



**proinbio**  
Programa para la Investigación Biomédica



Tesis de Doctorado:

**"Interfaz inmunológica de la superficie ocular: Expresión de MUC1, MUC4 y MUC16 y producción de citoquinas proinflamatorias en pacientes con síndrome de ojo seco secundario a enfermedad de Sjögren".**

Programa para la Investigación Biomédica (PROINBIO)

**Dra. Natalie Brossard Barbosa**

**Orientadores**

**Dra. Teresa Freire**

Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina

**Dra. María Elena Vergara**

Cátedra de Oftalmología, Facultad de Medicina

**Dr. Ernesto Cairoli**

Unidad de enfermedades autoinmunes, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina

## **TABLA DE CONTENIDOS**

---

<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIACIONES</b>	<b>7</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<i>La superficie ocular</i>	14
<i>Recuerdo anatomo histológico de la córnea y conjuntiva</i>	15
La conjuntiva	15
La córnea	16
<i>El síndrome de ojo seco</i>	17
Tests clínicos que definen el SOS	18
Clasificación del SOS	23
<i>El síndrome de Sjögren y el SOS</i>	24
Síndrome de Sjögren secundario	25
<i>Generalidades de la inmunidad en mucosas</i>	27
<i>Inmunidad de la superficie ocular</i>	28
<i>Las mucinas</i>	30
Mucinas expresadas en la superficie ocular	30
Función biológica de las mucinas en la Superficie ocular	31
<i>Evaluación de la deficiencia de mucinas en el examen clínico para diagnosticar sos</i>	32
Impresión citológica	32
<i>Regulación de la expresión y secreción de mucinas en la superficie ocular</i>	33
Regulación de la secreción de MUC5AC	33
Regulación de la producción de mucinas transmembranarias	34
<i>Mucinas oculares y la respuesta inmunitaria</i>	35
<i>Expresión de mucinas oculares en pacientes con síndrome de sjögren</i>	37
<i>Expresión de citoquinas en la lágrima de pacientes con síndrome de sjögren</i>	37
<i>Potenciales tratamientos para restaurar la función de las mucinas</i>	38
Moléculas miméticas de mucinas	38
Secretagogos de las mucinas	38
Inmunomoduladores tópicos oculares	40
Anti inflamatorios no esteroideos	40
Lifitegrast	41
Factor de crecimiento neural (NGF) y Tavilermide	41
inmunomoduladores sistemicos: agentes ahorradores de corticosteroides	41
<i>Tratamiento del SOS con suero autólogo en pacientes con SS</i>	42
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO, OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS</b>	<b>44</b>

<i>Hipótesis de trabajo</i>	44
<i>Objetivo general</i>	44
<i>Objetivos específicos</i>	44
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<i>Reclutamiento de pacientes y obtención de muestras biológicas</i>	45
<i>Valoración clínica de pacientes con ojo seco</i>	47
<i>Exploración oftalmológica general</i>	47
<i>Valoración de Síntomas</i>	48
<i>Valoración de signos clínicos</i>	49
<i>Valoración de Estabilidad Lagrimal</i>	49
<i>Valoración de la producción de lágrima</i>	51
<i>Valoración del daño de la superficie corneal y conjuntival</i>	51
<i>Toma de muestras mediante impresión conjuntival</i>	52
<i>Procedimiento de extracción de ARN</i>	53
<i>RT-PCR en tiempo real</i>	53
<i>Preparación y tratamiento con sa de pacientes con sos</i>	54
<i>Análisis estadístico</i>	54
<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<i>Descripción demográfica y parámetros de la superficie ocular.</i>	55
<i>Correlación de parámetros clínicos</i>	57
<i>Expresión génica de MUC1, MUC4 y MUC16 en muestras de impresión conjuntival en pacientes con SOS y SS versus controles sanos</i>	58
<i>expresión génica de mucinas y parámetros clínicos de SOS</i>	63
<i>Correlaciones entre IL 17 e IL 22 y parámetros clínicos de sos</i>	67
<i>Correlación entre la expresión de mucinas y de il-17 e il-22</i>	72
<i>impacto del tratamiento inmunorregulador sistémico</i>	74
	76
<i>Efecto del tratamiento con suero autólogo al 20% en pacientes con SS y SOS</i>	77
<b>DISCUSIÓN y perspectivas</b>	<b>78</b>
<i>Prevalencia e Incidencia del SOS en SS</i>	78
<i>La patogenia del SOS en SS</i>	79
<i>El rol de las mucinas en el SOS por SSP y SSS</i>	80
<i>Parámetros clínicos y la expresión de mucinas</i>	84
<i>El tratamiento inmunomodulador y la expresión de mucinas</i>	85
<i>La expresión de citoquinas proinflamatorias</i>	85
<i>El tratamiento de estos pacientes con suero autólogo</i>	86
<i>El desarrollo de un sistema de valoración y tratamiento focalizada en esta patología en nuestro medio</i>	87

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO I – Preguntas de screening sos</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO ii - HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	<b>93</b>
<i>Hoja de información al paciente</i>	93
<i>Consentimiento informado</i>	94
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

Figura 1. Componentes de la superficie ocular .....	14
Figura 2. Epitelio conjuntival .....	15
Figura 3. Diagrama de las distintas capas que conforman la córnea .....	16
Figura 4. Algoritmo diagnóstico de ojo seco propuesto por el TFOS DEWS II.....	18
Figura 5. Estadificación del daño de la superficie ocular .....	20
Figura 6. Test de tiempo de rotura de la película lagrimal. ....	21
Figura 7. Test de Schirmer .....	22
Figura 8. Clasificación de los tipos de ojo seco. ....	23
Figura 9. Inmunotolerancia en la superficie ocular y componentes del sistema inmunitario .....	29
Figura 10. Distribución de las mucinas más relevantes de la SO.....	30
Figura 11. Ilustración del procedimiento de impresión citológica conjuntival .....	33
Figura 12. Ejemplo de cartilla de snellen .....	47
Figura 13. cuestionario de test de osdi .....	48
Figura 14. test de tiempo de rotura del film lagrimal .....	50
Figura 15. Test de tinción conjuntival y corneal con verde de lisamina .....	51
Figura 16. Escala de queratopatía de Oxford .....	52
Figura 17. Correlación de los parámetros clínicos de daño de la SO en el grupo de pacientes y el grupo control .....	57
Figura 18. Expresión de RNA mensajero de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en el grupo de pacientes con SS-SOS y en individuos controles .....	58
Figura 19. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16 en el grupo de pacientes con SSP-SOS e Individuos controles. ....	59
Figura 20. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16 en el grupo de pacientes con SSS-SOS e Individuos controles .....	60
Figura 21. Correlación de la expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16.....	61
Figura 22. Correlación de la expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16 en pacientes con SSP.....	62
Figura 23. RNA mensajero en células conjuntivales de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en función del TBUT. ....	63
Figura 24. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en función del test de Schirmer.....	64
Figura 25. RNA mensajero en células conjuntivales de MUC1(A), MUC4(B) y MUC16 (C) en función del grado de queratopatía. ....	65
Figura 26. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en función del resultado obtenido en el cuestionario OSDI. ....	66
Figura 27. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-22 (A) e IL-17 (B) en el grupo de pacientes con SS- SOS y en individuos controles .....	67
Figura 28. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-17 e IL-22 en el grupo de pacientes con SSP, SSS y grupo control. ....	68
Figura 29. Expresión de ARN mensajero de IL-22 e IL-17 en la SO de pacientes e individuos controles. ....	69
Figura 30. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-17 en función del score clínico de queratopatía, OSDI score, test de Schirmer y del TBUT.....	70

Figura 31. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-22 en función del score clínico de queratopatía, OSDI score, test de Schirmer y del TBUT.....	71
Figura 32. Expresión de ARN mensajero de IL-17 en células conjuntivales en función de la expresión de las mucinas de superficie MUC1, MUC4 y MUC16.....	72
Figura 33. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-17 en función de la expresión de las mucinas de superficie MUC1, MUC4 y MUC16.....	73
Figura 34. Expresión de ARN mensajero de MUC1 (A), MUC4 (B), MUC16 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) en células conjuntivales de pacientes SOS-SSP y SOS-SSS en tratamiento inmunomodulador en comparación con los controles .....	74
Figura 35. Expresión de ARNA mensajero de MUC1 (A), MUC4 (B), MUC16 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) en células conjuntivales de pacientes con SOS sin tratamiento inmunomodulador en comparación con los controles .....	75
Figura 36. Estructura de MUC1, MUC4 y MUC16.....	81
Figura 37. o-gLICOSILACIÓN DE TIPO MUCINA.....	83
Tabla 1. Criterios diagnósticos del Síndrome de Sjögren .....	24
Tabla 2. Primers utilizados para RT-PCR cuantitativa. ....	53
Tabla 3. Características demográficas y de la valoración clínica de la SO de los pacientes en el estudio y controles .....	55
Tabla 4. Características demográficas y de la valoración clínica de la SO de los pacientes con SSP versus SSS .....	56
Tabla 5. Parámetros clínicos de daño de la superficie ocular y lagrime de los pacientes antes y después del tratamiento con suero autólogo.....	77

## ÍNDICE DE ABREVIACIONES

---

- 15(S)-HETE - ácido eicosanoico 15-(S)-hydroxy-5,8,11,13  
ADN - ácido desoxirribonucleico  
ADNds - ADN bicatenario  
ARN - ácido ribonucleico  
ARNm - ácido ribonucleico mensajero  
CALT - Tejido Linfoide Asociado a Conjuntiva  
CC - células calciformes  
CD - células dendríticas  
CsA - ciclosporina A  
DAMPS - patrones moleculares asociados a daño  
DGM - disfunción de las glándulas de meibomio  
DQS - diquafasol tetrasodio  
EGF - factor de crecimiento epitelial  
ES - esclerosis sistémica  
IC - impresión citológica  
ICAM 1 – Molécula de adhesión intercelular 1  
IFN- $\gamma$  - interferón- $\gamma$   
IKKb - inhibidor del factor nuclear quinasa kappa beta  
IL - interleuquina  
LES - lupus eritematoso sistémico  
LPET - linfopoyetina estromal tímica  
MALT - Tejido Linfoide Asociado a Mucosas  
MMP - metaloproteinasas de la matriz  
MUC – mucina  
NF-kb -factor nuclear kappa beta  
NGF - factor de crecimiento neural (NGF)  
NIBUT - tiempo de ruptura lagrimal no invasivo  
Nk - linfocitos Natural Killer  
NLR – receptores de membrana tipo NOD  
OSDI – Índice de enfermedad de la superficie ocular (Ocular surface disease index)  
PAMS - patrones moleculares asociados a patógenos  
PARC – Poliartritis reumatoide crónica  
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa  
PDL-1 - ligando de muerte celular programada 1  
SA - suero autólogo (SA)  
SO - superficie ocular  
SOS - síndrome de ojo seco  
SOS no-SS – Síndrome de ojo seco secundario a otras etiologías autoinmunes no vinculadas al SS.  
SOS - SS- síndrome de ojo seco secundario a síndrome de Sjögren  
SS - Síndrome de Sjögren  
TBUT – tiempo de rotura lagrimal  
TFOS – DEWS II - segundo taller de la sociedad de ojo seco, superficie ocular y film lagrimal (por su sigla en inglés)  
TGF- $\beta$  - factor de crecimiento tumoral beta

TLR - receptores de membrana tipo Toll  
TNF $\alpha$  - factor de necrosis tumoral alfa  
Treg - linfocitos T reguladores  
VEGF - factor de crecimiento vascular endotelial.  
VEGFR3 - receptor factor de crecimiento vascular 3

## AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo fue posible gracias a la ayuda y apoyo de muchas personas, a las cuales les quiero expresar mi agradecimiento.

A mis tutores, la Dra. Teresa Freire, el Dr. Ernesto Cairoli y la Dra. María Elena Vergara los cuales fueron mi guía y apoyo durante este largo proceso. Este trabajo representa horas de interacción con los pacientes, de lectura, trabajo de mesada y de análisis. Este proyecto fue desarrollado en un periodo muy particular, durante los años de pandemia por COVID19 y durante la compleción de mi residencia en oftalmología en el Hospital de Clínicas y Hospital de Ojos así como el procesamiento de los datos y escritura se extendieron durante 3 años de subespecialización fuera del país. Esto requirió una paciencia sin igual por parte de mis tutores, los cuales siempre fueron un apoyo para seguir adelante cuando mi formación en oftalmología requería gran parte de mi tiempo.

No puedo subrayar suficientemente la paciencia que en especial Teresa ha tenido conmigo, no es sencillo realizar proyectos clínico-básicos y acoplarse al tiempo que consume la clínica inevitablemente. Ella ha sabido llevarme de la mano desde mi etapa de estudiante de medicina, completando bajo su tutoría una maestría en ciencias y ahora este ambicioso proyecto. Soy afortunada de haberla tenido como guía durante estos 10 años.

También quiero destacar a mis tutores clínicos. Tanto María Elena como Nino han sido pilares irremplazables en el abordaje clínico de este proyecto y les estoy profundamente agradecida por su generosidad. No solo son clínicos con un sólido conocimiento de sus respectivas áreas sino además con una gran curiosidad por el conocimiento de la ciencia básica. Ha sido un placer este tiempo compartido con ellos y espero continuar nuestro intercambio en el futuro.

Al Prof. Dr. Marcelo Gallarreta por abrir las puertas de la Catedra de Oftalmología para realizar este proyecto y su generosidad para apoyar el desarrollo de la policlínica de ojo seco.

También quiero agradecer a todos mis compañeros del Laboratorio de Inmunomodulación y Desarrollo de Vacunas de Facultad de Medicina. Quiero en especial destacar algunos que generosamente donaron su tiempo, conocimiento y generosa amistad para que este trabajo fuera posible: Moni, Valeria y Sofía. Les voy a estar siempre agradecida por su compañerismo y apoyo, así como a todos los que integran este hermoso grupo.

Al Dr. Matías Agoglia, quien fue mi compañero en toda la valoración clínica de los pacientes y sin quien esto no hubiera sido posible. No puedo agradecerle suficiente las horas de trabajo conjunto y su perspectiva crítica y compromiso a la hora de ver nuestros pacientes.

Quiero a su vez no olvidarme de agradecer al Dr. Agustín Colombo, de la catedra de hemoterapia y medicina transfusional del Hospital de Clínicas, quien estuvo a cargo de la realización del suero autólogo. Su contribución ha sido invaluable.

A todos los miembros del Departamento de Inmunobiología, por todos los momentos compartidos y el enorme aprendizaje.

Por último, quiero destacar que todo lo conseguido no sería posible sin el enorme apoyo de mi familia, especialmente mis padres y mi hermano, así como mis queridos amigos. Les agradezco su apoyo incondicional y afecto ya sea en la cotidianidad o a la distancia.

A su vez, quiero agradecer a la CAP por la beca de doctorado y al PRO.IN.BIO por haber aceptado mi trabajo.

## RESUMEN

---

El síndrome de ojo seco (SOS) constituye una de las patologías oculares más frecuentes y con mayor repercusión en la calidad de vida de pacientes en el mundo actual. A su vez, dado cambios en los hábitos como el mayor uso de pantallas, la mayor polución y el envejecimiento poblacional hacen que la proyección sea en aumento.

Se estima que el 10% de los SOS son pacientes con síndrome de Sjögren (SS). Este puede ser primario o secundario cuando se encuentra asociado a otras enfermedades del tejido conectivo como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR) o la esclerosis sistémica (ES). El SOS secundario a SS (SS-SOS) nos resulta de particular interés por ser generalmente severo y de difícil tratamiento. El suero autólogo (SA) constituye una herramienta poco utilizada en nuestro medio hasta la realización de este proyecto. Sus componentes, que incluyen factores de crecimiento epitelial y vitamina A constituyen bloques fundamentales del mantenimiento de las barreras epiteliales haciéndolo una terapia prometedora y accesible.

El SS es la tercera enfermedad reumática más prevalente junto con AR y el LES. Se estima que la prevalencia del SSP va del 0.1 al 4.8% de la población dependiendo de la edad, y 90% de estos pacientes son mujeres. A pesar de su alta prevalencia, aún hay gran desconocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el SS-SOS.

Tanto la inmunidad innata como adaptativa participan en la patogenia del SOS asociado a SS. Estudios previos encontraron que tanto un perfil Th1 como Th17 serían los principales actores. Por este motivo, elegimos el estudio de las citoquinas IL-17 e IL-22 las cuales son las principales citoquinas efectoras de este perfil linfocitario. Estas citoquinas mantienen la integridad de la barrera epitelial estimulando la formación de proteínas que conforman las uniones estrechas. En especial IL-22 tiene un rol importante en la supervivencia y proliferación celular. Por su parte IL-17 tendría un rol estimulando la producción de péptidos antimicrobianos y quimioquinas que atraen leucocitos a la zona afectada cuando la barrera epitelial es penetrada.

En la escasa literatura publicada se ha observado que los niveles de IL-17 e IL-22 se encuentran aumentados significativamente en pacientes con SS-SOS con relación a los no SS y a los controles sanos. A su vez, el nivel de estas citoquinas se correlacionaba positivamente con el cuestionario de queratopatía del índice de enfermedad de la superficie ocular (OSDI por su sigla en inglés) y negativamente con el tiempo de rotura del film lagrimal (TBUT por su sigla en inglés) y el resultado de la prueba de Schirmer. Debemos destacar que estos resultados fueron vistos en un único estudio que incluyó un pequeño número de pacientes.

Las mucinas jugarían un rol fundamental en la homeostasis de la superficie ocular (SO). En particular las mucinas transmembrana MUC1, MUC4 y MUC16 estarían involucradas en la activación de factores de transcripción de citoquinas proinflamatorias.

Nuestra hipótesis inicial era que se podría observar una disminución en la expresión de estas mucinas en relación con el daño de la SO. Esta hipótesis se basó en el conocido rol protector que las mucinas

juegan normalmente en las superficies epiteliales, atrapando agentes patógenos y su estudiada naturaleza inmunorreguladora.

