



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“LA TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE MACRÓFAGOS
REVIERTE LA ATENUACIÓN DE LOS SIGNOS DE OJO
SECO EN RATONES DEFICIENTES PARA LA
MOLÉCULA MIF”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

LUIS ARMANDO RIVERA VELÁZQUEZ

Directora de tesis: **Dra. Alicia Vázquez Mendoza**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1.- RESUMEN

Ojo seco (OS) es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular caracterizada por la pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y daño tisular en la superficie ocular (SO). La prevalencia mundial oscila entre el 5 y el 50 % de la población adulta. Hay evidencia de que el agravamiento de la patología está relacionado con la sobreexpresión de mediadores inflamatorios como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) α , interferón gamma (IFN) γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, quimiocinas, metaloproteinasas 1, 3, 6 y 9 (MMP 1, 3, 6, 9) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). MIF es una citocina inflamatoria y un potente modulador de la respuesta inmune innata producida por una amplia variedad de células (monocitos, macrófagos y células T), capaz de inducir la producción de otros mediadores inflamatorios como TNF- α e IL-1 β . Diversos estudios han demostrado que la inhibición de MIF reduce significativamente el proceso inflamatorio y atenúa el desarrollo de patologías inflamatorias y autoinmunes. Sin embargo, es escasa la información acerca de su participación en el desarrollo y curso de enfermedades inflamatorias oculares como ojo seco (OS). Evidencia reciente sugiere que la respuesta inflamatoria crónica de la SO en ojo seco es un proceso que involucra la producción de diversos mediadores inflamatorios y enzimas, que en conjunto promueven la activación y polarización de poblaciones celulares patogénicas de la respuesta inmune innata residentes en córnea y conjuntiva, entre ellas los macrófagos (M ϕ). Con el objetivo de contribuir a establecer la participación de esta población celular en el desarrollo de OS, este estudio se dividió en dos fases. En la primera analizamos el efecto de la transferencia de M ϕ WT a ratones *Mif*^{-/-}, los resultados obtenidos de este análisis reveló que la transferencia promueve la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal (pérdida del volumen lagrimal y alteración del patrón de arborización de mucinas). Posteriormente, en la segunda fase comparamos el efecto de la transferencia de M ϕ M1 versus M2, interesantemente encontramos que la transferencia de M ϕ M1 exacerba los signos de OS y el daño tisular en la córnea, mientras que la transferencia de macrófagos M2 retrasó y atenuó los signos.

Palabras clave: Factor Inhibidor de Migración, inflamación, superficie ocular, ojo seco, película lagrimal, transferencia de M ϕ .

ÍNDICE

1.- RESUMEN	2
ÍNDICE	3
Índice de tablas y figuras	5
Abreviaturas	6
AGRADECIMIENTOS	9
2.- INTRODUCCIÓN	13
Anatomía ocular	13
2.1.- Estructura y fisiología de la Superficie Ocular	14
2.2.- Estructura y función de la película lagrimal	17
2.3.- Definición y clasificación de ojo seco	20
2.4.- Prevalencia de Ojo seco	21
2.5.- Signos y síntomas de OS	21
2.6.- Diagnóstico y tratamiento	22
2.7.- Inflamación y Ojo seco	22
2.8.- El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), un importante iniciador y promotor de la respuesta inflamatoria	23
2.9.- Papel de los macrófagos en la respuesta inmune inflamatoria	25
3.- Hipótesis	27
4.- Objetivos	28
4.1.- General	28
4.2.- Particulares	28
5.- Materiales y métodos	29
5.1.- Animales experimentales	29
5.2.- Genotipo de ratones experimentales por PCR	29
5.2.1.- Amplificación del gen	30
5.3.- Obtención y diferenciación de macrófagos de médula ósea	31
5.4.- Evaluación de la calidad de la película lagrimal por las técnicas de Schirmer y ferning	33
5.5.- Inducción del modelo de ojo seco	33

5.6.- Evaluación de los signos de Ojo seco en ratones WT y Mif ^{-/-} por medio de las técnicas de ferning y Schirmer	34
5.7.- Cuantificación de citocinas en suero por la técnica de ELISA-sándwich	35
5.8.- Análisis del perfil de citocinas en cultivos de linfocitos provenientes de bazo y ganglio linfático cervical	37
5.9.- Análisis histopatológico de córnea de ratones control y experimentales	38
5.10.- Determinación del número de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ por citometría de flujo	40
6.- Resultados.....	41
6.1.- Análisis del patrón de arborización de mucinas conjuntivales	41
6.2.- Cuantificación del volumen lagrimal	45
6.3.- Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos por ELISA sándwich	48
6.4.- Análisis histopatológico de córnea de ratones con Ojo seco.....	50
6.5.- Análisis del porcentaje de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ por citometría de flujo en ratones con Ojo seco y transferencia de macrófagos WT	53
7.- Discusión	59
8.- Conclusiones	65
9.- Perspectivas	66
Literatura citada	67
Apéndices.....	73
Apéndice 1 Buffer de lisis	73
Apéndice 3 TBE 1X.....	73
Apéndice 4 Medio de cultivo suplementado RPMI-FBS 20%.....	73
Apéndice 5 Solución de lavado PBS-TWEEN AL 0.05%	74
Apéndice 6 Solución de Bloqueo (PBS-BSA)	74
Apéndice 7 Solución hemolizante ACK	74
Apéndice 8 Buffer 1	74
Apéndice 9 Fijador de Zinc	74
Apéndice 10 Buffer de FAC'S.....	75
Anexo	78

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Representación anatómica del globo ocular humano	13
Figura 2 Diagrama esquemático de la superficie ocular y estructuras asociadas.....	14
Tabla 1 Mecanismos, Factores antiangiogénicos y Células de la respuesta inmune innata y adaptativa presentes en CALT y LDALT	16
Tabla 2. Tipo de mucinas presentes en la superficie ocular de humano	18
Figura 3. Estructura de la película lagrimal	19
Figura 4 Clasificación de Ojo Seco.	20
Figura 5 Genotipo de los ratones experimentales por la técnica de PCR	31
Figura 6 Representación gráfica de la estrategia experimental.	34
Figura 7 Patrón de arborización de mucinas de muestras de lagrimal de ratones WT, Mif ^{-/-} y Mif ^{-/-} (t)	42
Figura 8 Patrón de arborización de mucinas de muestras de lagrimal de ratones WT, Mif ^{-/-} , Mif ^{-/-} + M1 y Mif ^{-/-} + M2.....	44
Figura 9 Patrón de arborización de mucinas promedio de ambos ojos	44
Figura 10 Volumen lagrimal (Schirmer) de ratones WT y Mif ^{-/-}	46
Figura 11 Cuantificación de volumen lagrimal por medio de la técnica de Schirmer.	47
Figura 12 Cuantificación de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias IFN- γ , IL-6 , IL-12 e IL-10 (D) en sobrenadante de cultivo de esplenocitos.....	49
Figura 13 Cuantificación de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias IFN- γ , IL-6, IL-12 e IL-10 en sobrenadante de cultivo de ganglio cervical.	50
Figura 14 Cortes histológicos transversales de córnea de ratones, teñidos con Hematoxilina y eosina.....	52
Figura 15. Promedios de espesor (μ m) del epitelio y estroma de la córnea.	53
Figura 16 Análisis por citometría de flujo de linfocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en bazo de ratones control y experimentales.....	54
Figura 17 Estrategia experimental para la selección de linfocitos T provenientes de ganglio cervical.	56
Figura 18 Estrategia experimental para la selección de linfocitos T provenientes de bazo.	58

Abreviaturas

OS: Ojo Seco.

MIF: Migration Inhibitory Factor/ Factor inhibidor de la Migración de Macrófagos.

NEO: Neomicina.

M ϕ : Macrófago.

SO: Superficie Ocular.

SNC: Sistema Nervioso Central

EALT: Eye-Associated Lymphoid Tissue/ Tejido Linfoide Asociado a Ojo

CALT: Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue/ Tejido linfoide asociado a Conjuntiva.

LDALT: Lacrimal Drainage-Associated Lymphoid Tissue/ Tejido Linfoide Asociado a Drenaje Lagrimal

PL: Película Lagrimal

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1 β : Interleucina 1-beta

IL-(4,6,10,12,13,17): Interleucina (4,6,10,12,13,17)

MMP: Metaloproteinasa de Matriz Extracelular

TLR: Toll Like Receptor/ Receptor tipo Toll

BUT: Break Up Time/ Tiempo de Ruptura Lagrimal

OSDI: Índice de Enfermedad de la Superficie Ocular

MD: Degeneración Macular

VRP: Vitroretinopatía Proliferativa

EPR: Epitelio Pigmentado de Retina

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa inducible

PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógeno

DAMP: Patrón Molecular Asociado a Daño

M-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos

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

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de la Carrera de Biología.

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

Presidente: Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Vocal: Dr. José Luis Reyes Hernández

Secretario: Dra. Alicia Vázquez Mendoza

Suplente: Esp. Oscar Antonio Ramos Montes

Suplente: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

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

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales y formación profesional. Porque sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme, y porque nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por lo que soy y por todo el tiempo que les robé pensando en mí....Gracias.

Con admiración y respeto

A mi familia:

A mi madre **María Teresa Velázquez Sánchez** por iniciar su día cada madrugada alentándome a seguir adelante y no rendirme, por los valores inculcados, por el cariño, la dedicación y la paciencia que hoy en día me ha formado como hombre y por enseñarme a seguir el camino del éxito.

A mi padre **Armando Rivera Muñoz** por otorgarme uno de los más grandes regalos, mi educación, y por el esfuerzo constante como cabeza de familia, por los consejos, valores que me han guiado por el buen camino, por el cariño y la sabiduría que hoy en día me formaron como profesionista.

A mi hermano **Francisco David Rivera Velázquez** por el apoyo incondicional que me alentó a seguir adelante en este camino, por demostrarme que la fuerza de voluntad lo puede todo y no rendirme por más dificultades que enfrentemos.

A mi novia **Adriana Elizabeth Pérez Bolaños** por recorrer este largo camino a mi lado de principio a fin impulsándome a alcanzar mis metas, por toda la ayuda y el cariño que me ha brindado, por motivarme a llegar más lejos e inspirarme a seguir mis sueños y ser la persona con la que me enorgullece compartir mis logros.

A la familia Velázquez Sánchez:

A mis tíos: **Carlos, Patricia, Sofía, Lilia, Adelina y Laura** por su constante cariño, confianza y preocupación, su amor por la familia y los sacrificios dispuestos a hacer por la felicidad de sus seres queridos.

A mis primos: **Daniel, Erick, Alan, Carlos, Fabiola** por todas las risas y los buenos momentos a lo largo de mi vida

A la familia Rivera Muñoz

A mi tío **Francisco Rivera Muñoz**: por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi trayectoria académica, por su cariño y su confianza puesta en mí.

A mis amigos:

Luis, Paloma, Vanessa, Aldair, Alondra, Sagrario, Isabel, Camila y Nancy por todos los buenos momentos, las risas y las aventuras a lo largo de la carrera que hicieron de mi vida universitaria algo especial, momentos que atesorare con cariño y pese a tomar caminos distintos nunca olvidarnos y que hoy, con orgullo, puedo llamarlos colegas. Gracias, me alegra haberlos conocido.

A mi mejor amigo **Luis Gerardo Chavarría Ayala** por ser un amigo fiel desde el primer momento, por todo su apoyo incondicional tanto en la escuela como en el laboratorio, las risas y los buenos momentos. Amigo, lo logramos.

A los integrantes del laboratorio 18:

A la Dra. Alicia por todas sus enseñanzas a lo largo de este proyecto y por enseñarme que un biólogo puede involucrarse en distintas áreas de oportunidad para enriquecer su formación.

Al Dr. José Luis por el tiempo dedicado a enseñarme sobre inmunología y su apoyo constante en la realización de este proyecto.

A la Biol. Marisol por todas las risas, las enseñanzas y la confianza en el laboratorio

Al Dr. Tonatiuh por todo el tiempo dedicado a enseñarme sobre técnicas de inmunología, que sin su ayuda este proyecto no sería posible y más que ser un tutor, un buen amigo.

EN MEMORIA DE TODOS LOS SERES QUERIDOS QUE YA NO ESTÁN

Modestos Francisco Rivera Godínez

Concepción Muñoz Morales

Ernesto Velázquez Fuentes

Virginia Sánchez Rodríguez

Carolina Valencia Flores

2.- INTRODUCCIÓN

Anatomía ocular

El ojo humano (*figura 1*) es un órgano complejo de vital importancia para la vida diaria, este órgano está contenido en la órbita (cavidad ósea y cóncava del cráneo). Está protegido por los párpados y la lubricación de la superficie ocular (Kaplan, 2007) este órgano ocupa aproximadamente un tercio (o menos) del volumen de la órbita, y los otros dos tercios del volumen están compuestos por grasa, músculos, nervios y vasculatura. La pared del globo ocular consta de tres capas primarias (Malhotra *et al.*, 2011).

- La esclera, o capa externa, es la capa protectora fibrosa con la córnea.
- La úvea (tracto uveal), o capa media, que tiene función vascular y nutritiva, contiene tejido pigmentado que consiste en la coroides, el cuerpo ciliar y el iris.
- La retina, o capa interna, que es el estrato sensorial neural del ojo.

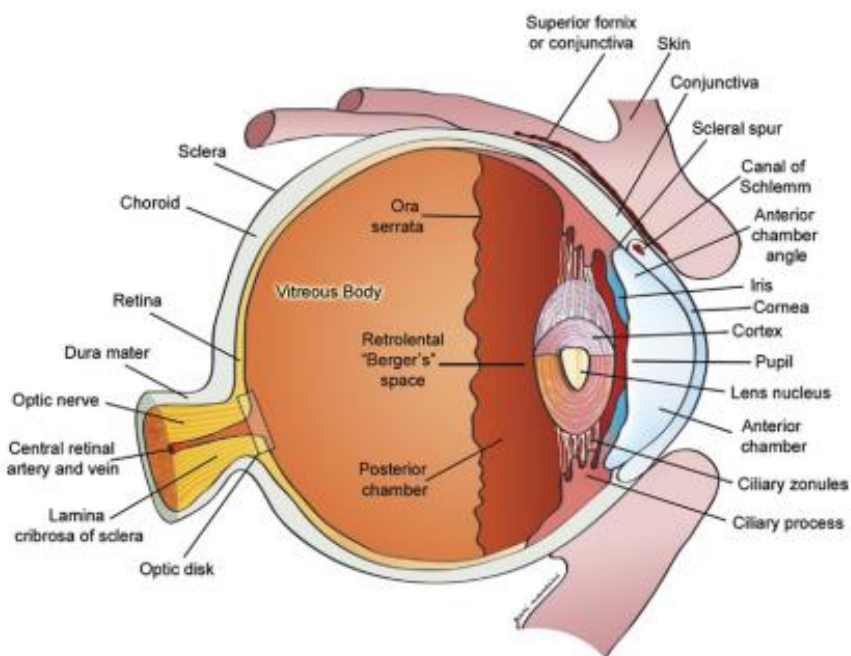


Figura 1. Representación anatómica del globo ocular humano tomada de Malhotra, A., Minja, F. J., Crum, A., & Burrowes, D. (2011). Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, 32(1), 2–13.

2.1.- Estructura y fisiología de la Superficie Ocular

La superficie ocular (SO) (*figura 2*) está compuesta por la córnea, la conjuntiva, los párpados, las pestañas, la película lagrimal, la glándula lagrimal principal, las glándulas accesorias (Krause y Wolfring) y las glándulas de Meibomio (Craig *et al.*, 2017).

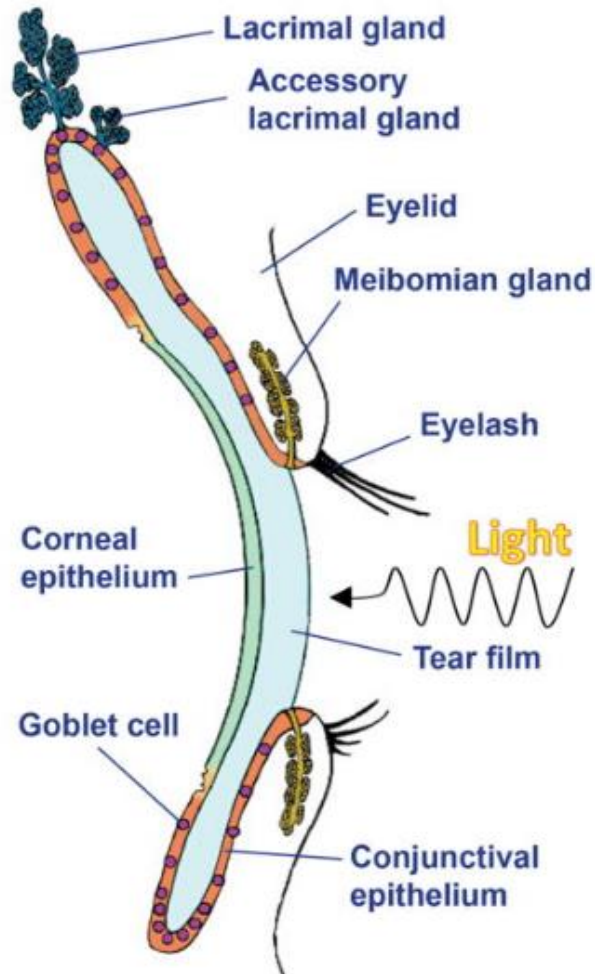


Figura 2 Diagrama esquemático de la superficie ocular y estructuras asociadas imagen tomada de Rodríguez Benavente, M. C., & Argüeso, P. (2018). Glycosylation pathways at the ocular surface. *Biochemical Society transactions*, 46(2), 343–350. <https://doi.org/10.1042/BST20170408>.

De manera conjunta, estas estructuras contribuyen al mantenimiento y la protección de la SO, ya que esta, se encuentra constantemente expuesta al medio ambiente y en consecuencia a una amplia variedad de estímulos, los cuales son contrarrestados

a través de la producción de lagrima, péptidos antimicrobianos, anticuerpos, y mucinas.

Otra de las características importantes de la SO es que los epitelios que la conforman son continuos y están unidos funcionalmente para preservar la transparencia corneal y el poder refractivo, y a su vez, para proteger al ojo contra la desecación, lesiones e infecciones. Es importante mencionar que estas funciones están coordinadas y reguladas por los sistemas: nervioso, endócrino, circulatorio e inmunológico (Rodríguez Benavente & Argües, 2018) (Gipson, 2007) (Taylor & T.F, 2018).

Como previamente se mencionó, la SO está constantemente expuesta a una amplia variedad de antígenos y microorganismos potencialmente dañinos, capaces de desencadenar procesos patológicos. Sin embargo, esto no ocurre en la mayoría de las ocasiones, ya que el ojo, al igual que otros órganos inmunológicamente privilegiados como los testículos, el cerebro o el útero, cuentan con diversos mecanismos que le permiten limitar la adhesión e invasión de agentes patógenos, así como contrarrestar procesos inflamatorios crónicos. En particular, el tejido linfoide asociado a ojo (EALT por sus siglas en inglés), es el principal componente inmunológico a nivel ocular, está compuesto por distintas poblaciones celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa, las cuales están presentes en la conjuntiva (CALT) y el drenaje nasolagrimal (LDALT). En la tabla 1, se enlistan los mecanismos, así como las moléculas y células encargadas de mantener el ambiente inmunoregulador característico de este órgano, con el objetivo de evitar y/o controlar el desarrollo de manifestaciones clínicas que resultan del proceso inflamatorio crónico y la angiogénesis.

A) Mecanismos de inmunoprivilegio ocular	
Ignorancia inmunológica a consecuencia de:	Barrera hematorretiniana.
	Barrera hematoacuosa.

	Privilegio angiogénico.
Expresión de moléculas no clásicas de MHC en la córnea	
Desviación inmunológica asociada a la cámara anterior (ACAID), desviación inmunológica asociada a la cavidad vítrea (VCAID).	
Inducción de la apoptosis de linfocitos activados por expresión de CD95L en células endoteliales corneales y retina.	
Moléculas solubles que suprimen la respuesta inmunológica	TGF- β , trombospondina, α -MSH y VIP en humor acuoso y superficie ocular.
Moléculas de membrana que inhiben la activación de linfocitos T	PDL1 en células endoteliales de córnea y epitelio pigmentado de retina.
Expresión de moléculas reguladoras del complemento en la córnea y la retina.	

B) Factores antiangiogénicos

Angioistatina	Retinoides
Antitrombina III	Derivados de la membrana basal endotelial de dominios no colagenosos.
Endostatina (fragmento del colágeno XVIII)	Receptor soluble de VEGF e isoformas de VEGF _{xxx} b.
Inhibidor activador del plasminógeno	CD59
Trombospondina 1	Factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF).

C) Células de la respuesta inmune innata y adaptativa

Linfocitos T $\gamma\delta$ y T $\alpha\beta$
Linfocitos B, células plasmáticas
Monocitos/macrófagos
Linfocitos NKT
Células dendríticas

Tabla 1 A) Mecanismos, **B)** Factores antiangiogénicos y **C)** Células de la respuesta inmune innata y adaptativa presentes en CALT y LDALT (Santacruz, C., Garfias, Y., (2016). Inmunología Ocular. En Ma. Del Carmen. Jiménez Martínez (Ed.), Inmunología molecular, celular y traslacional (pp. 572-587). Wolters Kluwer).

En este sentido y dada la exposición continua de la SO al medio ambiente, la respuesta inmunológica del ojo es única, ya que algunas de sus estructuras como la córnea, la cámara anterior y la retina son sitios inmunoprivilegiados, mientras que

otras (la conjuntiva y el tracto uveal) son capaces de exhibir importantes respuestas inmunológicas, lo que tiene implicaciones clínicas relacionadas con la inflamación y la angiogénesis (Santacruz & Garfias, 2016).

2.2.- Estructura y función de la película lagrimal

La película lagrimal (PL) es la primera barrera física de defensa del ojo frente al medio ambiente. Estructuralmente, el modelo más aceptado es el de un fluido trilaminar, no newtoniano, dinámico y complejo, formado por tres capas (*figura 3*): la porción más externa es la capa lipídica, la cual es secretada por las glándulas de meibomio y se extiende por toda la superficie ocular por acción del parpadeo y tiene como función estabilizar y brindar tensión superficial a la PL para evitar su rápida evaporación (McMonnies, 2017) (Braun *et al.*, 2015) (Bron *et al.*, 2004) (Knop *et al.*, 2009). La porción intermedia corresponde a la capa acuosa, es producida por la glándula lagrimal principal y representa el 90% del volumen lagrimal, misma que desempeña diversas funciones como: el transporte de oxígeno, la lubricación de la SO, la neutralización y eliminación de patógenos por acción de las inmunoglobulinas IgA e IgG, y péptidos antimicrobianos como la: lipocalina, lactoferrina y lisozima, que en conjunto se encargan de eliminar microorganismos potencialmente patógenos, los cuales pueden inducir procesos inflamatorios crónicos (Braun *et al.*, 2015). (Dilly., 1994) (Yazdani *et al.*, 2019).

Por último, la capa interna o porción mucínica, es producida principalmente por las células caliciformes de la conjuntiva. Estas células tienen la capacidad de secretar diferentes tipos de mucinas (MUC) las cuales de acuerdo con su estructura han sido clasificadas como: asociadas a membrana, formadoras de gel y solubles (Corfield, 2015) (Ablamowicz y Nichols, 2016). A nivel ocular, en condiciones de salud, se ha reportado la presencia de MUC 1, 2, 4, 5AC, 5B, C7, 16 y 20 en epitelio conjuntival y corneal, donde además de funcionar como barrera, estas moléculas se encargan de atrapar y remover microorganismos y sustancias potencialmente dañinas para la SO (*tabla 2*) (Corfield, 2015).

MUCINA	TIPO	UBICACIÓN	FUNCIÓN
MUC1	Asociada a membrana	Película conjuntiva, corneal lagrimal, epitelio	Anti-adhesión, señalización celular y bloqueo de patógenos.
MUC2	Secretora formadora de gel	Película conjuntiva, caliciformes lagrimal, células	Lubricación de la SO
MUC4	Asociada a membrana	Película conjuntiva, corneal lagrimal, epitelio	Lubricación de la SO, proliferación celular,
MUC5AC	Secretora formadora de gel	Película conjuntiva, caliciformes lagrimal, epitelio células	Previene la formación de moco que disperse la luz.
MUC5B	Secretora formadora de gel	Glándula lagrimal	
MUC7	Secretora soluble	Glándula lagrimal	Atrapar y remover desechos por medio del parpadeo. Actividad antimicrobiana.
MUC16	Asociada a membrana	Película conjuntiva, corneal lagrimal, epitelio	Componente del glicocalix, forma una barrera y cubierta protectora.
MUC20	Asociada a membrana	Conjuntiva y epitelio corneal	Juega un papel en vías de señalización para la motilidad celular.

Tabla 2. Tipo de mucinas presentes en la superficie ocular de humano (Ablamowicz, A. F., & Nichols, J. J. (2016). Ocular Surface Membrane-Associated Mucins. *The ocular surface*, 14(3), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2016.03.003>

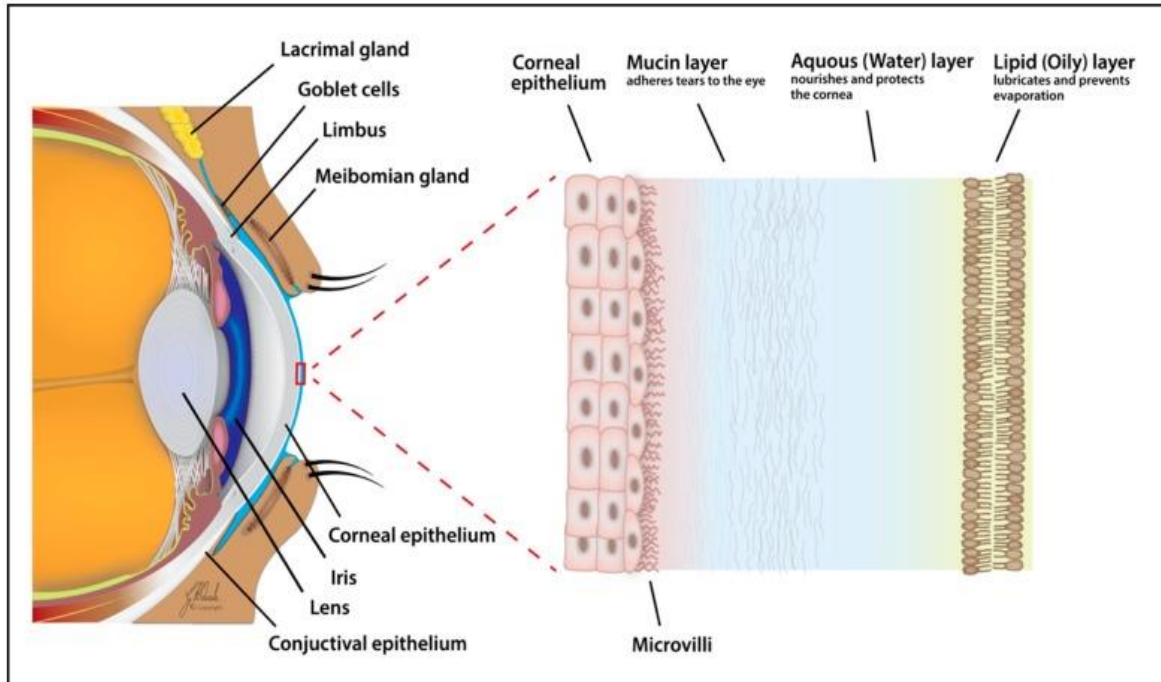


Figura 3. Estructura de la película lagrimal, tomada de Yazdani, M *et al.*, (2019). Metabolómica de las lágrimas en la enfermedad del ojo seco: una revisión. Revista internacional de ciencias moleculares, 20 (15), 3755. <https://doi.org/10.3390/ijms2015375>

Considerando lo antes expuesto, es claro el papel clave que desempeña la PL para mantener una superficie óptica lisa, humectada, lubricada y transparente (Willcox *et al.*, 2017) (Braun *et al.*, 2015) con el objetivo de funcionar como un componente refractivo del ojo. Se ha reportado que la alteración en los componentes y la dinámica de la película lagrimal puede ocasionar signos y síntomas que comprometen la fisiología de la SO, lo que conlleva a disminución de la agudeza visual y en condiciones más graves a ceguera. (Kohn *et al.*, 2018). En las últimas décadas se ha reportado que una amplia variedad de factores intrínsecos y extrínsecos afectan negativamente la composición, la integridad y la estabilidad de la película lagrimal, contribuyendo al desarrollo de enfermedades inflamatorias de la SO, entre las cuales se encuentra Ojo seco (Yazdani *et al.*, 2019).

2.3.- Definición y clasificación de ojo seco

Ojo seco (OS) es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por la pérdida de la homeostasis de la película lagrimal acompañada de síntomas oculares y en cuya etiología intervienen la inestabilidad e hiperosmolaridad de la película lagrimal, inflamación y daño de la superficie ocular, además de anomalías neurosensoriales (Craig *et al.*, 2017). Los signos clínicos incluyen: fotofobia, hiperemia, dolor, ulceración corneal e inflamación, que en conjunto pueden llevar a la ceguera (Stapleton *et al.*, 2017) (Paulsen *et al.*, 2014) (Sullivan *et al.*, 2017).

