de la Carrera de Optometría con el trabajo titulado **PARTICIPACIÓN DE MIF EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS INFLAMATORIAS EN LA SUPERFICIE OCULAR DE RATONES CON OJO SECO**, en el marco del *XLI Coloquio de Investigación* celebrado del 02 al 04 de agosto del 2023.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Los Reyes Iztacala, a 04 de agosto de 2023

---

Dr. Hibrain Adán Pérez Mendoza  
Jefe de la División de Investigación y Posgrado