A lo largo de este trabajo de doctorado PROINBIO, se utilizó una combinación de diversas estrategias experimentales y clínicas para estudiar la superficie ocular en pacientes con síndrome de Sjögren (SS) y síndrome de ojo seco (SOS) y la correlación de estos hallazgos con la clínica del paciente. Para el desarrollo de este proyecto de investigación, conseguimos articular un servicio dirigido a los pacientes con SOS con la participación de un equipo multidisciplinario integrado por médicos oftalmólogos pertenecientes a la cátedra de oftalmología (valoración- seguimiento - indicación terapéutica), hemoterapia (desarrollo del colirio de suero autólogo) y unidad de enfermedades autoinmunes (captación de los pacientes con síndrome de Sjögren primario o secundario) del Hospital de Clínicas en Montevideo, Uruguay. Al mismo tiempo, desarrollamos y pusimos a punto la toma de biopsias de células conjuntivales mediante impresión conjuntival. Este procedimiento se había realizado anteriormente en nuestro medio, pero nunca para el estudio posterior con técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real). También conseguimos sistematizar el correcto almacenamiento y procesamiento de las muestras para la realización de esta técnica. Esto facilitará en el futuro continuar con el estudio de nuevos marcadores en esta y otras patologías de la SO.

Nuestros resultados nos permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

Determinamos la primera estimación de prevalencia de SOS en una población de pacientes con diagnóstico de otras patologías autoinmunes en nuestra población la cual fue discretamente menor a la reportada en la literatura. Esta fue de 22% de los pacientes, constituyendo la primera estimación en Uruguay de SOS en pacientes con patología autoinmune.

Logramos medir la expresión de las tres principales mucinas transmembrana de la SO en nuestro grupo de pacientes estudiados e individuos sanos. Contrario a nuestra hipótesis, observamos un aumento significativo de la expresión de MUC1 y MUC4 en nuestro grupo de pacientes con SOS. A pesar de que es conocido el rol fundamental de las mucinas en mantener la homeostasis de la SO, se ha descrito el aumento en la expresión de MUC1 y MUC4 frente al daño inflamatorio o en casos de neoplasias tanto en el epitelio digestivo como respiratorio.

Detectamos una diferencia en la expresión de estas mucinas entre pacientes con SSP donde observamos un aumento de las tres mucinas de estudio (MUC1, MUC4 y MUC16) y SSS donde únicamente MUC1 se vio significativamente elevada.

Asimismo, correlacionamos estos hallazgos con la clínica (síntomas y signos de ojo seco) observando que MUC4 correlaciona significativamente tanto con menor producción del film lagrimal como con un mayor grado de queratopatía superficial. La correlación de MUC4 con los síntomas de SOS no fue significativa lo cual pensamos sí se observaría probablemente incluyendo un mayor número de pacientes en el estudio.

Por otra parte, MUC1 y MUC16 se correlacionaron positivamente con una presencia de síntomas más severos de SOS pero su correlación con los signos clínicos de SOS no llegó al nivel de significancia excepto en el caso de MUC1 con relación al grado de queratopatía.

Evaluamos la expresión de citoquinas proinflamatorias del perfil Th17 como son IL-17 e IL-22. Observamos como la IL 22 se correlaciona con la expresión de MUC16, la cual a su vez aumenta en pacientes con mayor sintomatología de SOS. Encontramos una correlación significativa entre la expresión de ambas citoquinas como era esperable ya que ambas son citoquinas que corresponden a un mismo perfil de respuesta linfocitaria.

No pudimos reproducir los resultados vistos en la literatura, aunque escasa, la cual reporta que los pacientes con SOS presentan un aumento de estas citoquinas en relación a una mayor severidad clínica del SS-SOS. En nuestro estudio no observamos diferencia entre nuestro grupo de pacientes y el grupo control ni una correlación con los síntomas o signos del SOS.

Analizamos la expresión de MUC1, MUC4 y MUC16 comparando el grupo de pacientes con SS tratados con inmunomoduladores versus los no tratados observando una diferencia interesante entre estos dos grupos. Mientras ambos grupos sobre expresan MUC1. Los pacientes en tratamiento presentan un aumento de MUC4 y no de MUC16 y lo inverso se observa en los pacientes no tratados.

Evidenciamos la mejoría sintomática del tratamiento de estos pacientes con suero autólogo al 20% el cual es una opción terapéutica disponible en nuestro medio que está subutilizada por la falta de evidencia clínica hasta el momento. Estos resultados son un sustento objetivo de la efectividad del tratamiento para este grupo de pacientes.

En suma, este trabajo constituye una aproximación a comprender como varia la expresión a nivel de ARN mensajero de mucinas transmembranarias específicas y su asociación con citoquinas de perfil Th17, así como síntomas y signos clínicos del SS-SOS. Constituye un gran paso inicial a la caracterización molecular de la SO de estos pacientes y con esta la potencialidad de desarrollar terapias dirigidas. Según nuestro saber y entender, éste constituye el primer trabajo de estas características en nuestro medio y nos brinda más información de la prevalencia y características de estos pacientes en Uruguay. La puesta a punto de la técnica de impresión conjuntival, conocida en el mundo, pero no utilizada en nuestro país habitualmente para la extracción de ARN, abre las puertas para ampliar nuestras investigaciones focalizándonos en otras moléculas posiblemente cruciales en el desarrollo de SOS como por ejemplo el estudio de glicosil transferasas.

## INTRODUCCIÓN

### LA SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular (SO) comprende la córnea, el limbo, la conjuntiva y la película lagrimal, así como las glándulas lagrimales principales y accesorias y las glándulas de Meibomio (Figura 1)[1]. Esta aporta la mayor parte de la potencia óptica del ojo, desempeñando así un papel clave en el sistema visual [2]. Una imagen detallada en la retina sólo puede formarse si los rayos de luz refractan primero a través de una superficie corneal clara y lisa, y la última depende de la protección proporcionada por su ambiente mucosal. Con este fin, el limbo circundante a la córnea y la conjuntiva están armados con todos los componentes del sistema inmunitario debido a que la SO está continuamente expuesta a patógenos [3]. La barrera ocular superficial es el terreno de comunicación entre células de la inmunidad local y sistémica y entre células mesenquimales y epiteliales que mantienen la homeostasis [4].

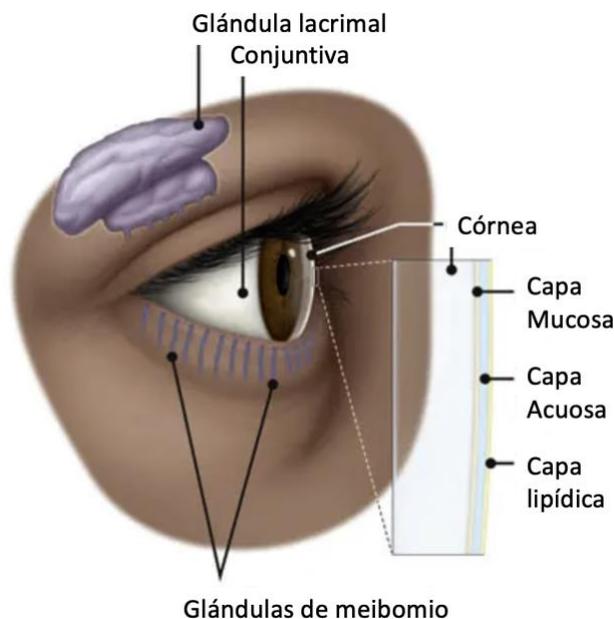


FIGURA 1. COMPONENTES DE LA SUPERFICIE OCULAR

**Figura 1. Componentes de la superficie ocular.** Se observa la córnea, conjuntiva y film lagrimal, así como las 3 capas del film lagrimal. La capa más próxima a la córnea corresponde a la capa mucosa. La capa en contacto directo con el aire es la capa lipídica la cual disminuye la evaporación de la capa acuosa que se encuentra entre ambas. Imagen tomada de [www.aaopt.org](http://www.aaopt.org).

La SO también podría ser pensada como un revestimiento mucosal especializado, y como tal, comparte mecanismos homeostáticos y patológicos con otras mucosas.

### LA CONJUNTIVA

La conjuntiva es una membrana mucosa fina y flexible que se extiende desde la superficie interna de los párpados hasta el limbo esclero-corneal. La conjuntiva que recubre los párpados interiormente se denomina conjuntiva tarsal y la que recubre el globo ocular se denomina conjuntiva bulbar. La vascularización la recibe de ramas de las arcadas marginales de los párpados (tarsal) y de las arterias ciliares anteriores (bulbar). Las conexiones linfáticas de la conjuntiva son paralelas a las de los párpados drenando a los nódulos linfáticos preauriculares y submandibulares y la inervación sensorial la recibe del V par craneal[5].

Histológicamente, la conjuntiva es similar a otras membranas mucosas y se compone de un epitelio estratificado no queratinizado de dos o más capas sobre un estroma formado por tejido conectivo fibrovascular que contiene vasos, nervios y linfáticos y donde residen las células dendríticas (CD) locales [6]. En la capa basal del epitelio se observan melanocitos que producen melanina y la inyectan a las células de alrededor. A lo largo de todo el epitelio se pueden observar células caliciformes, encargadas de producir el componente mucoide del film lagrimal, que son más numerosas en la porción ínfero nasal de la conjuntiva bulbar (Figura 2)[6].

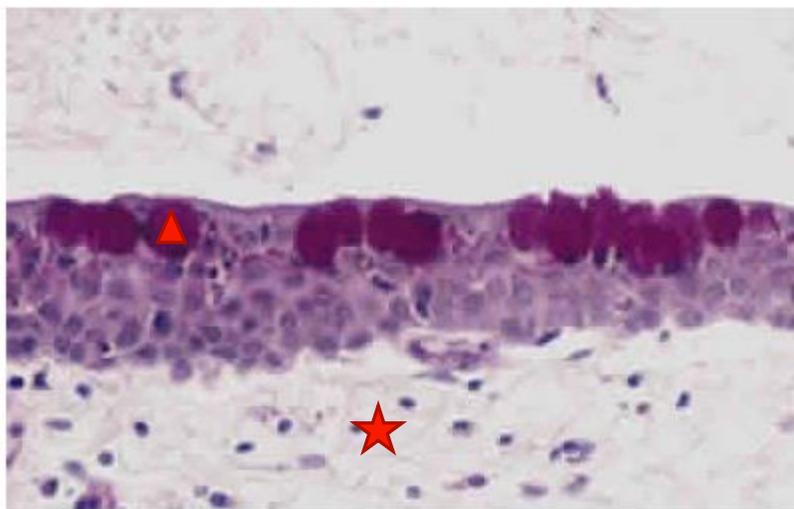


FIGURA 2. EPITELIO CONJUNTIVAL

**Figura 2. Epitelio conjuntival.** Se observa un epitelio cilíndrico poli-estratificado con abundantes células caliciformes (triángulo) sobre un tejido conectivo fibrovascular (estrella)[7].

A lo largo de la conjuntiva bulbar existe una capa linfoide que en algunas zonas forma agregados especializados llamados Tejido Linfoide Asociado a Conjuntiva (Conjunctival-associated Lymphoid Tissue -CALT) correspondiente al Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (Mucosa-associated Lymphoid Tissue -MALT) de otras regiones del organismo, formados por acúmulos de linfocitos T y B [4, 8].

---

## LA CÓRNEA

---

La córnea es una membrana mucosa modificada que cubre la porción anterior del ojo. Es un tejido altamente especializado que mantiene la transparencia necesaria para generar una imagen lo más precisa posible que se proyecte en la retina [2]. Se compone histológicamente de distintas capas las cuales yendo de la superficie a la profundidad del ojo son las siguientes (Figura 3):

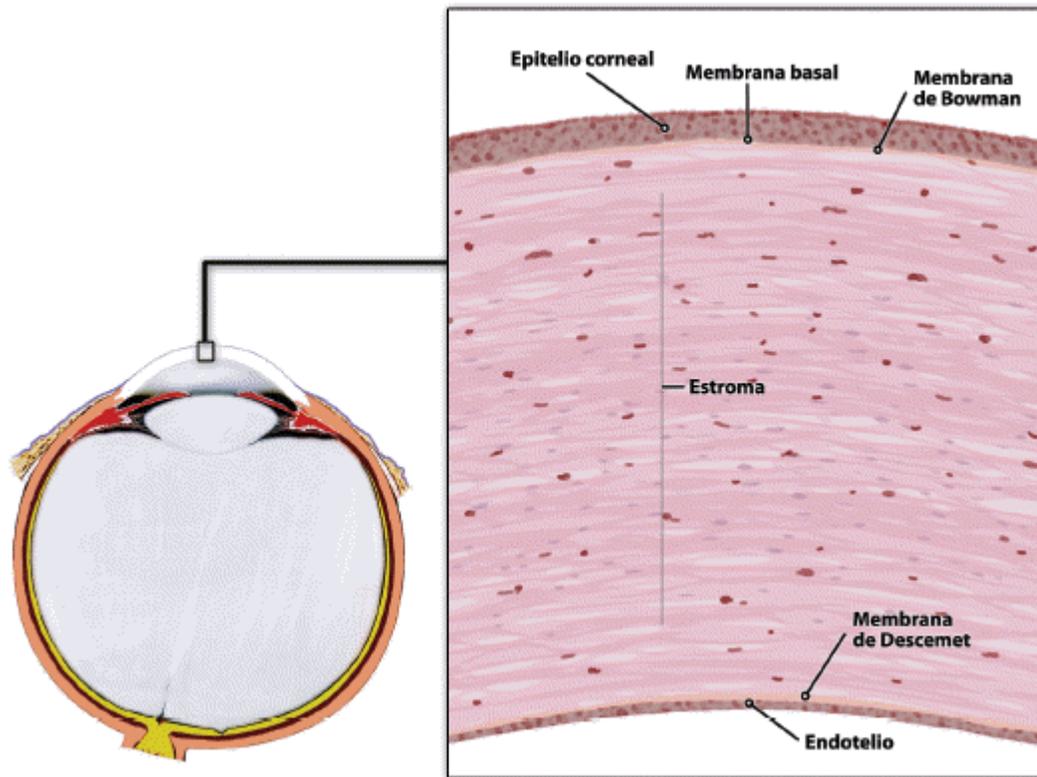


FIGURA 3. DIAGRAMA DE LAS DISTINTAS CAPAS QUE CONFORMAN LA CÓRNEA

**Figura 3. Diagrama de las distintas capas que conforman la córnea.** De la superficie a la profundidad se observa el epitelio corneal detallándose las diferentes capas: Epitelio corneal, membrana basal del epitelio corneal, membrana de Bowman, estroma corneal, membrana de Descemet y endotelio [9].

i) El epitelio es la capa más superficial. El mismo es estratificado no queratinizado y se compone de aproximadamente 5 capas de células. Se encuentra altamente inervado por fibras nerviosas que censan dolor (estímulos nociceptivos).

ii) La membrana de Bowman. Es una capa acelular gruesa por debajo de la membrana basal del epitelio. Se compone principalmente de fibras de colágeno tipo I.

iii) El estroma, que constituye aproximadamente el 90% de la córnea. Está formado por glucosaminoglicanos y una gran cantidad de fibras de colágeno dispuestas de forma paralela a la superficie de la córnea.

iv) Los queratinocitos, presentes entre las fibras de colágeno. Son células aplanadas con muy poco citoplasma. También encontramos axones y células de Schwann que los rodean en la parte más anterior y medial del estroma corneal. En condiciones normales el estroma corneal posee un 71% de colágeno tipo I, aunque también encontramos otros como el colágeno tipo III [2].

Las aproximadamente 300 láminas de fibras de colágeno cruzan de limbo a limbo. La disposición de las fibras es ortogonal en la parte más posterior, lo que da al estroma corneal una gran transparencia, fundamental para cumplir su función refractiva [2].

La membrana de Descemet es la membrana basal del endotelio corneal. La misma se secreta por el endotelio y se engrosa a lo largo de la vida para llegar a medir alrededor de 17 micrómetros en adultos. Se compone de colágeno de tipo IV, laminina y fibronectina. Su función fundamental es la de dar soporte y adhesión a las células del endotelio. Finalmente, el endotelio recubre la superficie posterior de la córnea. Se compone de una monocapa de células epiteliales cuboideas. Es fundamental en mantener la transparencia corneal al mantener el estroma corneal relativamente deshidratado bombeando el sodio fuera de la córnea hacia el humor acuoso del ojo. El sodio es seguido pasivamente por los aniones de cloro y el agua [2].

## EL SÍNDROME DE OJO SECO

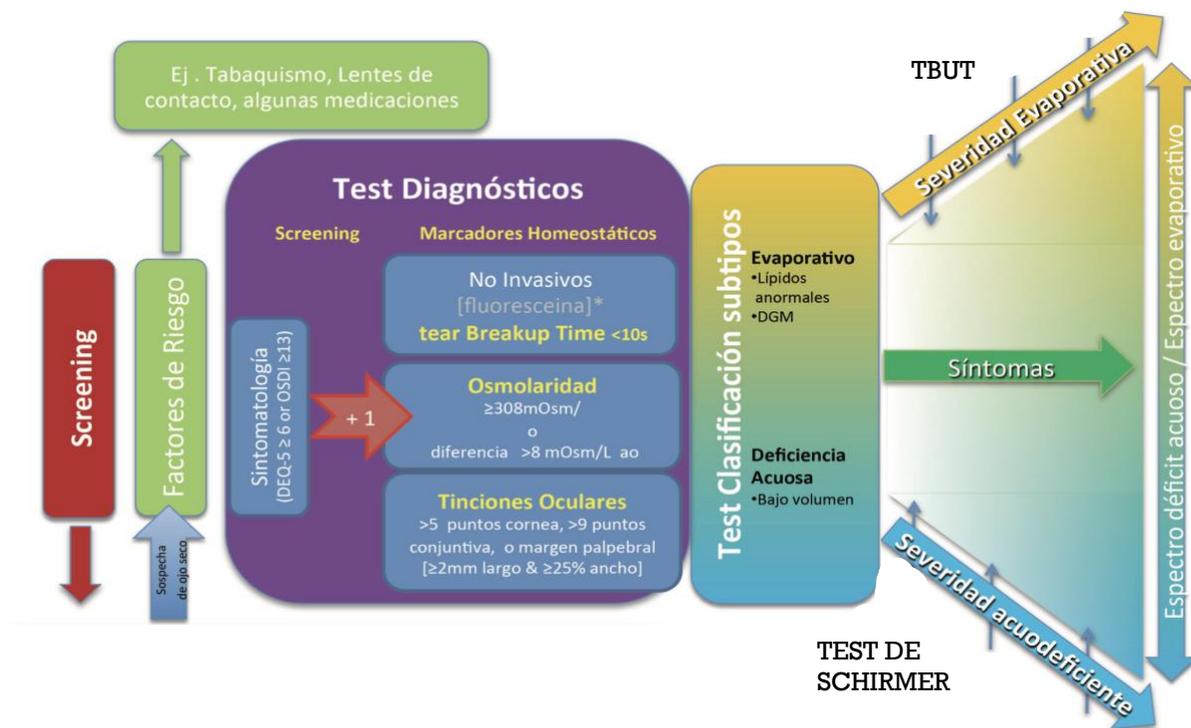
---

El síndrome de ojo seco (SOS) se define como una “enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por la pérdida de homeostasis del film lagrimal y acompañada de síntomas oculares, que comprenden: 1) la inestabilidad del film lagrimal (traducido por un tiempo corto de rotura lagrimal); 2) la hiperosmolaridad; 3) la inflamación y daño de la superficie ocular (valorado por la tinción de la superficie ocular); y 4) anormalidades neurosensoriales son todos factores etiológicos” según lo acordado en el segundo taller de la sociedad de ojo seco, superficie ocular y film lagrimal (TFOS – DEWS II, por su sigla en Inglés) en 2019 [1]. Por otra parte, el ojo seco fue también definido más recientemente por la sociedad asiática de ojo seco como una “enfermedad multifactorial caracterizada por la inestabilidad de la película lagrimal como principal mecanismo causando: 1) un número de síntomas y/o 2) distorsión visual, potencialmente acompañado de daño de la superficie ocular” [10]. La importancia de esta nueva definición radica en la ausencia de determinado score necesario en las diferentes pruebas clínicas que detallaremos más adelante para llegar al diagnóstico.