El TFOS DEWS II en el 2017 clasificó (*figura 4*) a esta enfermedad en dos categorías principales, ojo seco evaporativo y ojo seco acuodeficiente de tipo autoinmune asociado a Síndrome de Sjögren y no Síndrome de Sjögren, este último se asocia con deficiencia en la producción de la lagrimal, obstrucción de los conductos lagrimales, bloqueo reflejo y uso de fármacos sistémicos (Craig *et al.*, 2017).

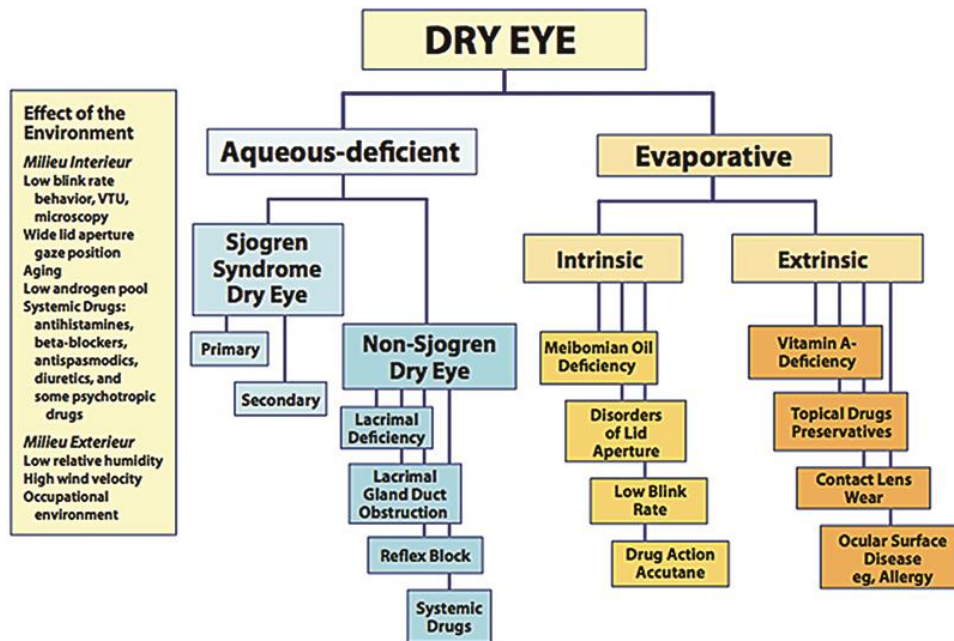


Figura 4 Clasificación de Ojo Seco tomada de Craig, J. P., Nichols, K. K., Akpek, E. K., Caffery, B., Dua, H. S., Joo, C. K., Liu, Z., Nelson, J. D., Nichols, J. J., Tsubota, K., & Stapleton, F. (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report.

2.4.- Prevalencia de Ojo seco

La prevalencia mundial de OS oscila entre el 5 y 50 % de la población adulta, donde las mujeres son las más afectadas con el 17.9% mientras que el 10.5% corresponde a la población masculina. Aun cuando OS ha sido considerado una patología inflamatoria de la SO de adultos, estudios recientes en población asiática reportaron que adolescentes principalmente de sexo femenino manifiestan síntomas de esta enfermedad (Wilson y Perry., 2007) (Wolffsohn *et al.*, 2017).

Estudios realizados en población mexicana, específicamente en la Universidad de Monterrey, reportaron que el 70.4% de los estudiantes presentan signos y síntomas de OS, cuya prevalencia fue mayor en mujeres (Garza-León *et al.*, 2016). Por su parte, la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, reportó que tanto pacientes jóvenes (15-29 años) como adultos (30-65 años) presentan signos y síntomas de esta enfermedad, con una prevalencia del 51.9% y 66.9%, respectivamente. Sin duda, estos estudios demuestran que los jóvenes, son un grupo etario de riesgo que no se había considerado (Navarro *et al.*, 2019).

2.5.- Signos y síntomas de OS

Los pacientes con OS comúnmente presentan síntomas como: prurito (comezón), sensación de cuerpo extraño, irritación, fotofobia (sensibilidad a la luz), hiperemia (ojo rojo), y signos como: descamación de la superficie corneal (pérdida de células caliciformes), disfunción de las glándulas de meibomio (MGD), rápida evaporación de la película lagrimal y pérdida de la sensibilidad corneal; y en casos graves ulceraciones, opacidad de la córnea y ceguera (McMonnies, 2017) (Wolffsohn *et al.*, 2017) (Craig *et al.*, 2017).

2.6.-Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de ojo seco se realiza a través de pruebas subjetivas mediante el uso de cuestionarios, entre los cuales destaca el OSDI (índice de enfermedad de la superficie ocular), instrumento que evalúa la sintomatología. En este mismo contexto, las pruebas objetivas permiten identificar cambios en el patrón de arborización de mucinas, volumen lagrimal y el tiempo de ruptura lagrimal a través de las técnicas de ferning, Schirmer y BUT, respectivamente. (Wolffsohn *et al.*, 2017) (Brott y Ronquillo, 2022) (Mou *et al.*, 2021) (Rolando, 1984). En conjunto, estas técnicas permiten evaluar la calidad, cantidad y estabilidad de la película lagrimal.

Por otro lado, el manejo terapéutico de los pacientes se basa principalmente en el uso de lágrimas artificiales y corticoesteroides por periodos prolongados, sin embargo, el uso continuo de este fármaco puede provocar el desarrollo de múltiples complicaciones locales y sistémicas como: inmunosupresión y aumento de la presión intraocular (Jones *et al.*, 2017) (Willcox *et al.*, 2017). Además de estos tratamientos convencionales, recientemente se ha explorado el potencial terapéutico de la aplicación de suero autólogo, la suplementación alimenticia con Omega 3 y 6, y el uso de inmunoreguladores como la ciclosporina (Jones *et al.*, 2017).

2.7.-Inflamación y Ojo seco

Hay evidencia de la asociación entre el agravamiento OS y un incremento en la producción de mediadores inflamatorios como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN) γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), así como quimiocinas y metaloproteinasas 1, 3, 6 y 9 (MMP 1, 3, 6,9). El incremento de estas moléculas induce el reclutamiento de otras poblaciones celulares como: neutrófilos, monocitos, macrófagos (M ϕ) y células

T, que inician y agravan la patología (Yoon *et al.*, 2007) (Wilson y Perry, 2007) (Luo *et al.*, 2007) (Kalt *et al.*, 2010).

Estas observaciones han generado gran interés por entender el papel de la inflamación en ojo seco, con el fin de entender los mecanismos subyacentes a esta enfermedad y posteriormente identificar potenciales agentes terapéuticos (Narayanan, Miller y McDermott, 2006). En este contexto, el uso de modelos murinos para estudiar esta enfermedad han demostrado ser una herramienta valiosa para establecer la participación de diversas citocinas proinflamatorias como: IL-1 β , IL-6, TNF- α y MIF en el fluido lagrimal, córnea y conjuntiva, así como la infiltración de células de la respuesta inmune innata y adaptativa (e.g. neutrófilos, macrófagos, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺) (De Pavia *et al.*, 2007) (Pflugfelder *et al.*, 1999) (Stern *et al.*, 2002). En este mismo contexto, nuestro grupo de trabajo, reporto el papel deletéreo de MIF en un modelo murino de OS. Sin embargo, aunque se sabe que una de las fuentes temprana de esta citocina son los macrófagos, no se analizó el papel de estas células durante desarrollo de la enfermedad

2.8.- El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), un importante iniciador y promotor de la respuesta inflamatoria

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

Aun cuando Matsuda y colaboradores, reportaron la expresión constitutiva de MIF en células del epitelio pigmentado de la retina, células del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar, iris y córnea de roedores, los autores no analizaron la función de esta molécula en modelos murinos o pacientes. Sin embargo, sugirieron que MIF puede tener un papel patogénico en enfermedades inflamatorias oculares (Matsuda *et al.*, 1997) (Matsuda *et al.*, 1996).

Estudios recientes reportaron que el estrés oxidativo contribuye a la progresión de enfermedades inflamatorias de retina como la degeneración macular (MD) y la vitrorretinopatía proliferativa (VRP) como resultado de la pérdida del soporte y nutrición mediado por células del epitelio pigmentado de retina (EPR) (Nowak *et al.*, 2003) (Cicik *et al.*, 2003) (Cai *et al.*, 2000). Por su parte, Ko JA y colaboradores demostraron que la exposición a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) incrementa la expresión de RNAm y la proteína de MIF en lisados y sobrenadante de células del epitelio pigmentado de la retina de humano (ARPE19). También, observaron que la inhibición de esta citocina reduce la expresión de proteínas asociadas con el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT). Concluyendo que MIF tiene un papel importante en la patogénesis de la VRP (Ko *et al.*, 2017).

Otro estudio reportó un incremento en la expresión de MIF en glándulas lagrimales y lágrimas en respuesta al tratamiento con Toxina Botulínica B (BTX) (Park *et al.*, 2007). En este mismo contexto, Lee HS y colaboradores, demostraron un mayor infiltrado de células dendríticas CD11c⁺ CD207⁺ y Mo en córnea de ratones a los 7 y 14 días post-inducción de ojo seco con escopolamina. Además, por PCR confirmaron que los Mo presentaban un fenotipo M1, caracterizado por incremento en la expresión de TNF- α e iNOs (Lee, Amouzegar y Dana, 2017).

Sin duda alguna, los esfuerzos hechos hasta ahora han permitido conocer algunas de las poblaciones involucradas en la patogénesis de OS. Sin embargo, 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.

2.9.- Papel de los macrófagos en la respuesta inmune inflamatoria

Las células del sistema inmune innato, específicamente los macrófagos, son determinantes durante las diferentes etapas de la respuesta inmune. En la fase temprana, estas células detectan señales de peligro externas (derivadas de patógenos, PAMPs como el lipopolisacárido (LPS) o internas (liberadas durante procesos de muerte celular, DAMPs y ATP); de esta manera son activadas y pueden eliminar tanto patógenos como células muertas. En etapas más avanzadas, estas células son centrales, ya que se encargan de modular la actividad de poblaciones celulares de la respuesta inmune adaptativa como los linfocitos T. (Zhou *et al.*, 2012).

Dos estados de activación son ampliamente aceptados: macrófagos clásicamente activados (M1), los cuales se caracterizan por la expresión de la enzima inducible de óxido nítrico (iNOS), su capacidad fagocítica y la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-12. Mientras que los macrófagos alternativamente activados (M2) son funcionalmente diversos y están divididos en los subtipos (M2a, M2b, M2c y M2d), se caracterizan por expresar quimiocinas, factores de crecimiento y la producción de citocinas antiinflamatorias como: IL-4 e IL-13. Además de tener función efectora, los M ϕ activan y polarizan a las células T, dependiendo de su estado de activación (M1 *versus* M2) estas células amplifican la respuesta inmune adaptativa polarizando a los linfocitos hacia un perfil tipo Th1 (inflamatorio) o Th2 (antiinflamatorio). En las últimas décadas, diversos grupos han demostrado el papel patogénico de los macrófagos M1 en el desarrollo y cronicidad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como: artritis reumatoide, lupus eritematoso, encefalitis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes tipo I y II, entre otras (Ma *et al.*, 2019) (López-Cacho *et al.*, 2014) (Wildenberg *et al.*, 2009) (Demetter *et al.*, 2005).

Evidencia reciente sugiere que la respuesta inflamatoria crónica de la superficie ocular (SO) en ojo seco, es un proceso orquestado por la producción de

quimiocinas, citocinas inflamatorias y enzimas tipo MMP, como consecuencia de la activación de poblaciones celulares de la respuesta inmune innata residentes en córnea y conjuntiva. Particularmente, se ha destacado el papel de las células presentadoras de antígeno, debido a su capacidad para activar y diferenciar a los linfocitos T hacia los subtipos Th1 y Th17, en conjunto estas poblaciones celulares contribuyen a sostener y exacerbar en proceso inflamatorio en la SO, lo que resulta en el desarrollo de metaplasia escamosa en el epitelio conjuntival, apoptosis de células de la conjuntiva, pérdida de células caliciformes, activación de los nervios sensoriales y alteración del epitelio corneal mediado por la producción de IFN- γ , IL-17A TNF- α e IL-1 β y de MMP3 y 9 (De Pavia *et al.*, 2007) (De Pavia *et al.*, 2009) (Zhang *et al.*, 2011).

Estas evidencias además de demostrar el papel patogénico de los macrófagos M1 en enfermedades inflamatorias, también sentaron las bases para explorar el efecto de las propiedades antiinflamatorias de los macrófagos M2 en enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En este contexto, su papel inmunomodulador, ha sido demostrado en modelos de: esclerosis múltiple, lesiones de la médula espinal, neuropatía, diabetes tipo I y colitis (Funes *et al.*, 2018) (Ma *et al.*, 2019) (Navegantes *et al.*, 2017). Resultados similares fueron reportados en modelos de miocarditis viral y tuberculosis (Dominguez *et al.*, 2016) (Chávez-Galán *et al.*, 2009). Lo interesante de estos modelos es que los autores demuestran, que la transferencia adoptiva de macrófagos M2 vía intravenosa o intraperitoneal, permite la migración de estas células, incluso a órganos inmunológicamente privilegiados como el sistema nervioso central (SNC) (Funes *et al.*, 2018). Aun cuando se ha explorado su potencial efecto terapéutico en diversas patologías, la información acerca de su efecto en enfermedades inflamatorias de la SO como ojo seco es escasa. Considerando estos antecedentes y con el objetivo de demostrar el papel patogénico y/o terapéutico de los macrófagos M1 versus M2, analizamos el efecto de la transferencia adoptiva de esta población celular a ratones con ojo seco acuodeficiente.

3.- Hipótesis

La transferencia adoptiva de macrófagos M1 a ratones deficientes para la molécula MIF favorecerá el desarrollo de ojo seco, a través de la liberación de mediadores inflamatorios y la consecuente activación y polarización de las células T, que en conjunto perpetuarán el microambiente inflamatorio y el agravamiento de los signos de ojo seco.

4.- Objetivos

4.1.- General

Evaluar el efecto sistémico y local de la transferencia adoptiva de macrófagos M1 versus M2 derivados de médula ósea en el desarrollo de ojo seco en ratones deficientes para la molécula MIF.

4.2.- Particulares

- 1.- Obtener y diferenciar macrófagos derivados de médula ósea de ratones WT.
- 2.- Inducir ojo seco a ratones silvestres (WT) y deficientes para la molécula MIF (Mif^{-/-}) con y sin transferencia adoptiva de macrófagos.
- 3.- Evaluar y comparar la estabilidad de la película lagrimal de ratones experimentales.
- 4.- Cuantificar el nivel de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en suero y sobrenadante de cultivo células de bazo y ganglio cervical de ratones experimentales.
- 5.- Realizar un análisis histopatológico en córnea de ratones control y experimentales.
- 6.- Analizar por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en bazo de ratones control y experimentales.

5.- Materiales y métodos

5.1.- Animales experimentales

Se usaron ratones macho con fondo genético Balb/c de 5-6 semanas de edad silvestres para la molécula MIF (WT) provenientes del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y deficientes para la molécula MIF (Mif^{-/-}), los cuales fueron donados por la Dra. Miriam Rodríguez Sosa. Los ratones experimentales fueron divididos en 4 grupos como a continuación se indica: grupo 1 (WT+OS), grupo 2 (Mif^{-/-}+OS), grupo 3 (Mif^{-/-} OS+M1) y grupo 4 (Mif^{-/-} OS+M2). El manejo de los animales experimentales se hizo en apego a los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de acuerdo a la norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

5.2.- Genotipo de ratones experimentales por PCR

Previo al inicio de cada uno de los experimentos, se realizó el genotipo de los grupos experimentales mediante la técnica de PCR, con el objetivo de confirmar que fueran silvestres (WT) o deficientes para la molécula MIF (Mif^{-/-}). Se utilizaron guantes, material nuevo y estéril libre de DNAsas-RNAsas. Brevemente, se obtuvieron 0.5 cm de la parte final de la cola de cada uno de los ratones, el tejido se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 500 µl de buffer de lisis (Apéndice 1) y 20 µl de proteinasa K (Invitro-gen) para llevar a cabo la digestión del tejido, los tubos fueron incubados toda la noche a 55 °C. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recuperó en tubos Eppendorf nuevos con 500µl de isopropanol frío, las muestras fueron agitadas suavemente hasta observar el precipitado de DNA. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en etanol frío al 75% en el mismo tubo, las muestras se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó

evaporar el etanol a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 50µl de agua inyectable estéril.

5.2.1.- Amplificación del gen

Se utilizaron primers específicos para la amplificación del gen de MIF y neomicina (NEO). Se usaron tubos nuevos estériles de 65µl, la reacción se realizó en un volumen final de 25µl con los siguientes reactivos:

Master mix	12.5 µl
Primer MIF forward (10nM)	1.0 µl
Primer MIF reverse (10nM)	1.0µl
Primer NEO forward (10nM)	1.0µl
Primer NEO reverse (10nM)	1.0µl
H ₂ O inyectable	7.5 µl
Muestra DNA	1.0 µl

Las muestras fueron colocadas en un termociclador (Mini Amp Plus) con las condiciones de temperatura de alineación (Apéndice 2).

5.2.2.- Electroforesis en gel

Se utilizó un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador de TBE 1x (Apéndice 3) se agregaron 3µl de bromuro de etidio sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos el cual se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificado se tomaron 10µl de cada muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 2µl de marcador de peso molecular y el décimo pozo fue usado para colocar 10µl de muestra control positivo. Las muestras se colocaron en la

cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 100 voltios durante 30 minutos. La imagen se capturó en un fotodocumentador (*figura 5*).

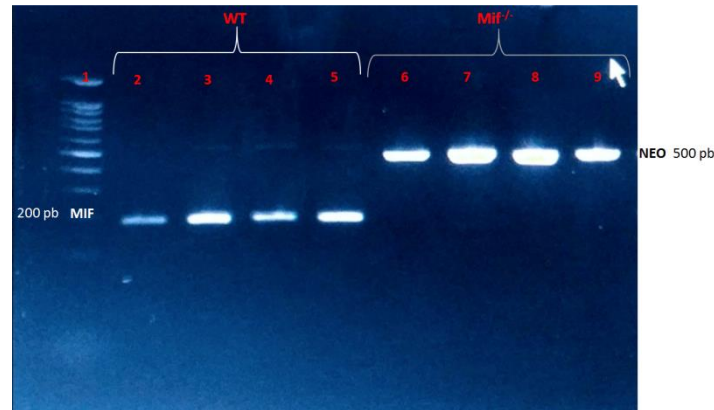


Figura 5 Gel de agarosa donde se muestra el genotipo de los ratones experimentales por la técnica de PCR. En los carriles (2-5) observamos la expresión del gen que codifica para MIF con un peso de 200 pb correspondiente a los ratones silvestres (WT) y en los (carriles 6-9) la expresión del gen de neomicina (NEO) correspondiente a ratones deficientes para la molécula MIF. El primer carril fue usado para el marcador de peso molecular.

5.3.- Obtención y diferenciación de macrófagos de médula ósea

Se utilizaron ratones WT macho de la cepa Balb/c de 6-7 semanas de edad. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se recuperó y perfundió el fémur de cada una de las extremidades con solución salina estéril para recuperar células de médula ósea, las cuales fueron colectadas en tubos cónicos de 50 ml estériles, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min, el sobrenadante fue decantado y la pastilla fue resuspendida en medio de cultivo estéril RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino (RPMI-FBS 20%).

Para su diferenciación las células obtenidas se contaron y ajustaron a 5×10^6 células por ml y se sembraron en cajas Petri estériles y se estimularon cada 48 horas con el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (M-CSF) a una concentración de 25 ng/ml, las células se incubaron a 37°C por 7 días. Concluida la diferenciación el sobrenadante fue decantado y la recuperación de los macrófagos se hizo mediante la incubación por 30 minutos con 4 ml de una solución con actividad tripsinisante

(solución 1:1 (TrypLE:Solución Salina Básica de Hanck's), la reacción se detuvo con medio RPMI-FBS 20%. Finalmente, las células fueron recuperadas en tubos cónicos de 50ml estériles, se centrifugaron a 3500 rpm/ 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en medio RPMI-FBS 20%. (Apéndice 4).

5.3.1.- Diferenciación de Macrófagos M1 y M2

Las células diferenciadas fueron contadas, ajustadas y sembradas a 250 mil células/pozo en cajas de cultivo de 24 pozos suplementadas con medio RPMI-FBS 20%. La diferenciación de macrófagos M1 o M2 se hizo mediante el estímulo con 10 ng de la recombinante de IFN- γ o IL-4, respectivamente. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. Finalmente, las células se despegaron y recuperaron mediante la incubación por 30 minutos con 4 ml de una solución con actividad tripsinásica (solución 1:1 (TrypLE:Solución Salina Básica de Hanck's), la reacción se detuvo con medio RPMI-FBS 20%.

5.3.2.- Transferencia adoptiva de Macrófagos

Previo a la transferencia adoptiva, los macrófagos fueron contados en una cámara de Neubauer y se ajustaron a 4.2×10^6 en un vehículo 200 μ l de PBS estéril. Las células fueron inyectadas vía intraperitoneal a los ratones Mif^{-/-} 24 horas antes de la inducción del modelo de Ojo seco. Cabe destacar que el desarrollo experimental se dividió en dos fases. En la primera fase evaluamos el efecto de la transferencia adoptiva de macrófagos WT a ratones Mif^{-/-} con OS. Mientras que, en la segunda fase, analizamos el efecto de la transferencia de macrófagos M1 versus M2 a ratones Mif^{-/-}.

5.4.- Evaluación de la calidad de la película lagrimal por las técnicas de Schirmer y ferning

La evaluación de la cantidad y calidad de la película lagrimal en todos los grupos experimentales se realizó a los 0, 7 y 14 días post-inducción de OS y a los siete días de la suspensión del modelo (fase de recuperación).

5.5.- Inducción del modelo de ojo seco

Para la a inducción de OS se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c de 6-7 semanas de edad, silvestres (WT) y deficientes para la molécula MIF ($Mif^{-/-}$). Previo a la inducción, los animales experimentales se dividieron en cuatro grupos: grupo 1 (WT con OS), grupo 2 ($Mif^{-/-}$ con OS), grupo 3, [$Mif^{-/-}$ con OS más transferencia de macrófagos M1 ($Mif^{-/-}$ + OS + M1)] y grupo 4 [$Mif^{-/-}$ con OS más transferencia de macrófagos M2 ($Mif^{-/-}$ + OS + M2)]. El modelo de OS se hizo mediante la administración de 0.5 mg de escopolamina (Sigma-Aldrich) en un vehículo de 60 μ l de solución salina estéril vía subcutánea 3 veces al día por 14 días. (Ver figura 6).

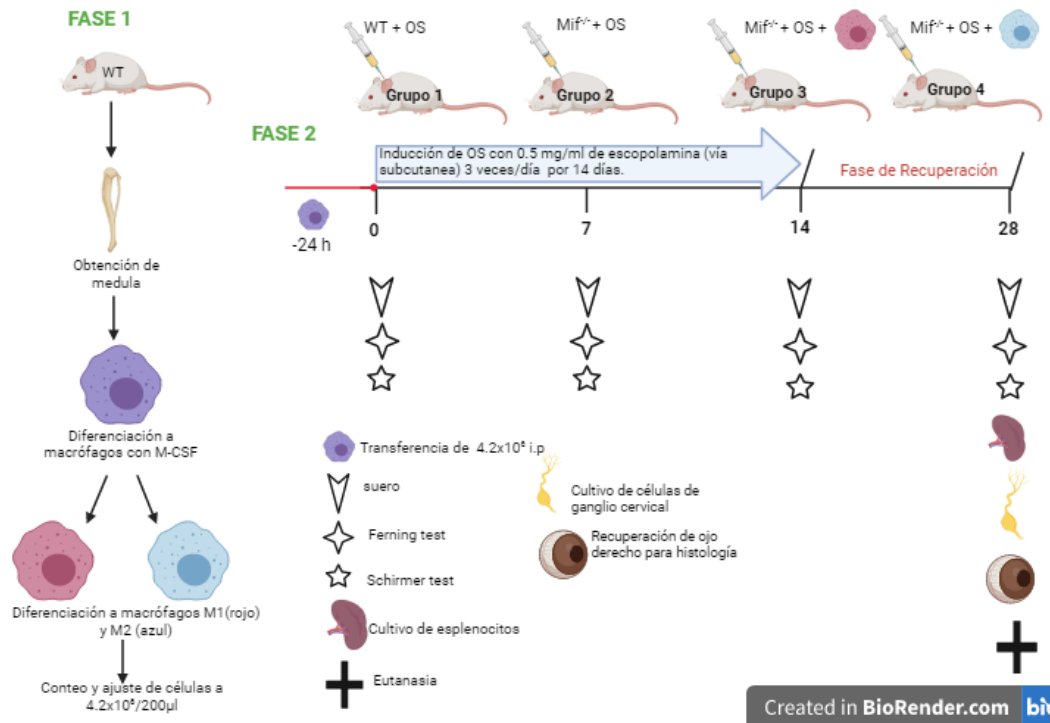


Figura 6 Representación gráfica de la estrategia experimental. A) Fase 1: Obtención y diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea (M1 versus M2). B) Fase 2: inducción del modelo de OS con escopolamina vía subcutánea 3 veces al día por 14 días. Imagen creada en BioRender.com.

5.6.- Evaluación de los signos de Ojo seco en ratones WT y *Mif*^{-/-} por medio de las técnicas de ferning y Schirmer

5.6.1.- Evaluación del patrón de arborización de mucinas conjuntivales

La evaluación del tipo de patrón de arborización de mucinas se hizo mediante la técnica de ferning. Previo a la toma de muestra los ratones se anestesiaron con 40µl de xilacina (PiSA). Posteriormente con una pipeta Pasteur a la cual se le adaptó una punta de micropipeta se tomaron 2µl de lagrima de cada ojo a los 0, 7 y 14 días post inducción de OS y a los siete días de haber suspendido el modelo (fase de recuperación). Para su observación, la muestra fue colocada 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 utilizando la escala de Rolando (tipo I, II, III y IV) (Rolando, 1984). El grado tipo I se caracteriza por la

presencia de arborizaciones uniformes y la ausencia de espacios vacíos, el grado de tipo II la arborizaciones son más pequeñas y menos ramificadas, además comienzan a aparecer espacios entre las mismas, el grado tipo III presenta arborizaciones pequeñas con pocas ramificaciones y de forma gruesa, irregular o nulas con presencia de numerosos espacios vacíos y finalmente el grado tipo IV se caracteriza por la ausencia de arborizaciones y se pueden presentar cúmulos de mucus. 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 película lagrimal.

5.6.2.- Cuantificación del volumen lagrimal por la técnica de Schirmer

Para cuantificar de volumen lagrimal utilizamos la técnica de Schirmer a los 0, 7 y 14 días post inducción de OS con escopolamina 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 a fin de evaluar la cantidad de lagrima basal, transcurrido el tiempo las tiras fueron retiradas y se midió la cantidad de lagrima secretada (mm) con un vernier digital. Los datos fueron registrados y analizados.

5.7.- Cuantificación de citocinas en suero por la técnica de ELISA-sándwich

5.7.1.- Obtención de suero

Se obtuvo sangre de ratones WT y Mif^{-/-} a los días 0, 7 y 14 post inducción de OS y a los 7 días de haber suspendido el modelo (fase de recuperación) Brevemente, realizamos una incisión en el primer tercio de la cola, las muestras se colectaron en tubos eppendorf de 1.5 ml posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min para separar plasma y suero. El suero colectado se guardó en tubos eppendorf nuevos debidamente etiquetados y se almacenaron a -20 ° C hasta su uso posterior.

5.7.2.- Técnica de ELISA sándwich

La técnica de ELISA se realizó en muestras de suero y sobrenadante de cultivo de órganos como bazo y ganglio cervical, con el siguiente procedimiento:

Sensibilización de la placa

Se diluyó el anticuerpo de captura en 10 ml de buffer de bloqueo (PBS-BSA), se homogenizó y se agregó 100 μ l de la solución a cada pozo de la placa de ELISA (Costar) por 96 pozos utilizando una micropipeta multicanal (Gilson). Para que se llevara a cabo la reacción de pegado del anticuerpo a la placa, esta se cubrió con aluminio y fue incubada a 4 ° C toda la noche.

Muestras y curva

Al día siguiente la placa fue retirada del refrigerador de 4°C y se mantuvo a temperatura ambiente, se decantó el contenido de la placa y posteriormente se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS-TWEEN) (Apéndice 5), después se secó de manera manual. Se bloqueó el pegado inespecífico adicionando 300 μ l de buffer de bloqueo a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas, posteriormente se lavaron las placas tres veces y se secaron de manera manual.

Una vez que la placa se encontraba seca, se colocaron las muestras en los pozos correspondientes, para poder extrapolar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la correspondiente citocina recombinante murina, con diluciones al doble para cada una de las placas utilizando las dos primeras filas, diluidas en solución de bloqueo. La curva se inició a una concentración de 6,000 pg, las placas se incubaron a 4 ° C toda la noche.

Revelado de Placa

Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces y se secaron de manera manual, posteriormente se adicionó el anticuerpo de detección correspondiente a cada citocina marcado con biotina en un volumen de 100 μ l por pozo con una dilución de 2 μ l/ml de anticuerpo en solución de bloqueo (Apéndice 6)

y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Terminando el tiempo de incubación las placas se lavaron 4 veces y fueron secadas de manera manual.

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

Por último, las placas fueron lavadas 5 veces y secadas de manera manual.

Se preparó la solución del sustrato de la enzima que consistía en 100 μ l de H₂O₂ al 3% en 10 ml de ABTS, se homogenizó y se agregaron 100 μ l por pozo, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se observó un cambio de color y se llevó al lector de placa (EPOCH) utilizando filtro para lectura de 405 nm de longitud de onda.

5.8.- Análisis del perfil de citocinas en cultivos de linfocitos provenientes de bazo y ganglio linfático cervical

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se extrajeron los siguientes tejidos para la elaboración de cultivos celulares.

Bazo. Fueron macerados individualmente en cajas Petri en 5ml de medio RPMI (Apéndice 3) con ayuda de Cell Strainers (100 μ m), en campana de esterilidad, el sobrenadante fue recuperado y colocado en tubos estériles de 15ml, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 6 minutos para la obtención de células, se decantó el sobrenadante y la pastilla se re suspendió en 3ml de solución hemolizante ACK (Apéndice 7) por 3 minutos para lisar eritrocitos de la muestra, trascurrido el tiempo la reacción se detuvo con 3ml de medio RPMI. Cada muestra fue centrifugada nuevamente a 3500 rpm por 6 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue re suspendida en 5ml de medio

Ganglio. Fueron macerados individualmente en cajas Petri en 1ml de Buffer 1 (Apéndice 5), el sobrenadante fue recuperado y colocado en tubos Eppendorf de 1.5ml, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 6 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla se re suspendió en 1ml de Buffer 1 (Apéndice 8). El conteo de células se realizó utilizando una dilución 1:10 (muestra: azul de tripano) para bazo y 1:3 (muestra: azul de tripano) para ganglio, tomando 10 μ l de muestra para contar en cámara de Neubauer con la finalidad de ajustar a 5 millones y 300 mil células, respectivamente.

Una vez ajustadas las muestras de bazo y ganglio (5 millones y 300 mil células en 1ml, respectivamente) fueron sembradas en placas de 24 pozos, donde para cada ratón se sembraron 6 pozos de los cuales 3 pozos fueron estimulados con Concanavalina (CoA, Sigma-Aldrich) a una concentración de 2.5 μ g/ml y los 3 restantes no recibieron ningún estímulo. Las placas fueron incubadas a 36 ° C por 48 horas en una estufa de CO₂. Finalmente, los sobrenadantes fueron recuperados en tubos eppendorf de 1.5ml los cuales se almacenaron a una temperatura de -20 ° C para su posterior análisis por la técnica de ELISA sándwich.

5.9.- Análisis histopatológico de córnea de ratones control y experimentales

Se enucleo el ojo derecho de todos los grupos experimentales y se almacenaron en tubos cónicos debidamente etiquetados, se les agregaron 5 ml de Fijador de Zinc (Apéndice 9) y se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas. Posterior a las 48 horas, los tejidos se deshidrataron mediante el uso de concentraciones crecientes de alcohol: 70, 80 y 90 por ciento por un periodo de 48 horas en cada uno, después las muestras se colocaron en alcohol al 100% y butanol por un periodo de 2 horas en cada uno. Finalmente, las muestras fueron colocadas en cassettes para su inclusión en parafina de inclusión I y II por un periodo de 48 horas en cada a y se realizaron bloques de parafina con cada una de las muestras para realizar cortes de 5 micrómetros con ayuda de un micrótopo (PKL Pokler ITALIA).

5.9.1.- Preparación de muestras

Con ayuda del micrótopo se realizaron cortes de 5µM de espesor y se colocaron en un baño de flotación para que el tejido se extendiera de manera uniforme, las muestras fueron recuperadas en portaobjetos, previamente tratados con poli-L-lisina, debidamente etiquetados y se colocaron en una plancha para eliminar el exceso de humedad, posteriormente las laminillas fueron colocadas en una estufa a 60 °C para eliminar el excedente de parafina del tejido y después teñirlas.

5.9.2.- Tinción con Hematoxilina y Eosina

Las laminillas fueron colocadas en una canastilla para su correcta manipulación durante su proceso de tinción. Posteriormente, se realizó una tinción con hematoxilina y eosina siguiendo los siguientes pasos:

Reactivo	Tiempo
Xilo I	5 min
Xilol II	5 min
Alcohol Etílico 100%	5 min
Alcohol Etílico 90%	5 min
Alcohol Etílico 80%	5 min
Alcohol Etílico 70%	5 min
Agua corriente	5 min
Hematoxilina	3 min
Agua corriente	10 seg
Alcohol ácido	5 seg
Agua corriente	Enjuagar
Agua amoniacal	30 seg
Agua destilada	Enjuagar
Eosina	3 min
Agua destilada	Enjuagar
Alcohol etílico 96%	Lavar a chorros
Alcohol absoluto 100%	30 seg
Xilol	5 min

Finalizada la tinción, se realizó el montaje de cada una de las laminillas mediante el uso de un par de gotas Entellan y se cubrieron con un cubreobjetos dejándolas secar para posteriormente ser observadas al microscopio a 10 y 40 x.

5.10.- Determinación del número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo

La determinación del porcentaje de linfocitos T por citometría de flujo se realizó en células de bazo y ganglio cervical. A los siete días de haber suspendido la inducción de OS (fase de recuperación) realizamos la eutanasia de los animales experimentales con el propósito de obtener células de bazo y ganglio cervical, las cuales se recuperaron en tubos cónicos estériles de 15ml, previamente etiquetados. Los tubos con las células se centrifugaron durante 6 minutos a 3500 rpm para posteriormente decantar el sobrenadante y resuspender cada muestra en 5 ml de medio de cultivo RPMI suplementado. Cada muestra fue contada en cámara de Neubauer y ajustada a una concentración de 1×10^6 /ml.

Las muestras se pasaron a tubos eppendorf de 1.8 ml y se adicionaron 500 μ l de buffer de FACS (Apéndice 10), cada muestra se centrifugó a 3000 rpm/6min, se decantó el sobrenadante y agregaron 200 μ l del mismo buffer. Finalmente, se agregaron los anticuerpos conjugados con los distintos marcadores de fluorescencia y un anticuerpo isotipo (IgG2a) como control para pegado inespecífico, a una concentración de 0.2 μ g, a continuación, se enlistan los anticuerpos empleados:

Tinción (Linfocitos)

CD4 – PerCP

CD8 – APC Cy 7

Una vez agregados los anticuerpos las muestras fueron incubadas 40 minutos a 4 °C, posteriormente se realizaron dos lavados con buffer de FACS, el sobrenadante

se decantó. Finalmente, las células fijaron agregando 300 μ l de buffer de FACS y 200 de paraformaldehído al 4%. El análisis de las poblaciones celulares se realizó mediante el uso de un Citómetro de Flujo (Attune, life technologies).

6.- Resultados

6.1.- Análisis del patrón de arborización de mucinas conjuntivales

Uno de los objetivos particulares de esta investigación fue determinar si los macrófagos promueven el desarrollo de los signos de OS. Para responder a esta interrogante, se indujo OS a ratones WT (grupo 1), ratones Mif^{-/-} (grupo 2) y ratones Mif^{-/-} con transferencia adoptiva de macrófagos WT (grupo 3). El efecto de la transferencia adoptiva de macrófagos sobre la estabilidad de la película lagrimal se determinó mediante la evaluación del patrón de arborización de mucinas a los 0, 7, 14 y 21 días post-inducción de OS y a los siete días de haber suspendido el modelo. En la figura 7 mostramos imágenes representativas de los grupos experimentales, donde podemos ver que al día 0 todos los grupos experimentales presentaron un patrón de arborización de mucinas tipo I (considerado sano con base en la escala de Rolando). A los siete días post-escopolamina, solo los ratones WT tuvieron un patrón de mucinas tipo III, mientras que al día 14, encontramos que todos los grupos presentaron un patrón de mucinas tipo III. Sin embargo, a los 21 días solo los grupos 1 y 3 presentaron una pérdida completa del patrón de arborización de mucinas (tipo IV). De manera interesante, tras la suspensión de la inducción de OS, observamos que todos los grupos experimentales presentaron recuperación del patrón de arborización de mucinas, pero solo los ratones Mif^{-/-} sin transferencia (grupo 2) presento un patrón tipo II.

Estos resultados además de confirmar que la ausencia de la citocina MIF resulta en la atenuación de la pérdida del patrón de arborización de mucinas (Rivera *et al.*,

2023) también evidencian el papel patogénico que tienen los macrófagos en el desarrollo de OS.

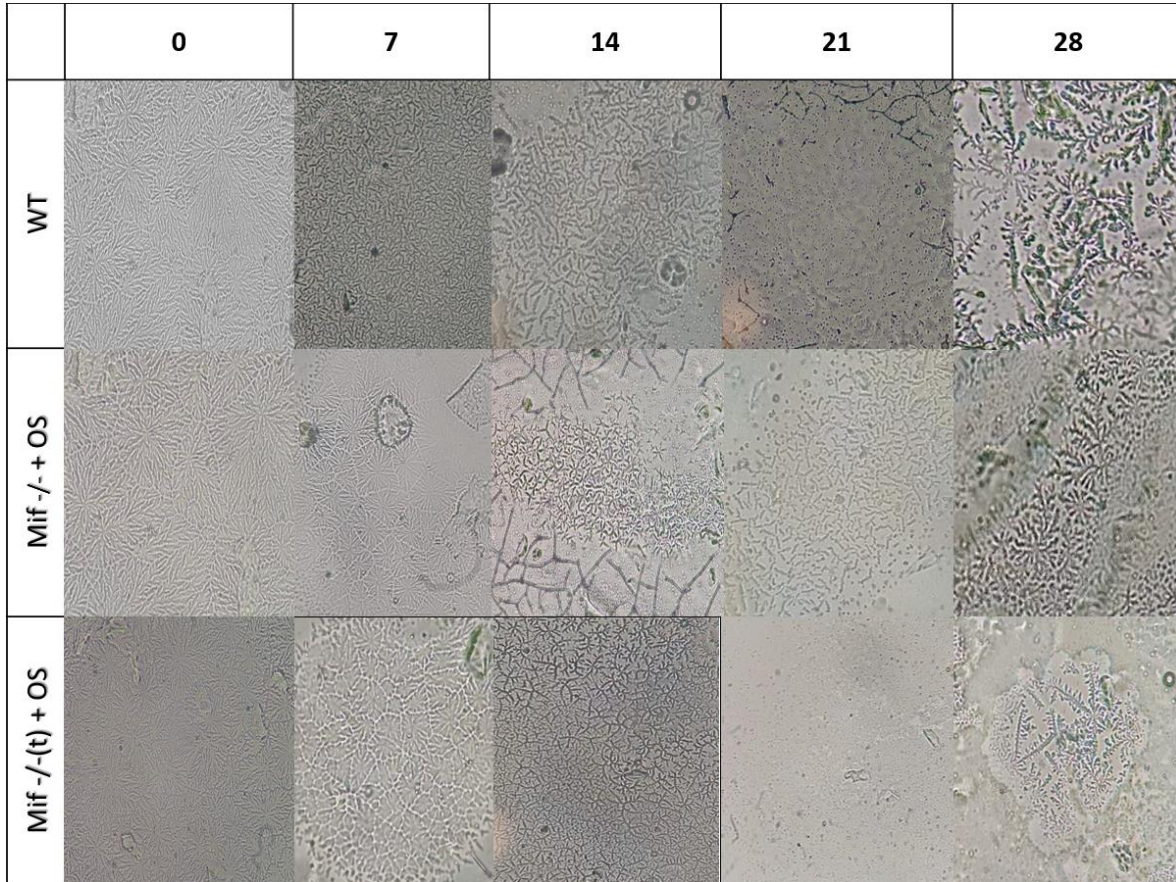


Figura 7 Imágenes representativas del tipo de patrón de arborización de mucinas de muestras de lagrima de ratones WT, Mif^{-/-} y Mif^{-/-}(t) por la técnica de ferning a los 0, 7, 14 y 21 días post inducción de OS con escopolamina y a los siete días de haber suspendido el modelo (Fase de recuperación). Imágenes observadas en microscopio óptico con una magnificación 40x. Resultado de un experimento (n=4).

Considerando los resultados obtenidos de la transferencia de macrófagos WT a ratones Mif^{-/-} con OS, donde observamos que la transferencia promovió la pérdida del patrón de arborización de mucinas (resultados similares a lo observado en los ratones WT), nos preguntamos, si la transferencia adoptiva de macrófagos M1 versus M2 podría exacerbar o atenuar los signos de esta enfermedad. Para responder a esta pregunta, se indujo OS a ratones WT y Mif^{-/-}, organizados de la siguiente manera: grupo 1 (ratones WT con OS), grupo 2 (ratones Mif^{-/-} con OS),

grupo 3 (ratones $Mif^{-/-}$ con OS+M1) y grupo 4 (ratones $Mif^{-/-}$ con OS+M2). Brevemente, 24 horas antes de la inducción de OS se inyectaron vía intraperitoneal 4.5×10^6 macrófagos M1 o M2 a los grupos 3 y 4, respectivamente. El efecto de la transferencia sobre la estabilidad de la película lagrimal se evaluó a los 0, 7 y 14 días post-inducción de OS a través de la evaluación de la pérdida del patrón de arborización de mucinas y la cuantificación de volumen lagrimal. En la figura 8 se muestran imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas de cada uno de los grupos experimentales. Donde podemos observar que al día 0 los cuatro grupos experimentales presentaron un patrón de arborización tipo I. A los 7 días post-escopolamina, observamos que solo los grupos 1 y 3 presentaron pérdida del patrón de arborización de mucinas (tipo III y II, respectivamente). Interesantemente, al día 14, observamos que los ratones transferidos con macrófagos M2 conservaron un patrón de arborización tipo II, mientras que los grupos 1 y 2 presentaron un patrón tipo III y el grupo 3, es decir los ratones con transferencia de macrófagos M1 tuvieron una pérdida completa del patrón de mucinas (tipo IV). Además, en la figura 9, podemos ver que a los 7 días las diferencias más marcadas se observaron en el grupo con transferencia de Mo M2, ya que la mayoría de los ratones conservaron un patrón de mucinas tipo II, en comparación con los ratones M1, los cuales perdieron por completo el patrón de arborización. Estos resultados, son valiosos, ya que evidencian el papel patogénico que tienen los macrófagos M1 (inflamatorios) y el potencial efecto modulador que tiene la transferencia adoptiva de macrófagos M2 (antiinflamatorios) en la pérdida o estabilidad del patrón de arborización de mucinas, un componente importante de la película lagrimal.

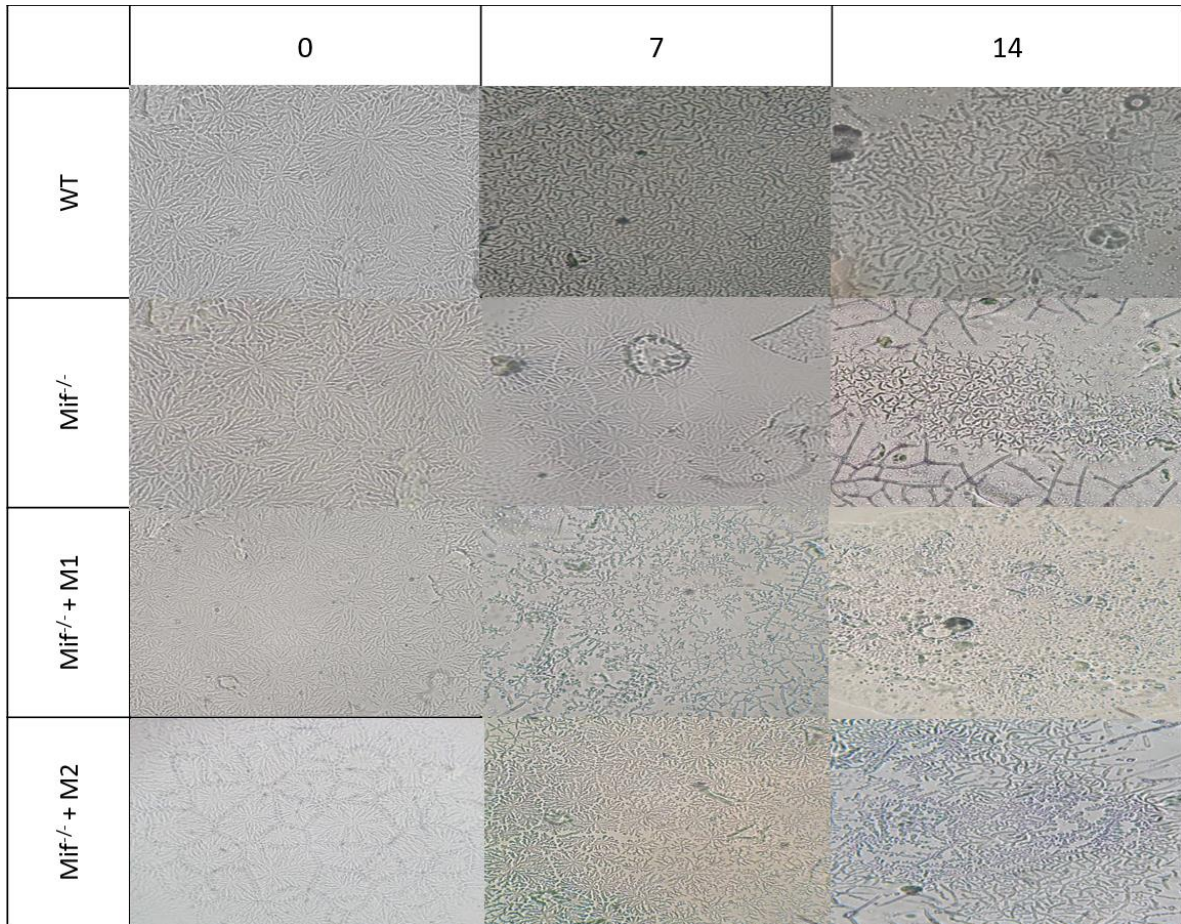


Figura 8 Imágenes representativas del patrón de arborización de mucinas de muestras de lagrimea de ratones WT, Mif^{-/-}, Mif^{-/-} + M1 y Mif^{-/-} + M2 a los 0, 7 y 14 días post inducción de OS con escopolamina. Imágenes observadas en microscopio óptico con una magnificación 40x. Resultado de dos experimentos (n=6).

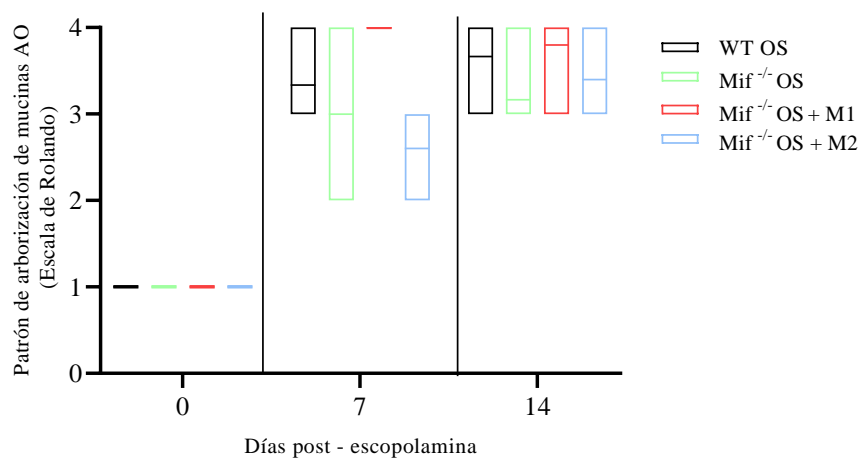


Figura 9 Patrón de arborización de mucinas a los 0, 7 y 14 días post inducción con escopolamina, promedio de ambos ojos, los resultados se muestran usando la escala de Rolando. Resultados de dos experimentos (n=6). Se realizó análisis estadístico mediante ANOVA sin diferencias estadísticamente significativas (GraphPad Prism 8.4).

6.2.- Cuantificación del volumen lagrimal

Otro de los parámetros que permiten evaluar la inestabilidad de la superficie ocular es la disminución del volumen lagrimal, así que con el propósito de determinar si la transferencia de macrófagos WT a ratones *Mif^{-/-}* con OS contribuye a la pérdida, cuantificamos el volumen lagrimal producido por ratones WT (grupo 1), ratones *Mif^{-/-}* (grupo 2) y ratones *Mif^{-/-}* con transferencia adoptiva de macrófagos WT (grupo 3). Brevemente, la lagrima se colectó mediante la colocación de tiras de Schirmer en la región temporal del parpado inferior de cada uno de los ratones experimentales durante 5 min, transcurrido el tiempo, con un vernier digital se midió la producción de lagrima a los 0, 7, 14 y 21 post-inducción de OS y a los 7 días de haber suspendido la inducción del modelo (fase de recuperación). En la figura 10 se muestra la producción de lagrima de cada uno de los grupos experimentales, donde podemos observar que al día 0 la producción de lagrima de todos los grupos experimentales en promedio es de 2.13 mm/5 minutos. A los 7 días de la inducción todos los grupos experimentales tuvieron pérdida del volumen lagrimal, sin embargo, esta fue mayor en el grupo 3 con un promedio de 1.69 mm/5 min equivalente al 21% del volumen lagrimal. De manera interesante, a los 14 días, solo el grupo 2 tuvo mayor pérdida del volumen lagrimal del 35.69% (1.37 mm/5min) en comparación con los otros grupos experimentales. Sin embargo, a los 21 días post-inducción de OS y en la fase de recuperación solo los ratones *Mif^{-/-}* (grupo 2) recuperó la producción de lagrima, mientras que los ratones WT solo mostraron incremento en el día 21. Finalmente, encontramos que la transferencia de macrófagos WT a ratones *Mif^{-/-}* resultó en reducción del volumen lagrimal a los 21 días y un ligero incremento a los 7 días de haber suspendido la inducción de ojo seco. Estos resultados muestran que la transferencia de macrófagos WT a ratones *Mif^{-/-}* resulta en disminución del volumen lagrimal.

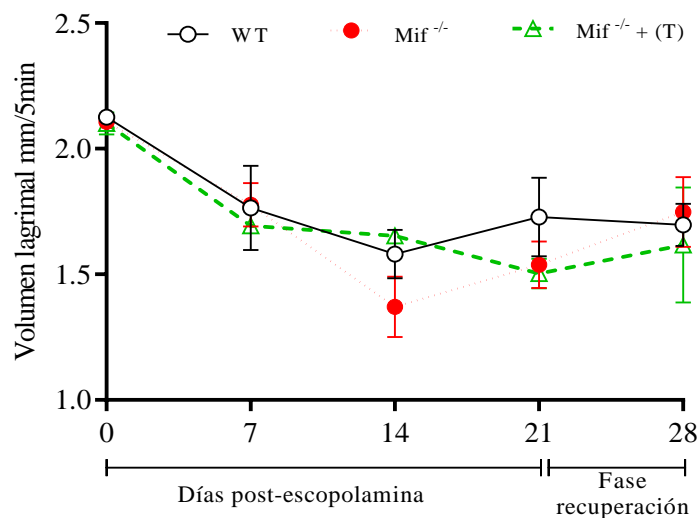


Figura 10 Volumen lagrimal (Schirmer) de ratones WT y Mif^{-/-} a los 0, 7, 14 y 21 post-inducción de OS y a los 7 días posteriores a la suspensión de la inducción del modelo. Los resultados son el promedio \pm ES de 4 ratones por grupo de un experimento. Se realizó análisis estadístico mediante ANOVA sin diferencias estadísticamente significativas (GraphPad Prism 8.4).

Para evaluar el impacto de la transferencia de macrófagos M1 versus M2 se cuantifico la producción de lagrima ratones WT y Mif^{-/-} con OS, los grupos se dividieron como a continuación se muestran: grupo 1 (ratones WT con OS), grupo 2 (ratones Mif^{-/-} con OS), grupo 3 (ratones Mif^{-/-} con OS+M1) y grupo 4 (ratones Mif^{-/-} con OS+M2) ratones con OS. La cuantificación del volumen lagrimal se realizó por la técnica de Schirmer. Se colocaron las tiras de Schirmer (schirmer strips) sobre el párpado inferior en la región temporal de cada uno de los ojos durante 5 min. Transcurrido este tiempo se midió el volumen lagrimal con un vernier digital a los 0, 7 y 14 días post-inducción de OS. Al día 0 la producción de lágrima de todos los grupos fue de 2 mm/5min (figura 11A, B y C). En la figura 11A y B, se puede observar que a los 7 días post-inducción, el grupo Mif^{-/-} + M1 presento una pérdida del 22.5 y 44.1% del volumen lagrimal en ojo izquierdo (OI) y derecho (OD), respectivamente. En contraste, a lo observado con la transferencia de macrófagos M1, la transferencia de macrófagos M2 resultó en una pérdida del volumen lagrimal, encontrando una reducción del 26 y 28% para OI y OD, respectivamente. La figura 11C muestra el promedio del volumen lagrimal de ambos ojos. En conjunto, estos

resultados, refuerzan las observaciones obtenidas previamente, donde encontramos que la deficiencia de la citocina MIF protege de la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal y evidencian el papel patogénico de los macrófagos M1 en el desarrollo de OS.

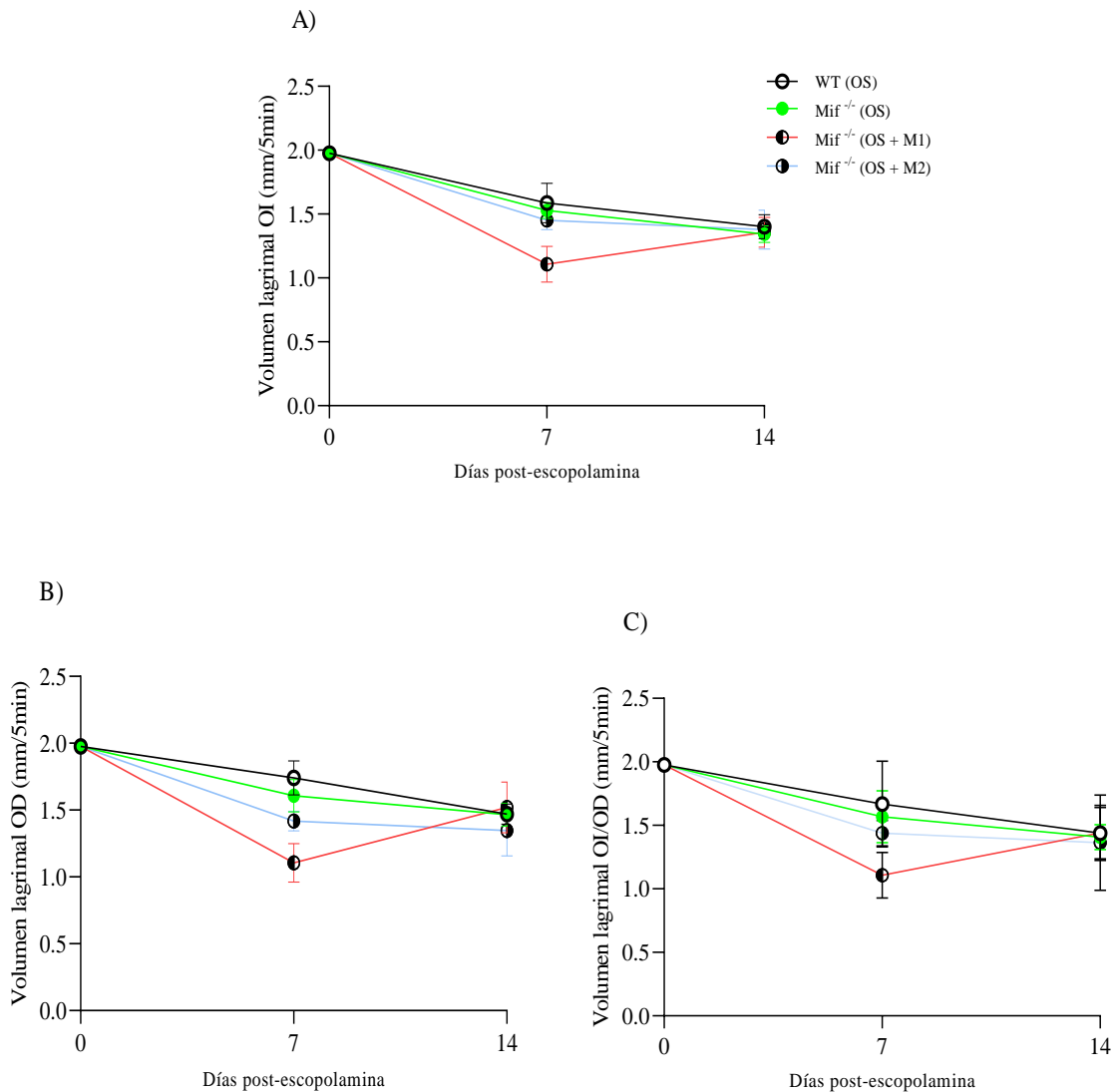


Figura 11 Cuantificación de volumen lagrimal por medio de la técnica de Schirmer a los 0, 7 y 14 días post-escopolamina de cada grupo de ratones A) volumen lagrimal ojo izquierdo (OI), B) volumen lagrimal ojo derecho (OD) y C) volumen lagrimal del promedio de ambos ojos (AO). Los resultados son el promedio \pm ES de 6 ratones por grupo de dos experimentos.