## TESTS CLÍNICOS QUE DEFINEN EL SOS

TFOS DEWS II recomienda una secuencia de pruebas diagnósticas y evaluación de severidad del ojo seco (Figura 4). El proceso diagnóstico primero utiliza preguntas de cribado o screening (ver anexo I) para excluir condiciones que simulan SOS. El diagnóstico de SOS luego requiere una puntuación positiva en alguno de los dos cuestionarios de sintomatología (OSDI o DEQ5), seguido de al menos un criterio clínico positivo: disminución del tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT), elevada o significativa disparidad de osmolaridad entre ambos ojos o tinción anormal de la superficie ocular.

FIGURA 4. ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE OJO SECO PROPUESTO POR EL TFOS DEWS II



*Figura 4. Algoritmo diagnóstico de ojo seco propuesto por el TFOS DEWS II. Adaptado de Ocular Surface (2017) [1].*

Se puede valorar en la consulta oftalmológica de manera sencilla el daño presente en la superficie corneal, mediante el uso de distintas tinciones que detallaremos a continuación. También es posible valorar la estabilidad de la película lagrimal mediante otras técnicas de fácil acceso e interpretación y bajo costo. Estas pruebas clínicas aportan información y son parte de los pilares diagnósticos del SOS de acuerdo con TFOS - DEWS II.

## TINCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR

La tinción de la superficie ocular es una técnica sencilla y accesible para evaluar la integridad de la córnea y la conjuntiva. Se utilizan principalmente para valorar daño de estos tejidos como ocurre en ulceraciones o desecación y se han visto asociaciones entre las tinciones y la expresión de determinadas mucinas como mencionaremos más adelante. Las tinciones utilizadas más frecuentemente son la fluoresceína sódica, el rosa de bengala y el verde de lisamina. La presencia de un glicocálix intacto junto con uniones estrechas intercelulares íntegras es necesaria para evitar que las tinciones penetren en capas celulares más profundas [1].

### VERDE DE LISAMINA

El verde de lisamina al 1% es una tinción no tóxica, que traduce la vitalidad del epitelio y se considera la tinción ideal para detectar la presencia de células muertas o degeneradas. A diferencia del rosa de bengala, no afecta la viabilidad de las células epiteliales. El verde de lisamina tiñe únicamente las células cuando su membrana se encuentra dañada, sin importar la integridad del mucus que las recubre. Este colorante tiene una sensibilidad comparable al rosa de bengala para detectar daño celular. Asimismo, esta tinción se correlaciona de forma significativa con la presencia de síntomas relacionados a la sequedad ocular medida por el cuestionario de OSDI (Ocular Surface disease index)[1].

### FLUORESCEÍNA SÓDICA

La fluoresceína sódica es la tinción más apropiada y la más utilizada para evaluar el daño del epitelio corneal. La fluoresceína es soluble en agua y es capaz de penetrar en los tejidos cuyas uniones estrechas intercelulares se encuentran dañadas. Por lo tanto, actualmente, la recomendación es usar fluoresceína para la tinción corneal y verde de lisamina para la tinción conjuntival [1].

### ROSA DE BENGALA

El rosa de bengala al 1% no sólo tiñe regiones donde hay una disrupción del glicocálix sino también tiñe células epiteliales sanas las cuales no están protegidas por una capa de mucina suficiente y por lo tanto no se considera una tinción que traduzca vitalidad del epitelio. A su vez, se ha visto que la tinción depende de la dosis de rosa bengala aplicado, pudiendo confundir los resultados. Esta tinción, desafortunadamente, es también tóxica para el epitelio y causa gran irritación cuando es utilizada y se ha prácticamente discontinuado su uso [1].

## ESCALA DE QUERATOPATÍA DE OXFORD

La severidad de queratopatía, o sea, del daño de la superficie ocular, se puede determinar con diferentes escalas. La escala de Oxford (ver Figura 5) es una forma rápida y simple de hacerlo. La misma permite asignar un grado de 0 a 5 según el daño de las células epiteliales. Luego de instilar la tinción (ya sea verde de lisamina, rosa de bengala o fluoresceína) se compara el patrón de daño visible con ilustraciones de cada nivel de daño y se le asigna un score[1].

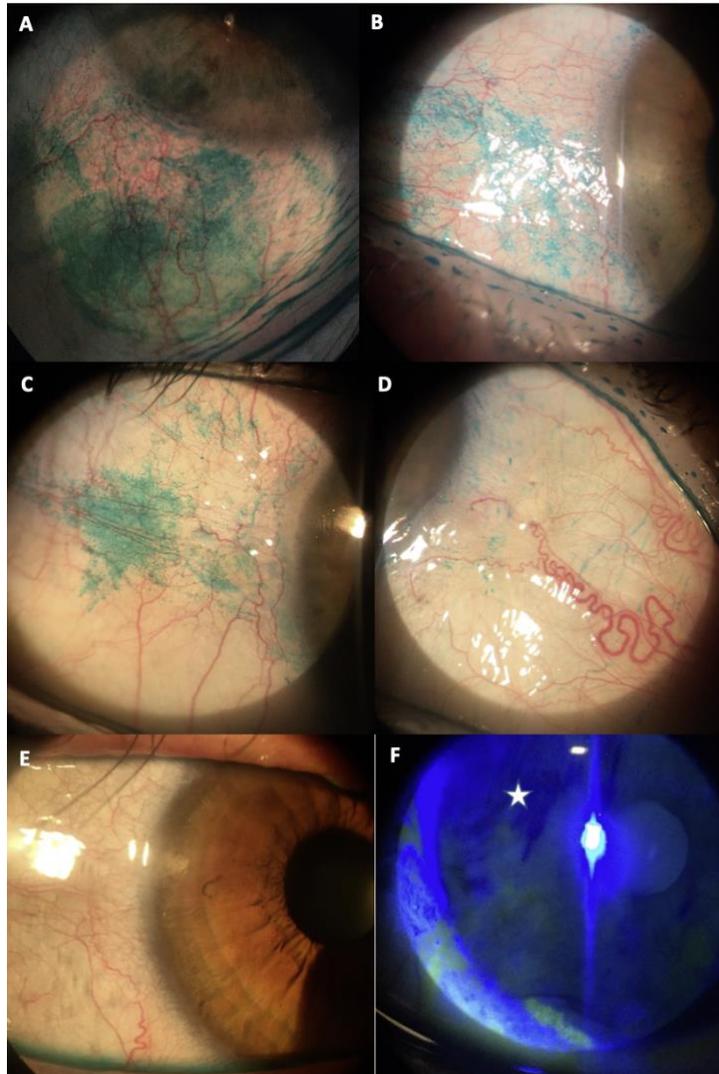


FIGURA 5. ESTADIFICACIÓN DEL DAÑO DE LA SUPERFICIE OCULAR

**Figura 5. Estadificación del daño de la superficie ocular.** A- E: Se utilizó verde de lisamina para tinción de la superficie ocular. Se observa en A daño grado 4 en la escala de Oxford, en B un grado 3, en C un grado 2, en D un grado 1 y en E un grado 0 (sin daño visible). En la imagen F se observa la superficie corneal con tinción de fluoresceína para valorar el tiempo de rotura del film lagrimal - la estrella marca disrupción del film lagrimal como se observa en la lámpara de hendidura con luz de azul cobalto. Imagen de producción propia obtenida personalmente durante nuestro estudio.

## EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL FILM LAGRIMAL

### TIEMPO DE ROTURA DEL FILM LAGRIMAL

La estabilidad del film lagrimal se mide tradicionalmente mediante el tiempo en que demora el film lagrimal que recubre la córnea en romper. Se determina mediante la aplicación de tinción de fluoresceína (solución de fluoresceína al 2% diluida en suero fisiológico) y sin anestesia, se determina el tiempo transcurrido hasta el inicio de signos de ruptura del menisco lagrimal (TBUT, por su nombre en inglés: tear break up time) (ver Figura 6). El valor del TBUT en sujetos normales es de 10 o más segundos. La sensibilidad y la especificidad de la prueba TBUT para el diagnóstico de SOS llega a alcanzar un 75% y 60% respectivamente [11].

Investigaciones recientes sugieren que el patrón de rotura del film lagrimal (linear, punteado, etc.) tendría relación con el mecanismo causal del SOS [12]. Por ejemplo, los patrones de rotura punteados estarían más asociados a ojos secos secundarios a inflamación, más que a inestabilidad del film lagrimal. La inflamación, al inducir apoptosis y necrosis de las células epiteliales de la superficie, resultaría en una hidrofiliidad irregular de la SO rompiendo el film lagrimal en un patrón punteado correspondiente a las regiones más hidrofóbicas. Por otra parte, patrones de rotura azarosos, sin una consistencia, se relacionarían más a una inestabilidad intrínseca del film lagrimal [12].

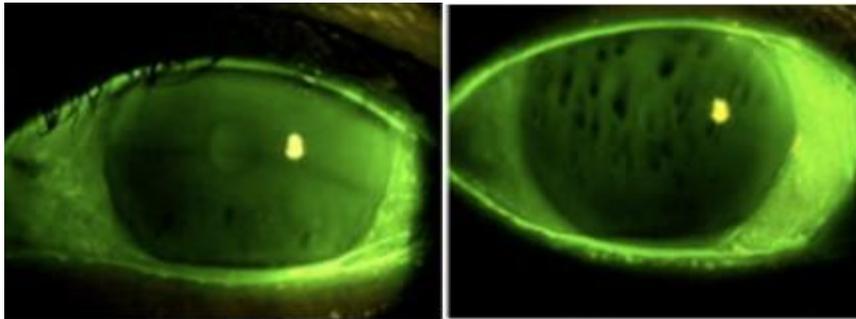


FIGURA 6. TEST DE TIEMPO DE ROTURA DE LA PELÍCULA LAGRIMAL.

**Figura 6. Test de tiempo de rotura de la película lagrimal.** El tiempo de ruptura de la película lagrimal (TBUT: tear break up-time) es una prueba para el diagnóstico de ojo seco que traduce la estabilidad del film lagrimal. En la imagen se observan roturas en el film lagrimal mediante el uso de fluoresceína y luz de azul cobalto [12].

## VALORACIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA ASOCIADA AL SOS

---

En relación con la sintomatología, evaluada con el cuestionario OSDI (por su sigla en inglés: ocular surface disease index), se establece el diagnóstico de ojo seco leve con un score mayor o igual a 13 y menor a 22, moderado de 23 a 32 y severo mayor a 33 [1]. En este cuestionario también se aborda como el SOS interfiere en la calidad de vida de los pacientes.

### TEST DE SCHIRMER

---

La prueba de Schirmer es tradicionalmente una medida de la producción acuosa lagrimal y es útil en la diferenciación entre el SOS por déficit de producción de lágrima y el causado por mayor evaporación del film lagrimal (Figura 7). Para el intervalo de confianza del 99%, los valores medios de secreción lagrimal, en individuos que se esperaba que tuvieran secreción normal, fueron mayores de 10 mm en 2 minutos y mayores de 13 mm en 5 minutos (nivel de significación 1% o  $\alpha = 0,01$ ) [13].



FIGURA 7. TEST DE SCHIRMER

**Figura 7. Test de Schirmer.** Se observa la colocación de papel de filtro graduado en milímetros a nivel del fórnix palpebral inferior y la medida de hasta dónde se encontraba la misma mojada por lágrima luego de 5 minutos. Se considera normal una producción de lágrima mayor a 20 mm, insuficiente un resultado a menor a 13mm y un resultado indeterminado o probablemente insuficiente entre 13 y 20 mm.

Imagen obtenida de [https://institutodelavision.cl/portfolio\\_page/test-de-schirmer/](https://institutodelavision.cl/portfolio_page/test-de-schirmer/)

## CLASIFICACIÓN DEL SOS

Existen dos variedades de SOS que se definen por: 1) una deficiencia en la producción de la lágrima, como por ejemplo los de etiología autoinmune, causada principalmente por pacientes con Síndrome de Sjögren (SS) primario o secundario (cuando está asociado a otras enfermedades autoinmunes), Pénfigo Ocular Cicatrizal o enfermedades autoinmunes órgano-específicas como tiroiditis de Hashimoto, hepatopatía autoinmune y enfermedad celíaca; o 2) un aumento de evaporación de la lágrima como en la disfunción de las glándulas de Meibomio (DGM) la cual es la principal causa de SOS no autoinmune por alteración en la capa lipídica de la lágrima [1]. Esta clasificación se ilustra en la Figura 8. Nosotros limitaremos nuestro estudio al síndrome de ojo seco secundario a SS (SOS - SS), ya que es una de las causas más frecuentes del SOS en nuestro medio. En adelante, denominaremos (SOS- no SS) a otras etiologías autoinmunes de ojo seco no vinculadas al SS.



FIGURA 8. CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE OJO SECO.

**Figura 8. Clasificación de los tipos de ojo seco.** Existen dos variedades de SOS que se definen por: 1) una deficiencia en la producción de la lágrima o 2) un aumento de evaporación de la lágrima como en la disfunción de las glándulas de meibomio.

## EL SÍNDROME DE SJÖGREN Y EL SOS

El SS es un desorden autoinmune caracterizado por la infiltración linfoplasmocitaria crónica principalmente de las glándulas lagrimales y salivales que lleva a la sequedad bucal y ocular [14]. Se trata de una enfermedad predominante en mujeres, con una proporción de 1 hombre por cada 10 mujeres [15]. Los criterios diagnósticos para el SS se detallan en la Tabla 1. El SS secundario es aquel que ocurre en concomitancia con otro diagnóstico de una enfermedad del tejido conectivo como por ejemplo lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis sistémica (ES) o artritis reumatoide (AR) más frecuentemente [16].

**Tabla 1. Criterios diagnósticos del Síndrome de Sjögren (SS). Pacientes que presentan un score de 4 o más cumplen con el diagnóstico de SS. La puntuación de tinción ocular de 5 corresponde (aproximadamente) a una escala de Oxford score 2 [17].**

TABLA 1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DEL SÍNDROME DE SJÖGREN

Item	Score
Sialoadenitis linfocítica focal en glándula salival menor con $\geq 1$ foco linfocítico/4 mm <sup>2</sup> de tejido glandular	3
Anti-SSA/Ro positivo	3
Puntuación de tinción ocular $\geq 5$ (o $\geq 4$ según escala de Bjsterveld) en al menos un ojo	1
Test de Schirmer $\leq 5$ mm/5 minutos, en al menos un ojo	1
Flujo salival sin estimular $\leq 0,1$ ml/minuto	1

Se ha propuesto que el mecanismo troncal de la patología SOS en el SS sería una epitelitis autoinmune de las células de las glándulas exócrinas, incluyendo las glándulas lagrimales y posiblemente también en las glándulas de Meibomio oculares en las cuales las células epiteliales de la mucosa conjuntival actuarían como células no profesionales presentadoras de antígenos [18]. Existiría una expresión aberrante de autoantígenos expresados en las glándulas exócrinas y mucosa epitelial lo cual llevaría a la infiltración del tejido por linfocitos T autorreactivos que median la destrucción epitelial. Este mismo mecanismo se observa también en las glándulas salivales de estos pacientes [18].

Es importante destacar que aproximadamente el 5% de los pacientes con SS desarrollan linfoma de células B con el tiempo, ya que presentan entre 15 y 20 veces más probabilidades de desarrollar este tipo de cáncer que el resto de la población [15]. Esto estaría vinculado con la estimulación y activación crónica de los linfocitos B aumentando el riesgo de la generación de una mutación oncogénica y la selección monoclonal de esta línea [15].

A su vez, se ha visto que existe un riesgo aumentado 3.6 veces de presentar SS si se tiene un diagnóstico de tiroiditis, esto no se denomina en sí SS secundario, ya que la tiroiditis no se considera una patología del tejido conectivo [19]. También se observó que la prevalencia de SS entre los pacientes con hepatitis

autoinmune es del 7%, comparado con la prevalencia en la población general estimada entre el 0.5 al 1% [20].

---

## SÍNDROME DE SJÖGREN SECUNDARIO

---

Por definición, el Síndrome de Sjögren secundario (SSS) se asocia a otra enfermedad autoinmune reumatológica, las más frecuentemente asociadas son la artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES) y esclerosis sistémica (ES). La AR es una enfermedad sistémica inflamatoria, caracterizada por sinovitis persistente, inflamación sistémica y la presencia de autoanticuerpos (factor reumatoide y anti-péptidos cíclicos citrulinados). La prevalencia va del 0.5 al 2% de la población general. Estos pacientes poseen una prevalencia de SS del 4 al 50% [21]. El SOS es la manifestación ocular más frecuente en pacientes con AR y este es 9 veces más frecuente en mujeres [22]. La probabilidad de presentar SOS secundario a AR aumenta con la duración de la enfermedad [23]. Sin embargo, no se ha demostrado asociación entre la severidad de la AR y la prevalencia de SOS [24]. El mecanismo del ojo seco en pacientes con AR es diferente del de SS y podría ser el resultado de una patología local que afecta el líquido lagrimal, la conjuntiva o la córnea. Sin embargo, se sabe que las lágrimas de los pacientes con SS secundario a AR presentan un aumento en los niveles de IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  [25].