6.3.- Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos por ELISA sándwich

Hay evidencia que sugiere que la respuesta inflamatoria de la SO en pacientes con Ojo seco es un proceso orquestado por la producción de metaloproteasas, quimiocinas y citocinas inflamatorias, como consecuencia de la activación de poblaciones celulares de la respuesta inmune innata residentes en córnea y conjuntiva. Particularmente, se ha destacado el papel de las células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas), debido a su capacidad para migrar a los órganos linfoides secundarios como el bazo, con el objetivo de llevar a cabo la presentación de antígeno a las células T, promoviendo su activación y diferenciación hacia los subtipos Th1 y Th17, en conjunto estas poblaciones celulares contribuyen a sostener y exacerbar en proceso inflamatorio en la SO.

Considerando estos antecedentes, y con el objetivo de analizar la producción de citocinas en órganos linfoides secundarios, a los 14 días post-inducción de OS, mediante la técnica de Elisa-sándwich cuantificamos la producción de citocinas en sobrenadante de células de bazo y ganglio cervical, con el objetivo de evaluar, si la transferencia adoptiva de macrófagos M1 versus M2 a ratones deficientes para la molécula MIF favorece o atenúa el desarrollo de esta enfermedad. En la figura 12, mostramos la producción de IFN- γ (A), IL-6 (B), IL-12 (C) e IL-10 (D) en sobrenadante de cultivo de esplenocitos, el análisis estadístico no mostró diferencias en la producción espontánea de ninguna de las citocinas evaluadas. Sin embargo, cuando las células se estimularon con CoA, solo encontramos diferencias estadísticamente significativas en IFN- γ , contrario a lo esperado, el grupo con transferencia de macrófagos M1 tuvo menor producción de esta citocina en comparación al grupo que recibió macrófagos M2 (figura 12 A).

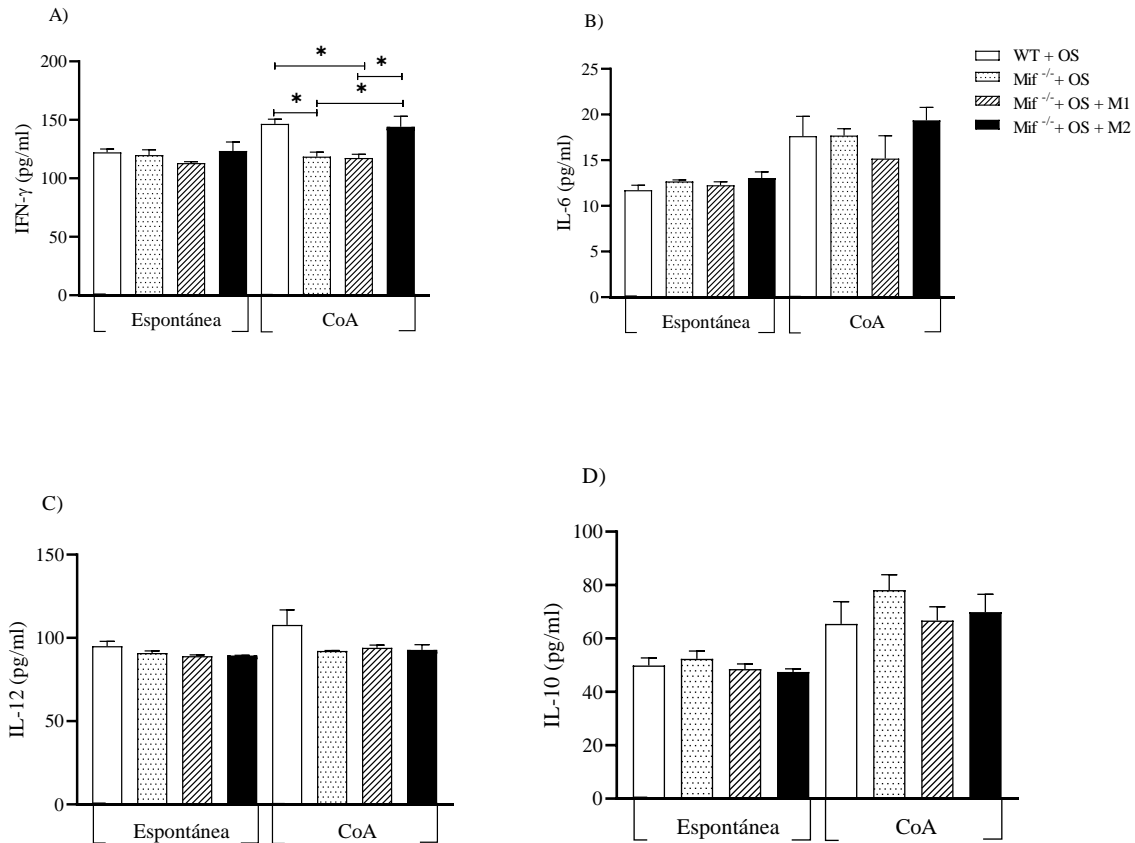


Figura 12 Cuantificación de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias IFN- γ (A) IL-6 (B), IL-12 (C) e IL-10 (D) en sobrenadante de cultivo de esplenocitos, producción espontánea y estimuladas con Concanavalina A (CoA). Los resultados son el promedio \pm ES de dos experimentos (n=6). Se realizó análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$), sin diferencias significativas (GraphPad Prism 8.4).

El análisis estadístico de estos mismos mediadores en sobrenadante de células de ganglio cervical no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales figura 13 A-D. Aun cuando estos resultados no explican la atenuación de los signos de OS observada en los ratones con transferencia de macrófagos M2, consideramos que es conveniente realizar nuevos experimentos donde se analice la producción de estos mediadores a tiempos más tempranos y tardíos de la enfermedad.

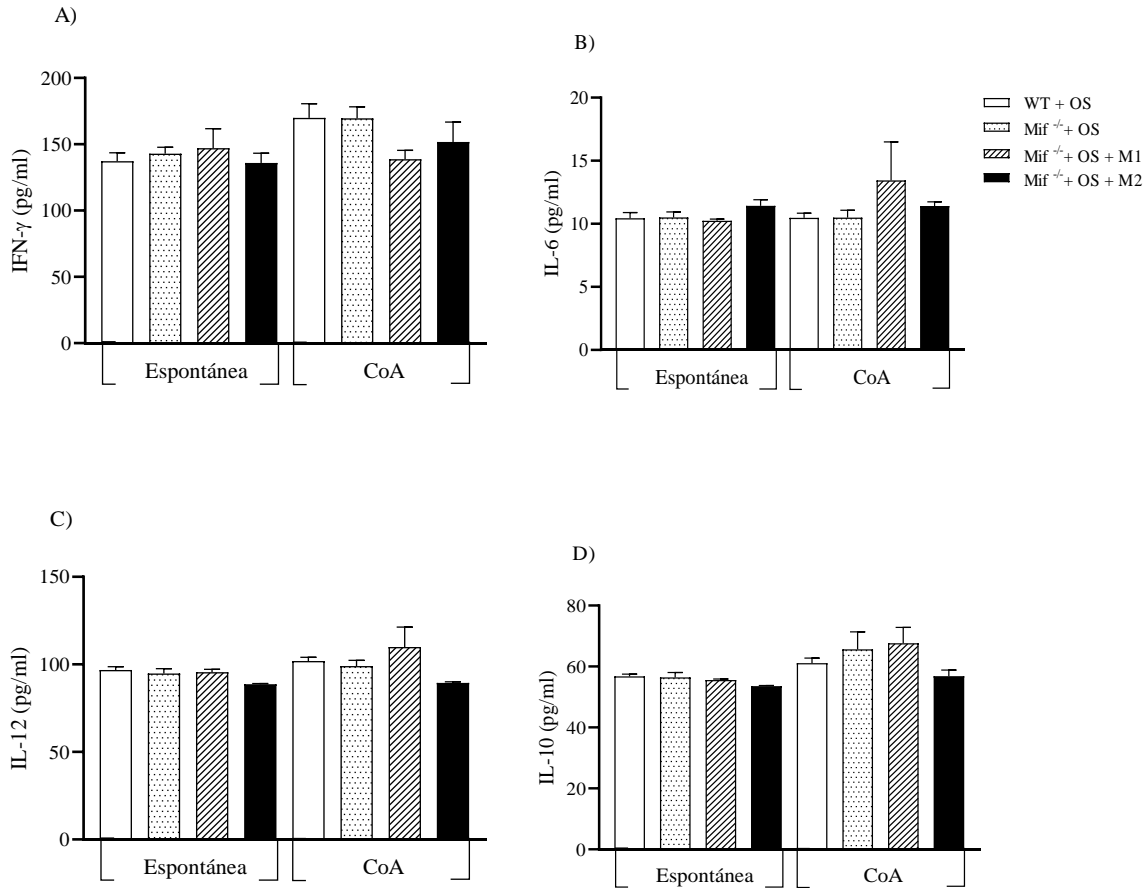


Figura 13 Cuantificación de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias IFN- γ (A) IL-6 (B), IL-12 (C) e IL-10 (D) en sobrenadante de cultivo de ganglio cervical, producción espontánea y estimuladas con Concanavalina A (CoA). Los resultados son el promedio \pm ES de dos experimentos (n=6). Se realizó análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$), sin diferencias significativas (GraphPad Prism 8.4).

6.4.- Análisis histopatológico de córnea de ratones con Ojo seco

Ojo seco es una enfermedad inflamatoria crónica de la superficie ocular caracterizada por el incremento en la osmolaridad de la lagrime, lo cual trae como consecuencia el desbalance en la secreción y composición de la película lagrimal y la pérdida de células epiteliales y caliciformes, estos cambios, promueven alteración en la síntesis de moléculas implicadas en el mantenimiento del privilegio inmunológico de la superficie ocular. De hecho, se ha demostrado que la perpetuación del microambiente inflamatorio está directamente relacionada con el

daño tisular en la córnea. Por tal motivo, uno de los objetivos planteados en este trabajo fue analizar si la transferencia adoptiva de macrófagos M2 reduce el daño histológico en córnea. En la figura 14 se muestran imágenes representativas de cortes histológicos de la córnea de ratones control WT y *Mif^{-/-}*, donde se puede observar que en condiciones de homeostasis la córnea se caracteriza por presentar un epitelio formado por 5 capas de células epiteliales, la membrana de Bowman, el estroma, en el que se distingue la presencia de queratocitos y fibras de colágena, las cuales están más compactas en el primer tercio, le sigue la membrana de Descemet y una capa de células endoteliales (figura 14 A y B). En la figura 14 C y D mostramos imágenes representativas del análisis histológico de córnea de ratones WT y *Mif^{-/-}* con OS, donde podemos ver que los ratones deficientes para MIF tienen un menor infiltrado inflamatorio en el epitelio y un menor desarreglo de las fibras de colágena en comparación con los ratones WT. En la figura 14 E, podemos ver que la transferencia de macrófagos M1 resulta en un marcado desarreglo de las fibras de colágena en los tres tercios del estroma, pérdida de queratocitos y edema en el endotelio en comparación a los hallazgos encontrados en los cortes de córnea de ratones transferidos con macrófagos M2 (figura 14 F). Finalmente, en la figura 15 A y B, mostramos que la transferencia de macrófagos M1 indujo incremento en el grosor del epitelio y el estroma en comparación al grupo con transferencia de M2. Estos resultados sustentan el potencial efecto terapéutico de la transferencia de macrófagos M2 en enfermedades inflamatorias oculares como OS.

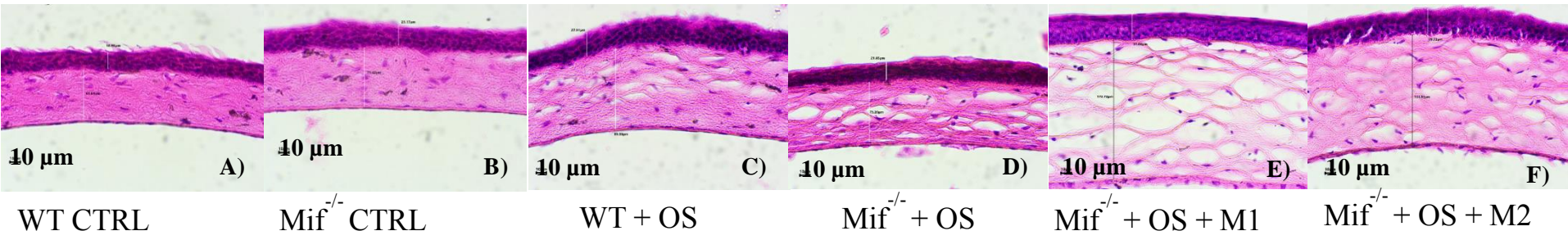


Figura 14 Imágenes representativas de cortes histológicos transversales de córnea de ratones control y experimentales, teñidos con Hematoxilina y eosina, observados a una magnificación de 40x. Resultado de dos experimentos (n=6)

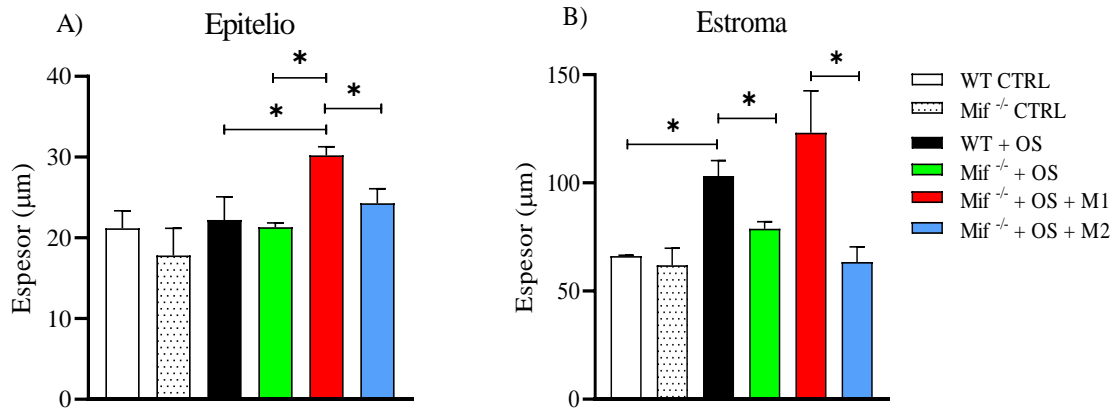


Figura 15. Promedios de espesor (μm) del epitelio (A) y estroma (B) de la córnea de grupos control y experimentales. Los resultados son el promedio \pm ES de dos experimentos ($n=6$). Se realizó análisis estadístico ANOVA ($*p<0.05$) (GraphPad Prism 8.4).

6.5.- Análisis del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo en ratones con Ojo seco y transferencia de macrófagos WT

Con el objetivo de determinar si la transferencia de macrófagos de ratones WT a ratones deficientes para MIF con OS favorece la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, realizamos un análisis por citometría de flujo de ambas poblaciones celulares en el bazo de ratones WT, Mif^{-/-} y Mif^{-/-} + T a los 28 días post-escopolamina. En la figura 13 se puede observar que los ratones Mif^{-/-} con transferencia de macrófagos provenientes de ratones WT tuvieron un incremento del 10% en linfocitos T CD4⁺ en comparación con los ratones WT con OS, correspondiente al 50.6 y 43.6%, respectivamente (figura 16 A). En cuanto al análisis de los linfocitos T CD8⁺ no se observaron diferencias en el porcentaje entre los grupos experimentales, pero sí en los números absolutos (figura 16 B y C). Estos resultados son interesantes y se requiere un análisis minucioso de ambas poblaciones celulares, con el objetivo de caracterizar su fenotipo y determinar si la deficiencia de MIF, favorece la proliferación de linfocitos T y de ser así hacia que subtipo o sí impide su egreso del bazo hacia la superficie ocular.

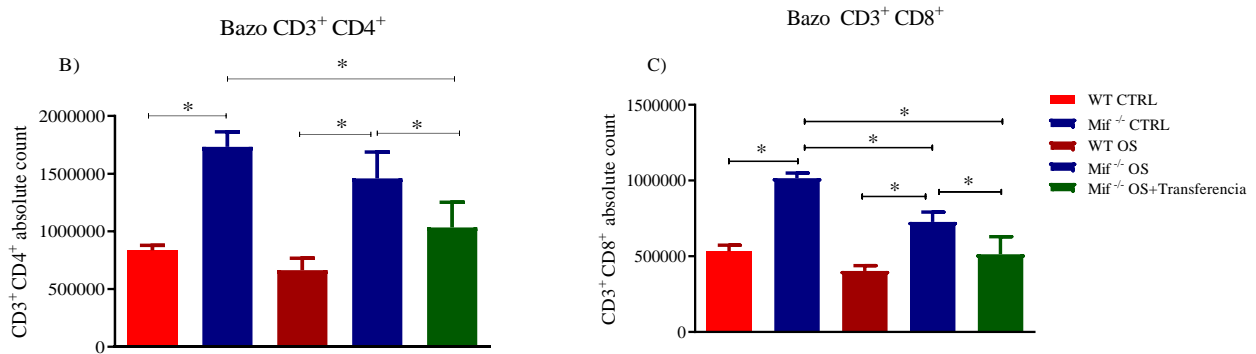
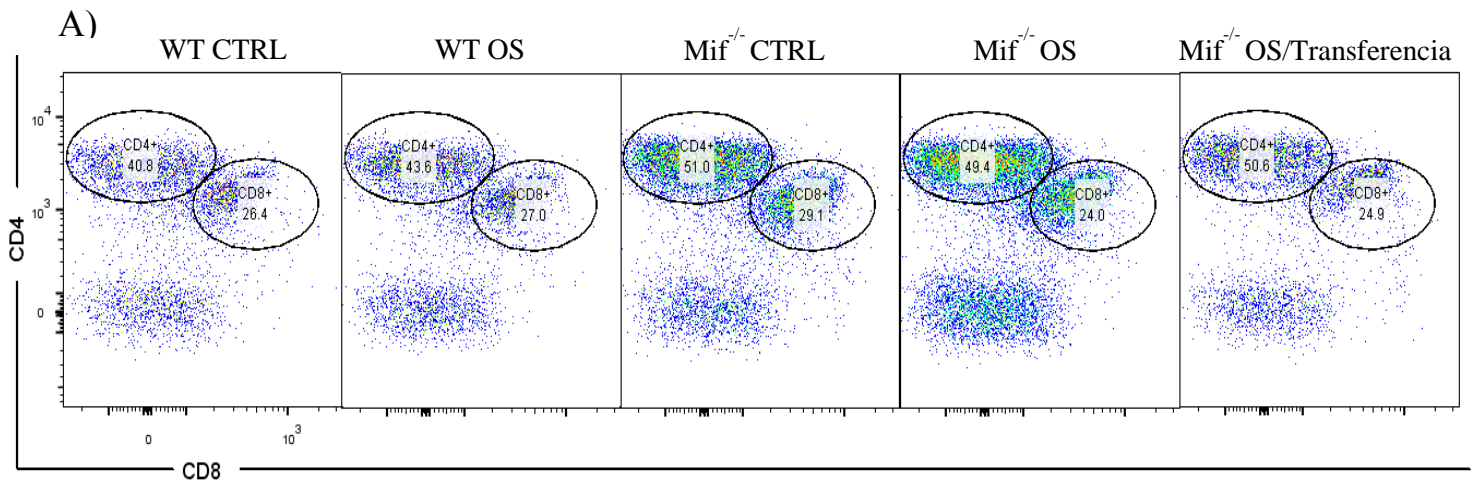


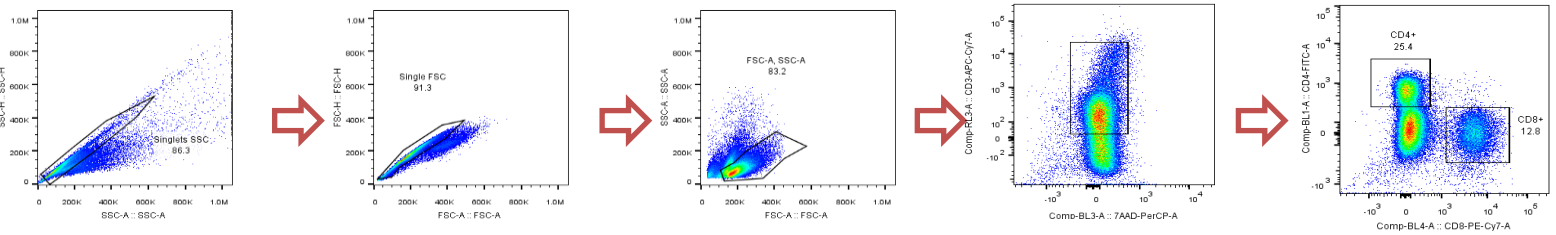
Figura 16 A) Plots representativos del análisis por citometría de flujo de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en bazo de ratones control y experimentales. B) números absolutos de linfocitos T CD4⁺ y C) números absolutos de linfocitos T CD8⁺. ANOVA (****p<0.05) (GraphPad Prism 8.4).

6.5.1.- Caracterización de poblaciones celulares en ganglio cervical

Considerando los resultados observados tras la transferencia de macrófagos WT a ratones deficientes para MIF, analizamos si la transferencia de macrófagos M1 versus M2 a ratones deficientes para MIF con OS favorece la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el ganglio cervical. Brevemente, a los 14 días post-inducción de OS, se realizó la eutanasia de los organismos y se extrajeron las

células de los ganglios cervicales de ratones WT, *Mif*^{-/-}, *Mif*^{-/-} + M1 y *Mif*^{-/-} + M2. Por citometría de flujo se analizó el porcentaje de ambas poblaciones celulares, en la figura 17 A se muestra la estrategia experimental que seguimos para seleccionar la región de células vivas y por tamaño y granularidad correspondiera a la población de linfocitos T. En la figura 17 B mostramos el porcentaje de viabilidad para células CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺. En cuanto a los porcentajes de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ encontramos que tras la inducción de OS todos los grupos experimentales mostraron un incremento, sin embargo, no hubo diferencias entre los grupos que recibieron transferencia de macrófagos (figura 17 C y D). Aun cuando no observamos diferencias entre los grupos experimentales que nos expliquen la atenuación de los signos de OS, es necesario hacer un análisis exhaustivo de estas poblaciones celulares, ya que hasta ahora desconocemos su fenotipo.

A)



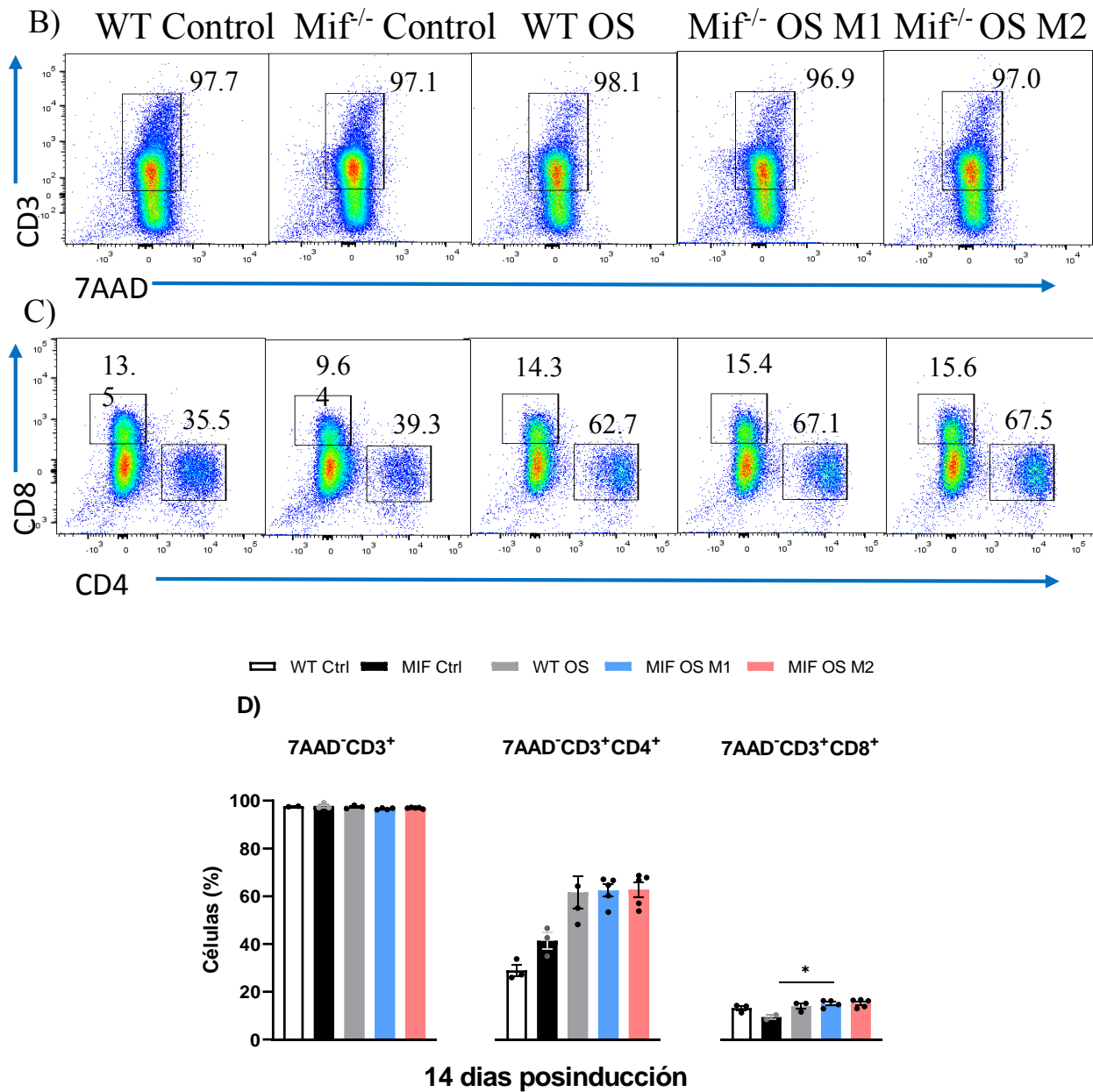


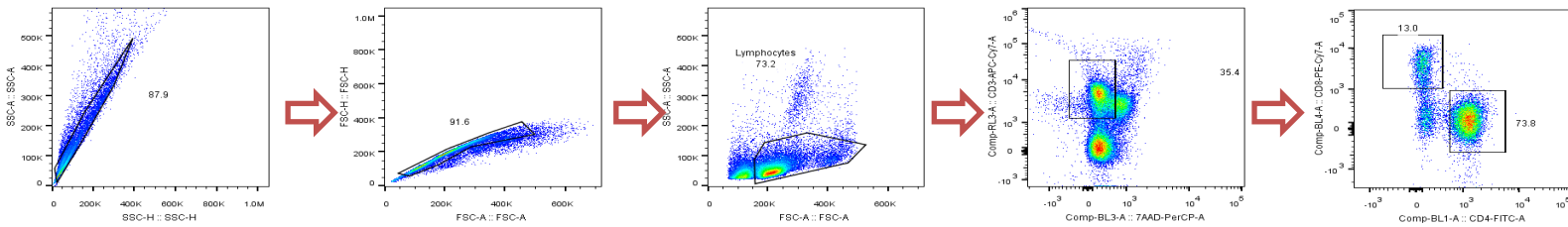
Figura 17 Plots representativos de citometría A) Estrategia experimental para la selección de linfocitos T provenientes de ganglio cervical, B) identificación de células T CD3⁺ y 7AAD⁻, C) Células CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺ y, D) Gráficas donde se muestra el resultado en porcentaje de viabilidad, linfocitos CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺. Se realizó análisis estadístico ANOVA (*p<0.05) (GraphPad Prism 8.4).

6.5.2.- Caracterización de poblaciones celulares en bazo

La estrategia experimental para el análisis de estas mismas poblaciones celulares en bazo se muestra en la figura 18 A. Interesantemente el análisis en bazo muestran

que a los 14 días post-inducción de OS hay un incremento del 5 % de linfocitos CD3⁺ en los ratones que recibieron la transferencia de macrófagos M1 en comparación con los otros grupos experimentales (figura 18 B). En cuanto, al porcentaje de linfocitos CD4⁺ observamos que la transferencia de macrófagos M2 indujo un incremento del 5.1% en la población de linfocitos CD4⁺. Por su parte, en análisis de linfocitos CD8⁺ revelo que la transferencia de macrófagos M1 resulto en un incremento significativo de esta población en comparación con los Mif^{-/-} que recibieron macrófagos M2 (figura 18 C). Finalmente, en la figura 18 D mostramos el porcentaje de CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ de todos los grupos experimentales. Hasta ahora estos resultados nos muestran que la transferencia de macrófagos M1 a ratones deficientes para MIF con OS induce un incremento significativo de linfocitos T CD8⁺, sin embargo, es necesario caracterizar su fenotipo a fin de determinar si estas células son citotóxicas y/o son fuente de mediadores inflamatorios.

A)



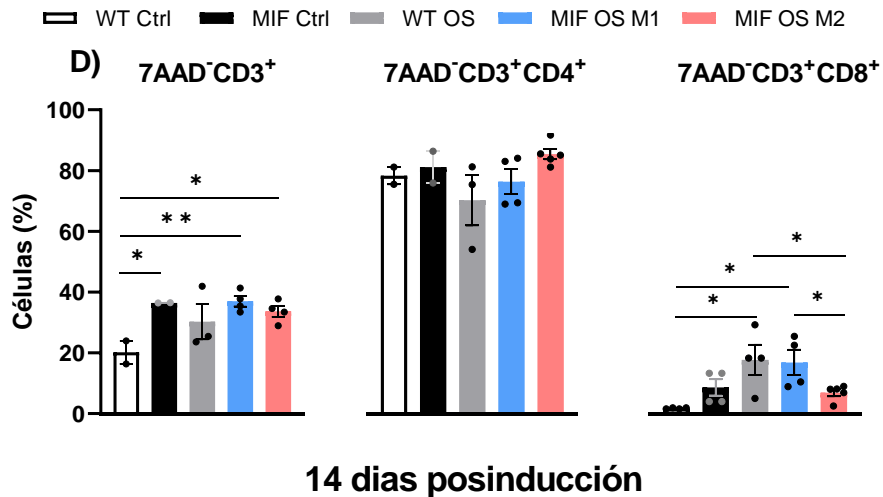
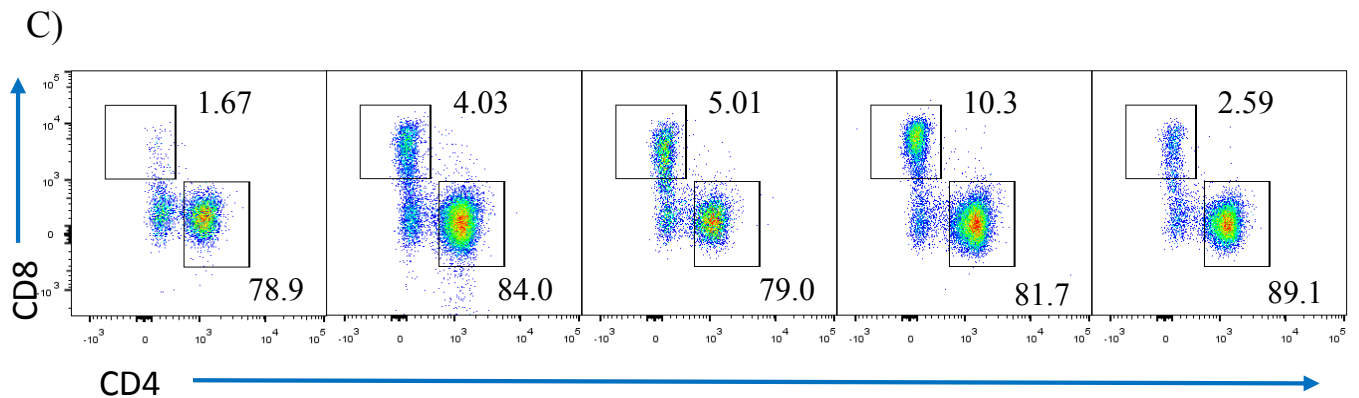
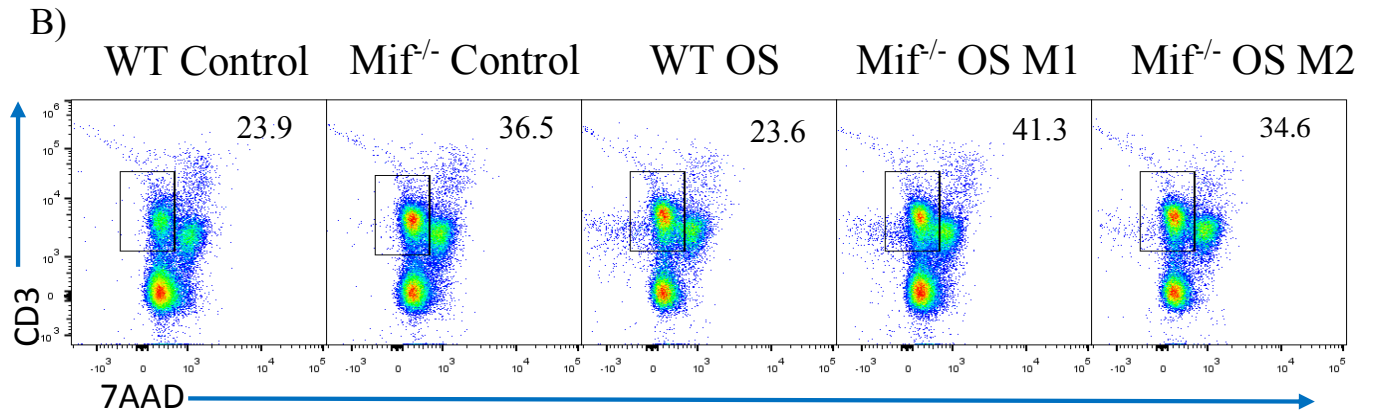


Figura 18 Plots representativos del análisis por citometría de flujo de linfocitos T en bazo de ratones control y experimentales A) Estrategia experimental para la selección de linfocitos T provenientes de bazo, B) identificación de células T CD3⁺ y 7AAD⁻ C) Células CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺ y, D) Gráficas donde se muestra el resultado en porcentaje de viabilidad, linfocitos CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺. Análisis estadístico ANOVA (**p<0.05) (GraphPad Prism 8.4).

7.- Discusión

Se ha reportado que independientemente del factor o factores subyacentes al desarrollo de OS, la aparición de los signos y síntomas de esta enfermedad son consecuencia del incremento en la osmolaridad de la lágrima, la producción de mediadores inflamatorios (citocinas y quimiocinas) y la síntesis de metaloproteasas (Yoon *et al.*, 2007) (Wilson y Perry, 2007) (Luo *et al.*, 2007) (Kalt *et al.*, 2010). Actualmente se reconoce que OS es una enfermedad limitante que afecta a diversos grupos etarios, por tal motivo, en los últimos años, se han incrementado los esfuerzos por entender el papel de las citocinas inflamatorias en la inmunopatogénesis de OS. De manera particular, nuestro grupo de investigación se ha centrado en analizar el papel de MIF, debido a que es una citocina inflamatoria secretada por células de la respuesta inmune, entre las que se encuentran los macrófagos y linfocitos T (Calandra & Roger, 2003). Y se ha demostrado el papel patogénico de esta citocina en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, ya que es capaz de promover la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia los subtipos Th1 y Th17 (Lue *et al.*, 2003) (Denkinger *et al.*, 2003).

Matsuda A, y colaboradores reportaron la expresión de MIF en epitelio pigmentado de la retina, iris y córnea de roedores y humanos sanos, aun cuando los autores no describieron la función de MIF a nivel ocular, sugirieron un papel en el mantenimiento del privilegio inmunológico ocular ((Matsuda *et al.*, 1997) (Matsuda *et al.*, 1996) Por otro lado, estudios en modelos murinos de uveítis, retinopatía y ojo seco reportaron niveles incrementados de esta citocina, sugiriendo una posible participación en el agravamiento de estas enfermedades, sin embargo, es escasa la información acerca de su participación en el desarrollo de la mismas (Onodera *et al.*, 2000) (Yang *et al.*, 2016) (Cicik *et al.*, 2003).

En este contexto, previamente, nosotros reportamos que ratones deficientes para MIF tienen signos atenuados de OS y un menor daño tisular en la córnea, estos hallazgos se asociaron con una menor producción de mediadores inflamatorios (artículo bajo revisión). Este estudio es el primero en reportar que MIF favorece el

desarrollo de los signos de esta enfermedad, sin embargo, desconocemos la o las fuentes tempranas de esta citocina. Considerando estos hallazgos y que se sabe que células de la respuesta inmune innata como los macrófagos son fuente de MIF y han sido implicados en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como: artritis reumatoide, lupus eritematoso, encefalitis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes tipo I y II, entre otras (Ma *et al.*, 2019) (López-Cacho *et al.*, 2014) (Wildenberg *et al.*, 2009) (Demetter *et al.*, 2005) (Funes *et al.*, 2018). Uno de los objetivos particulares del presente proyecto, fue evaluar el efecto de la transferencia adoptiva de macrófagos WT a ratones Mif^{-/-}.

Posterior a la transferencia de macrófagos y a la inducción de OS, evaluamos la estabilidad de la película lagrimal en todos los grupos experimentales y encontramos que los ratones Mif^{-/-} transferidos con macrófagos WT, tuvieron una marcada pérdida del patrón de arborización de mucinas, estos resultados fueron similares a lo observado en los ratones WT (figura 7).

Una vez confirmada la participación de los macrófagos en la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal a través de las técnicas de ferning y Schirmer, evaluamos y comparamos el efecto de la transferencia de macrófagos M1 versus M2 en ratones Mif^{-/-} con OS. De manera interesante encontramos que la transferencia de macrófagos M1 exacerba la pérdida de la estabilidad de la película lagrimal en comparación con los ratones que recibieron macrófagos M2. Esta afirmación se fundamenta en los hallazgos registrados durante la evaluación del patrón de arborización de mucinas a los 7 días post-escopolamina, donde encontramos que el grupo con transferencia de M1 tuvo una marcada pérdida de las ramificaciones (patrón tipo III), mientras que los organismos con transferencia de M2 conservaron un patrón tipo I, con base en la escala de Rolando. Al día 14, los ratones con transferencia de M1 presentaron una pérdida completa del patrón de arborización de mucinas, categorizado como tipo IV, mientras que los ratones con transferencia de M2 se mantuvieron con un patrón tipo II (figuras 8 y 9).

Otro de los parámetros empleados para determinar el efecto de la transferencia de macrófagos sobre la estabilidad de la lagrime, fue la cuantificación del volumen

lagrimal mediante la técnica de Schirmer. El primer hallazgo que encontramos fue que la transferencia de macrófagos WT a ratones *Mif^{-/-}* con OS reproduce los resultados observados en el grupo WT (figura 10). Este mismo análisis se hizo para comparar el efecto de la transferencia de macrófagos M1 versus M2, en este caso analizamos la producción de lagrime en cada uno de los ojos y encontramos que el grupo con transferencia de M1 tuvo mayor pérdida del volumen lagrimal a los 7 días post-escopolamina en comparación con los otros grupos experimentales. Sin embargo, al día 14 fue el único grupo que mostro un incremento en la producción de lagrime (figura 11). Estos resultados, evidencian el papel patogénico de los macrófagos M1 en un modelo murino de OS. Además, nuestras observaciones son consistentes con otros estudios, donde se ha demostrado que la depleción de estas células y/o la transferencia adoptiva de macrófagos derivados de medula ósea y diferenciados a M1 o M2 resulta en la exacerbación o atenuación del proceso inflamatorio en colitis experimental (Weissert, van Rooijen y Sly, 2012)

Hay evidencia de que tanto las células epiteliales como las células de la respuesta inmune innata y adaptativa residentes en la SO juegan un papel clave en el desarrollo de Ojo seco a través de la producción de mediadores inflamatorios y la presentación de antígeno en órganos linfoides secundarios (ganglio cervical y bazo), este proceso promueve la activación, proliferación y el reclutamiento de poblaciones celulares patogénicas , que en conjunto robustecen y perpetúan el microambiente inflamatorio característico de esta enfermedad (Zhang *et al.*, 2017). En este contexto, y a fin de evaluar si la transferencia de macrófagos M1 versus M2 influye en el tipo de citocinas producidas en órganos linfoides secundarios, a los 14 días post-escopolamina, realizamos cultivos de células de bazo y ganglio cervical, posteriormente cuantificamos la producción de mediadores inflamatorios y antiinflamatorios. En general no observamos diferencias estadísticamente significativas en la producción espontánea o posterior al estímulo con CoA entre los grupos experimentales (figuras 12 y 13). Aun cuando estos resultados no explican la atenuación de los signos de OS observada en los ratones con transferencia de macrófagos M2, no descartamos que la polarización de la respuesta inmune pudiera

requerir más tiempo, por lo que sugerimos que este mismo análisis se haga en un modelo crónico.

Actualmente se reconoce que la perpetuación del microambiente inflamatorio en la SO puede causar disminución de la agudeza visual y en casos graves ceguera a consecuencia de la pérdida de la transparencia corneal ((McMonnies, 2017) (Wolffsohn *et al.*, 2017) (Craig *et al.*, 2017). Particularmente, se ha destacado el papel de las células presentadoras de antígeno como los macrófagos M1, debido a su capacidad para activar y diferenciar a los linfocitos T hacia los subtipos Th1 y Th17, en conjunto estas poblaciones celulares promueven el desarrollo de metaplasia escamosa, apoptosis de células epiteliales y caliciformes presentes en córnea y conjuntiva. (De Pavia *et al.*, 2007) (De Pavia *et al.*, 2009) (Zhang *et al.*, 2011). Considerando lo antes expuesto, analizamos por histología el efecto de la transferencia de macrófagos M1 y M2 en cortes de córnea de ratones con OS. El análisis histológico reveló que la transferencia de macrófagos M2 resulta en un menor daño tisular en comparación al grupo con transferencia de M1, los cuales tuvieron un mayor engrosamiento del epitelio y un marcado desarreglo de las fibras de colágena como se puede observar en las (figuras 14 y 15).

Considerando la importancia de los macrófagos en la activación y polarización de los linfocitos T, así como los antecedentes donde se reporta su papel patogénico, particularmente, de los subtipos Th1 y Th17 (Stern *et al.*, 2002) (De Pavia *et al.*, 2007) (De Pavia *et al.*, 2009). En un primer acercamiento para analizar su posible participación en la inmunopatogénesis de esta enfermedad, analizamos por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en ratones Mif^{-/-} con y sin transferencia de macrófagos WT. El análisis por porcentaje no reveló diferencias en linfocitos CD8⁺ entre los grupos antes mencionados (figura 16). Sin embargo, los ratones Mif^{-/-} con transferencia tuvieron un incremento del 7% en CD4⁺ en comparación con los ratones WT con OS. Por otro lado, cuando analizamos los números absolutos observamos que los ratones Mif^{-/-} control y con OS tienen un mayor número de CD4⁺ y CD8⁺ contrario a lo observado en el grupo con transferencia. Hasta ahora desconocemos el fenotipo de estas poblaciones

celulares, sin embargo, estos resultados sugieren que la transferencia de macrófagos pudiera influir en la proliferación y/o egreso de los linfocitos T.

Una vez que evaluamos el efecto de la transferencia de Mo a ratones deficientes para MIF. Realizamos este mismo análisis, pero ahora con transferencia de M1 versus M2. Y encontramos que los ratones transferidos con macrófagos M2 tuvieron un incremento del 10% en linfocitos CD4 en comparación a los ratones *Mif*^{-/-} con transferencia de M1 o del 7.4 % cuando se les comparo con los WT. En contraste con lo antes descrito y de manera interesante, cuando analizamos el porcentaje de CD8⁺ observamos que los ratones con transferencia de M2 tuvieron un menor porcentaje de esta población en comparación con los ratones *Mif*^{-/-} que recibieron M1 o con el grupo WT, equivalente al 2.5, 10.3 y 5.0%, respectivamente (figura 17).

En conjunto estos datos, hasta ahora permite ver que la transferencia de macrófagos WT a ratones deficientes para MIF con OS revierte la atenuación de los signos de la enfermedad y aun cuando no encontramos diferencias en el porcentaje de ambas poblaciones linfocíticas, no descartamos que la atenuación en la pérdida del volumen lagrimal, del patrón de arborización de mucinas y el daño tisular en la córnea, pueda estar relacionado con un fenotipo antiinflamatorio. Por otro lado, cuando probamos el efecto de la transferencia de macrófagos M1 o M2 en un modelo murino agudo de OS, encontramos que los organismos con transferencia de M2 tienen más CD4⁺ y menos CD8⁺ en comparación con los otros grupos experimentales.

Estos hallazgos son valiosos, pero requieren un análisis minucioso a fin de caracterizar el fenotipo de estas poblaciones linfocíticas y determinar el tipo de citocinas que secretan. De tal manera que podamos confirmar sí nuestros resultados son consistentes con el estudio hecho por Bose T, *et al*, estos autores categorizaron a los pacientes con OS en dos grupos, dicha clasificación estuvo asociada con los tipos de poblaciones linfocíticas y la presentación clínica de los signos de la enfermedad.

Finalmente, es conveniente mencionar que este estudio debe replicarse, pero ahora considerando solo el uso de animales WT, puesto que el objetivo es explorar el potencial uso de la terapia celular a través de la transferencia de macrófagos M2.

8.- Conclusiones

- La transferencia adoptiva de macrófagos WT a ratones *Mif^{-/-}* promueve la pérdida del volumen lagrimal, del patrón de arborización de mucinas y el daño tisular en córnea.
- Los ratones con transferencia de macrófagos M2 presentaron menor pérdida del volumen lagrimal y alteración del patrón de arborización de mucinas en comparación con los organismos que recibieron macrófagos M1.
- La transferencia de macrófagos M1 exacerbo el daño tisular en la córnea.
- No hay diferencias estadísticamente significativas en la producción de citocinas en cultivos de células de bazo y ganglio cervical.

9.- Perspectivas

- Explorar el potencial uso de la terapia celular a través de la transferencia de macrófagos M2 en ratones WT con OS agudo y crónico.
- Evaluar el efecto de la terapia celular sobre la expresión de transcritos de moléculas inflamatorias, antiinflamatorias y metaloproteasas en córnea y conjuntiva.
- Evaluar el efecto de la terapia celular sobre la expresión de transcritos de mucinas en córnea y conjuntiva.
- Realizar un análisis minucioso a fin de caracterizar el fenotipo de las poblaciones linfocíticas y determinar el tipo de citocinas que secretan

Literatura citada

- Ablamowicz, A. F., & Nichols, J. J. (2016). Ocular Surface Membrane-Associated Mucins. *The ocular surface*, 14(3), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2016.03.003>
- Braun, R. J., King-Smith, P. E., Begley, C. G., Li, L., & Gewecke, N. R. (2015). Dynamics and function of the tear film in relation to the blink cycle. *Progress in retinal and eye research*, 45, 132–164. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.11.001>
- Bron, A. J., Tiffany, J. M., Gouveia, S. M., Yokoi, N., & Voon, L. W. (2004). Functional aspects of the tear film lipid layer. *Experimental eye research*, 78(3), 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.019>
- Brott, N. R., & Ronquillo, Y. (2022). Schirmer Test. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Cai, J., Nelson, K. C., Wu, M., Sternberg Jr, P., & Jones, D. P. (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in retinal and eye research*, 19(2), 205-221.
- Calandra, T., & Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews immunology*, 3(10), 791.
- Cicik, E., Tekin, H., Akar, S., Ekmekçi, Ö. B., Donma, O., Koldaş, L., & Özkan, Ş. (2003). Interleukin-8, nitric oxide and glutathione status in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic research*, 35(5), 251-255.
- Contreras-Ruiz, L. y Masli, S. (2015). Interferencia inmunomoduladora entre células caliciformes conjuntivales y células dendríticas. *PloS uno*, 10 (3), e0120284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120284>
- Corfield A. P. (2015). Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et biophysica acta*, 1850(1), 236–252. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.003>
- Chávez-Galán, L., del Carmen Arenas-Del Ángel, M., Sada-Ovalle, I., & Lascurain, R. (2009). Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por Mycobacterium tuberculosis. *Gaceta Médica de México*, 145(4), 323-330.
- Craig, J. P., Nichols, K. K., Akpek, E. K., Caffery, B., Dua, H. S., Joo, C. K., ... & Stapleton, F. (2017). TFOS DEWS II definition and classification report. *The ocular surface*, 15(3), 276-283.
- De Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A. & Keates, A. C. (2001). Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nature immunology*, 2(11), 1061.
- De Paiva, C. S., Chotikavanich, S., Pangelinan, S. B., Pitcher III, J. D., Fang, B., Zheng, X., & Stern, M. E. (2009). IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal immunology*, 2(3), 243.
- De Paiva, C. S., Villarreal, A. L., Corrales, R. M., Rahman, H. T., Chang, V. Y., Farley, W. J.,... & Pflugfelder, S. C. (2007). Dry eye–induced conjunctival epithelial

squamous metaplasia is modulated by interferon- γ . *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(6), 2553-2560.

- Demetter, P., De Vos, M., Van Huyse, JA, Baeten, D., Ferdinande, L., Peeters, H., ... y Cuvelier, CA (2005). La mucosa del colon de pacientes tanto con espondiloartritis como con enfermedad de Crohn está enriquecida con macrófagos que expresan el receptor secuestrante CD163. *Anales de las enfermedades reumáticas*, 64 (2), 321-324.
- Denkinger, C. M., Denkinger, M., Kort, J. J., Metz, C., & Forsthuber, T. G. (2003). In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of encephalitogenic T cells to the central nervous system. *The Journal of Immunology*, 170(3), 1274-1282.
- Dilly P. N. (1994). Structure and function of the tear film. *Advances in experimental medicine and biology*, 350, 239–247. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2417-5_41
- Domínguez, F., Kühl, U., Pieske, B., García-Pavía, P. y Tschöpe, C. (2016). Actualización sobre miocarditis y miocardiopatía inflamatoria: el resurgir de la biopsia endomiocárdica. *Revista Española de Cardiología*, 69 (2), 178-187.
- Enríquez-de-Salamanca, A., Castellanos, E., Stern, M. E., Fernández, I., Carreño, E., García-Vázquez, C., & Calonge, M. (2010). Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Molecular vision*, 16, 862.
- Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 154(2), 186–195. <https://doi.org/10.1111/imm.12910>
- Garza-León, M., Valencia-Garza, M., Martínez-Leal, B., Villarreal-Peña, P., Marcos-Abdala, H. G., Cortéz-Guajardo, A. L., & Jasso-Banda, A. (2016). Prevalence of ocular surface disease symptoms and risk factors in group of university students in Monterrey, Mexico. *Journal of ophthalmic inflammation and infection*, 6(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12348-016-0114-z>
- Gipson IK (2007). La superficie ocular: el desafío de habilitar y proteger la visión: la conferencia de Friedenwald. *Oftalmología investigadora y ciencias visuales*, 48 (10), 4390–4398. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0770>
- Jabs, D. A., Rosenbaum, J. T., Foster, C. S., Holland, G. N., Jaffe, G. J., Louie, J. S., ... & Whitcup, S. M. (2000). Guidelines for the use of immunosuppressive drugs in patients with ocular inflammatory disorders: recommendations of an expert panel. *American journal of ophthalmology*, 130(4), 492-513.
- Jackson, D. C., Zeng, W., Wong, C. Y., Mifsud, E. J., Williamson, N. A., Ang, C. S., & Downie, L. E. (2016). Tear interferon-gamma as a biomarker for evaporative dry eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(11), 4824-4830.

- Jones, L., Downie, L. E., Korb, D., Benitez-del-Castillo, J. M., Dana, R., Deng, S. X.,... & Seo, K. Y. (2017). TFOS DEWS II management and therapy report. *The ocular surface*, 15(3), 575-628.
- Kalt, W., Hanneken, A., Milbury, P., & Tremblay, F. (2010). Recent research on polyphenolics in vision and eye health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 4001-4007.
- Kaplan H. J. (2007). Anatomy and function of the eye. *Chemical immunology and allergy*, 92, 4–10. <https://doi.org/10.1159/000099236>
- Ko, J. A., Sotani, Y., Ibrahim, D. G., & Kiuchi, Y. (2017). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the effects of oxidative stress on human retinal pigment epithelial cells. *Cell biochemistry and function*, 35(7), 426-432.
- Koh, S., Tung, C. I., Inoue, Y., & Jhanji, V. (2018). Effects of tear film dynamics on quality of vision. *The British journal of ophthalmology*, 102(12), 1615–1620. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312333>
- Knop, E., Knop, N., & Schirra, F. (2009). Meibom-Drüsen. Teil II: Physiologie, Eigenschaften, Verteilung und Funktion des Meibom-Ols [Meibomian glands. Part II: physiology, characteristics, distribution and function of meibomian oil]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 106(10), 884–892. <https://doi.org/10.1007/s00347-009-2019-9>
- Lee, H. S., Amouzegar, A., & Dana, R. (2017). Kinetics of corneal antigen presenting cells in experimental dry eye disease. *BMJ open ophthalmology*, 1(1), e000078.
- López-Cacho, JM, Gallardo, S., Posada, M., Aguerri, M., Calzada, D., Mayayo, T., ... & Cárdbaba, B. (2014). Asociación de perfiles celulares inmunológicos con fenotipos clínicos específicos de la enfermedad de la esclerodermia. *Investigación BioMed Internacional*, 2014 .
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. y Bernhagen, J. (2002). Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF): mecanismos de acción y papel en la enfermedad. *Microbios e infección*, 4 (4), 449–460. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01560-5](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01560-5)
- Luis A. Rivera , Pablo E. Hernández , Danielle T. Vannan , José L. Reyes , Tonathiu Rodríguez , Ángel Sánchez-Barrera , Marisol I. González , José Bustos , Oscar A. Ramos , Imelda Juárez , Miriam Rodríguez-Sosa & Alicia Vázquez (2023) El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es un actor clave en la enfermedad del ojo seco, la inmunología y la inflamación ocular, DOI:10.1080/09273948.2023.2290624
- Luo, L., Li, D. Q., Doshi, A., Farley, W., Corrales, R. M., & Pflugfelder, S. C. (2004). Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(12), 4293-4301.

- Ma, WT, Gao, F., Gu, K. y Chen, DK (2019). El papel de los monocitos y macrófagos en las enfermedades autoinmunes: una revisión exhaustiva. *Fronteras en inmunología*, 10 , 1140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01140>
- Malhotra, A., Minja, F. J., Crum, A., & Burrowes, D. (2011). Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, 32(1), 2–13. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2010.10.009>
- Matsuda, A., Kotake, S., Tagawa, Y., Matsuda, H., & Nishihira, J. (1996). Detection and immunolocalization of macrophage migration inhibitory factor in rat iris and ciliary epithelium. *Immunology letters*, 53(1), 1-5.
- Matsuda, A., Tagawa, Y., Matsuda, H., & Nishihira, J. (1997). Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38(8), 1555-1562.
- Matsuda, A., Tagawa, Y., Yoshida, K., Matsuda, H., & Nishihira, J. (1997). Expression of macrophage migration inhibitory factor in rat retina and its immunohistochemical localization. *Journal of neuroimmunology*, 77(1), 85-90.
- McMonnies C. W. (2017). Conjunctival Tear Layer Temperature, Evaporation, Hyperosmolarity, Inflammation, Hyperemia, Tissue Damage, and Symptoms: A Review of an Amplifying Cascade. *Current eye research*, 42(12), 1574–1584.
- Mou, Y., Xiang, H., Lin, L., Yuan, K., Wang, X., Wu, Y., Min, J., & Jin, X. (2021). Reliability and efficacy of maximum fluorescein tear break-up time in diagnosing dry eye disease. *Scientific reports*, 11(1), 11517. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91110-9>
- 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>
- Navegantes, K. C., de Souza Gomes, R., Pereira, P. A. T., Czaikoski, P. G., Azevedo, C. H. M., & Monteiro, M. C. (2017). Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *Journal of translational medicine*, 15(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1141-8>
- Nowak, M., Świętochowska, E., Wielkoszyński, T., Marek, B., Karpe, J., Gorski, J., ... & Ostrowska, Z. (2003). Changes in blood antioxidants and several lipid peroxidation products in women with age-related macular degeneration. *European journal of ophthalmology*, 13(3), 281-286.
- Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M., & Nishihira, J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 444-450.
- Park, C. Y., Zhuang, W., Lekhanont, K., Zhang, C., Cano, M., Lee, W. S., ... & Chuck, R. S. (2007). Lacrimal gland inflammatory cytokine gene expression in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model. *Mol Vis*, 13(252-255), 2222-2232.

- Paulsen, A. J., Cruickshanks, K. J., Fischer, M. E., Huang, G. H., Klein, B. E., Klein, R., & Dalton, D. S. (2014). Dry eye in the beaver dam offspring study: prevalence, risk factors, and health-related quality of life. *American journal of ophthalmology*, 157(4), 799-806.
- Pflugfelder, S. C., Jones, D., Ji, Z., Afonso, A., & Monroy, D. (1999). Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Current eye research*, 19(3), 201-211.
- Pflugfelder, SC, De Paiva, CS, Moore, QL, Volpe, EA, Li, DQ, Gumus, K., ... & Corrales, RM (2015). La deficiencia de lágrimas acuosas aumenta la expresión de interferón- γ (IFN- γ) conjuntival y la pérdida de células caliciformes. *Oftalmología investigativa y ciencia visual*, 56 (12), 7545-7550.
- Rodríguez Benavente, M. C., & Argüeso, P. (2018). Glycosylation pathways at the ocular surface. *Biochemical Society transactions*, 46(2), 343–350. <https://doi.org/10.1042/BST20170408>
- Rolando, M. (1984). Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. *Chibret Int J Ophthalmol*, 2(4), 32-41.
- Santacruz, C., Garfias, Y., (2016). Inmunología Ocular. En Ma. Del Carmen. Jiménez Martínez (Ed.), *Inmunología molecular, celular y traslacional* (pp. 572-587). Wolters Kluwer.
- Stapleton, F., Alves, M., Bunya, V. Y., Jalbert, I., Lekhanont, K., Malet, F., ... & Viso, E. (2017). Tfos deus ii epidemiology report. *The ocular surface*, 15(3), 334-365.
- Stern, M. E., Gao, J., Schwalb, T. A., Ngo, M., Tieu, D. D., Chan, C. C., ... & Smith, J. A. (2002). Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(8), 2609-2614.
- Sullivan, D. A., Rocha, E. M., Aragona, P., Clayton, J. A., Ding, J., Golebiowski, B., ... & Versura, P. (2017). TFOS DEWS II sex, gender, and hormones report. *The ocular surface*, 15(3), 284-333.
- Taylor, A.W. and T.F. Ng, *Negative regulators that mediate ocular immune privilege*. *J Leukoc Biol*, 2018.
- Weisser, S. B., van Rooijen, N., & Sly, L. M. (2012). Depletion and reconstitution of macrophages in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (66), 4105. <https://doi.org/10.3791/4105>
- Wildenberg, ME, Welzen-Coppens, JM, van Helden-Meeuwsen, CG, Bootsma, H., Vissink, A., van Rooijen, N., ... y Versnel, MA (2009). Aumento de la frecuencia de monocitos CD16+ y presencia de células dendríticas activadas en las glándulas salivales en el síndrome de Sjögren primario. *Anales de las enfermedades reumáticas*, 68 (3), 420-426.
- Wilson, S. E., & Perry, H. D. (2007). Long-term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. *Ophthalmology*, 114(1), 76-79.