El LES es una enfermedad autoinmune, crónica y multisistémica que afecta de 6 a 10 veces más a mujeres en edad fértil [26]. La incidencia de SS secundario a LES es de aproximadamente el 14 % [27]. Los niveles elevados de anticuerpos anti-ADN bicatenario (anti-ADNs) y la velocidad de sedimentación globular, así como la depresión en los niveles de complemento (C3 y C4) [28] se utilizan comúnmente para predecir el brote de lupus y evaluar su actividad. Chen et al. encontraron que en pacientes con LES sin SS secundario, el progreso de la gravedad del SOS era consistente con títulos de anticuerpos anti-ADNs y niveles bajos de C3, pero no con niveles bajos de C4, velocidad de sedimentación globular y anticuerpos antinucleares (ANA) [29]. El LES no sólo altera la densidad y la morfología de las células de Langerhans corneales, sino que también interfiere con la homeostasis corneal y podría contribuir al desarrollo del ojo seco [30]. El LES tiende a presentarse con múltiples factores de ojo seco inducido, incluidos trastornos de la glándula lagrimal, la córnea y las glándulas de Meibomio.

La ES, es una enfermedad reumática inmunomediada que se caracteriza por fibrosis y vasculopatía de la piel y los órganos internos [31]. La proporción de mujeres con ES es tres veces mayor que la de hombres [32]. Esta enfermedad involucra diferentes órganos, incluidos los ojos y los tejidos perioculares. El ojo seco es la manifestación ocular más común de la ES [33]. El ojo seco relacionado con la ES probablemente se deba a la fibrosis de la conjuntiva y las glándulas lagrimales [33]. Según un estudio histológico, la fibrosis de la conjuntiva se asocia con la desgranulación de los mastocitos [34]. El ojo seco por SS primario y el ojo seco por ES comparten un mecanismo similar ya que el conducto de la glándula lagrimal primaria está involucrado en ambos. Sin embargo, la infiltración linfocítica en la glándula es más escasa en la ES [35], lo que puede usarse para diferenciar la ES y el ojo seco primario relacionado con la SS. La presencia de fibrosis sugiere ES, mientras que la infiltración linfocítica es un signo crítico de SS primaria [36]. Debido a que la ES está relacionada con la neuropatía periférica, se ha propuesto que los pacientes con ES pueden tener una sensación corneal disminuida, lo que puede explicar la falta de correlación entre los signos y síntomas del ojo seco [35]. Además del deterioro de la capa acuosa de la película lagrimal debido a la fibrosis de la glándula lagrimal [33], la blefaritis y la DGM son otros factores del ojo seco relacionado con la ES.



## GENERALIDADES DE LA INMUNIDAD EN MUCOSAS

---

Las mucosas son sitios que constituyen interfaces de contacto entre el organismo y antígenos exógenos, por lo tanto, se encuentran armadas con un potente mecanismo de respuesta inmunitaria. Sin embargo, la inflamación puede tener efectos contraproducentes en la superficie ocular comprometiendo la transparencia corneal, impidiendo total o parcialmente la visión. La mayor parte del tiempo, la respuesta inmunitaria local está establecida de manera de reconocer los antígenos presentes en un contexto de tolerancia. Tanto para poner en marcha una respuesta de tolerancia como de inflamación, la respuesta inmune es iniciada y direccionada por células presentadoras de antígenos estromales, principalmente células dendríticas (CD) residentes, las cuales están condicionadas por citoquinas producidas por el epitelio conjuntival y corneal. Existen diferentes subtipos de CD epiteliales y estromales que han sido asociados a respuestas patogénicas o tolerogénicas. En la mucosa intestinal, hay evidencia que demuestra que las mucinas del lumen desencadenan cascadas de señalización tolerogénicas a través de sus residuos glucídicos así como el pasaje de antígenos a través de las células caliciformes, para finalmente ser captadas por las CD[37].

La inmunotolerancia a un antígeno determinado es llevada adelante por linfocitos T reguladores (Treg) los cuales inhiben células de la inmunidad innata, CD y linfocitos B y T efectores, los cuales son los principales encargados de llevar adelante una respuesta inflamatoria. Dentro de los Treg existen aquellos que se originan en el timo (Tregs centrales o naturales) y otros que se originan en órganos linfoides periféricos a partir de linfocitos T *naive* los cuales interactúan con CD tolerogénicas (Tregs periféricos o inducibles). La mayoría de los Tregs expresan determinadas proteínas en su membrana o factores de transcripción como son CD4, Foxp3 y CD25, sin embargo, otros Tregs inducibles son CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> (Tr1). Asimismo, hay Tregs que son CD8<sup>+</sup>. La contribución de cada subtipo de linfocito Treg en la homeostasis mucosal varía en los diferentes órganos así como también difieren en el mecanismo de supresión de la respuesta inflamatoria [38].

## INMUNIDAD DE LA SUPERFICIE OCULAR

---

La integridad de la SO depende de mecanismos de defensa llevados adelante por componentes de la inmunidad innata y adaptativa. El film lagrimal atrapa antígenos y su continuo recambio a través del sistema de drenaje de la lágrima remueve los mismos de forma constante.

Por otra parte, el glicocáliz y las uniones estrechas en la porción apical de las células epiteliales de la córnea y conjuntiva sirven de barrera física y a su vez son componentes activos en la respuesta inmunitaria al secretar sustancias microbicidas así como péptidos y citoquinas que responden a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) y asociados a daño (DAMPS) a través de receptores de membrana tipo Toll (TLR) y tipo NOD (NLR) y a través de sus sistemas de señalización intracelular [39]. De manera importante, el epitelio de la SO expresa receptores de membrana que mantienen la inmunotolerancia local de forma constitutiva mediante la expresión del ligando de muerte programada (PD -1) el cual frena la infiltración linfocitaria y de esta forma reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias [40]. A su vez secreta el receptor factor de crecimiento vascular 3 (VEGFR3) así como el factor derivado del pigmento epitelial, los cuales previenen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos favoreciendo un efecto inmunorregulador [40].

Las células calciformes (CC) también cumplen un rol importante en la modulación de la respuesta inmune a través de la secreción de factor de crecimiento tumoral beta ( $TGF-\beta$ ) [40]. De manera opuesta, estas mismas células cuando son expuestas a la desecación secretan quimioquinas como CCL20, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 así como linfopoyetina estromal tímica que reclutan de la sangre preferentemente linfocitos T efectores tipo Th1/Th17 y secretan citoquinas pro inflamatorias como IL -1 $\beta$  y TNF $\alpha$  así como expresan ligandos de membrana que activan linfocitos *Natural Killer* (NK) y estimulan la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )[40]. De esta forma, las células de la SO funcionan como sensores de los cambios del microambiente para desencadenar respuestas inmunitarias adecuadas (Figura 9).

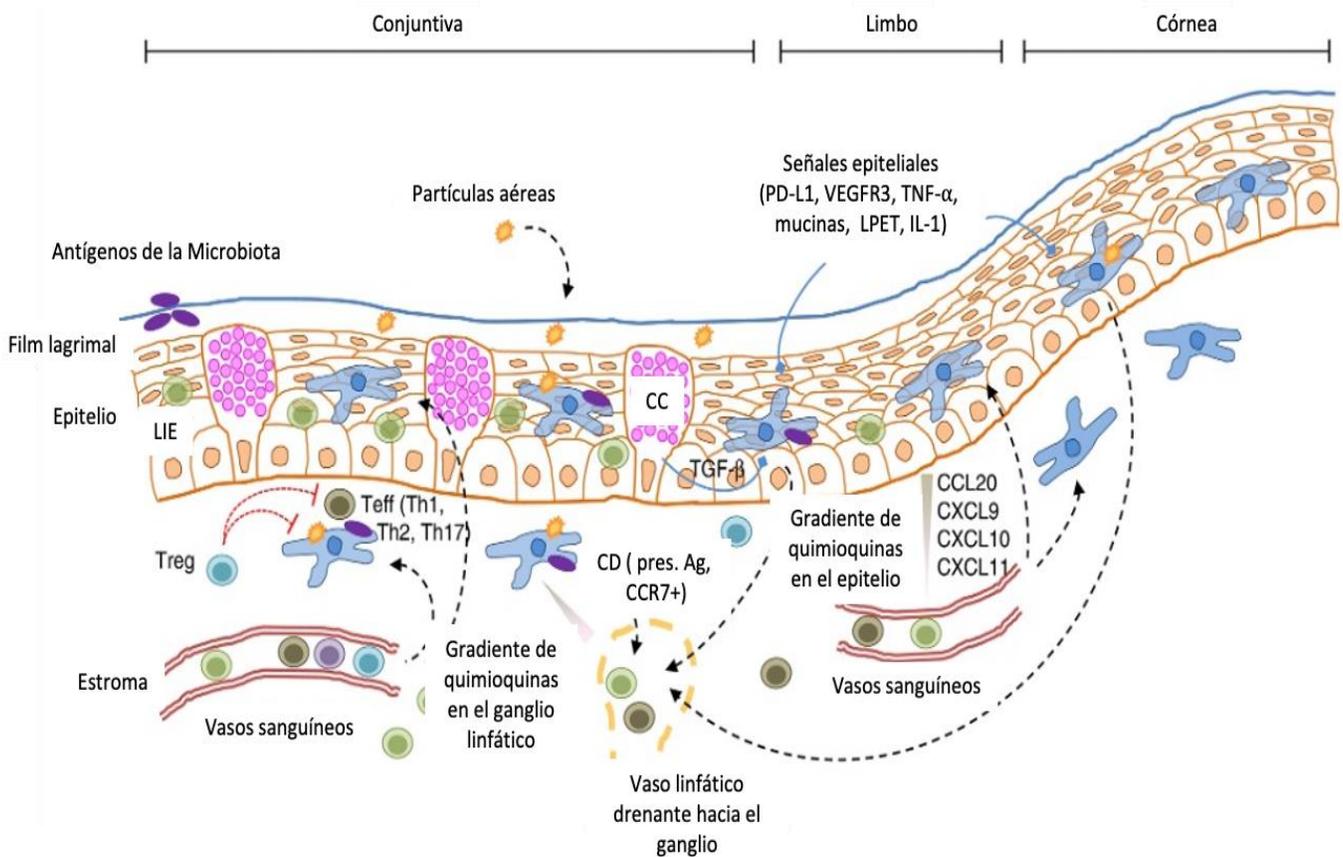


FIGURA 9. INMUNOTOLERANCIA EN LA SUPERFICIE OCULAR Y COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNITARIO

**Figura 9. Inmunotolerancia en la superficie ocular y componentes del sistema inmunitario.** Las partículas que llegan a la superficie ocular normal (provenientes de la microbiota o del aire) alcanzan el film lagrimal. Las células caliciformes (CC) y el epitelio corneal y conjuntival conforman la barrera para el ingreso de estos. Las células dendríticas (CD) residentes y los linfocitos intraepiteliales interactúan entre sí a través de mediadores solubles y receptores de membrana como el factor transformador de crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), la linfopoyetina estromal tímica (LPET), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), la interleuquina 1 (IL-1 $\beta$ ), el ligando de muerte celular programada 1 (PDL-1) y el receptor (3) del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR3) [40].

## LAS MUCINAS

### MUCINAS EXPRESADAS EN LA SUPERFICIE OCULAR

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular caracterizadas por su extensa O-glicosilación [41]. Estas recubren las mucosas en el cuerpo humano. En la superficie ocular, las mismas son secretadas por las CC y las glándulas lagrimales, así como también se expresan en la membrana apical de las células epiteliales conjuntivales y del epitelio escamoso corneal [42]. Estas mucinas poseen un dominio transmembranario hidrofóbico que mantiene la mucina anclada a la membrana. Presentan también un dominio citoplasmático corto y un dominio extracelular que alcanza el film lagrimal. Estas mucinas son las que conforman el glicocáliz [43, 44].

En la SO se han identificado hasta 10 tipos de mucinas diferentes. Estas pueden ser clasificadas en tres familias distintas: las mucinas transmembrana, aquellas formadoras de gel y las mucinas solubles. Las mucinas principales expresadas por los epitelios de la superficie ocular incluyen mucinas transmembrana, como MUC1, MUC4 y MUC16 [45-47], y la mucina formadora de gel MUC5AC [46] (Figura 10). Ésta última, así como las formas secretadas de las mucinas asociadas a la membrana celular como las ya nombradas, serían los principales componentes mucínicos de la SO.

Las alteraciones en la expresión de mucinas así como en la biosíntesis de sus O-glicanos se han descrito en trastornos de la SO, incluyendo alergia [48, 49], SOS no autoinmune [50, 51], SOS autoinmune [52, 53] e infecciones [54, 55], poniendo de manifiesto su función en la homeostasis de la SO. Interessantemente, MUC16 es la glicoproteína de mayor tamaño de todo el cuerpo humano, con un peso molecular de 20 MDa. Por su parte, el peso molecular de MUC1 y MUC4 es de 120-300 kDa y 900 kDa, respectivamente [56].

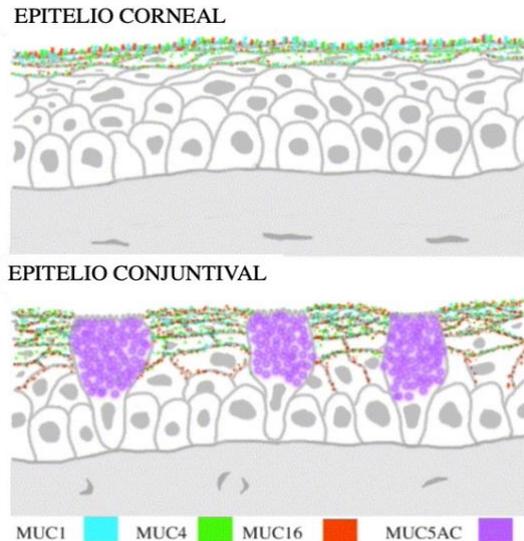


FIGURA 10. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUCINAS MÁS RELEVANTES DE LA SO

**Figura 10. Distribución de las mucinas más relevantes de la SO.** Arriba: epitelio corneal, no presenta CC. Abajo: epitelio conjuntival donde se observan las mucinas transmembranarias presentes en el epitelio corneal intercaladas por CC con MUC5AC en su interior la cual es luego secretada al film lagrimal.

---

## FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS MUCINAS EN LA SUPERFICIE OCULAR

---

Las mucinas cumplen un rol fundamental en la lubricación de la SO, al presentar un grueso glicocáliz electronegativo el cual mantiene las mucinas secretadas solubles en el film lagrimal fluidas al repelerlas de la superficie epitelial. Este se encuentra a lo largo de las microvellosidades del epitelio de la SO y puede extenderse hasta 500 nm desde la membrana plasmática. Un segundo componente del glicocáliz es una proteína de unión a  $\beta$ -galactósidos en estas mucinas, llamada galectina 3, la cual tiene una función estabilizadora [57]. La electronegatividad del glicocáliz está dada por la extensa O-glicosilación de las mucinas que lo conforman, la cual comprende del 50 al 80% de la masa molecular de las mucinas [57].

Tanto las mucinas secretadas como las asociadas a membrana serían fundamentales en mantener la homeostasis de la superficie ocular [58]. Por ejemplo, la mucina MUC5AC, es típicamente secretada, y tendría un rol fundamental en atrapar *debris* celular y material extraño a la superficie ocular incluyendo alérgenos y patógenos [59].

Las mucinas transmembranarias también están involucradas en la traducción de señales a través de su dominio extracelular, el cual es capaz de unirse a ligandos o interactuar con receptores que influyen en el crecimiento o diferenciación celular. De hecho, MUC1 contiene múltiples tirosinas plausibles de fosforilación, las cuales también pueden conformar vías de señalización para el crecimiento celular [57]. A su vez, MUC1 también puede interactuar con ICAM 1 (intercelular adhesión molecule 1) y puede reconocer y unirse a bacterias extracelulares. Por otro lado, MUC4 presenta dominios extracelulares similares estructuralmente al factor de crecimiento endotelial los cuales pueden unirse a los receptores ErbB2 y ErbB3 e inducir la proliferación epitelial [57]. En el caso de MUC16, su dominio citoplasmático se une al citoesqueleto de actina e interactúa con proteínas involucradas en la formación de microvellosidades y micropapilas responsables de la estabilización de la capa fluida lagrimal. Por último, las colas citoplasmáticas de MUC1, MUC3 y MUC16 se han detectado en el núcleo celular, sugiriendo poder ser liberadas de la membrana para modular factores de transcripción y proteínas regulatorias [57].

La expresión y estructura de las mucinas en la SO se modifica en presencia de un proceso patogénico [60, 61]. Por ejemplo, una deficiencia en la producción de mucinas estaría *a priori* relacionada con un aumento de la inflamación en la SO y sería causa, y a su vez consecuencia, de la misma: por una parte, una menor expresión de mucinas disminuiría su poder inmunorregulador y de aislamiento de las células epiteliales a potenciales antígenos lo cual genera inflamación. Por otra parte, estos mecanismos generarían alteraciones en el tipo y cantidad de mucina producida y secretada por las células. Es sabido, por ejemplo, que los procesos inflamatorios crónicos se asocian a pérdida de las CC así como a la queratinización de las células epiteliales y metaplasia [62]. Hay evidencia experimental que demuestra que los mediadores inflamatorios actúan directamente sobre las CC modulando su proliferación, diferenciación, apoptosis y otras funciones [63-65].

Las mucinas son actores clave en la calidad y la estabilidad de la película lagrimal. La alteración de la expresión de mucina unida a la membrana en las células epiteliales de la córnea y la conjuntiva y/o la secreción de mucina formadora de gel por las células caliciformes favorece las enfermedades de la superficie ocular y la enfermedad del ojo seco (EOS). Los cambios en la capa de mucina pueden provocar una mayor evaporación de las lágrimas, lo que eventualmente contribuye a la

hiperosmolaridad de las lágrimas, que se ha asociado con la inflamación de la superficie ocular. Los mediadores inflamatorios, a su vez, pueden tener un impacto negativo en la diferenciación, proliferación y secreción de mucina de las CCs generando un círculo vicioso. Como contribuyente a la homeostasis inmune de la superficie ocular, la pérdida de CCs puede contribuir al deterioro de la tolerancia inmune de la superficie ocular observado en el SOS. A pesar de esto, no existen herramientas en la práctica clínica habitual para explorar la deficiencia/desregulación de mucina en la superficie ocular. Por lo tanto, a la hora de seleccionar las opciones de tratamiento más adecuadas, existe una clara necesidad insatisfecha de comprender mejor la importancia de las mucinas y las opciones para su sustitución.

## EVALUACIÓN DE LA DEFICIENCIA DE MUCINAS EN EL EXAMEN CLÍNICO PARA DIAGNOSTICAR SOS

---

En la actualidad, no existe ninguna prueba clínica para evaluar específicamente la expresión de mucinas y la presencia y cantidad de CC. Existen, sin embargo, métodos indirectos para evaluar la calidad de la lágrima y el daño a la superficie ocular.