- Willcox, M., Argüeso, P., Georgiev, G. A., Holopainen, J. M., Laurie, G. W., Millar, T. J., Papas, E. B., Rolland, J. P., Schmidt, T. A., Stahl, U., Suarez, T., Subbaraman, L. N., Uçakhan, O. Ö., & Jones, L. (2017). TFOS DEWS II Tear Film Report. *The ocular surface*, 15(3), 366–403. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.03.006>
- Wolffsohn, J. S., Arita, R., Chalmers, R., Djalilian, A., Dogru, M., Dumbleton, K., Gupta, P. K., Karpecki, P., Lazreg, S., Pult, H., Sullivan, B. D., Tomlinson, A., Tong, L., Villani, E., Yoon, K. C., Jones, L., & Craig, J. P. (2017). TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *The ocular surface*, 15(3), 539–574. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.001>
- Yang, H., et al., 2016. *Modulating of ocular inflammation with macrophage migration inhibitory factor is associated with notch signalling in experimental autoimmune uveitis*. Clin Exp Immunol. 183(2): p. 280-93.
- Yazdani, M., Elgstøen, K., Rootwelt, H., Shahdadfar, A., Utheim, Ø. A. y Utheim, TP (2019). Metabólica de las lágrimas en la enfermedad del ojo seco: una revisión. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 20 (15), 3755. <https://doi.org/10.3390/ijms20153755>
- Yoon, K. C., De Paiva, C. S., Qi, H., Chen, Z., Farley, W. J., Li, D. Q., & Pflugfelder, S. C. (2007). Expression of Th-1 chemokines and chemokine receptors on the ocular surface of C57BL/6 mice: effects of desiccating stress. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(6), 2561-2569.
- Zhang, X., Chen, W., De Paiva, C. S., Corrales, R. M., Volpe, E. A., McClellan, A. J., & Pflugfelder, S. C. (2011). Interferon- γ exacerbates dry eye-induced apoptosis in conjunctiva through dual apoptotic pathways. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(9), 6279-6285.
- Zhang, X., M, V. J., Qu, Y., He, X., Ou, S., Bu, J., Jia, C., Wang, J., Wu, H., Liu, Z., & Li, W. (2017). Dry Eye Management: Targeting the Ocular Surface Microenvironment. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1398. <https://doi.org/10.3390/ijms18071398>
- Zhou, D., Chen, Y. T., Chen, F., Gallup, M., Vijmasi, T., Bahrami, A. F. & McNamara, N. A. (2012). Critical Involvement of Macrophage Infiltration in the Development of Sjögren's Syndrome-Associated Dry Eye. *The American journal of pathology*, 181(3), 753-760.
- Zhu, L., et al., 2009 *Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulium toxin B induced murine dry eye model*. Mol Vis, 2009. 15: p. 250-8.

Apéndices

Apéndice 1 Buffer de lisis

Nucleic Acids Research Vol.19 Num 15, 4393)

200 mM NaCl (J.T Baker)

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

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

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

Aforar a 1 Lt con agua destilada

Apéndice 2 Parámetros de Temperatura de alineación en termociclador

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95 °C	4 min	1x
2	95 °C	30 seg	30x
	58 °C	40 seg	
	72 °C	30 seg	
3	72 °C	5 min	1x
	4 °C	∞	

Apéndice 3 TBE 1X

10.8 g Tris base

5.5 g Ácido Bórico

4 mL EDTA 0.5M

Aforar a 1 L de agua destilada

Apéndice 4 Medio de cultivo suplementado RPMI-FBS 20%

500 mL de Medio RPMI

6 mL antibiótico (Pen-Strep)

6 mL Glutamina

100 mL Suero Fetal Bovino (FBS)

Apéndice 5 Solución de lavado PBS-TWEEN AL 0.05%

1 L de PBS 1X

0.5 mL de Tween

Apéndice 6 Solución de Bloqueo (PBS-BSA)

100 mL de PBS 1X

1 g de Albumina

Apéndice 7 Solución hemolizante ACK

8.02 g de Cloruro de Amonio NH_4Cl .15 M

1 g de Bicarbonato de Potasio (ACS) (KHCO_3) 10 M

200 μL de 0.5 mM EDTA/ Na_2 (0.1mM)

Aforar a 1 L de agua destilada

Filtrar

Apéndice 8 Buffer 1

500 mL de PBS 1X

50 mL de FBS

0.526 g de EDTA

Apéndice 9 Fijador de Zinc

2.12 g Tris Base

0.1 g Acetato de Calcio

Diluir en 160 mL de agua destilada

Ajustar pH (7.2-7.4)

Aforar a 200 MI de agua destilada

1 g Acetato de Zinc

1 g de Cloruro de Zinc

Apéndice 10 Buffer de FAC'S

500 mL de PBS

0.25 g de Azida de sodio

5 mL de FBS

Filtrar



Prophylactic effect of adoptive transfer of bone marrow-derived M2 macrophages in a murine model of dry eye disease.

Aguiar-Garduño, A.¹, Cruz-Hernández, D.B.¹, Reyes-Hernández, J.L.², Rodríguez-Hernández, T.¹, González-Gonzalez, M.I.², Ramos-Montes, O.A.¹, Vázquez-Mendoza, A.¹

¹Laboratorio de Enfermedades Oculares Inflamatorias, UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, Tlalnepanitla de Baz, Estado de México, México. ²Laboratorio de Inmunología Experimental y Regulación de la Inflamación Hepatointestinal UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepanitla de Baz, Estado de México, México.

*Autor correspondencia: arturo.aguiar99@comunidad.unam.mx; sficiavm@ired.unam.mx

Dry eye disease (DED) is an inflammatory disease affecting the ocular surface, where loss tear film stability and hyperosmolarity are the main hallmarks. High levels of inflammatory cytokines such as IL-1beta, IL17, TNF-alfa and macrophage migration inhibitory factor (MIF) are found in tear and serum samples. Also, infiltrating innate and adaptive cells (i.e. macrophages and T cells) promote chronicity in DED. The inflammatory response is central in triggering and maintaining injury in the eye tissues. Indeed, several DED therapies target diverse components of the immune response like leukocyte adhesion and proliferation. Furthermore, cell therapy has been proved to be highly effective in pre-clinical trials. Amongst others, macrophage manipulation and transfer has been explored in inflammatory diseases. In particular, M2 macrophages (macrophages

exposed to Th2 cytokines, IL-4) transfer showed promising results in MS, diabetes and colitis models. However, whether this therapy can also display beneficial effects on eye diseases such as DED has not been reported yet. To test whether intraperitoneal M2 transfer ameliorates experimental DED. Six-to-nine week-old male BALB/c mice were induced DED and compared to M2 macrophage-given (4x10⁶ cells) similarly induced individuals. Mice receiving M2 macrophages showed lessened DED signs, as gauged by Schirmer's and ferning tests as compared to mice without cell transfer. M2 transfer also resulted in lower TNF-alfa levels. M2 prophylactic transfer attenuates signs in experimental DED.

This Project Is currently funded by DGAPA-PAPIIT-UNAM IN226220





Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a Key Player in Dry Eye Disease

Luis A. Rivera, Pablo E. Hernández, Danielle T. Vannan, José L. Reyes, Tonathiu Rodríguez, Ángel Sánchez-Barrera, Marisol I. González, José Bustos, Oscar A. Ramos, Imelda Juárez, Miriam Rodríguez-Sosa & Alicia Vázquez

To cite this article: Luis A. Rivera, Pablo E. Hernández, Danielle T. Vannan, José L. Reyes, Tonathiu Rodríguez, Ángel Sánchez-Barrera, Marisol I. González, José Bustos, Oscar A. Ramos, Imelda Juárez, Miriam Rodríguez-Sosa & Alicia Vázquez (21 Dec 2023): Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a Key Player in Dry Eye Disease, Ocular Immunology and Inflammation, DOI: [10.1080/09273948.2023.2290624](https://doi.org/10.1080/09273948.2023.2290624)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09273948.2023.2290624>



© 2023 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



Published online: 21 Dec 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 521



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a Key Player in Dry Eye Disease

Luis A. Rivera, BSc^a, Pablo E. Hernández, BSc^a, Danielle T. Vannan, PhD^b, José L. Reyes, PhD^c, Tonathiu Rodríguez, PhD^a, Ángel Sánchez-Barrera, MSc^d, Marisol I. González, BSc^c, José Bustos, PhD^e, Oscar A. Ramos, BSc^a, Imelda Juárez, MSc^f, Miriam Rodríguez-Sosa, PhD^f, and Alicia Vázquez, PhD^a

^aLaboratorio de Enfermedades Inflamatorias Oculares, Carrera de Optometría, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla de Baz, México; ^bBoston Scientific, 300 Boston Scientific Way, Marlborough, Massachusetts, USA; ^cLaboratorio de Inmunología Experimental y Regulación de la Inflamación Hepato-Intestinal, UBIMED, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla de Baz, México; ^dLaboratorio de Inmunoparasitología, UBIMED, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla de Baz, México; ^eLaboratorio de Biología Molecular e Inmunología de Arbovirus, UBIMED, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla de Baz, Estado de México; ^fLaboratorio de Inmunidad Innata, UBIMED, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla de Baz, México

ABSTRACT

Purpose: To explore the role of the proinflammatory cytokine, macrophage migration inhibitory factor (MIF), in a murine model of dry eye disease (DED).

Methods: The role of MIF on DED was determined using genetically MIF deficient mice and pharmacological inhibition of MIF. DED was induced with 0.5 mg of scopolamine via subcutaneous injection in wild type (WT) and mice lacking MIF (*Mif*^{-/-}), three times a day for 21 days. DED signs, tear volume, ferning pattern and cytology impression were evaluated. Also, eye tissues were collected to determine transcripts of key inflammatory mediators and histopathological damage. In a second set of experiments, we neutralized MIF with ISO-1, an isoxaline-derivative MIF tautomerase activity-inhibiting small molecule in WT mice, following an acute DED model for 10 days. ISO-1 was given starting on day 3 after DED induction and signs were evaluated, including a recovery phase in both experimental approaches.

Results: When compared to WT, *Mif*^{-/-} mice showed attenuated signs of DED like preserved mucin pattern and increased tear volume. Also, *Mif*^{-/-} mice maintained conjunctival epithelial cells and less corneal damage, associated with lower levels of TNF α and IL-1 β . At recovery phase, *Mif*^{-/-} mice presented improved signs. Interestingly, in cornea and conjunctiva the absence of MIF selectively downregulated the transcription of inflammatory enzymes like inos and nox4 whereas displayed enhanced transcripts of il-4, il-13, tgfb β and cox2. Finally, pharmacological inhibition of MIF using ISO-1, replicated the above findings in the mouse model.

Conclusion: MIF is a central positive mediator of the inflammatory process in experimental DED, thus, targeting MIF could be used as a novel therapy in ocular surface inflammatory pathologies.

ARTICLE HISTORY

Received 3 August 2023
Revised 9 November 2023
Accepted 28 November 2023

KEYWORDS

Dry eye disease;
inflammation; ISO-1; MIF;
ocular surface

Dry eye disease (DED) is a multifactorial group of diseases affecting the ocular surface. Tear film instability and hyperosmolarity results in the loss of homeostasis and triggers ocular inflammation and tissue damage, which in turn cause DED symptoms such as photophobia, discomfort, pain and neurosensory abnormalities. DED prevalence ranges from 5% to 50% depending on ethnicity and diagnostic tests, including both patient-reported questionnaires and objective assessments such as Schirmer's test, ferning and tear break-up time (BUT).^{1,2} Although epidemiological studies report that women over age of 40 are at highest risk, mainly associated to decreased hormone production,³ recent findings suggest that a variety of environmental factors such as diet, smoking, excessive medication, and exposure to blue light in electronic devices could be altering the overall incidence pattern.^{4,5} Furthermore, it has been recognized that chronic systemic diseases, such as Crohn's disease,⁶ diabetes,⁷ arthritis,⁸ and psoriasis⁹ affect the ocular microenvironment resulting in eye pathologies, where DED is the most common, increasing the case reports of DED as a co-morbidity.

Regardless of the origin, DED manifestations are dependent on an inflammatory response, characterized by early loss of immune privilege which in turn promotes activation of resident immune cell populations through release of inflammatory mediators (cytokines and chemokines) and infiltration of other cell types in order to amplify the ongoing immune response.¹⁰ Cytokines are key messengers in the immune response and participate in the onset, polarization, and maintenance of the pathological processes. Innate inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) α and macrophage migration inhibitory factor (MIF) are required for host resistance against pathogens like *Leishmania* and *Toxoplasma*.^{11,12} However, MIF production has been associated with exacerbating clinical signs of chronic inflammatory (kidney injury and otitis) and autoimmune diseases (experimental autoimmune encephalomyelitis) and where MIF blockage resulted in lower levels of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IFN γ and TNF α .¹³⁻¹⁵ In regards of the role of MIF on eye immune response, pioneer

studies by Matsuda *et al.* showed that MIF is expressed in ocular surface tissues such as human cornea and in posterior segment tissues as shown by rat iris, retina, and ciliary epithelium. Nonetheless, these authors did not determine any specific role for MIF, although they suggested that steady expression of MIF might be a component of either immune surveillance or immune privilege mechanisms, however a pathogenic role for MIF was not ruled out.^{16–18} More recently, it has been demonstrated that MIF indeed aggravates pathologies in the posterior eye segment like vitreoretinopathy and uveitis.^{19,20} Therefore, mounting evidence suggests that MIF is a key cytokine contributing to eye disease, but more studies are required to better understand its role in the development and chronicity of such diseases.

Here, we report that both mice lacking MIF and the use of a pharmacological MIF inhibitor (4,5-dihydro-5-isozalone acetic acid methyl ester (ISO-1)) resulted in decreased local and systemic production of inflammatory cytokines and attenuated ocular surface injury compared to wild-type (WT) mice.

Methods

Mice and DED model

Seven to nine-week-old male WT mice were used as the control group and compared to age- and sex-matched MIF-deficient mice (*Mif*^{-/-}), both in a BALB/c genetic background. *Mif*^{-/-} mice were originally created by inserting a neomycin-resistance cassette (neo) and disrupting exons 2 and 3 of the *mif* gene in mouse embryonic stem cells. Thus, disrupting part of exon 2, the second intron and exon 3 successfully ablated MIF expression and its function.²¹ All animals were maintained in a pathogen-free environment and established as breeding colonies in the animal facilities at FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Animal procedures met the NOM-062-ZOO-1999 guidelines for the use of experimental animals.

We used a previously created DED model by Plugfelder *et al.*, which consists of pharmacologically inhibiting lacrimal gland function through scopolamine delivery (Sigma Aldrich USA),²² however a modified protocol was implemented for our studies. This modified protocol included a follow-up for 21 days and a recovery phase where our goal was to determine whether MIF might also be influencing re-establishment of tear film homeostasis upon withdrawing scopolamine. We maintained our experimental animals under controlled environment chamber (CEC) and DED was induced administering 0.5 mg of scopolamine hydrobromide (Sigma Aldrich, USA) in 60 μ l of saline via subcutaneous (s.c.) injection three times a day (9 hr 12 hr 15 hr) for 21 days. To evaluate the recovery phase, mice were humanely sacrificed on day 28 (7 days after the last scopolamine dose). CEC conditions were controlled to provide a relative humidity of <25%, airflow of 10 L/min, and temperature of 20°C to 22°C for 24 hours a day. Assessment of DED was conducted by using cytology impression, ferning and Schirmer's test at indicated time points.

MIF inhibitor administration

We used a modified DED acute protocol which consisted of 10 continuous days of scopolamine administration followed by 5 days of recovery. The MIF inhibitor (ISO-1) was purchased from EMD Millipore Corp. USA and was delivered by using dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% as vehicle (1 mg/ml). A final volume of 5 μ l was given in each eye twice a day (9 hr 12 hr) daily, starting three days after the first scopolamine dose and continued until day 10. The experimental design consisted of three groups of WT mice as follows: group 1; WT mice induced DED, group 2; WT mice induced DED plus DMSO and group 3; WT mice induced DED plus ISO-1. All experimental groups were anesthetized and humanely sacrificed on day 15.

Tear film stability assessment

Both ferning and Schirmer's are key tests to diagnose and monitor DED.²³ The former test evaluates the mucin pattern found on tear samples and the second quantifies tear volume. We performed both tests at indicated time points (before DED induction and 7, 14, 21 and 28 post- scopolamine administration) as follows: animals were anesthetized by s.c. administration of xilacine (40 mg/kg) (Pisa, México). Under deep anesthesia, tear samples were collected with micropipette (2 μ l) and observed under light microscope to determine mucin patterns based on Rolando's score²⁴ where Type I; compact and abundant arborization in the entire field without spaces between the ferns. Type II; arborization is abundant, ferns are smaller and lower frequency of branching, Type III; Single ferns are little and incompletely formed with rare or no branching, Type IV; ferning pattern is absent. Additionally, Schirmer's strips were placed on temporal conjunctiva for 5 minutes and the volume was recorded. In order to assess epithelial cell numbers, Schirmer's strips were fixed on absolute alcohol and stained with periodic acid Schiff (PAS) and cell counts per mm² are shown.

Histopathology

Corneal samples were obtained from experimental groups and fixed in Zync buffer for 48 hr. Thereafter, tissue samples were dehydrated, and paraffin-embedded tissues were cut (5 μ m thick) and H&E stained. Mounted slides were observed under a light microscope and tissue architecture was quantified (thickness, oedema, and infiltrating cells).

Quantification of cytokines

Cytokines were quantified in serum samples, eye tissues and secondary lymphoid organs (cervical lymph node (CLN) and spleen) culture supernatants. Blood samples were collected by tail snips and centrifuged (3500 rpm/10 min.). Serum samples were stored at -80°C until use. At the time of sacrifice, conjunctiva and corneas were placed in flat bottom 96 well plates (Corning) in 200 μ l of supplemented RPMI (Biowest) medium and tissues were incubated without any further stimulation for 24 hr at 37°C 5% CO₂. Once incubation was complete,

supernatants were collected and frozen at -80°C . Spleen and CLN were aseptically removed from animals and cell suspensions obtained by lysing RBCs (ammonium chloride buffer). Cell suspensions adjusted at 1×10^6 and 5×10^6 cells/well (CLN and spleen, respectively) were seeded on 24-well plates and incubated in presence of concanavalin A ($5 \mu\text{g}$) for 48 hr (37°C , 5% CO_2). Supernatants were collected and assayed for cytokines. ELISA assays were conducted following manufacturer's instructions (Peprotech, México), levels of IL-1 β , IL-4, IL-13, and TNF α are reported.

mRNA transcripts in ocular tissues

At sacrifice (28 days), both eyes were aseptically enucleated from the mice. Cornea and conjunctiva tissues were homogenized in presence of Trizol[®] reagent with sonicator (Science med). Nucleic acids were extracted by the formol-isopropanol method and 1 μg of mRNA was used as template for cDNA synthesis by means of the Reverse aid first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, USA). Next, sample purity and concentration were determined by using a nanospectrophotometer (Implen, USA) and 100ng cDNA templates were used for PCR in a thermal cycler (Miniamp plus, Thermo Scientific, USA). A program consisting of 35 cycles using the primer sequence and melting temperatures indicated in Table 1 were used Transcript products were visualized on agarose gel, and densitometry analysis is shown in Figure 4.

Flow cytometry

Total spleen cells were adjusted at $1 \times 10^6/\text{ml}$ and unspecific antibody binding was prevented by incubating cells in anti-CD-16/32-containing flow cytometry buffer (PBS with 5% FBS, 0.05% sodium azide) for 10 minutes at room temperature. In order to characterize T cell populations, the following fluorochrome-conjugated antibodies were added APC-Cy7-CD3, APC-CD4, PE-Cy7-CD8, and 7AAD as cell viability dye. Cells were incubated 4°C for 35 min. and after washing unbound antibodies, samples were acquired in ATUNNE[®] flow cytometer and data analyzed with Flow Jo[®] software.

Statistical analysis

A student's *t* test was used to compare WT and Mif^{-/-} groups. In a second set of experiments data were analyzed by one-way ANOVA followed by unpaired student's *t*-test to compare the effect of either DMSO vehicle or ISO1 inhibitor on DED, where $p < 0.05$ was accepted as significantly different. Analysis was conducted by using the GraphPad Prism V6 software (San Diego, CA, USA).

Results

MIF contributes to ocular surface injury

MIF is a cytokine released during the acute proinflammatory phase and is involved in diverse pathologies. Here, we observed that its presence exacerbated the damage on the ocular surface induced in the murine model of DED gauged by loss of tear film stability. Using the scopolamine DED protocol shown in Figure 1a, we found that WT mice exhibited a progressive loss of tear volume compared to initial measurements (2 mm/5 min), reaching a maximum loss on day 21 post-scopolamine delivery (1.16 mm/5 min), representing a 42% decrease. In contrast, Mif^{-/-} mice with comparable basal tear volume (2 mm/5 min) and similarly induced with DED, showed an attenuated loss in tear volume (1.68 mm/5 min) representing only a 16% decrease (Figure 1b). Interestingly, seven days after the scopolamine administration was stopped (day 28), both experimental groups showed a clear recovery in terms of tear volume, however, whereas Mif^{-/-} mice returned to basal levels (2 mm/5 min), WT mice only recovered by 25% (1.66 mm/5 min) (Figure 1b). In line with this, upon scopolamine delivery, WT mice also showed a significant decrease in epithelial cells as gauged by the cytology analysis. At baseline, both WT and Mif^{-/-} mice presented 538 ± 27 and 530 ± 23 cells/mm², respectively, however, upon DED induction, WT mice had a pronounced loss of epithelial cells on day 21 (154 ± 32) whereas Mif^{-/-} mice had significantly preserved numbers of epithelial cells/mm² (201 ± 45). At the recovery phase (day 28), WT mice presented a significant increase in such cell population (262 ± 47), however, Mif^{-/-} mice had a greater number of cells (428 ± 57)

Table 1. Primers used in this study.

Primers	Sequence	Annealing Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	PCR Products (bp)
<i>tnf-a</i>	F:5'-AGAACCAGTTCCAACGCTACC-3' R:5'-TCTGAGTCTCCTTACAGGGGAT-3'	60	102
<i>il-1β</i>	F:5'-AAGCCTCGTGTGCTCGGACC-3' R:5'-TGAGGCCCAAGCCACAGGT-3'	66	140
<i>il-4</i>	F:5'-ATGTGTCATCCTGCTTCTTT-3' R:5'-GACTGGGACTCATTATGGTGC-3'	60	342
<i>il-13</i>	F:5'-GCAACGGCAGCATGGTATGGAG-3' R:5'-TGGTATAGGGGAGGCTGGAGAC-3'	63	171
<i>inos</i>	F:5'-CTGGAGGAGCTCCTGCCTCATG-3' R:5'-GCAGCATCCCTCTGATGGTG-3'	63	440
<i>tgf-β</i>	F:5'-TGCTTCAGCTCCACAGAGAA-3' R:5'-TACTGTGTGCCAGGCTCCA-3'	60	155
<i>nox4</i>	F:5'-ACTCCTTGGGTCAGCACTGG-3' R:5'-GTTCTGTCCAGTTGCTTCG-3'	60	166
<i>cox-2</i>	F:5'-ACACACTTATCACTGGCACC-3' R:5'-TTCAGGGAGAAGCGTTTG-3'	57	274
<i>β-actin</i>	F:5'-GCTGTGCTATGTTGCTCTAG-3' R:5'-CGCTCGTTGCCAATAGTG-3'	56	117

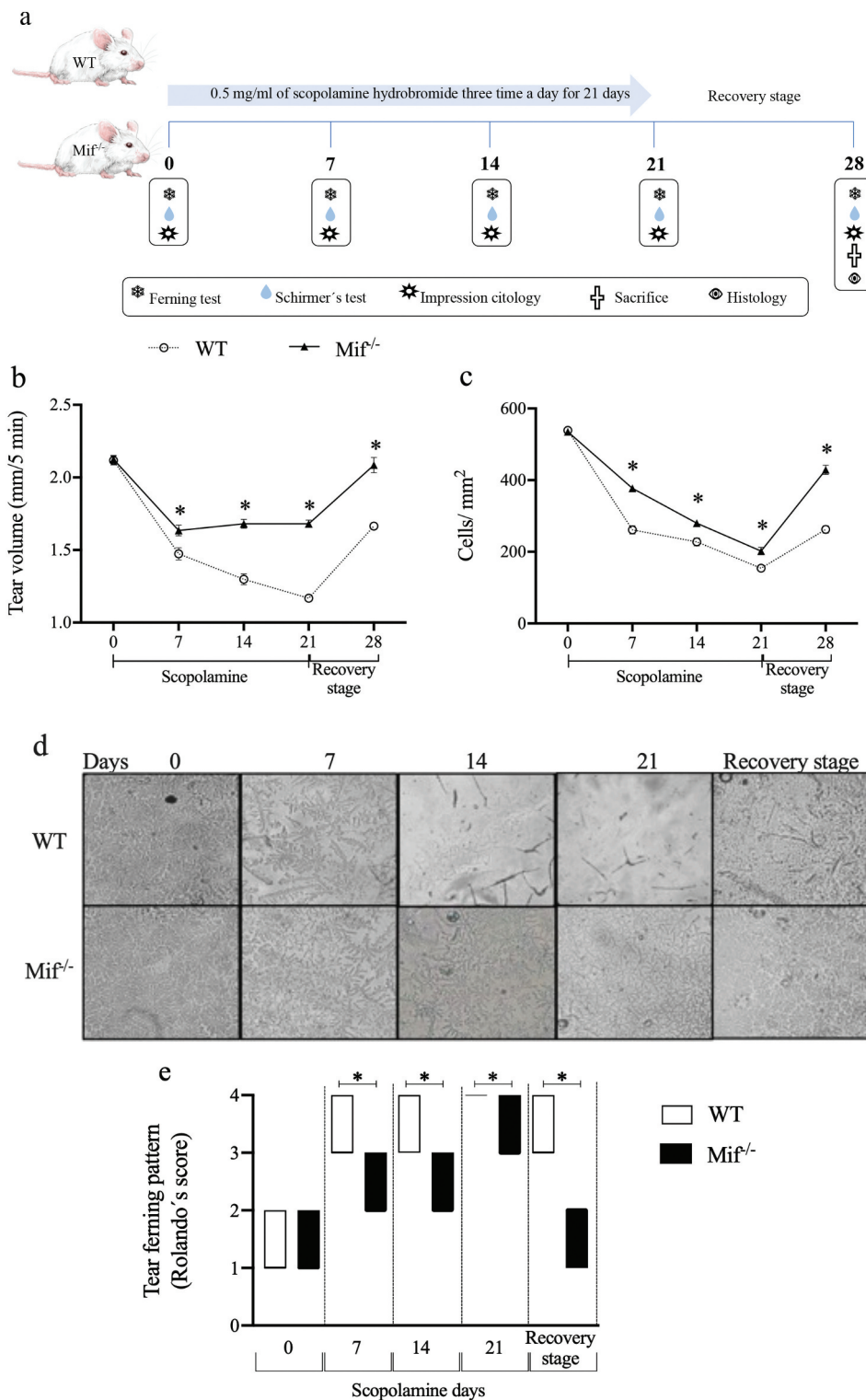


Figure 1. Lack of MIF prevents loss of tear film stability. Panel (a) shows DED induction protocol for both WT and *Mif*^{-/-} mice, scopolamine was administered for 21 continuous days (3 times daily) and withdrawn for additional 7 days comprising the recovery stage. Kinetics of tear volume decrease was assessed by Schirmer's test conducted on experimental groups and values of tear volume per five minutes are shown in (b). Damage in conjunctival epithelium is another hallmark in DED, loss of conjunctival epithelial cells was quantified by means of impression cytology performed at indicated times in panel (c). Mucin ferning pattern was observed in tear samples from experimental animals, representative images are shown in (d) and graded according to Rolando's score as seen in (e) where representative images are also depicted. Data shown are from 3 independent experiments ($n = 5$ per group), where * represents $p < 0.05$ when groups were compared.

(Figure 1c). The ferning test, considered an accurate marker of tear stability, describes various ferning patterns depending on abundance and type of mucin present and ranges from highly dense to absent as described in methods (Rolando's score),

representative images are shown in Figure 1d. Noteworthy, when the ferning pattern was determined, *Mif*^{-/-} mice did not show alterations under basal conditions, but after DED induction, these mice exhibited a reduced Rolando's score as

compared to WT mice (Figure 1e), where it was observed that $Mif^{-/-}$ mice did not register a maximum 4 point score throughout the experiment, as opposite to most of WT mice (75%) that showed a complete loss of ferning pattern assigned as score 4 from day 7 to day 21 (Figure 1e). When scopolamine delivery was withdrawn (day 21 to day 28), only $Mif^{-/-}$ mice registered a recovery in terms of ferning pattern (score 2), which is accepted as physiological, see representative images in Figure 1d.

Likewise, mucins are an important component in the tear film providing a glycocalyx which is responsible for pathogen containment by preventing translocation of infectious agents. Optimal mucin secretion results in an observable ferning pattern that can be quantified by the Rolando's score.²⁴ The absence of MIF did not alter the baseline ferning pattern since both WT and $Mif^{-/-}$ mice

had comparable ferning score prior to DED induction (Figure 1e). Once scopolamine was given, WT mice exhibited a less compacted and separated ferning patterns on day 7, 14 and 21 according to Rolando's score showing type III and IV mostly (Figure 1e). In sharp contrast, $Mif^{-/-}$ mice displayed delayed ferning pattern alterations as seen on day 14. However, by day 21 both groups had a complete loss of the ferning pattern (Rolando's score IV) (Figure 1e). Noteworthy, on day 28, tear samples from WT mice showed no ferning patterns rather dense clusters of mucins were found, whereas $Mif^{-/-}$ mice recovered a type I ferning pattern (Figure 1e).

Furthermore, to evaluate corneal damage, tissue samples were obtained and stained at the end of the experiment. Histopathological analysis revealed altered stromal tissue architecture along with disorganized collagen fibers and

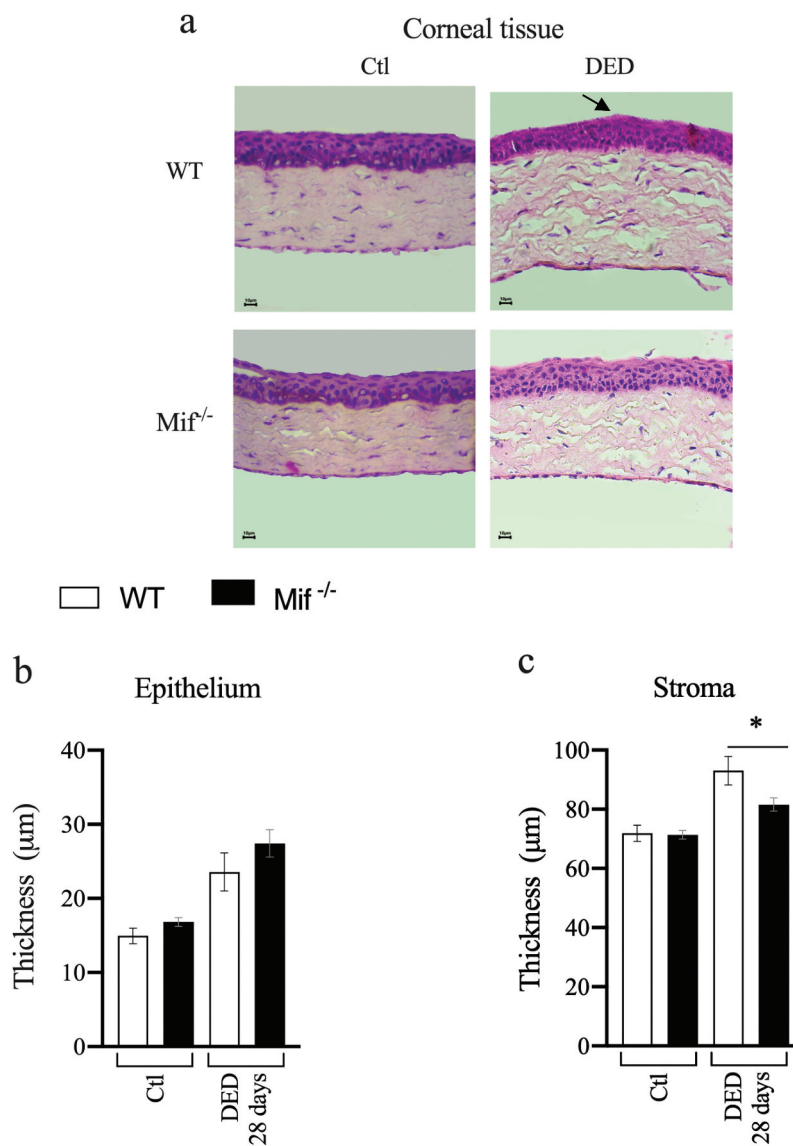


Figure 2. MIF aggravates corneal histopathological damage. Healthy control mice (Ctl) as well as experimental mice induced with dry eye disease (DED) were sacrificed at 28 days and corneal tissues embedded in paraffin were cut (5 μm) and H&E stained. Panel (a) shows representative images where a clear increase in stromal thickness is found in WT mice whereas a lower damage is observed in samples from $Mif^{-/-}$ individuals. Arrow points a substantial disarrangement in epithelial layers in central cornea. In (b) and (c) is shown epithelium and stromal thickness, respectively. Histopathological analysis is representative from 3 identical experiments ($n = 5$ per group), where * represents $p < 0.05$ yielded from student's t test.

keratocyte loss in WT mice (Figure 2a). On the other hand, *Mif*^{-/-} mice presented mild oedema with reduced thickness and stromal keratocyte loss (Figure 2b,c).

MIF deficiency resulted in lower inflammatory and Th2-skewed response

MIF is suggested to play a pathological role in a diverse number of diseases by promoting release of early inflammatory mediators such as TNF α and IL-1 β and conversely, Th2-related cytokines like IL-4 and IL-13 are known to antagonize these pro inflammatory cytokines.^{25,26} Here, we analyzed serum levels and spontaneous release in ocular tissues of these cytokines upon DED induction with or without MIF. In WT mice, DED induction caused a substantial increase in blood concentration of both inflammatory cytokines (TNF α and IL-1 β), which peaked at 14 days and was sustained until day 21 (Figure 3a,b). In WT mice, TNF α and IL-1 β concentrations were 1046 \pm 51 pg/ml and 72 \pm 2.2 pg/ml, respectively. In sharp contrast, *Mif*^{-/-} mice similarly induced with DED displayed a significantly attenuated production of both cytokines 673 \pm 170 and 27 \pm 14 pg/ml ($p < 0.05$). Interestingly, DED induction triggered high circulating levels of Th2-type cytokines (IL-4 and IL-13) only in *Mif*^{-/-} mice, whereas serum samples obtained from WT evidenced a delayed production of Th2 cytokines by two-fold on day 14 (Figure 3c,d). Intriguingly, when supernatants from both cornea (CN) and conjunctiva (CJ) were tested for these same cytokine levels, we did not observe significant changes in terms of TNF α and IL-1 β (Figure 3e,f), in line with the cytokine profiles found in sera and ocular tissues (CN and CJ) from *Mif*^{-/-} mice a significant heightened release of spontaneous IL-4, however, IL-13 was observed increased only in CJ cultures (Figure 3g,h). Thus, cytokine profiling strongly suggested that in absence of MIF, DED pathology is attenuated most likely resulting of lower levels of inflammatory molecules and increasing levels of Th2-type cytokines such as IL-4 and IL-13.

Lack of MIF promotes a mixed ocular transcriptional landscape

In response to tear film osmolarity changes, ocular surface inflammation arises and promotes increased gene expression of oxidative enzymes and cytokines involved in tissue injury. Here, we aimed to analyze transcriptional changes in regards of inflammatory cytokines and enzymes as well as Th2-related genes. Surprisingly, when a semiquantitative mRNA analysis was carried out in CN and CJ in *Mif*^{-/-} mice, transcription of *tnfa*, *il-1 β* , *il-4*, *il-13* and *tgfb* were all significantly elevated as compared to WT counterparts (Figure 4). Enzymes such as *cox2*, *inos* and *nox4* play important roles in cellular oxygen and nitrogen metabolism which is also a component of the inflammatory response.²⁷ We observed that *Mif*^{-/-} mice, which are resistant to DED induction, highly and selectively expressed *cox2* enzyme but in contrast showed lower expression of *inos* and null expression of *nox4* (Figure 4).

Attenuated DED signs in *Mif*^{-/-} mice are associated with increased splenic CD4⁺ T cells

Pioneer studies by Medawar, Billingham, and Streilein revealed that antigens delivered through the anterior chamber in the eye caused a tolerogenic response which requires intact spleen, this phenomenon is known as the chamero-splenic axis.²⁸ Currently, it is well known that the spleen is central as a niche of immune modulation both for maintaining eye homeostasis as well as for induction of pathogenic responses and this is achieved by immune cells through re-circulating between spleen and eye.^{29,30} We sought to measure changes in splenic T cell subpopulations and observed more CD4⁺ T cells in samples from *Mif*^{-/-} mice than those found in spleen from WT mice, even before DED induction and at the end of recovery stage (day 28) (Figure 5). Interestingly, CD8⁺ T cells were also found increased in spleens retrieved from *Mif*^{-/-} mice. These observations suggest that the attenuated signs of DED in *Mif*^{-/-} mice might be related to a decrease efflux of splenic T cells. Further characterization of these splenic T cells in the context of chemokine receptors and adhesion molecules will confirm this speculation.

Ophthalmological delivery of MIF inhibitor (ISO-1) preserves tear volume and corneal architecture and reduces inflammatory cytokines

Inhibition of MIF has proven to be beneficial in autoimmune diseases.³¹ So far, the efficacy of ocular topical delivery of ISO-1 has not been explored in DED. ISO-1 was given via eye drops to WT mice after 3 days of DED induction (protocol shown in Figure 6a). On day 10 (7 days after ISO-1 delivery), we observed a significant amelioration in tear volume when compared to DED mice, although did not reach baseline values (Figure 6b). Interestingly, mice receiving the vehicle DMSO showed increased tear volume as compared to DED-induced mice alone. As mentioned previously, an additional indicator of tear stability is the ferning pattern. Before DED induction, all groups had a normal physiological ferning pattern (type II in Rolando's score) as seen in representative tear samples images (Figure 6c). On day 10, DED-induced mice or those given DMSO exhibited a complete loss of mucin pattern, whereas a preserved ferning pattern was found in mice receiving ISO-1, (Figure 6d). Interestingly, after scopolamine treatment was stopped (day 10–15) only vehicle-treated DED mice showed a reduced ability to restore the ferning pattern as compared to DED and DED plus ISO-1 mice. Histopathologically, a massive inflammatory infiltrate in the corneal epithelium and damage to the corneal stroma was observed in mice induced with DED as compared to control mice (Figure 6e). Notably, in cornea tissues from DMSO-treated DED mice, a reduced infiltrated was observed, but in contrast, a large disarrangement of collagen fibers (starting from the second third) and loss of keratocytes were observed in the stroma (Figure 6g). The ophthalmological delivery of ISO-1 resulted in a non-apparent infiltrate and reduced epithelial and stroma thickness with a striking preservation of keratocytes (Figure 6f,g). When thickness of epithelial and stromal layers was measured in corneal sections, the ISO-1 treatment modulated the inflammatory infiltrate and oedema, preventing

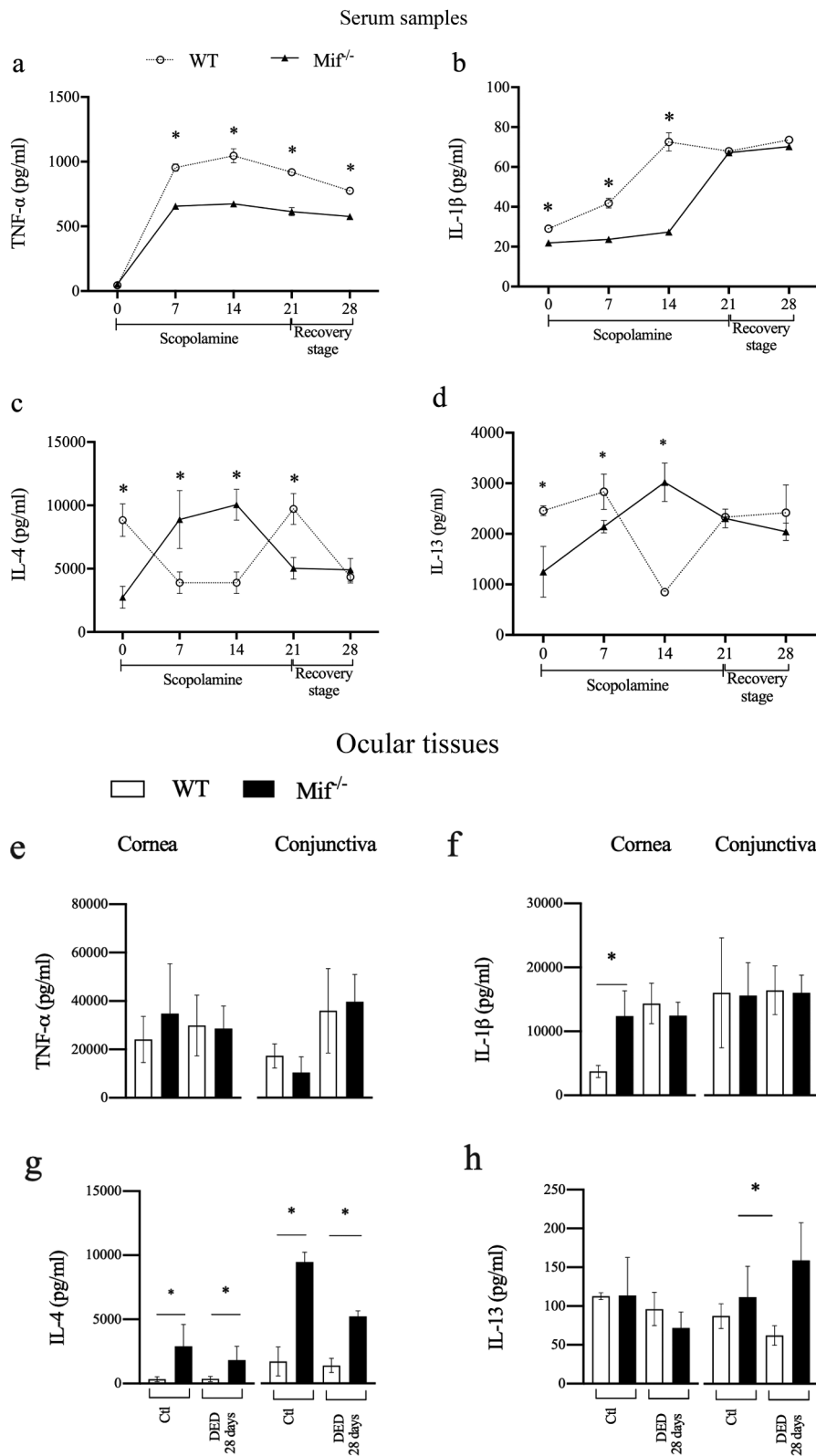


Figure 3. Deficiency in MIF results in a Th2-type dominated environment and lower output of inflammatory cytokines. Panel a–d shows circulating levels of inflammatory TNF α and IL-1 β as well as IL-4 and IL-13, where WT mice exhibited a selective inflammatory profile throughout DED induction (21 days) as compared to healthy control mice (Ctl). Furthermore, spontaneous output of these cytokines was evaluated in cornea and conjunctiva harvested at day 28 followed by incubation for 48 hr in the absence of additional stimuli, as shown in panel 3e–h. Data are representative from four experiments for blood cytokines and one experiment for ocular tissues ($n = 4$ mice per experiment). Values shown are mean \pm SEM where * is $p < 0.05$ obtained by student's t test.

increasing in thickness in both ocular tissues as compared to DED and DMSO-receiving mice (Figure 6f,g). Thus, mice given ISO-1 showed lessened injury in corneal tissue when compared to mice receiving vehicle only and DED-induced animals.

Finally, we observed that ISO-1 administration also altered the cytokine profile released upon DED induction. In terms of circulating cytokine levels, blocking MIF delayed the output of TNF- α and IL-1 β inflammatory

Transcripts in ocular tissue

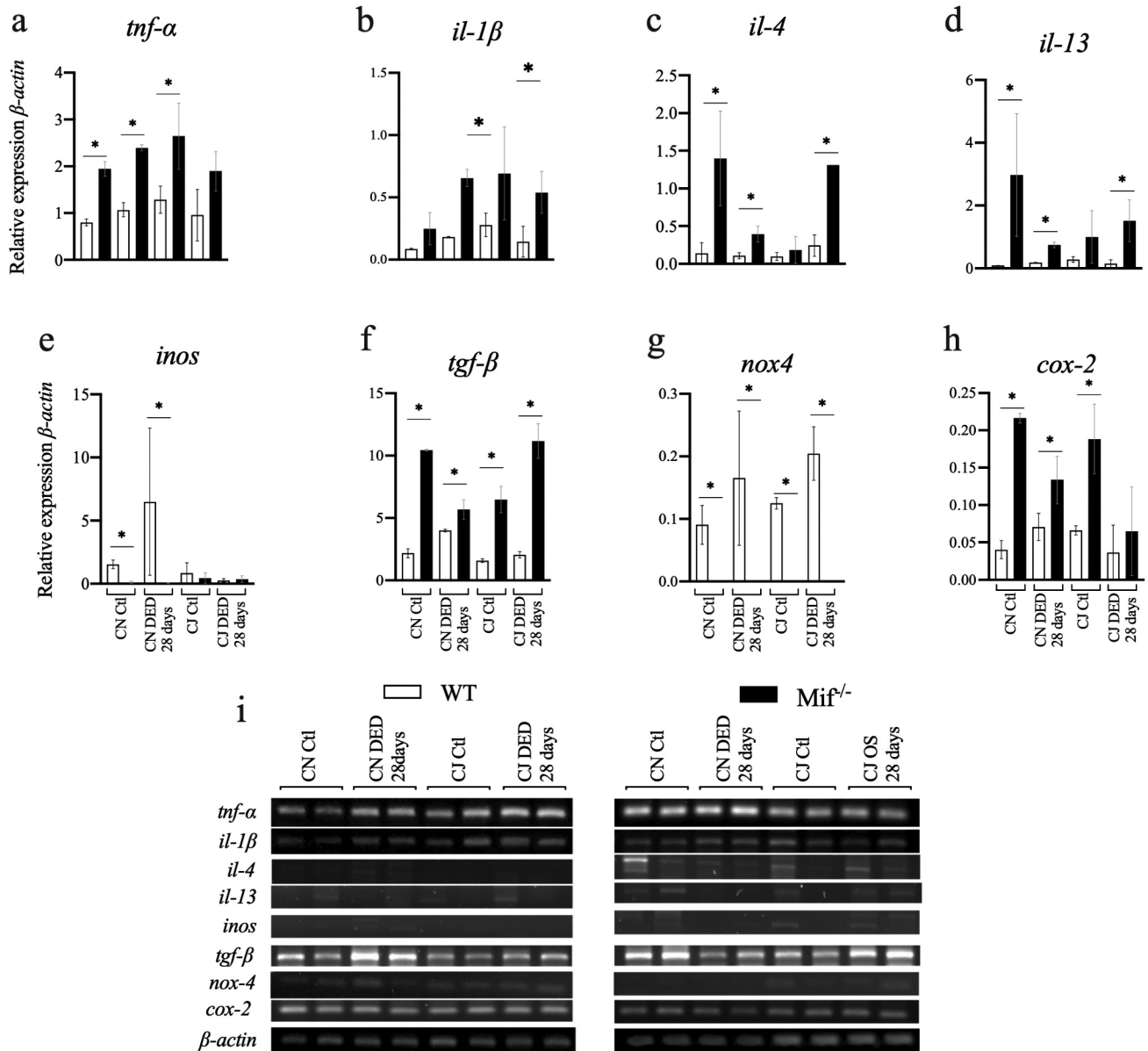


Figure 4. DED induction in *Mif*^{-/-} mice results in a mixed Th2/inflammatory ocular microenvironment. On day 28, cornea (CN) and conjunctiva (CJ) were collected from euthanized control (Ctl) and experimental animals and placed in Trizol® reagent to carry out mRNA extraction. Transcript analysis of genes reported on suppl. Table 1 are shown in panel a-h and panel i shows a representative agarose gel with the expected products. Data shown are from one experiment ($n = 4$) and * is indicative of $p < 0.05$ obtained by unpaired student's *t* test.

cytokines involved in disease perpetuation, whereas ISO-1 induced early increase in IL-4 and complementarily increased IL-13 starting on day 5 and sustained until day 15 (Figure 7a). On day 15, we evaluated spontaneous release of these same cytokines on CN and CJ incubated for 48 hr. We did not notice a significant suppression of inflammatory cytokines in samples obtained from ISO-1-treated mice, however, consistent with findings on MIF deficient mice, increased amounts of IL-4 and IL-13 were found on CN cultures, when ISO1-treated mice were compared to DED group (Figure 7b). However, in CJ supernatants IL-4 but not IL-13 levels were found to be elevated when ISO-1 treatment was given (Figure 7c). Altogether, these results suggest that ISO-1 ophthalmic delivery is highly efficient in

modulating cytokine microenvironment in ocular surface which is ultimately related to attenuated DED signs (*i.e.* ferning pattern and tear volume preserved and lessened corneal injury).

Discussion

Dry eye is a heterogeneous multifactorial disease affecting the ocular surface. The main contributing factor is osmolarity changes altering the tear film stability, which in turn triggers early release of inflammatory mediators (*e.g.*, IL-1 β , IL-6, MIF and TNF α) by resident immune cells as well as epithelial sources.^{32,33} These non-physiological levels of inflammatory cytokines are thought to be relevant biomarkers which can

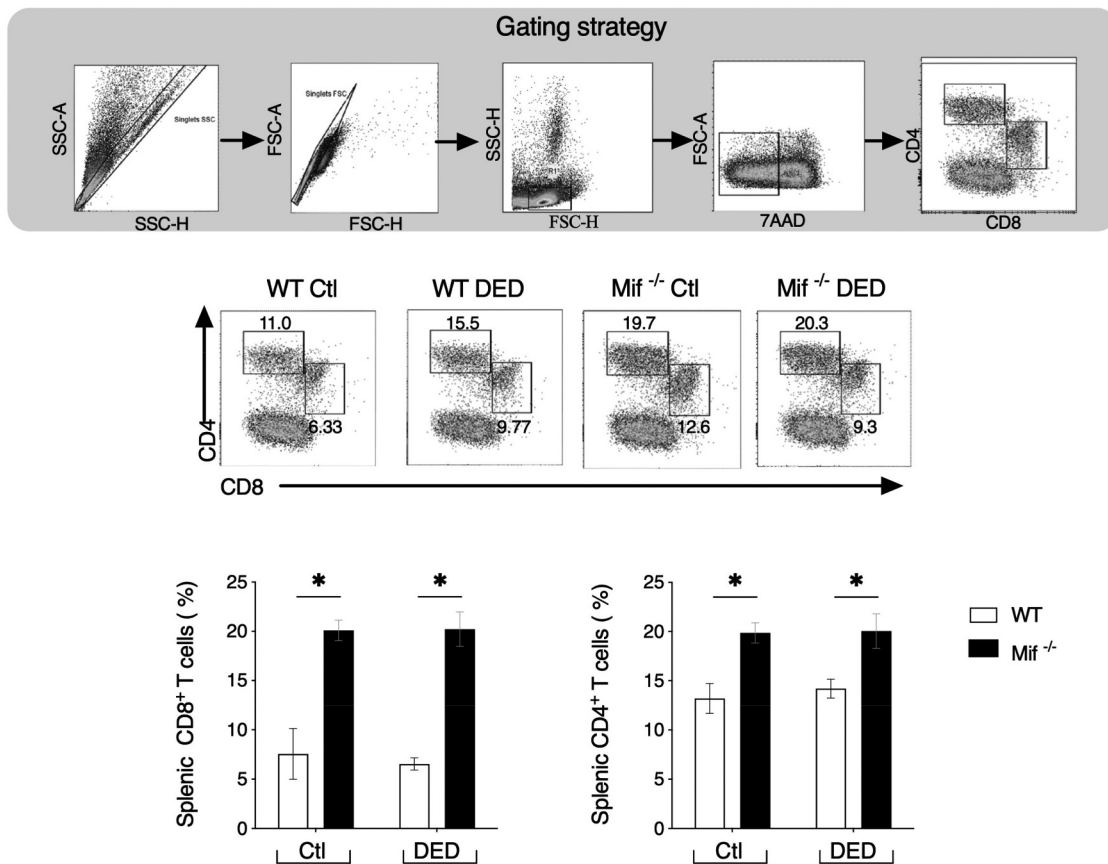


Figure 5. Resistance to DED induction in $Mif^{-/-}$ mice correlated with increased T cells in spleen. Splenocytes were collected from control mice (Ctl) and experimental groups before and 28 days after DED induction. To identify T cell subpopulations by flow cytometry, $CD3^{+} CD4^{+}$ and $CD3^{+} CD8^{+}$ staining was used. Based on the gating strategy depicted, singlet cells from the lymphocyte gate (R1) were selected and analyzed to determine differences in percent of T cells. Increased T cells were found prior to DED induction and at the end of recovery stage in DED-induced $Mif^{-/-}$ mice. Data are from 2 independent experiments, where * is indicative of $p < 0.05$.

also be seen as therapeutic targets. It has previously been reported that MIF is elevated in patients suffering from autoimmune and inflammatory diseases.^{34,35} Likewise, MIF has been found in tear samples from both autoimmune DED (Sjögren's disease) as well as non-autoimmune DED patients,³⁶ suggesting a pathological role played by this cytokine, however, whether MIF is active player in inflammation of the ocular surface is not known. Here, we evaluated the role of MIF in a DED mouse model by two means, the genetic deletion of MIF and its pharmacological inhibition. The absence of MIF resulted in improved tear film stability as gauged by preservation of tear volume and epithelial cell integrity (Figure 1b,c). Also, the ferning pattern in tear samples obtained from $Mif^{-/-}$ mice revealed only minor alterations as compared to those found in WT mice (Figure 1d,e). Furthermore, when DED was induced in $Mif^{-/-}$ mice, less histopathological damage was observed in epithelium and stroma layers in cornea (Figure 2a), suggesting that MIF collaborates with other inflammatory cytokines in activating and attracting immune cells increasing the extent of tissue injury. These findings correlated with delayed release of innate inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF α), given that the influence of MIF as promoter of these cytokines is well known.³⁷ We noticed a rapid increase in systemic (Figure 3a,b,c,d), secondary lymphoid organs (Fig. Suppl. 1) and local ocular tissues levels of Th2-associated IL-4 and IL-13 (Figure 3e,f,g,h), this

demonstrated that MIF is a central mediator regulating the cytokine profile polarization upon DED induction, we speculate that deficiency in MIF resulted in the improved outcome of DED due to an enhanced Th2-skewed response. Interestingly, there is no clear consensus about the role of MIF in modulating Th2 cytokines, for instance, when infected with intracellular³⁸ or extracellular parasites³⁹ MIF deficient mice showed comparable levels of circulating IL-4 to WT counterparts. However, the microenvironment seems to be highly relevant since oral infection of $Mif^{-/-}$ mice with the parasite *Toxoplasma gondii* did not alter IL-1 β levels, but in contrast, when pregnant $Mif^{-/-}$ mice were infected with this same parasite an increased IL-4 response was found.⁴⁰ Noteworthy, it has been described that certain pathogens such as *Plasmodium* and *Brugia* release a MIF homologue which is able to cooperate in inducing a Th2 response.^{41,42} Also, MIF is required to induce a Th2 response in a mouse model of allergic conjunctivitis and dermatitis.^{43,44} This evidence demonstrates that the role MIF is influenced by the microenvironment created by diverse stimuli like infectious or allergenic triggers.