### IMPRESIÓN CITOLÓGICA

---

La impresión citológica (IC) es una técnica práctica y mínimamente invasiva para tomar biopsia del epitelio superficial ocular. A pesar de que no es una técnica específica de la detección de mucinas, puede ser utilizada para extraer las células de la superficie ocular para luego poder extraer su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y analizar la expresión génica de las mucinas. Se realiza luego de la aplicación de anestesia tópica y no presenta prácticamente contraindicaciones. Esta técnica fue introducida hace 46 años, en 1977, como forma de determinar el daño de la superficie ocular. Mediante este método se pueden recolectar células epiteliales, caliciformes y células inflamatorias de la superficie ocular [66]. El procedimiento se realiza mediante el uso de una tira de acetato de celulosa o filtros de papel de polietersulfona los cuales se aplican a la conjuntiva nasal y/o temporal (Figura 11). Esto remueve de una a tres capas de células conjuntivales. El espécimen puede luego procesarse tanto para la observación bajo microscopio fijando las células con etanol o formaldehído o se puede utilizar para múltiples diferentes ensayos incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y citometría de flujo [66]. A pesar de no ser uno de los test clínicos de primera línea en la evaluación de pacientes con SOS, la IC ha sido sugerida como la prueba con mayor especificidad, sensibilidad y valor predictivo positivo para el diagnóstico de SOS en comparación con el test de Schirmer, TBUT y tinción de rosa de bengala [66].



FIGURA 11. ILUSTRACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE IMPRESIÓN CITOLÓGICA CONJUNTIVAL

*Figura 11. Ilustración del procedimiento de impresión citológica conjuntival. Se observa cómo se contacta la superficie ocular con un papel de nitrocelulosa. Imagen de acceso público publicada por el instituto universitario de oftalmología aplicada (IOBA) de Valladolid, España.*

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE MUCINAS EN LA SUPERFICIE OCULAR

---

La cantidad de mucina producida depende de la síntesis, secreción y degradación de estas. Para que la capa mucosa del film lagrimal sea funcional, hay dos factores fundamentales: la cantidad y calidad de las mucinas que lo conforman. La cantidad de mucina, a su vez, depende de: 1) el número de células epiteliales o caliciformes capaces de responder a un estímulo mediante la secreción de mucinas (capacidad de respuesta y proliferación celular), y 2) la velocidad a la cual pueden producirlas. Por otra parte, la calidad de la mucina depende de la estructura y tipo de mucina secretada, así como de su hidratación [66]. Esta última depende de la secreción de agua y electrolitos por el epitelio conjuntival.

---

### REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE MUC5AC

---

MUC5AC es la principal mucina formadora de gel en la lágrima y es producida y secretada exclusivamente por las CC [59, 66]. La producción de esta mucina es rápidamente estimulada por agentes ambientales incluyendo alérgenos, estimulación de las terminales nerviosas en la superficie ocular, mediadores inflamatorios, cambios en la temperatura y osmolaridad. En condiciones normales la secreción de esta mucina es parte de un reflejo de la estimulación de las terminales nerviosas presentes en la córnea y conjuntiva, activando los nervios parasimpáticos [59, 67]. La secreción de MUC5AC es inducida por receptores muscarínicos (M1, M2 y M3) que están expresados en la superficie de las CC. La inflamación neurogénica es producida principalmente a través de la liberación de neuromoduladores como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina los cuales llevan a la desintegración de la barrera hemato-tisular con generación de edema y liberación de polimorfonucleares a la lágrima. Estas sustancias a su vez estimulan directamente la secreción de MUC5AC por las CC [67].

---

## REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MUCINAS TRANSMEMBRANARIAS

---

Las mucinas transmembranarias principales son MUC1, MUC4 y MUC16 como mencionamos anteriormente. Estas mucinas también han sido identificadas en el film lagrimal. Esto sucedería mediante el clivado de la porción extracelular y liberación de esta. Hay evidencia que sugiere la implicancia de diferentes mecanismos que controlan la síntesis y la secreción de estas mucinas [66]. Sin embargo, las vías de señalización intracelular involucradas en la producción de mucinas transmembrana no están del todo esclarecidas. A continuación, detallaremos las particularidades de lo que se ha logrado evidenciar en relación con la estimulación y vías de señalización que llevan a la producción de estas tres mucinas.

---

### REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MUC1, MUC4 Y MUC16

---

En relación a MUC1, en 2002 Jumblatt et al. publicaron la primera evidencia de la producción de esta mucina por la conjuntiva [68]. El ácido eicosanoico 15-(S)-hydroxy-5,8,11,13 (15(S)-HETE) estimula la secreción de MUC1 por las células conjuntivales, pero no de MUC2, MUC4 o MUC5AC [68]. Esto es consistente con que MUC1 tiene un mecanismo de secreción al film lagrimal diferente a estas otras mucinas. MUC1 se secreta luego del clivado del ectodominio y no mediante la fusión y liberación de gránulos a la membrana celular, como ocurre en las células caliciformes o, en el caso de MUC4, en las células epiteliales escamosas.

Por otra parte, se ha observado un aumento selectivo de MUC4 y MUC16, pero no de MUC1, al agregar ácido retinoico o suero al medio de cultivo de células conjuntivales humanas [69]. Otro estudio demostró que la dexametasona aumenta la expresión de MUC1 y MUC16 mientras que MUC4 la disminuye [70]. Con relación a la biosíntesis de MUC16, se ha visto que esta se regula post-transcripcionalmente por la vía de señalización de Notch. Sin embargo, esta vía no se está implicada en la biosíntesis de MUC1 ni de MUC4 [71].

La proliferación y apoptosis de las CC, así como la producción de mucinas por estas células, puede ser regulada por citoquinas producidas por células de la inmunidad innata y adaptativa [72]. Múltiples estudios en ratones sugieren que la pérdida de CC llevaría a una pérdida de la homeostasis y al desarrollo de inflamación crónica [73]. Existiría un pasaje de antígenos a través de las CC hacia las células presentadoras de antígenos, las cuales generarían tolerancia a los mismos al presentarlos en un contexto tolerogénico. El TGF $\beta$ 2 también se ha asociado al mantenimiento de la inmunorregulación observándose que las CC de la conjuntiva de ratones producen esta citoquina al estimular sus receptores tipo TLR4 [74].

En cambio, frente a situaciones en las que existe daño del epitelio, células epiteliales presentan antígenos junto con CD residentes en el estroma conjuntival favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1 y Th17. En estas situaciones, existe un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como por ejemplo el IFN $\gamma$  [73, 75]. Éste juega un rol central en la metaplasia conjuntival y la disminución del número de CC. Además, el estrés por la desecación produce un aumento de IFN $\gamma$  el cual a su vez induce una disminución de la producción de interleuquina (IL)-13, la cual está asociada a un rol protector en las CC [76]. En este sentido, se ha propuesto que una expresión constitutiva de IL-13 sería requisito para un control homeostático de las CC al estimular la producción de MUC5AC y MUC2 [76, 77].

Aunque aún no está clara la relación entre la expresión citoquímica y la de las diferentes mucinas de la SO, existe evidencia que demuestra que las citoquinas proinflamatorias regulan la expresión de mucinas. De hecho, la IL-1 $\beta$ , disminuye la producción de MUC16 [78], mientras que el IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-8 la aumentan [79].

También existe evidencia contradictoria con relación a MUC1. Por un lado, Albertsmeyer *et al.* reportaron que el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  regulan al alza la expresión de MUC1 [61]. Por otro lado, usando un modelo *in vitro* de células epiteliales de la córnea, se ha demostrado que la disminución de la expresión de MUC1 se correlaciona con el aumento de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  [80]. Entonces, la regulación al alza de MUC1 podría constituir una respuesta compensatoria a la inflamación. En este sentido, Corrales *et al.* han evidenciado que la expresión del gen de MUC1 tiene la mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de SOS proponiéndola como marcador diagnóstico [81].

Estudios previos han mostrado que las mucinas asociadas a la superficie ocular MUC1 y MUC16, suprimen las respuestas inmunes innatas mediadas por los receptores Toll-like (TLR)2 y TLR5 contribuyendo a la homeostasis de la superficie ocular [80]. Zhang *et al.*, además, demostraron que la severidad de los síntomas del SOS se correlaciona con menores niveles de expresión de MUC5AC y un aumento en la expresión de IL-6 [82].

Por otro lado, la glicosilación de las mucinas de la SO también se encuentra alterada en los pacientes con SOS, producto de una alteración en la expresión de glicosiltransferasas que participan en este proceso. El bloqueo en la síntesis de O-glicanos conduce a la liberación de Galectina-3 al film lagrimal a través de su interacción con los O-glicanos y manteniendo la estabilidad del glicocáliz. Por este motivo, se ha sugerido que la Galectina 3 podría constituir un biomarcador del SOS. Otro elemento

importante es que se ha observado que los niveles de metaloproteinasas de la matriz (MMP) 9 se encuentran aumentadas en estos pacientes. Estas metaloproteinasas degradarían la Galectina 3, aumentando los monómeros de Galectina 3 que interferirían en la oligomerización de mucinas [83].

## EXPRESION DE MUCINAS OCULARES EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN

---

Nuestro conocimiento actual sobre la expresión de mucinas de la SO en pacientes con SS sigue siendo escaso y conflictivo. En particular, en el SS también la evidencia sobre las modificaciones en la expresión de mucinas es contradictoria. Por un lado, Argueso *et al.* no observaron cambios significativos en la expresión de ARNm de MUC1 y MUC4 en las lágrimas de pacientes con SS y SOS, mientras que los niveles del ARNm de MUC5AC estaba disminuido, al compararlo con las lágrimas de individuos normales [52]. Caffery *et al.* observaron un aumento en la expresión de MUC1 y MUC16 en pacientes con SOS autoinmune no-SS al compararlos con individuos normales. Además, detectaron un aumento en la expresión del ARNm de estas mucinas en pacientes con SOS secundario a SS al compararlas con los no-SS y pacientes controles [84, 85]. En contraposición, Jones *et al.* encontraron una disminución en la expresión conjuntival de MUC1 en pacientes con SOS no-SS [86].

## EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LA LÁGRIMA DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN

---

Como mencionamos anteriormente, se ha visto que la respuesta inflamatoria en la superficie ocular, cuando existe daño del epitelio, tiene un perfil preferentemente tipo Th1 y Th17 [87]. En este sentido, ha sido reportado previamente que los niveles de IL-17 e IL-22 aumentan significativamente en las lágrimas de los pacientes con SOS, siendo estos valores mayores en aquellos pacientes con SOS autoinmune [87]. Además, se ha reportado que los niveles de IL-17 e IL-22 se correlacionan positivamente con el puntaje del cuestionario clínico OSDI (por las siglas en ingles de índice de enfermedad de la superficie ocular) y el puntaje de queratopatía, y negativamente con el tiempo de ruptura de la película lagrimal y el test de Schirmer I, tanto en pacientes SOS autoinmune, como SOS no autoinmune. Esto conduce a una asociación entre los niveles de IL-17 e IL-22 con la progresión de la enfermedad [87]. Sin embargo, se ha descrito también el rol favorable de IL-17 en la proliferación de CC, ya que puede inducir su proliferación, al igual que la IL-6 [88].

## POTENCIALES TRATAMIENTOS PARA RESTAURAR LA FUNCIÓN DE LAS MUCINAS

---

Existen varias opciones terapéuticas para el SOS. Dada la alta prevalencia de este síndrome, la cantidad de abordajes terapéuticos es muy vasta. Los tratamientos disponibles van desde colirios tópicos que aumentan la viscosidad de la lágrima hasta la oclusión de parte del párpado o el punctum lagrimal pasando por múltiples terapias para aumentar la secreción del componente lipídico de la lágrima (usando calor, radiofrecuencia, compresión mecánica de los párpados) así como anti-inflamatorios, secretagogos de diferentes componentes de la lágrima, hasta cámaras húmedas para mantener la humedad en la superficie ocular o incluso estimuladores eléctricos nasales que aumentan la secreción de la glándula lagrimal de forma refleja.

A continuación, nos limitaremos únicamente a mencionar aquellos relacionados con sustituir o estimular la producción de mucinas o involucrados directamente en la modulación de la respuesta inflamatoria en el SOS. Posteriormente, abordaremos brevemente los tratamientos inmunomoduladores más frecuentemente utilizados en pacientes con SS, así como con enfermedades del tejido conectivo, dado que una gran parte de nuestros pacientes se encuentran bajo dichos tratamientos.

---

### MOLÉCULAS MIMÉTICAS DE MUCINAS

---

Las moléculas miméticas de mucinas son geles lubricantes conteniendo polímeros que sustituyen parcialmente la función de las mucinas. Estos están diseñados para prevenir la desecación de la superficie y para disminuir la fricción. Existe una gran cantidad de opciones, dentro de las cuales la más utilizada es el ácido hialurónico. Otras alternativas son el ácido poliacrílico, la carboximetil celulosa, el dextrano, la hidroxipropyl-temil celulosa, el alcohol polivinil y el glicol polietileno [89]. No entraremos en el detalle de cada uno de éstos, ya que la variedad de opciones es muy amplia y nos limitaremos a decir que estos son los componentes de las llamadas lágrimas artificiales, las cuales son el tratamiento más frecuente y accesible del SOS.

---

### LUBRICINA

---

La lubricina (proteoglicano 4) es una glicoproteína tipo mucina que fue identificada en el fluido sinovial. Más recientemente fue también identificada en la SO y en las glándulas de meibomio. Es un agente lubricante altamente efectivo que funciona de forma sinérgica con el ácido hialurónico. En un estudio randomizado, doble ciego, realizado con 39 pacientes que fueron tratados durante 2 semanas con lubricina o con ácido hialurónico al 0.18%, se demostró que la lubricina es más eficaz en disminuir los síntomas de SOS y en mejorar el TBUT, la tinción con fluoresceína corneal y la irritación conjuntival [90].

---

### SECRETAGOGOS DE LAS MUCINAS

---

Los secretagogos de mucinas son drogas que específicamente mejoran el déficit en la expresión de mucinas. Los aprobados para su uso en humanos son: el diquafasol tetrasodio (DQS) y el rebamipide.

## DIQUAFOSOL TETRASODIO (DQS)

---

El DQS es un agonista del receptor purinérgico P2Y2 cuya estimulación induce la producción de mucinas por las CC y la secreción acuosa por las células epiteliales. Fue aprobado como una solución oftálmica al 3% en algunos países asiáticos como Japón y Corea del Sur. Esta molécula aumenta la expresión de MUC5AC, así como la expresión de mucinas transmembrana como MUC1, MUC4 y MUC16. El aumento en la expresión de estas mucinas tendría un efecto en el aumento de la viscosidad y disminución de la inflamación como se discutió anteriormente. Múltiples ensayos randomizados han demostrado que su uso mejora la tinción fluoresceínica y extiende el TBUT y el score en el test de Schirmer [91].

## REBAMIPIDE

---

El rebamipide, un derivado de la quinolona usado como citoprotector en el tratamiento de la gastritis, puede inducir la proliferación de CC y la expresión de mucinas en la conjuntiva bulbar [92]. También estimula la producción de prostaglandinas e inhibe la producción de especies reactivas del oxígeno, disminuyendo la inflamación. Por otro lado, induce la expresión génica de la ciclooxigenasa-2 y el factor de crecimiento endotelial, así como de su receptor. En ensayos *in vitro*, se ha observado que aumenta la expresión de MUC1, MUC4 y MUC16 en células conjuntivales humanas cuando éstas están dispuestas en monocapa en cultivo [93]. Los pacientes que reciben rebamipide al 2% presentan una mejoría en el test de verde de lisamina, tinción con fluoresceína, TBUT y síntomas de ojo seco desde la segunda semana de tratamiento en comparación con las mediciones previo al tratamiento [93].

Desafortunadamente, en nuestro medio no accedemos a ninguno de estos secretagogos de mucinas ni tampoco a la lubricina.

---

## INMUNOMODULADORES TÓPICOS OCULARES

---

El control directo de la inflamación es otra estrategia terapéutica del SOS. Se usan diferentes agentes inmunomoduladores tópicos en forma de colirio. A continuación, describiremos los más utilizados: la ciclosporina A y los esteroides tópicos.

---

### ESTEROIDES TÓPICOS

---

Los esteroides se han visto que son útiles en romper el círculo vicioso de respuestas inmunes en el SOS. Entre estos se encuentran la metilprednisolona tópica al 1%, la fluorometolona tópica al 0.1% y el loteprednol 0.5%.

Estas moléculas disminuyen la expresión de citoquinas proinflamatorias, suprimen la MMP9, inhiben la activación de protein-quinasas activadas por mitógenos en el epitelio corneal y conducen a la disminución de la descamación epitelial [94, 95]. En el caso del loteprednol al 0.5% se ha visto que su uso durante 2 semanas previo al de ciclosporina 0.05% muestra una recuperación en menor tiempo del score en el test de Schirmer, el índice de queratopatía valorado mediante tinción ocular con fluoresceína o verde de lisamina y los síntomas de ojo seco en comparación con lágrimas artificiales o ciclosporina sola.

---

### CICLOSPORINA A

---

La ciclosporina A (CsA), un inhibidor de la activación de linfocitos T dependiente de IL-2, disminuye la apoptosis de las células epiteliales conjuntivales, protege de la pérdida de CC en modelos experimentales murinos de ojo seco [96] y aumenta la densidad de CC en pacientes de ojo seco [97, 98]. Por otro lado, se ha demostrado que los pacientes tratados durante 6 meses con CsA, presentan una reducción significativa de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, en particular, HLA-DR, en la superficie ocular de paciente con SOS moderado a severo disminuyendo la respuesta inflamatoria local [99]. Es un tratamiento para el SOS aprobado por la FDA desde 2003.

---

### TACROLIMUS

---

El tacrolimus 0.03% es otro inhibidor de la activación de los linfocitos T, pero su poder inmunosupresor es mayor que el de la CsA. Se usa como alternativa en pacientes que no toleran esta última. Un estudio prospectivo doble ciego demostró que su uso durante una semana de tratamiento mejora el índice de queratopatía evaluado con tinción de fluoresceína y rosa de bengala de los pacientes con SS [100]. Por otro lado, el TBUT y test de Schirmer mejoran solamente luego de 28 días de tratamiento [100].