Additionally, mRNA analysis in CN and CJ showed that DED induction in mice lacking MIF allowed co-expression of inflammatory genes (*tnfa*, *il1 β*) and Th2-type *il4* and *il13*, which partly explains the mild signs observed in $Mif^{-/-}$ mice, since these cytokines antagonize each other (Figure 4). In

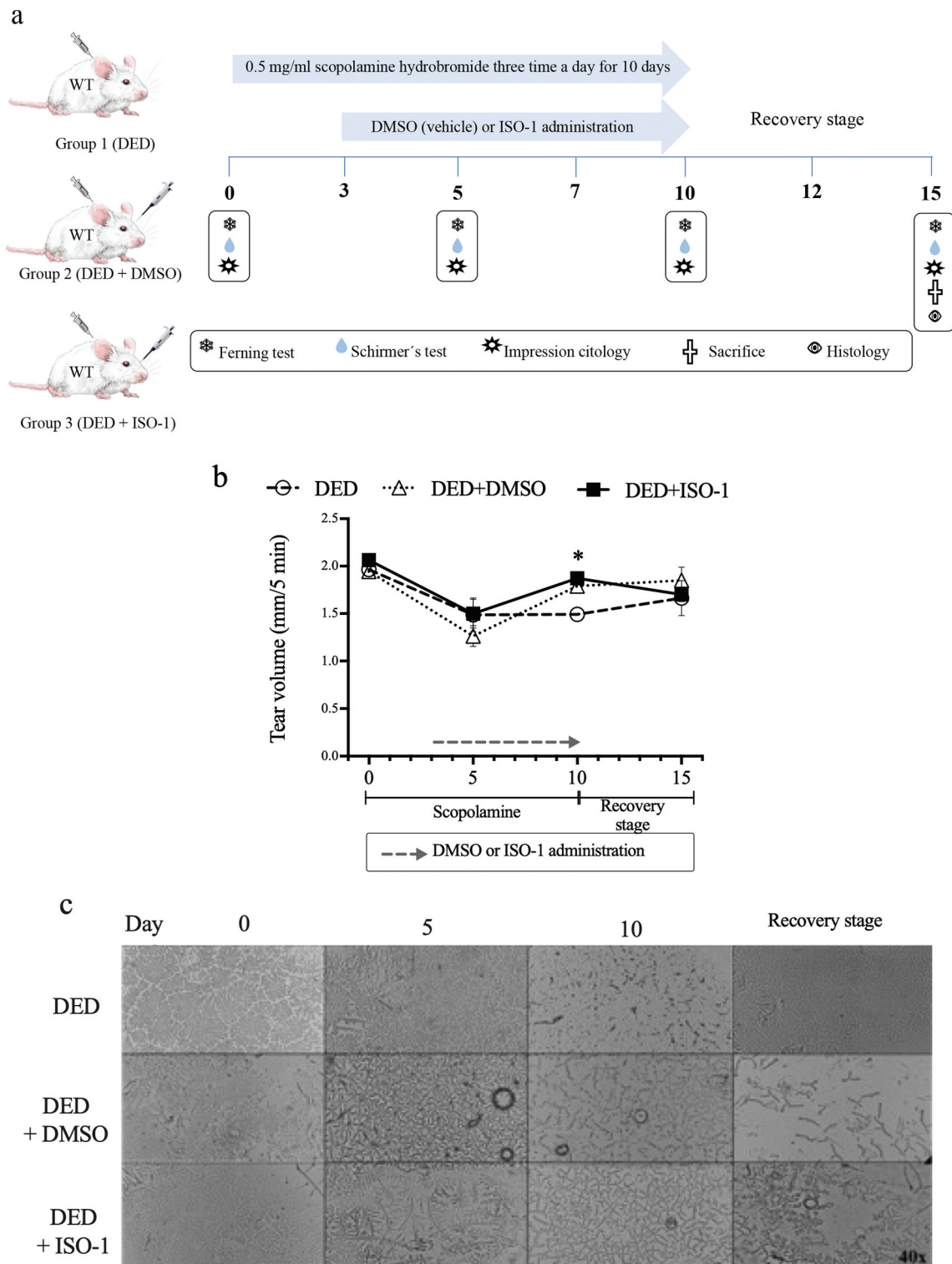


Figure 6. Pharmacological inhibition of MIF ameliorates DED. The efficacy of the MIF inhibitor (ISO-1) was tested in acute DED. As indicated in the scheme (a), DED was induced for 10 days in three groups of BALB/c WT mice and were compared to control animals (Ctl): group 1 DED, group 2 DED plus vehicle (DMSO) and group 3 DED plus ISO-1, following a treatment protocol which started at day 3 of DED induction. On day 10, both scopolamine and ISO-1 delivery were suspended. The assessment of DED signs was conducted before DED induction and 5, 10 and 15 days (recovery stage). DED signs included tear volume (b) and the ferning pattern (c and d). Finally, histopathological analysis of cornea is shown in (e), where black and blue arrows point to epithelial and endothelial disarrangement caused by inflammatory infiltrate and oedema, respectively. Red arrows indicate keratocytes. Data are from 2 experiments ($n = 5$ mice per group), where * is indicative of $p < 0.05$.

contrast, increased gene expression of enzymes involved in oxidative stress (*inos* and *nox4*), were only apparent in WT mice, most likely as a result from the activity of

inflammatory cytokines, whereas in *Mif*^{-/-} mice, low expression of these molecules might be reflecting the impact of IL-4, which is known to repress enzymes like iNOS (Figure 4).⁴⁵

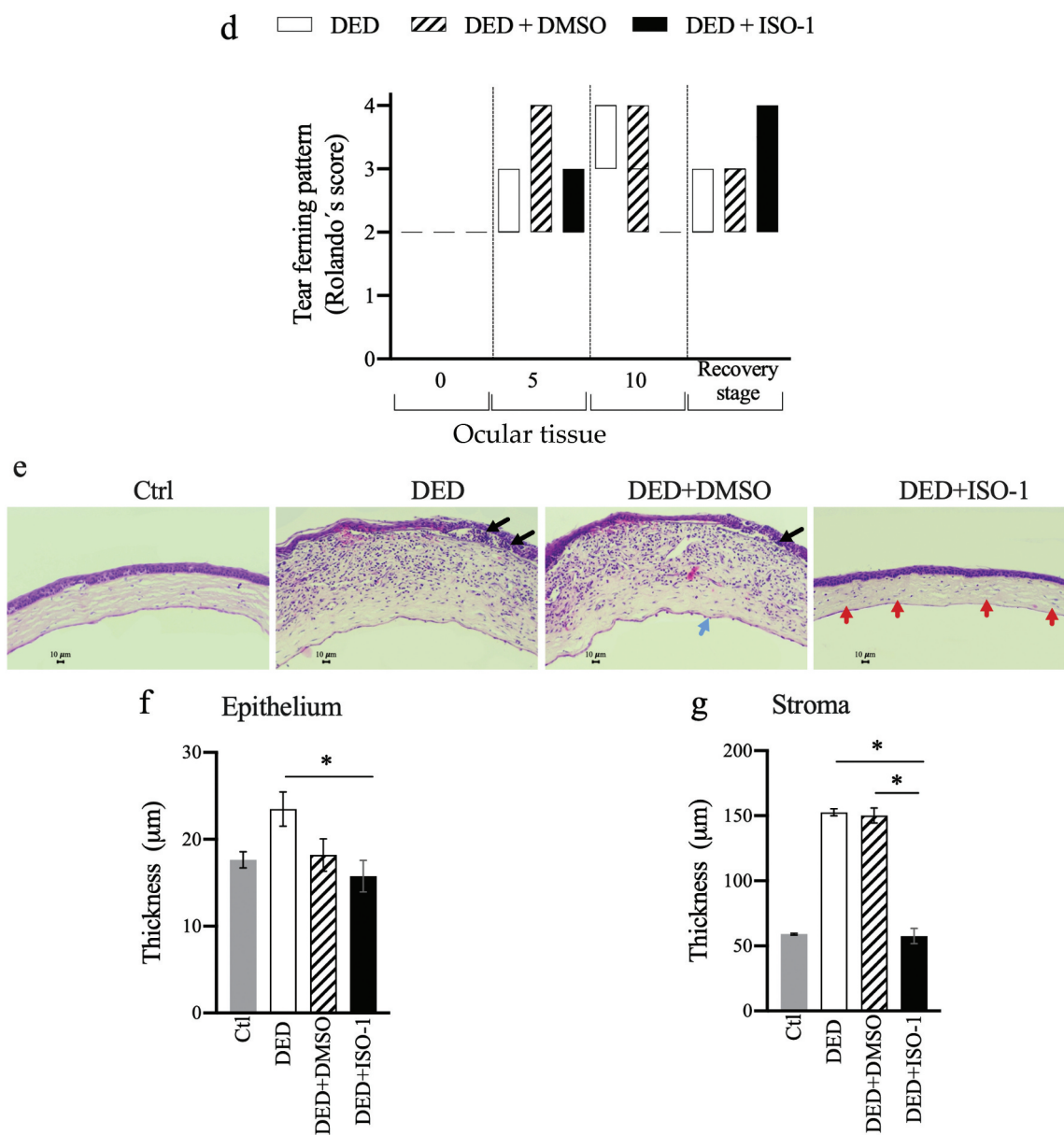


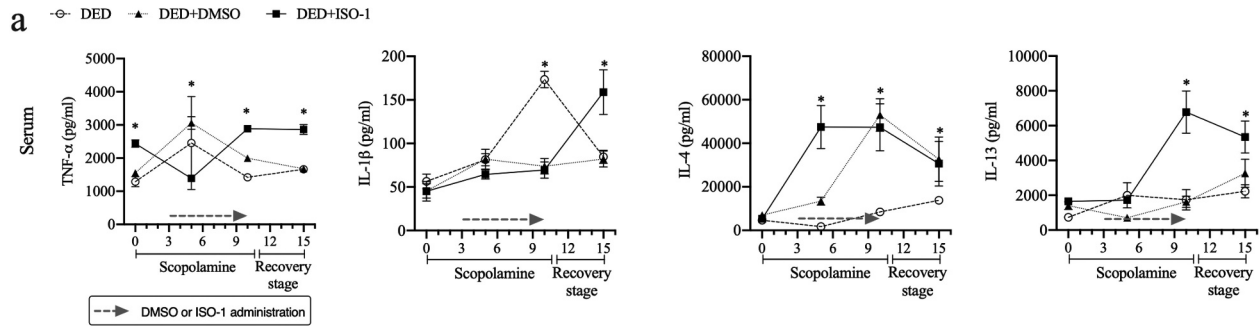
Figure 6. (Continued).

However, the cellular source of these enzymes remains undetermined.

Flow cytometry analysis revealed that before and at the end of DED induction increased numbers of T cells were evident in the spleen of *Mif*^{-/-} mice as compared to WT individuals. This latter suggests that lacking MIF might be affecting the immunobiology of T cells either by modulating their expansion or spleen egress (Figure 5). Another topic still to be addressed is phenotyping of these cells since it was not determined in this study which subtype is overrepresented. Interestingly, our findings also suggest that MIF may be promoting distant Th2 polarization, as evidenced by high levels of IL-4 and IL-13 in spleen culture supernatants (data not shown). Altogether, these evidences support a role for MIF during DED, most likely and amongst others, as a key modulator of the chamerospenic axis.

In order to confirm the findings in the genetically deficient mouse model, we proceeded to evaluate the effect of pharmacological inhibition of MIF, through ophthalmic delivery of ISO-1. Promising results showed that, while administered, ISO-1 was able to ameliorate loss of tear volume and ferning pattern as compared to DED group (Figure 6b,c,d). To our surprise, DMSO vehicle administration prevented complete loss of ferning pattern and tear volume (Figure 6b,c,d). Remarkably, mice given ISO-1 showed negligible infiltrating cells and reduced stroma thickness in cornea sections (Figure 6e,f,g) showing that neutralizing MIF in the ocular surface might be similarly efficient to previous reports with experimental retinal detachment,⁴⁶ pancreatitis,⁴⁷ and diabetes.⁴⁸ Furthermore, unlike the results obtained from the *in vivo* model where the complete absence of MIF resulted in lower sustained production of TNF α throughout 21 days of

Serum samples



Ocular tissue supernatants

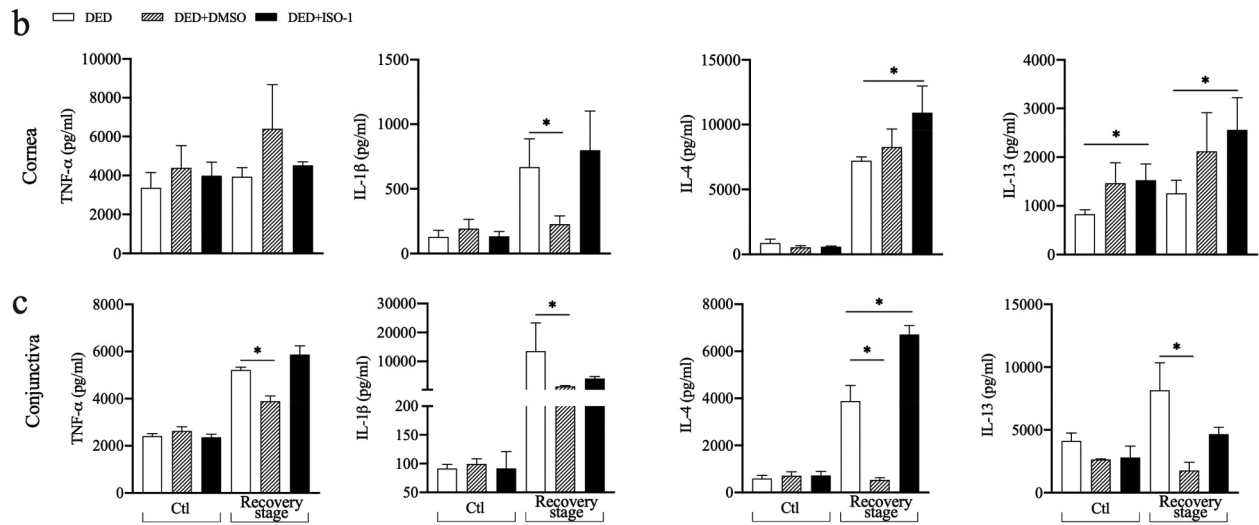


Figure 7. MIF neutralization increases levels of IL-4. The effect of ISO-1 delivery, MIF inhibitor, was analyzed both systemically and locally by using an acute DED protocol. Cytokine levels were determined in blood samples (a) at 5 day-intervals and spontaneous cytokine production was quantified in cornea (b) and conjunctiva (c) at the end of DED protocol (15 days) and contrasted to control mice (Ctl). Data are from one experiment ($n = 4$), where * is indicative of $p < 0.05$.

DED induction, in contrast, treatment with ISO-1 caused a differential decreased in inflammatory cytokines, where levels of TNF α and IL-1 β decreased in serum samples when ISO 1 was administered and then bounce back in the recovery phase (Figure 7a), whereas TNF α levels remained unchanged in cornea and conjunctiva supernatants relative to DED group (Figure 7b,c), and significantly lower production in conjunctiva levels of IL-1 β was noticed (ISO1 group versus DED group). Thus, although neutralizing MIF was highly effective in preventing tissue injury, we cannot rule out that low levels of MIF were still present evidenced by incomplete abolishment of TNF α , which in turn resulted in an inability to recover an acceptable physiological ferning pattern in mice receiving ISO-1, since TNF α is involved in apoptosis of mucin-producing cell.⁴⁹ Also, IL-1 β release depends on inflammasome assembling and MIF is a well-established activator of this platform which partly explains a defective production of this cytokine. In line with this, recent evidence showed that NLRP3 inflammasome is activated in DED patients.⁵⁰

Interestingly, consistent with findings observed in genetically deficient mice, neutralizing MIF resulted in an early increased of IL-4 and late enhanced IL-13 levels in sera samples (Figure 7a),

supporting that a microenvironment containing these cytokines attenuates loss of tear film stability, most likely by promoting Goblet cell survival as previously reported.⁵¹ We also noticed that although both IL-4 and IL-13 are elevated in systemic and local environments, the presence of IL-13 specifically in conjunctiva might be a more accurate indicator of preservation in tear ferning pattern, which is a key component in this fluid. We concluded this since IL-13 was elevated in conjunctiva supernatants obtained from *Mif*^{-/-} mice induced with DED, exhibiting an overall improved in ferning pattern (Figure 3h). When MIF was inhibited with ISO-1, we did not observe a complete recovery in ferning pattern which was correlated with low levels of IL-13 in conjunctiva (Figure 7c). Evidence showing that MIF modulates IL-13, and this, in turn, promotes worm expulsion through activating intestinal mucin-producing cells has been also published.⁵²

This is, to our knowledge, the first study showing active participation of MIF leading to damage of the anterior segment of the eye. Together, these data suggest that MIF contributes to exacerbate the loss of tear film stability and our findings support the use of MIF inhibitors such as ISO-1, delivered via ophthalmologic route, as treatment for ocular inflammatory diseases (as integrated in Figure 8).

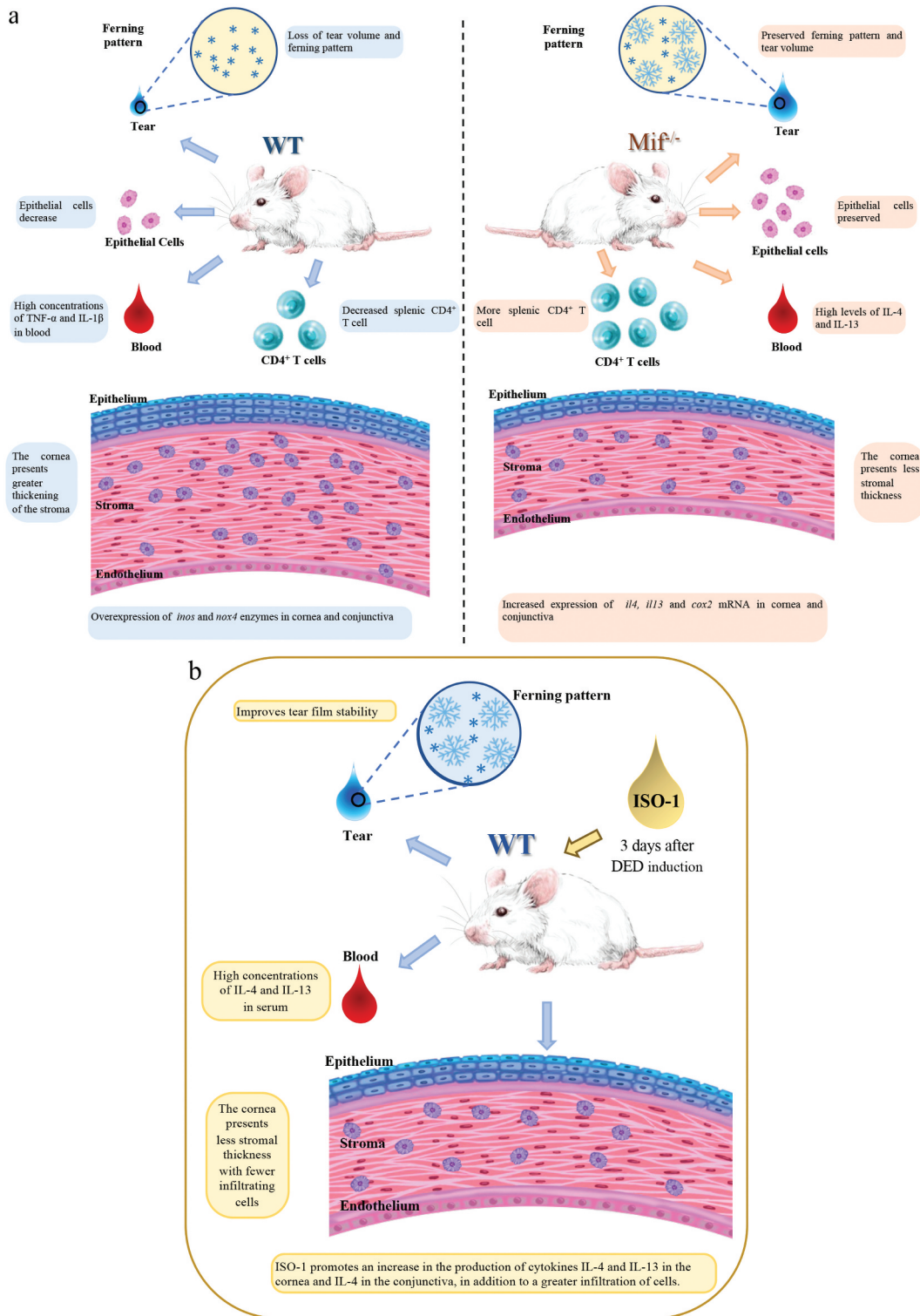


Figure 8. Schematic view of the role of MIF on DED. Panel (a) shows the impact of genetic deletion of MIF over ocular surface inflammation and panel (b) depicts the beneficial effect of pharmacological inhibition of MIF. Interestingly, both strategies resulted in Th2-type cytokine increased production.

Acknowledgments

We acknowledge to Maria Leticia Flores and Tomas Ernesto Villamar for their assistance in animal facilities.

Disclosure statement

The authors report there are no competing interests to declare.

Funding

This work was supported by DGAPA-UNAM-PAPIIT under grant (number TA200118), DGAPA-UNAM-PAPIIT under grant (number IN226220); Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnologia (COMECyT) under grant (number FICDTEM-2021-033) for A. V. and by DGAPA-UNAM PAPIIT under grant (number IN224520) and DGAPA-UNAM PAPIIT under grant (number IN215323) for J.L.R.

Data availability statement

Data available within the article or its supplementary materials.

References

1. Rouen PA, White ML. Dry Eye Disease: Prevalence, Assessment, and Management. *Home Healthc Now*. 2018;36(2):74–83. doi:10.1097/NHH.0000000000000652.
2. Miljanovic B, Dana R, Sullivan DA, Schaumberg DA. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(3):409–15. doi:10.1016/j.ajo.2006.11.060.
3. Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, et al. TFOS DEWS II sex, gender, and hormones report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):284–333. doi:10.1016/j.jtos.2017.04.001.
4. Jaiswal S, Asper L, Long J, et al. Ocular and visual discomfort associated with smartphones, tablets and computers: what we do and do not know. *Clin Exp Optom*. 2019;102(5):463–477. doi:10.1111/cxo.12851.
5. Tariq MA, Amin H, Ahmed B, et al. Association of dry eye disease with smoking: a systematic review and meta-analysis. *Indian J Ophthalmol*. 2022;70(6):1892–1904. doi:10.4103/ijoo.IJO_2193_21.
6. Martins T, Miranda Sipahi A, Dos Santos FM, et al. Eye disorders in patients with celiac disease and inflammatory bowel disease: a study using clinical data warehouse. *Eur J Ophthalmol*. 2021;11206721211012849. doi:10.1177/11206721211012849.
7. Yoo TK, Oh E. Diabetes mellitus is associated with dry eye syndrome: a meta-analysis. *Int Ophthalmol*. 2019;39(11):2611–2620. doi:10.1007/s10792-019-01110-y.
8. Abd-Allah NM, Hassan AA, Omar G, et al. Dry eye in rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Immunol Med*. 2020;43(2):92–97. doi:10.1080/25785826.2020.1729597.
9. Wu PC, Ma S-H, Huang Y-Y, et al. Psoriasis and dry eye disease: a systematic review and meta-analysis. *Dermatology*. 2022;238(5):876–885. doi:10.1159/000522167.
10. Reyes JL, Vannan DT, Eksteen B, et al. Innate and adaptive cell populations driving inflammation in dry eye disease. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1–12. doi:10.1155/2018/2532314.
11. Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis*. 2012;12(1):75. doi:10.1186/1471-2334-12-75.
12. Flores M, Saavedra R, Bautista R, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *Faseb J*. 2008;22(10):3661–3671. doi:10.1096/fj.08-111666.
13. Li J, Tang Y, Tang PMK, et al. Blocking macrophage migration inhibitory factor protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice. *Mol Ther*. 2018 Oct 3;26(10):2523–2532. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30077612; PMCID: PMC6171075 doi:10.1016/j.ymthe.2018.07.014.
14. Zhang J, Xu M, Zheng Q, Zhang Y, Ma W, Zhang Z. Blocking macrophage migration inhibitory factor activity alleviates mouse acute otitis media in vivo. *Immunol Lett*. Nov 2014;162(1 Pt A):101–8. doi:10.1016/j.imlet.2014.07.013. Epub 2014 Aug 6. PMID: 25108100; PMCID: PMC4252730.
15. Fagone P, Mazzon E, Cavalli E, et al. 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.
16. Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human cornea. *FEBS Lett*. 1996;385(3):225–8. doi:10.1016/0014-5793(96)00386-9.
17. 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;77(1):85–90. doi:10.1016/S0165-5728(97)00061-1.
18. Matsuda A, Kotake S, Tagawa Y, et al. Detection and immunolocalization of macrophage migration inhibitory factor in rat iris and ciliary epithelium. *Immunol Lett*. 1996;53(1):1–5. doi:10.1016/0165-2478(96)02600-4.
19. Taguchi C, Sugita S, Tagawa Y, Nishihira J, Mochizuki M. Macrophage migration inhibitory factor in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(11):1367–1371. doi:10.1136/bjo.85.11.1367.
20. Cebulla CM, Stevenson W, Van Law H, et al. MIF promoter polymorphisms are associated with epiretinal membrane but not retinal detachment with PVR in an American population. *Exp Eye Res*. 2019;185:107667. doi:10.1016/j.exer.2019.05.007.
21. Bozza M, Sato AR, Lin G, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*. 1999;189(2):341–346. doi:10.1084/jem.189.2.341.
22. Pflugfelder SC, Farley W, Luo L, et al. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. *Am J Pathol*. 2005;166(1):61–71. doi:10.1016/S0002-9440(10)62232-8.
23. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, et al. TFOS DEWS II diagnostic methodology report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):539–574. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.001.
24. Williams D, Hewitt H. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. *Chibret Int J Ophthalmol*. 1984;2:32–41.
25. Allen JB, Wong HL, Costa GL, Bienkowski MJ, Wahl SM. Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *J Immunol*. 1993;8:4344–51. doi:10.4049/jimmunol.151.8.4344.
26. Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, et al. IL-4 and IL-13 Negatively Regulate TNF- α - and IFN- γ -induced β -defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol*. 2007;179(2):984–92. doi:10.4049/jimmunol.179.2.984.
27. Seen S, Tong L. Dry eye disease and oxidative stress. *Acta Ophthalmol*. 2018;96(4):e412–e420. doi:10.1111/aos.13526.
28. Stein-Streilein J, Streilein JW. Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol*. 2002;21(2–3):123–52. doi:10.1080/08830180212066.
29. Cone R, Chattopadhyay S, O'Rourke J. Control of delayed-type hypersensitivity by ocular-induced CD8+ regulatory t cells. *Chem Immunol Allergy*. 2008;94:138–149.
30. Biro D. Anterior chamber-associated immune deviation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2008;38(2):309–21, vi–vii. doi:10.1016/j.cvsm.2007.12.006.
31. Bilsborrow JB, Doherty E, Tilstam PV, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Ther Targets*. 2019, Sep;23(9):733–744. doi:10.1080/14728222.2019.1656718.
32. Zheng Q, Ren Y, Reinach PS, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. *Exp Eye Res*. 2015;134:133–40. doi:10.1016/j.exer.2015.02.013.
33. Zhu L, Shen J, Zhang C, et al. Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulinum toxin B induced murine dry eye model. *Mol Vis*. 2009;15:250–258.
34. Hernandez-Palma LA, García-Arellano S, Bucala R, et al. Functional MIF promoter haplotypes modulate Th17-related cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells from control subjects and rheumatoid arthritis patients. *Cytokine*. 2019;115:89–96. doi:10.1016/j.cyto.2018.11.014.
35. Garcia-Arellano S, Hernández-Palma LA, Cerpa-Cruz S, et al. The novel role of MIF in the secretion of IL-25, IL-31, and IL-33 from

- PBMC of patients with rheumatoid arthritis. *Molecules*. 2021;26(16):4968. doi:10.3390/molecules26164968.
36. Willeke P, Gaubitz M, Schotte H, et al. Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):R43. doi:10.1186/ar2182.
 37. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 1995;377(6544):68–71. doi:10.1038/377068a0.
 38. Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, et al. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. 2006;74(6):3170–3179. doi:10.1128/IAI.01648-05.
 39. Rodriguez-Sosa M, Rosas LE, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *taenia crassiceps*. *Infect Immun*. 2003;71(3):1247–54. doi:10.1128/IAI.71.3.1247-1254.2003.
 40. Marcon CF, et al. WITHDRAWN: macrophage migration inhibitory factor (MIF) and pregnancy may impact the balance of intestinal cytokines and the development of intestinal pathology caused by *Toxoplasma gondii* infection. *Cytokine X*. 2020;2(3):100034. doi:10.1016/j.cyttox.2020.100034.
 41. Shao D, Han Z, Lin Y, et al. Detection of *Plasmodium falciparum* derived macrophage migration inhibitory factor homologue in the sera of malaria patients. *Acta Trop*. 2008;106(1):9–15. doi:10.1016/j.actatropica.2007.12.008.
 42. Zang X, Taylor P, Wang JM, et al. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. *J Biol Chem*. 2002;277(46):44261–44267. doi:10.1074/jbc.M204655200.
 43. Li R, Wang F, Wei J, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Asthmatic Airway Remodeling. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2021;13(1):88–105. doi:10.4168/aa.2021.13.1.88.
 44. Yoshihisa Y, Makino T, Matsunaga K, et al. Macrophage migration inhibitory factor is essential for eosinophil recruitment in allergen-induced skin inflammation. *J Invest Dermatol*. 2011;131(4):925–31. doi:10.1038/jid.2010.418.
 45. Yorimitsu M, Nishida K, Shimizu A, et al. Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(7):764–771. doi:10.1016/j.joca.2007.11.006.
 46. Kim B, Kusibati R, Heisler-Taylor T, et al. MIF Inhibitor ISO-1 Protects Photoreceptors and Reduces Gliosis in Experimental Retinal Detachment. *Sci Rep*. 2017;7(1):14336. doi:10.1038/s41598-017-14298-9.
 47. Chen Y, Wang C-Y, Zhao L, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor prevents thyroid dysfunction in pregnant rats with acute pancreatitis. *Int Immunopharmacol*. 2020;87:106771. doi:10.1016/j.intimp.2020.106771.
 48. Wang Z, Wei M, Wang M, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor reduces diabetic nephropathy in type II diabetes mice. *Inflammation*. 2014;37(6):2020–2029. doi:10.1007/s10753-014-9934-x.
 49. Dartt DA, Masli S. Conjunctival epithelial and goblet cell function in chronic inflammation and ocular allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14(5):464–70. doi:10.1097/ACI.0000000000000098.
 50. Niu L, Zhang S, Wu J, et al. Upregulation of NLRP3 Inflammasome in the tears and ocular surface of dry eye patients. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126277. doi:10.1371/journal.pone.0126277.
 51. De Paiva CS, Raince JK, McClellan AJ, et al. Homeostatic control of conjunctival mucosal goblet cells by NKT-derived IL-13. *Mucosal Immunol*. 2011;4(4):397–408. doi:10.1038/mi.2010.82.
 52. Damle SR, Martin RK, Cross JV, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency enhances immune response to *nippostrongylus brasiliensis*. *Mucosal Immunol*. 2017;10(1):205–214. doi:10.1038/mi.2016.29.