---

### ANTI INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

---

Existe una variedad de opciones de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para el tratamiento de SOS, entre ellos el diclofenac 0.1%, ketorolac 0.4% e indometacina 0.1% [101]. Sin embargo, el tratamiento con estos fármacos disminuye la sensibilidad corneal y aumenta el riesgo de desarrollos de

úlceras corneales [101]. A su vez, no han demostrado beneficio en mejorar los síntomas de SOS moderado a severo en pacientes con SS [101].

---

### LIFITEGRAST

---

El lifitegrast (SAR 1118) es un inhibidor de la adhesión, migración, activación y reclutamiento de linfocitos T. Su actividad inhibitoria la realiza a través del bloqueo de la interacción entre el antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) [102, 103]. También puede inhibir la liberación de citoquinas incluyendo el IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-17 de linfocitos T activados en sangre periférica [104]. La utilización de lifitegrast bajo forma de solución oftálmica al 5% se ha estudiado como tratamiento tópico para el SOS y ya se han publicado múltiples ensayos clínicos [105].

---

### FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL (NGF) Y TAVILERMIDE

---

El factor de crecimiento neural (NGF) y tavilermide participan en la homeostasis de la SO al mejorar la sensibilidad corneal y la secreción lagrimal refleja. Estos son agentes que promueven la regeneración de fibras nerviosas sensitivas y autonómicas. Poseen además propiedades antiinflamatorias. El tavilermide (MIM-D3) es un agonista del receptor de tirosina quinasa que funciona como mimético del NGF. Este puede estimular la producción de mucinas por parte de células conjuntivales [106].

---

### INMUNOMODULADORES SISTEMICOS: AGENTES AHORRADORES DE CORTICOSTEROIDES

---

Las drogas inmunomoduladoras conocidas como ahorradoras de corticosteroides sustituyen a la prednisona en el tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes. Estas patologías incluyen aquellas presentes en los pacientes incluidos en el presente estudio los cuales presentan síndrome de Sjögren primario o asociado a otras enfermedades autoinmunes como el lupus sistémico eritematoso (LES), la artritis reumatoide (AR), o hipotiroidismo secundario a enfermedad de Hashimoto.

A continuación, realizaremos una pequeña reseña de cada uno de los inmunomoduladores que constituyen parte del tratamiento de algunos de nuestros pacientes.

---

### HIDROXICLOROQUINA (HCQ):

---

A pesar de su extenso uso en enfermedades como el LES y la AR, el mecanismo de acción de los antimaláricos como la hidroxicloroquina es en gran parte desconocido. Al ser una base débil, la HCQ tendría tropismo por los lisosomas e interferirían en su acidificación impidiendo el correcto procesamiento y presentación de antígenos extracelulares [107, 108]. Por otro lado, la HCQ disminuiría la activación de los receptores TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 mediada por enzimas proteolíticas en los

endolisosomas [109]. Otro mecanismo propuesto es su capacidad de regular canales iónicos, particularmente de potasio y calcio, los cuales son fundamentales en la activación del inflammasoma y la posterior activación de la caspasa-1 encargada de clivar la IL-1 $\beta$  permitiendo su secreción [110]. Se ha visto también que la HCQ indirectamente reduce la producción de otras citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  por parte de células mononucleares de la sangre [111].

### AZATIOPRINA

---

La azatioprina, un análogo de purinas, una prodroga que se convierte inicialmente en 6-mercaptopurina y luego en 6-tioguanina, el metabolito activo. La azatioprina actúa durante la fase S del ciclo celular e inhibe la formación de nucleótidos de la adenina y la guanina. De esta forma, inhibe la respuesta inmune, impidiendo la replicación celular necesaria en la proliferación de células T en este proceso [112].

### MOFETIL MICOFENOLATO (MMF)

---

El MMF es un inhibidor de los linfocitos T y B efectivo en el tratamiento de múltiples enfermedades autoinmunes. Limita la síntesis de purinas inhibiendo la inosín-monofosfato deshidrogenasa. El MMF demostró inducir proliferación de CC y expresión de ARNm de MUC5AC en células conjuntivales humanas *in vitro* [112].

### METOTREXATE

---

El metotrexate es un antimetabolito que suprime la síntesis de ADN y ARN durante la fase S del ciclo celular mediante la inhibición competitiva de la enzima dihidrofolato reductasa. Esta, normalmente se une al ácido fólico en un proceso que lleva a la generación de bases purínicas y pirimidínicas del ADN y ARN, lo que interfiere directamente en la proliferación de células con alto índice mitótico como los linfocitos T necesarios para la respuesta inmune [113].

## TRATAMIENTO DEL SOS CON SUERO AUTÓLOGO EN PACIENTES CON SS

---

Como describimos anteriormente, múltiples componentes del film lagrimal son fundamentales para mantener una SO saludable, como por ejemplo el factor de crecimiento epitelial (EGF) y la vitamina A, los que regulan la proliferación, diferenciación y maduración del epitelio de la SO. En 1984 Fox *et al.* reportaron los efectos beneficiosos de la aplicación de suero autólogo (SA) en pacientes con SS, basándose en el hecho de que estos mismos factores presentes en las lágrimas de individuos sanos se encuentran habitualmente en circulación [114]. La aplicación de SA tiene beneficios sobre el uso de lágrimas artificiales ya que estas no contienen ninguno de estos componentes.

Otro estudio publicado por Tsubota *et al.* mostró que 12 pacientes con diagnóstico de SS tratados con SA al 20% durante 4 semanas presentaron una disminución de la queratopatía superficial observada con tinción de fluoresceína y rosa de bengala [115]. No se observó, sin embargo, cambios en el TBUT [115]. Este tratamiento aumentó la expresión de MUC1 [85], lo que podría explicar, al menos parcialmente, la efectividad del SA en el grupo de pacientes tratados. Otro estudio, demostró que el

tratamiento con lágrimas artificiales o SA al 50% mejora la descamación, densidad de CC, proporción entre núcleo y citoplasma, así como presencia de células inflamatorias [116].

# **HIPÓTESIS DE TRABAJO, OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

---

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

---

En nuestro trabajo proponemos que, en condiciones fisiológicas, las mucinas MUC1, MUC4 y MUC16 en la SO tienen un rol inmunorregulador, determinando una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, y basándonos en los antecedentes antes mencionados, hipotetizamos que la SO de los pacientes con SOS, se caracteriza por una disminución en la expresión de dichas mucinas en la superficie ocular, lo que se correlaciona con un aumento de citoquinas inflamatorias, en particular de tipo Th17 (como la IL-17 e IL-22) y el progreso de la enfermedad. Dada la presencia de factores favorecedores de la regeneración y de la homeostasis de la SO, y basados en la literatura previa, el tratamiento con SA al 20% en los pacientes con ojo seco favorecerá la mejoría total o parcial clínica en estos pacientes.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

El objetivo general de nuestro trabajo fue la determinación de la expresión de ARNm de MUC1, MUC4 y MUC16 por células conjuntivales de pacientes con SOS e individuos controles, así como determinar su correlación con la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y la severidad de los síntomas de la enfermedad. También nos planteamos valorar la respuesta de estos pacientes al tratamiento con SA al 20%.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

- 1) Generar un contexto clínico multidisciplinario para la captación, valoración, tratamiento y seguimiento de pacientes con SOS y SS (tanto primario como secundario).
- 2) Determinar la expresión génica de MUC1, MUC4 y MUC16 en la superficie ocular de pacientes con SOS secundario a SS (primario/ secundario y pacientes tratados/ no tratados).
- 3) Determinar la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias de tipo Th17 (IL-17, IL-22) en la SO de pacientes con SOS mediante PCR en tiempo real.
- 4) Estudiar la relación entre la expresión génica de mucinas y los de las citoquinas evaluadas.
- 5) Evaluar la relación entre la severidad clínica del SOS y la expresión génica de estas mucinas en pacientes con SOS secundario a SS.
- 6) Evaluar la respuesta clínica de estos pacientes al tratamiento con SA al 20%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### RECLUTAMIENTO DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

---

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República en Montevideo, Uruguay. El mismo tuvo LA aprobación el día 13 de Setiembre de 2017 y el número de protocolo es 97-17.

Todos los pacientes fueron captados en la policlínica de enfermedades autoinmunes y patología ocular del Departamento de Oftalmología en conjunto con la Unidad de enfermedades autoinmunes sistémicas perteneciente a dicho hospital durante el período entre diciembre 2017 y diciembre 2019. Este servicio fue creado en el marco de esta tesis de doctorado. La Cátedra de Hemoterapia estuvo a cargo de la producción de SA, parte del tratamiento de estos pacientes. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes involucrados en el estudio. Todas las muestras obtenidas de pacientes y controles se numeraron del 1 al 33 para identificar los individuos y la información clínica recopilada y asociarlo a sus muestras biológicas, asegurando el anonimato en el manejo de datos y muestras clínicas. Se obtuvieron 2 grupos de pacientes:

1) Ojo seco derivado de Síndrome de Sjögren primario (SSP) o secundario (SSS).

2) Individuos controles sin enfermedades autoinmunes, sin patologías oculares, de la misma franja etaria que los pacientes, libres de enfermedades infecciosas.

Los criterios de inclusión para el diagnóstico de SOS fueron los siguientes:

- Presentar síntomas de SOS durante al menos los últimos tres meses
- Tener un score en el cuestionario OSDI igual o mayor a 13 puntos
- Poseer un tiempo de rotura de la lágrima (TBUT por su sigla en inglés) menor a 10 segundos
- Obtener un resultado del test de Schirmer I menor a 13 mm
- Demostrar una queratopatía en la escala de Oxford mayor o igual a 1
- Tener diagnóstico de SSP o SSS

Los criterios para el diagnóstico de SS fueron en base a los definidos por el consenso Euro-Americano. En el diagnóstico de SSP debían sumar 4 puntos de los criterios detallados en la Tabla 1 (deben incluir evidencia histopatológica y/o serológica). Para el diagnóstico del SSS se necesitaba además del diagnóstico de SS la presencia de anticuerpos antinucleares positivos, factor reumatoide positivo o presencia de anticuerpos asociados a escleritis sistémica (anti-centrómero, anti-Scl-70, anti-RNA polimerasa III).

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- menores de 18 años
- presentar anomalías anatómicas post trauma o post cirugía previa
- poseer antecedentes de cirugía ocular en los últimos 3 meses
- estar en tratamiento ocular tópico (a excepción de lágrimas artificiales)
- tener cualquier patología ocular en los últimos 3 meses que afecte la superficie ocular (conjuntivitis, chalazión, etc.) o uso de lentes de contacto.
- Tener antecedentes de radioterapia en cabeza/cuello,
- presentar infecciones sistémicas o afectaciones neoplásicas activas
- los pacientes con uso concomitante de drogas anticolinérgicas fueron excluidos dado que pueden confundir los hallazgos y/o síntomas.

Los pacientes del grupo control fueron evaluados de la misma forma, registrando los parámetros ya descritos.

Se solicitó la firma de un consentimiento informado (ver Anexo II) a todos los sujetos que participaron del estudio luego de la explicación del procedimiento.

## VALORACIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON OJO SECO

Los pacientes que ingresaron a nuestro estudio fueron valorados desde el punto de vista oftalmológico obteniéndose la siguiente información:

1. Fecha y hora de la consulta
2. Edad
3. Sexo
4. Antecedentes personales

### EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA GENERAL

- Agudeza visual: analizada utilizando la cartilla de Snellen (Figura 12).
- Biomicroscopia: corresponde a la visualización de las diferentes estructuras oculares con la lámpara de hendidura.
- Fundoscopia: valoración de la mácula y papila con lupa 90D.
- Frecuencia de parpadeo.

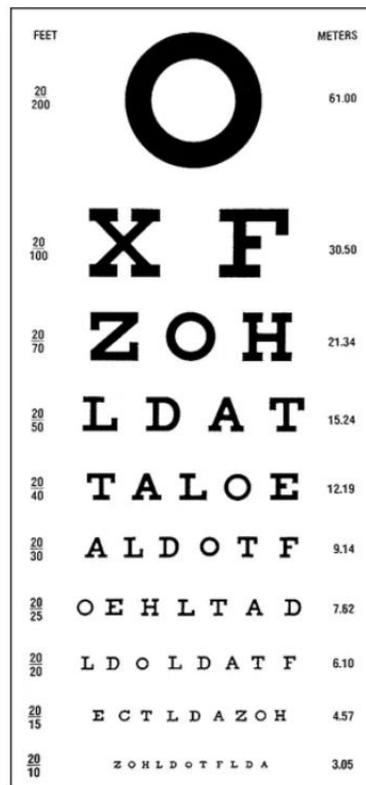


FIGURA 12. EJEMPLO DE CARTILLA DE SNELLEN

*Figura 12. Ejemplo de Cartilla de Snellen. Se observa la medida de agudeza visual desde el 20/200 (letra O en lo más alto de la cartilla) al 20/20 considerada la visión normal.*

## VALORACIÓN DE SÍNTOMAS

### CUESTIONARIO OSDI

El cuestionario OSDI, estandarizado para pacientes con SOS establece el diagnóstico de ojo seco en relación con las respuestas de las preguntas que se describen a continuación. Se consideran síntomas leves de ojo seco con un puntaje mayor o igual a 13 y menor a 22, moderado de 23 a 32 y severo mayor a 33 (Figura 13).

¿Ha experimentado alguna de las siguientes alteraciones durante la última semana?

A. SINTOMAS FÍSICOS	En todo momento	Casi en todo momento	En el 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	
1. Sensibilidad a la luz	4	3	2	1	0	N/C
2. Sensación de arenilla en los ojos	4	3	2	1	0	N/C
3. Dolor de ojos	4	3	2	1	0	N/C
4. Visión borrosa	4	3	2	1	0	N/C
5. Mala visión	4	3	2	1	0	N/C

¿Ha tenido problemas en los ojos que le han limitado o impedido realizar alguna de las siguientes acciones durante la última semana?

B. ACTIVIDADES DIARIAS	En todo momento	Casi en todo momento	En el 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	
6. Leer	4	3	2	1	0	N/C
7. Conducir de noche	4	3	2	1	0	N/C
8. Trabajar con un ordenador o utilizar un cajero automático	4	3	2	1	0	N/C
9. Ver la televisión	4	3	2	1	0	N/C

¿Ha sentido incomodidad en los ojos en alguna de las siguientes situaciones durante la última semana?

C. FACTORES AMBIENTALES	En todo momento	Casi en todo momento	En el 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	
10. Viento	4	3	2	1	0	N/C
11. Lugares con baja humedad (muy secos)	4	3	2	1	0	N/C
12. Zonas con aire acondicionado	4	3	2	1	0	N/C

El valor de OSDI nos da una puntuación para valorar el nivel de sequedad ocular del paciente como:

Puntuación total: \_\_\_\_\_

Normal OSDI: hasta 13

Leve/Moderado OSDI: entre 13 y 22

Total preguntas sin contestar: \_\_\_\_\_

Moderado/Grave OSDI: entre 23 y 48

FIGURA 13. CUESTIONARIO DE TEST DE OSDI

*Figura 13. Cuestionario de test de OSDI. El Test OSDI (ocular surface disease index) es un test sencillo creado para establecer una gravedad y clasificación del ojo seco según su sintomatología. Extraído de eyewiki.aao.org.*

---

## VALORACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS

---

Presencia de Blefaritis (edema o eritema del párpado) y disfunción de las glándulas de Meibomio (DGM) la cual comprende la obstrucción o inflamación de estas en el borde palpebral). Estas glándulas producen la porción lipídica de la lágrima.

**Cuantificación de características morfológicas del párpado:** A continuación, se describe el formulario empleado para determinar las características morfológicas del párpado.

1. El borde del párpado
  - Engrosado
  - Irregularidad del margen palpebral
2. Unión mucocutánea:
  - Desplazamiento anterior:
  - Desplazamiento posterior:
3. Los orificios de drenaje de las GM: (el número normal es de 20 a 25 en el párpado inferior).
  - Desplazamiento posterior de los orificios
  - Obliteración
  - Orificios opacos
4. Acinos:
  - Chalazión
5. Expresión de las secreciones:
  - Normal: es transparente
  - Nublada: secreciones líquidas difusamente turbias.
  - Granular: por lo general secreción turbia de los fluidos, contiene las partículas en suspensión. El color de estas secreciones varía de color blanco a gris y al amarillo.
  - Espesa y semisólidos o de una sustancia parecida a la pasta de dientes. La expresión suele retrasarse o requiere una presión extra. El material contiene células epiteliales queratinizadas.
6. Otros signos:
  - Pestañas grasientas adheridas entre sí, escamas blandas, amarillentas y grasas y se localizan entre las raíces de las pestañas.
  - Eritema del borde anterior palpebral.
  - Escamas duras, quebradizas y forman collarettes
  - Telangiectasias
  - Distiquiasis
  - Triquiasis
  - Madarosis

---

## VALORACIÓN DE ESTABILIDAD LAGRIMAL

---

La estabilidad del film lagrimal se determinó midiendo el tiempo en que demora el film lagrimal que recubre la córnea en romper. Se aplicó tinción de fluoresceína (solución de fluoresceína al 2% diluida

en suero fisiológico) y sin anestesia, se determinó el tiempo transcurrido hasta el inicio de signos de ruptura del menisco lagrimal (Figura 14). El valor del TBUT en sujetos normales es igual o mayor a 10 segundos.



FIGURA 14. TEST DE TIEMPO DE ROTURA DEL FILM LAGRIMAL

*Figura 14. Test de tiempo de rotura del film lagrimal (TBUT por sus siglas en ingles). Se observan áreas de rotura del film lagrimal (se señalan dos ejemplos con flechas) en una superficie ocular a la cual se aplicó tinción de fluoresceína. Imagen propia obtenida personalmente durante nuestro estudio.*

---

## VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÁGRIMA

---

La producción de lágrima se valoró mediante el test de Schirmer tipo I (sin anestesia tópica) el cual se llevó adelante mediante la colocación de papel de filtro graduado en milímetros a nivel del fórnix palpebral inferior y la medida de hasta dónde se encontraba la misma mojada por lágrima luego de 5 minutos (Figura 7). Se considera normal una producción de lágrima mayor a 20 mm, insuficiente un resultado menor a 13 mm y un resultado indeterminado o probablemente insuficiente entre 13 y 20 mm. Para el intervalo de confianza del 99%, los valores medios de secreción lagrimal en individuos que se esperaba que tuvieran secreción normal, fueron mayores de 10 mm en 2 minutos y mayores de 13 mm en 5 minutos (nivel de significación menor a 0,01)[13].

---

## VALORACIÓN DEL DAÑO DE LA SUPERFICIE CORNEAL Y CONJUNTIVAL

---

El verde de lisamina es una tinción no tóxica, que traduce la vitalidad del epitelio y se considera la tinción ideal para detectar la presencia de células muertas o degeneradas. El verde de lisamina tiñe únicamente las células cuando su membrana se encuentra dañada, independientemente de la integridad del mucus que las recubre (Figura 15).

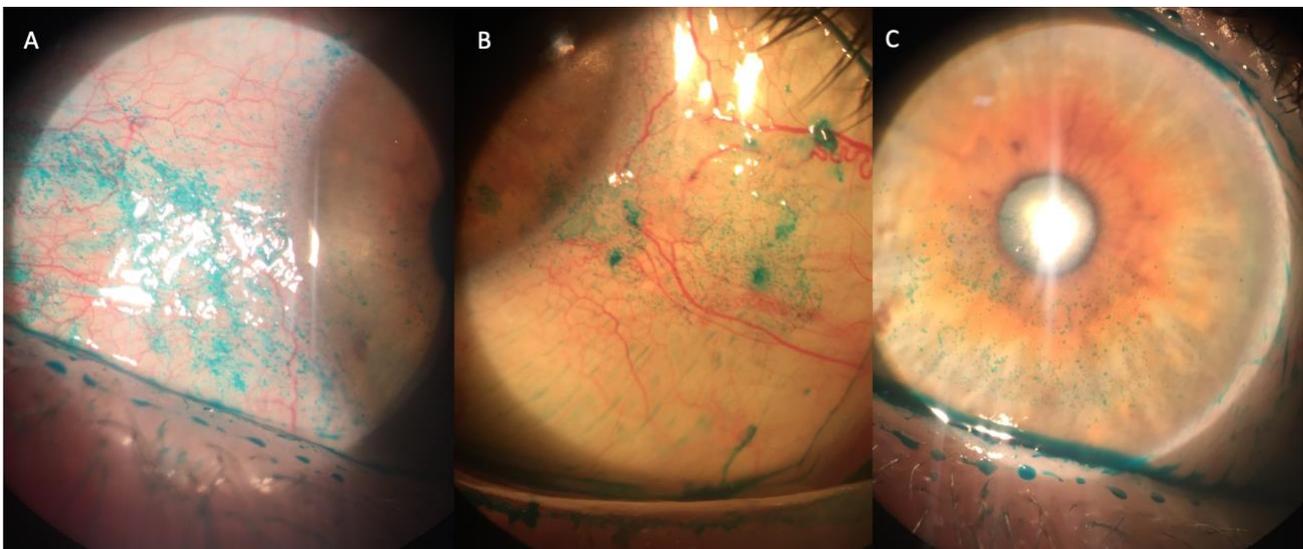


FIGURA 15. TEST DE TINCIÓN CONJUNTIVAL Y CORNEAL CON VERDE DE LISAMINA

**Figura 15. Test de tinción conjuntival y corneal con verde de lisamina.** La figura ilustra el daño conjuntival (A y B) y corneal (C) que se observa en la superficie ocular luego de la aplicación de verde de lisamina. Imagen obtenida personalmente durante nuestro estudio.

La valoración del daño de la superficie corneal y conjuntival se realizó mediante la aplicación de verde de lisamina (tiras de 1.5 mg de verde de lisamina - Hub Pharmaceuticals, LLC. Rancho Cucamonga, CA 91730). Se humedeció la tira con 1-2 gotas de suero fisiológico y posteriormente se aplicó a nivel del fórnix conjuntival. Posteriormente, se compararon los hallazgos de punteado de lisamina en la

superficie con el diagrama de la escala de queratopatía de Oxford que se muestra a continuación (Figura 16).

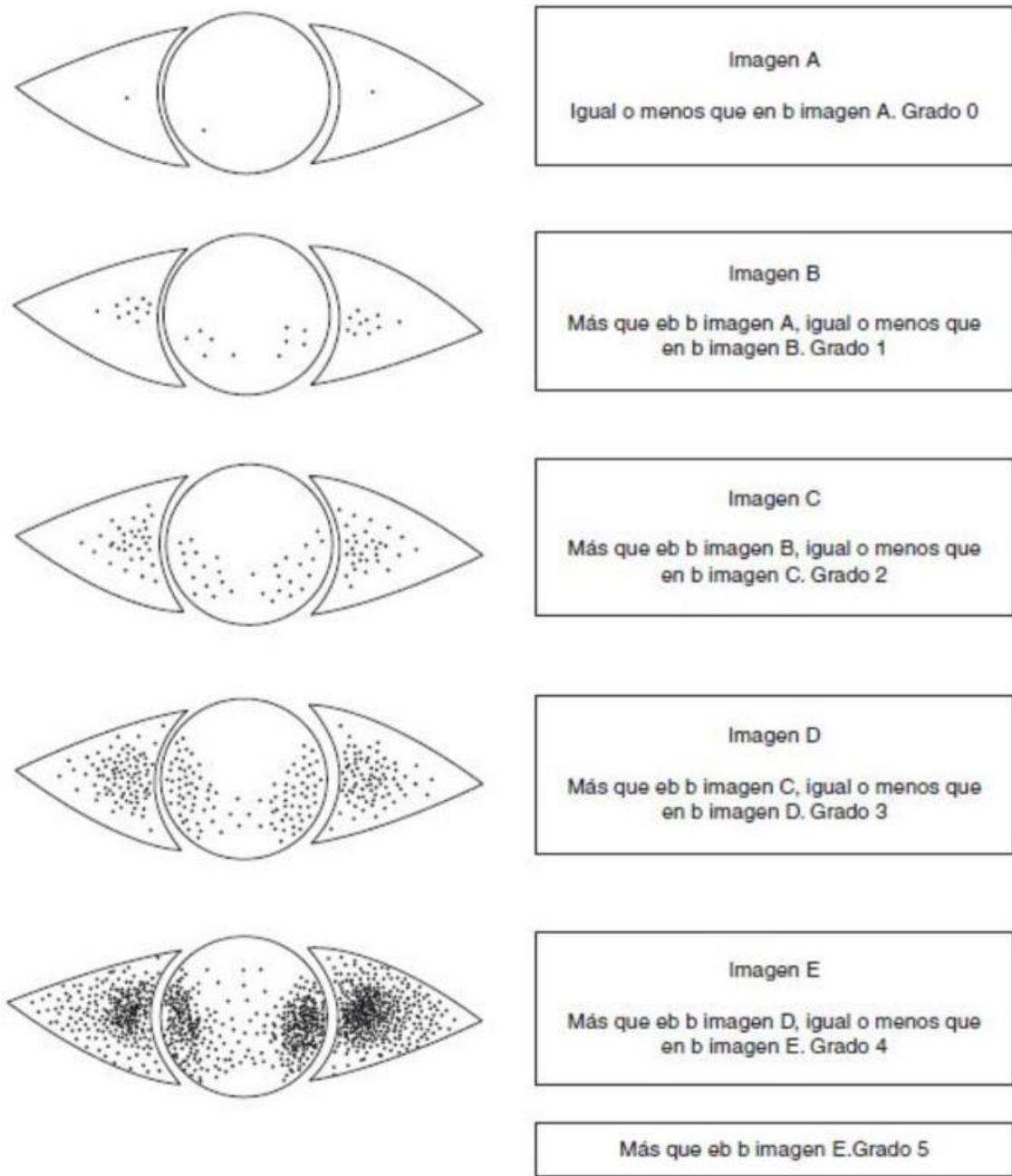


FIGURA 16. ESCALA DE QUERATOPATÍA DE OXFORD

*Figura 16. Escala de queratopatía de Oxford. Los diagramas muestran mayor daño desde el Grado 0 al Grado 5 mostrando un aumento en el punteado de la córnea y conjuntiva con la tinción biológica utilizada, en nuestro caso, verde de lisamina. [117]*

## TOMA DE MUESTRAS MEDIANTE IMPRESIÓN CONJUNTIVAL

Se obtuvieron células epiteliales conjuntivales mediante la técnica de citología de impresión (ver Figura 11). Para ello, un cuadrado de 5 mm x 5 mm de membrana de nitrocelulosa, de tipo de filtro HA con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ M (Millipore, catalog No HAWG04700, Millipore Corporation, Bedford, MA 01730) se presionó ligeramente contra la conjuntiva ocular temporal luego de la instilación de anestesia tópica (0.5% tetracaína, Alcon China Ophthalmic Product Company Ltd, Beijing, China). Las 2 membranas de cada paciente se colocaron en tubos estériles de 1.5 mL conteniendo 700  $\mu$ L de buffer de lisis celular (Quiagen, #74004). Los tubos se almacenaron a -80°C para ser utilizados en los ensayos posteriores.

## PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE ARN

---

El ARNm se extrajo usando RNA easy Microkit (Quiagen #74004). A 700  $\mu$ L de muestra se le agregó igual volumen de etanol al 70% y se colocó esta mezcla en las columnas del kit. Esto se centrifugó a 8000 rpm durante 15 segundos. Se agregaron 700  $\mu$ L del buffer RW1 a la columna y se centrifugó a iguales condiciones posteriormente. Luego se agregaron 500  $\mu$ L del buffer RPE a la columna centrifugando a 10000 rpm durante 1 minuto posteriormente. Finalmente, se eluyó el ARN en la columna con 30  $\mu$ L de agua RNase free centrifugando un minuto a 10000 rpm. El ARN se cuantificó por nanodrop midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm.

## RT-PCR EN TIEMPO REAL

---

El ARN total fue cuantificado utilizando un Nanodrop y posteriormente se sintetizó cDNA utilizando el kit sensiFAST cDNA synthesis (Bioline). El cDNA se sintetizó utilizando el kit SensiFAST cDNA synthesis kit (Bioline) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Primero se realizó una mix de reacción que incluyó buffer TransAmp, la enzima transcriptasa reversa a 200 U/ $\mu$ L, y 1  $\mu$ g de ARN, el cual fue calculado de acuerdo con la concentración obtenida mediante Nanodrop. El ADNc se generó en un termociclador de gradiente T de la marca Biometra, utilizando el siguiente programa: 25°C durante 10 minutos, 42°C por 15 minutos, 48°C por 15 minutos y 85°C por 5 minutos. y la curva de melting se realizó mediante un incremento de 1,3% desde 60°C a 95°C en el termociclador StepOne Plus System Applied Biosystems. Para las real time PCR, las muestras se analizaron en un Eco real-time PCR (Illumina) utilizando el Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Los ensayos se realizaron utilizando el equipo Illumina Eco qPCR (modelo 1010180, USA). Un control sin ADNc se incluyó en todos los ensayos para evaluar la contaminación de los reagentes utilizados. Los primers usados en este estudio están listados en la Tabla 2. Las condiciones de amplificación fueron 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C con una extensión final de 10 minutos a 95°C. La curva de melt consistió en ciclos de 15 segundos de 95°C, luego 15 segundos a 55 °C y 15 segundos a 95°C. Los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron por el método de ciclo umbral comparativo y se normalizaron con GAPDH como control interno. Los resultados se expresaron como la relación entre cada gen de interés y la expresión de GAPDH.

TABLA 2. PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR CUANTITATIVA.

Gen	Forward Primer	Reverse primer
MUC1	5' - AGCGTGAGTGATGTGCCATT - 3'	5' - AGCGCAACCAGAACACAGAC - 3'
MUC4	5' - GGTGGTGGAGGCGTTCTTAT - 3'	5' - CTCACGTTCAAGGCTGTAC - 3'

MUC16	5' - CCAACTCTTCCGAAACAGCA - 3'	5' - GCCAGTGGCGAGAAGTTACA- 3'
GAPDH	5' - ATGGGGAAGGTGAAGGTC G- 3'	5' -GGGGTCATTGATGGCAACAATA- 3'
IL 17	5' - ACCTGAACATCCATAACCGGATAC-3'	5'- AGCGTTATGCAGCCCAAG- 3'
IL 22	5'- TGGGAAAGAAGGGCTGTGTCAG- 3'	5' -GCGGTGACCCTGGCA- 3'

## PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO CON SA DE PACIENTES CON SOS

La preparación de SA se realizó a cargo del Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas a través del centrifugado de la sangre periférica de cada paciente de forma de separar el suero de los elementos formes de la sangre. Para ello, se obtuvieron 20 mL de sangre periférica mediante venopunción a nivel del pliegue de codo centrifugando posteriormente a 1500 rpm durante 5 minutos. De los 20 mL de sangre se obtuvieron 10 mL de suero mediante esta técnica. El suero se separó cuidadosamente en condiciones de esterilidad. Luego, se procedió a la dilución al 20% del mismo en solución salina y se alicuotó en tubos de 5 mL con protección ultravioleta para evitar la degradación de la vitamina A por exposición a la luz. Se instruyó a los pacientes para que mantuvieran el SA en un ambiente refrigerado y oscuro, como el refrigerador, durante su utilización y los tubos cerrados en el freezer. Este se realizaba el mismo día de la evaluación inicial del paciente. La aplicación del SA se indicó 1 gota en cada ojo de 6 a 10 veces al día durante 12 semanas y luego se reevalúa al paciente.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados utilizando el test *t* de Student utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los análisis de correlación se realizaron mediante regresión lineal simple. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### DESCRIPCIÓN DEMOGRÁFICA Y PARÁMETROS DE LA SUPERFICIE OCULAR.

Un total de 18 pacientes con SOS y SS junto con 15 controles de pacientes sanos fueron seleccionados. Todos los pacientes y controles fueron mujeres de entre 27 y 83 años. Los datos demográficos de edad y sexo se observan en la Tabla 3. No hubo diferencias significativas en la edad de los dos grupos ( $P=0.923$ ,  $P>0.05$ ). Como esperado se hallaron diferencias estadísticas significativas ( $P<0.05$ ) entre los dos grupos en el score de OSDI, TBUT, Schirmer I y Escala de Queratopatía de Oxford (Tabla 3).

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y DE LA VALORACIÓN CLÍNICA DE LA SO DE LOS PACIENTES EN EL ESTUDIO Y CONTROLES

Parámetros	Pacientes (n=18)	Controles (n=15)	Valor P
Edad (años)	$56.72 \pm 11.73$ (37– 83)	$53.73 \pm 11.11$ (39 – 70)	0.923
Sexo (M/F)	0/18	0/15	
OSDI score	$45.20 \pm 19.25^{***}$	$4.395 \pm 2.745$	3.604E-9
TBUT (s)	$3.2 \pm 2.6^{***}$	$13.5 \pm 2.0$	5.401E-26
Escala de queratopatía Oxford	$2.2 \pm 1.0^{***}$	$0.3 \pm 0.5$	2.134E-26
Schirmer I test (mm)	$4.7 \pm 4.0^{***}$	$20 \pm 2.8$	2.744E-13

Abreviaciones: F, femenino; M, masculino. Todos los parámetros se expresaron como media  $\pm$  desvío estándar. El análisis estadístico entre los grupos y los controles se muestra junto al valor.  $^{***}p<0.0001$ , pacientes vs. controles.

El grupo de pacientes seleccionado se constituyó en un 50% por pacientes con SSP y 50% con SSS ya sea secundario a lupus eritematoso sistémico (LES) en 4 pacientes, artritis reumatoide (AR) en 3 pacientes, o esclerosis sistémica (ES) en los 2 restantes. Al comparar las características clínicas del grupo con SSP y SSS, observamos que no hubo diferencias significativas en los parámetros evaluados excepto en el resultado del test de Schirmer I que fue significativamente mayor, aunque aún claramente por debajo de la normalidad, en el grupo con SSS (Tabla 4).

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y DE LA VALORACIÓN CLÍNICA DE LA SO DE LOS PACIENTES CON SSP VERSUS SSS

Parámetros	Sjögren Primario (n=9)	Sjögren Secundario (n=9)	Valor P
Edad (años)	54.55 ± 14.22 (37 – 71)	55.22 ± 13.30 (39 – 83)	0.919
OSDI score	41.8 ± 18.2	48.6 ± 19.69	0.445
TBUT (s)	3.3 ± 2.7	3.2 ± 2.6	0.902
Escala de queratopatía Oxford	2.3 ± 1.0	2.0 ± 1.1	0.338
Schirmer I test (mm)	3.2 ± 3.2*	6.2 ± 4.2	0.020

Todos los parámetros se expresaron como media ± desvío estándar. El análisis estadístico entre los grupos y los controles se muestra junto al valor. \*p<0.05

## CORRELACIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICOS

Como esperado, se observó una correlación inversa entre TBUT, el score de OSDI y grado de queratopatía superficial. A su vez, el TBUT se correlacionó positivamente de forma significativa con el resultado del test de Schirmer cuando consideramos todos los individuos reclutados, tanto controles como pacientes con SOS (a mayor score de OSDI, mayor grado de queratopatía, menor producción de lágrima estimada con el test de Schirmer y menor estabilidad lagrimal medida por TBUT). Todas estas correlaciones fueron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$  (Figura 17).

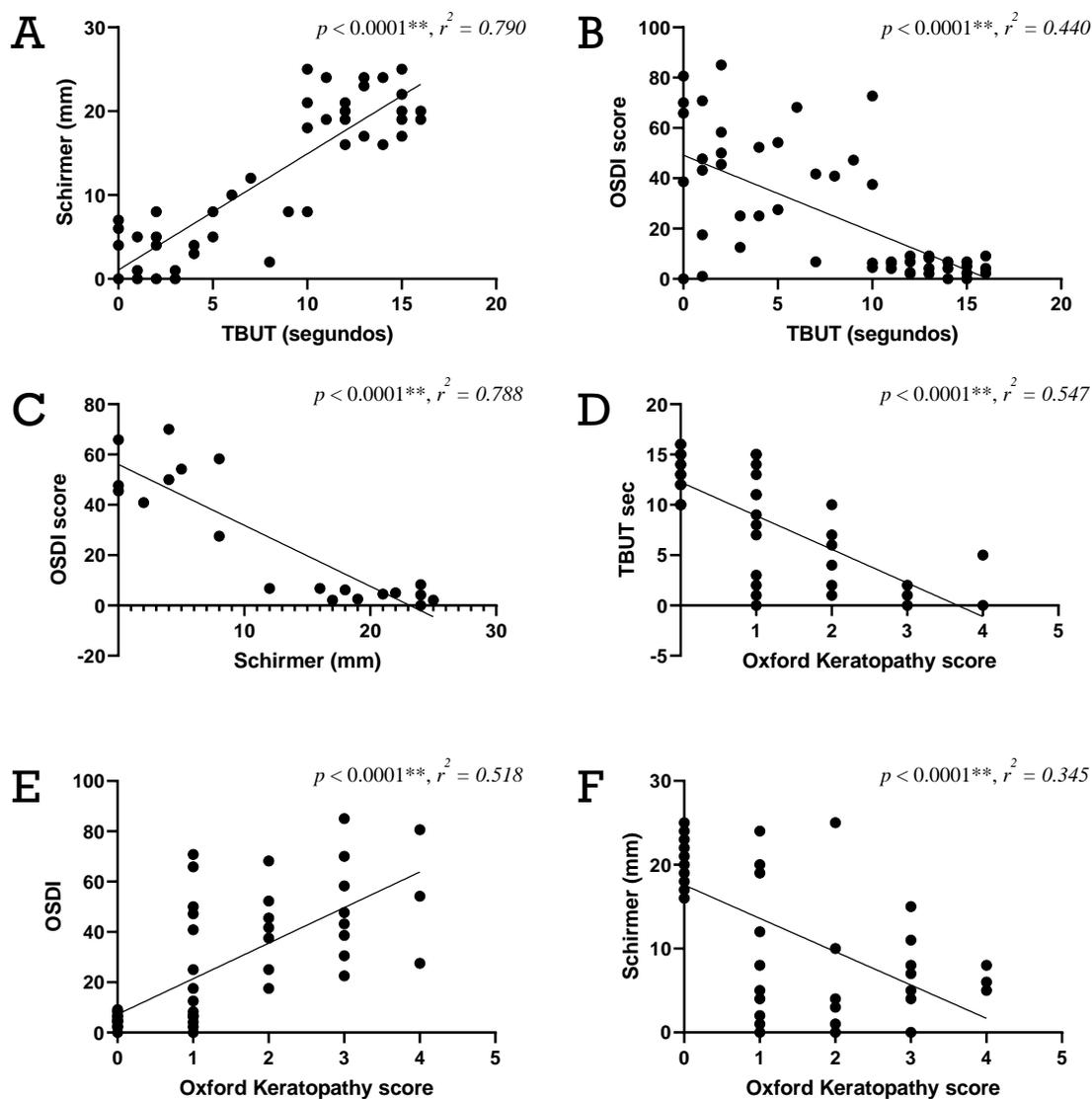


FIGURA 17. CORRELACIÓN DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS DE DAÑO DE LA SO EN EL GRUPO DE PACIENTES Y EL GRUPO CONTROL

**Figura 17. Correlación de los parámetros clínicos de daño de la SO en el grupo de pacientes y los individuos del grupo control.** a) Schirmer en relación con TBUT, b) OSDI en relación con TBUT, c) OSDI en relación con el test de Schirmer, d) TBUT en relación con el grado de queratopatía, e) OSDI en relación con el grado de queratopatía, f) Schirmer en relación con el grado de queratopatía. TBUT: tiempo de rotura del film lagrimal. OSDI: Ocular surface disease index. Se detalla en la sección de materiales y métodos cómo se obtienen estos parámetros durante la evaluación clínica de los pacientes.

## EXPRESIÓN GÉNICA DE MUC1, MUC4 Y MUC16 EN MUESTRAS DE IMPRESIÓN CONJUNTIVAL EN PACIENTES CON SOS Y SS VERSUS CONTROLES SANOS

Posteriormente, evaluamos la expresión génica de MUC1, MUC4 y MUC16 en pacientes y controles mediante el método de PCR en tiempo real (Figura 18). Se observó una diferencia significativa con una expresión de MUC1, 17 veces mayor ( $p=0.0032$ ) y 2.11 veces mayor de MUC4 ( $p=0.0104$ ) en pacientes con relación a controles. No hubo una diferencia significativa en la expresión de MUC16 ( $p=0.0635$ ) entre pacientes y controles (Figura 18).

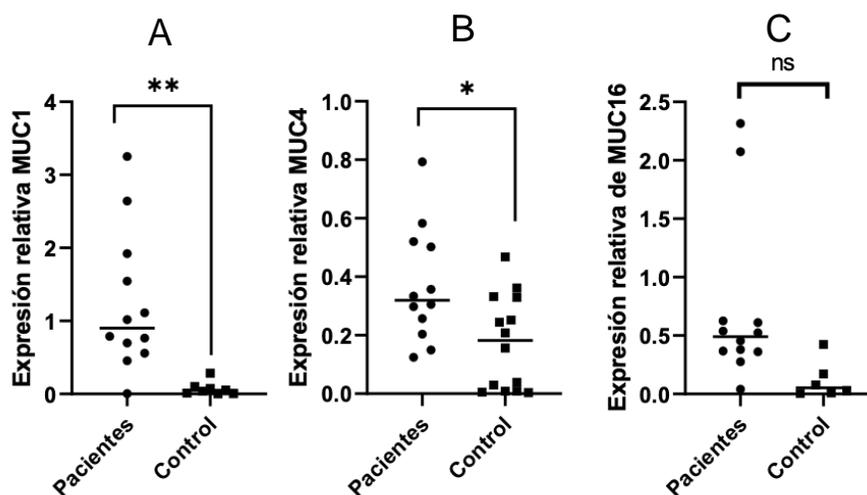


FIGURA 18. EXPRESIÓN DE RNA MENSAJERO DE MUC1 (A), MUC4 (B) Y MUC16 (C) EN EL GRUPO DE PACIENTES CON SS-SOS Y EN INDIVIDUOS CONTROLES

*Figura 18. Expresión de RNA mensajero de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en el grupo de pacientes con SS-SOS y en individuos controles. El RNA mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, extraído y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. \*corresponde a  $p<0.05$ , \*\*corresponde a  $p<0.01$ , ns = no hay una diferencia significativa entre los grupos.*

Posteriormente, analizamos la expresión de mucinas en los subgrupos de pacientes con SSP y SSS con relación a los controles (Figuras 19 y 20). Con relación a la expresión de MUC1 entre los pacientes con SSP ( $p=0.0136$ ) y SSS ( $p=0.0015$ ) la misma es expresada 15.7 y 19 veces más en SSP y SSS que los controles respectivamente. Interesantemente, MUC4 no se vio expresada de forma diferente al comparar grupo de pacientes con SSS y los controles ( $p=0.0641$ ), pero sí al comparar los mismos controles con el grupo de SSP ( $p=0.0095$ ). La misma tuvo una expresión de 2.29 veces más en este grupo. También de forma llamativa, MUC16 sí demostró una diferencia significativa al analizar los pacientes con SSP en relación con los controles ( $p=0.0465$ ), lo cual no sucede en SSS ( $p=0.182$ ). MUC16 se expresó 5.56 veces más en el grupo de pacientes SSP en comparación con el grupo control.

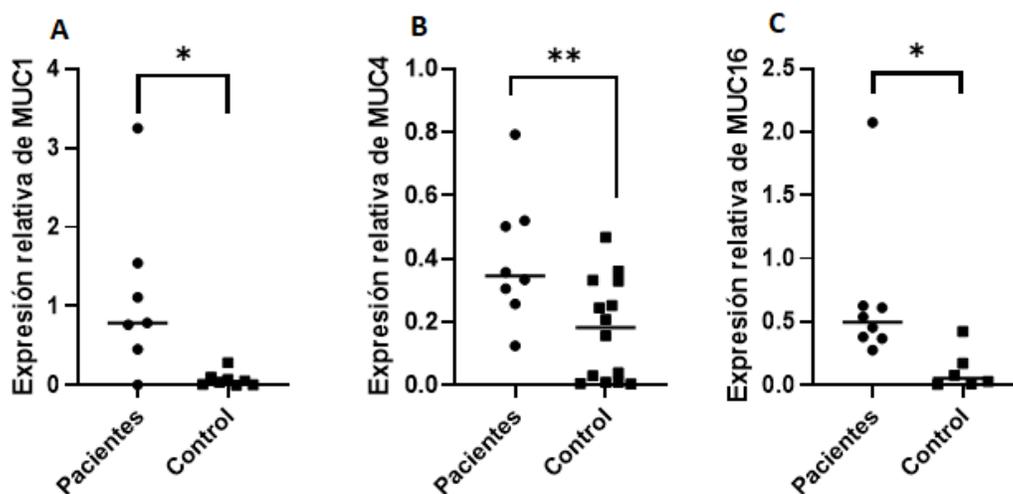


FIGURA 19. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1, MUC4 Y MUC16 EN EL GRUPO DE PACIENTES CON SSP-SOS E INDIVIDUOS CONTROLES.

*Figura 19. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16 en el grupo de pacientes con SSP-SOS e individuos controles. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar el ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. \*corresponde a  $p<0.5$ , \*\*corresponde a  $p<0.01$ , ns = no hay una diferencia significativa entre los grupos.*

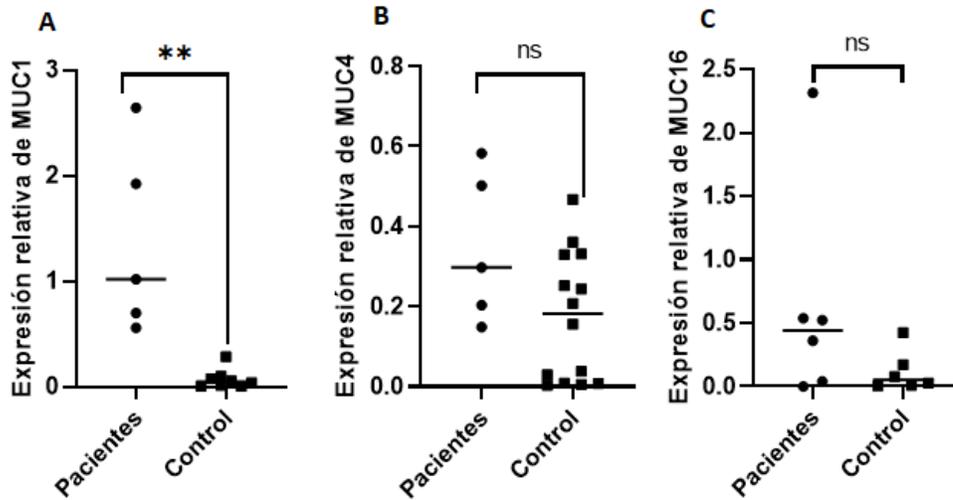


FIGURA 20. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1, MUC4 Y MUC16 EN EL GRUPO DE PACIENTES CON SSS-SOS E INDIVIDUOS CONTROLES

*Figura 20. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16 en el grupo de pacientes con SSS-SOS e individuos controles. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar el ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. \*corresponde a  $p < 0.5$ , \*\*corresponde a  $p < 0.01$ , ns = no hay una diferencia significativa entre los grupos.*

Seguidamente, nos propusimos analizar si existía una correlación entre la producción de las diferentes mucinas (Figura 21). Se observó una correlación estadísticamente significativa en la producción de MUC1 y MUC4 ( $P = 0.0004$ ), pero no entre estas y MUC16 ( $P = 0.84$  con MUC1 y  $P = 0.651$  con MUC4).

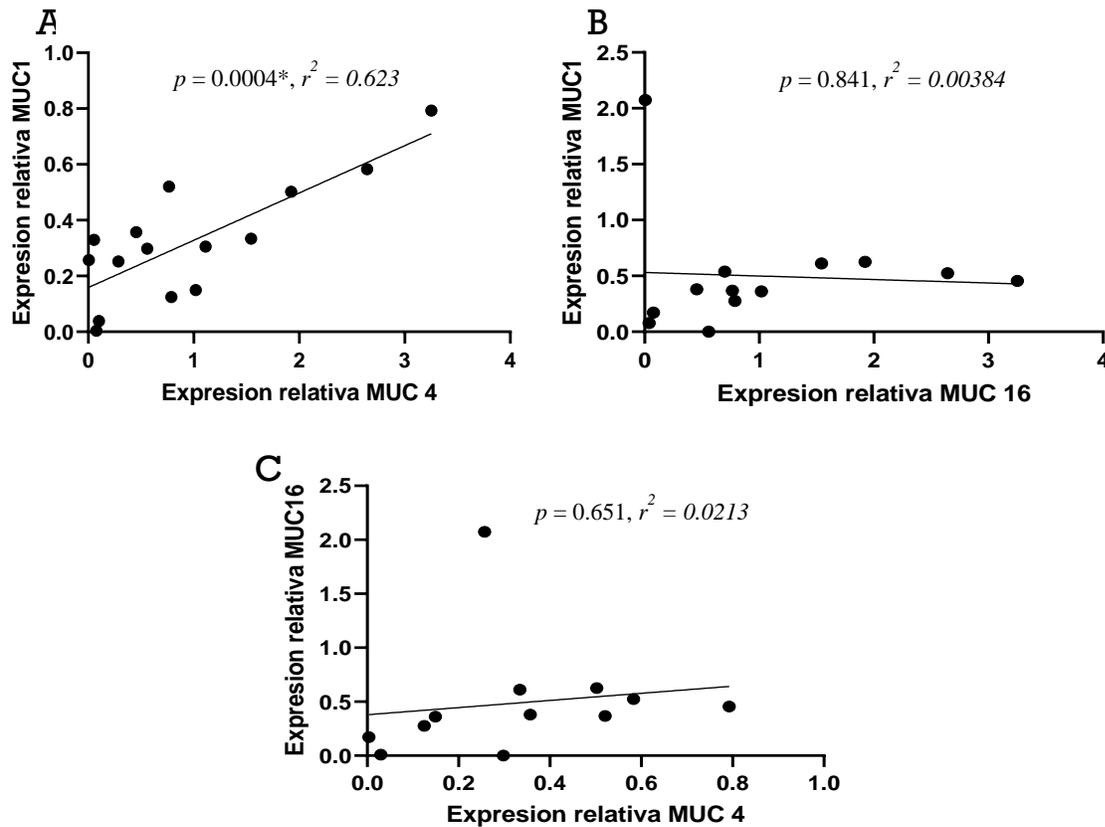


FIGURA 21. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1, MUC4 Y MUC16.

*Figura 21. Correlación de la expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16. A) Expresión de MUC1 en relación con la expresión de MUC4, B) Expresión de MUC16 en relación con MUC4, C) Expresión de MUC1 en relación a MUC16. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar el ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos.*

Luego nos propusimos analizar si existía una correlación entre la producción de las diferentes mucinas en el subgrupo de pacientes son SSP (Figura 22) y pacientes con SSS (no se muestran las gráficas). Se observó una correlación estadísticamente significativa en la producción de MUC1 y MUC4 ( $p = 0.0428$ ) únicamente para el grupo de SSP, no para SSS ( $p = 0.141$ ). Tampoco observamos correlaciones significativas entre estas y MUC16 ( $p = 0.42$  con MUC1 y  $p = 0.639$  con MUC4) en SSP o SSS ( $p = 0.723$  con MUC1 y  $p = 0.833$  con MUC4) en SSS.

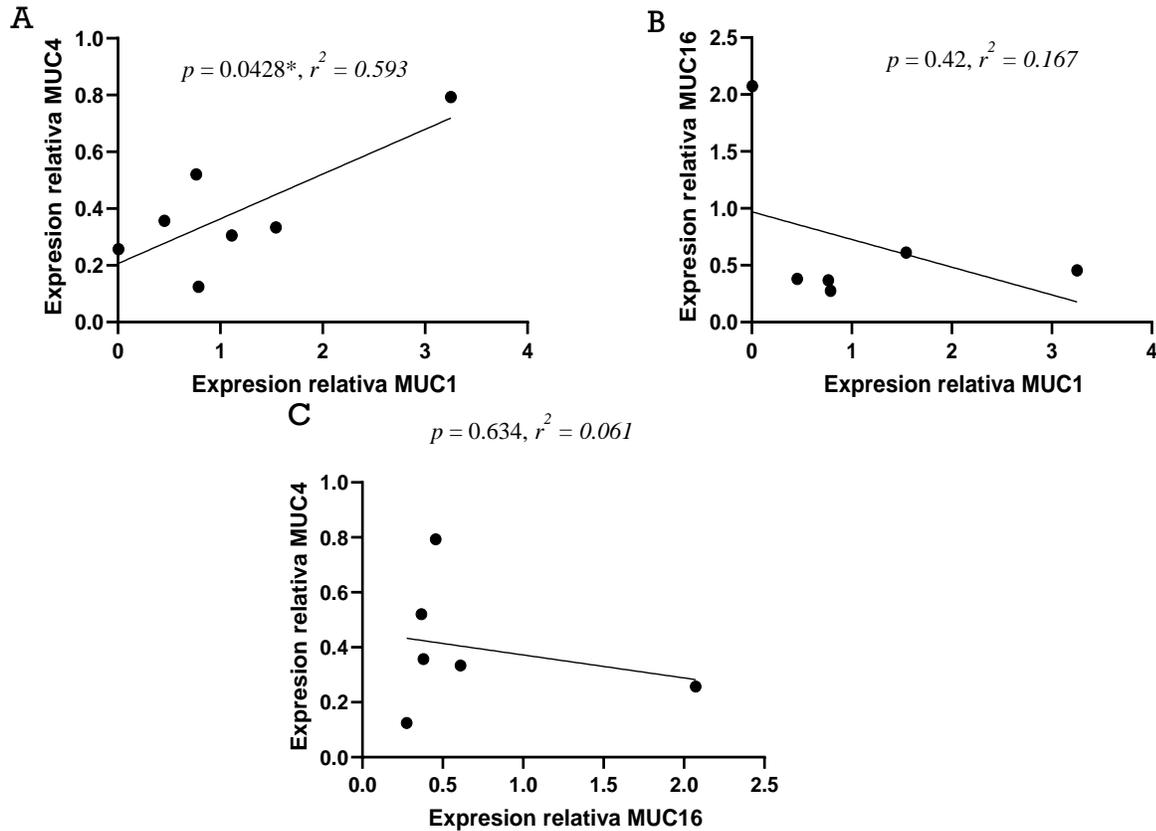


FIGURA 22. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1, MUC4 Y MUC16 EN PACIENTES CON SSP

**Figura 22. Correlación de la expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1, MUC4 y MUC16 en pacientes con SSP.** A) Expresión de MUC1 en relación con la expresión de MUC4, B) Expresión de MUC16 en relación a MUC4, C) Expresión de MUC1 en relación a MUC16. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar el ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos.

## EXPRESIÓN GÉNICA DE MUCINAS Y PARÁMETROS CLÍNICOS DE SOS

Para complementar estos estudios, las correlaciones entre la expresión génica de MUC1, MUC4 y MUC16 y los parámetros de superficie ocular de las pacientes fueron evaluadas. Con relación al TBUT y la expresión de mucinas (Figura 23) no hubo una relación estadísticamente significativa para ninguna de las tres. Sin embargo, se observó una tendencia a una correlación negativa entre ambas (mucinas y TBUT). En el caso de MUC1:  $R^2 = 0.34$ ,  $p = 0.0614$ , MUC4:  $R^2 = 0.21$ ,  $P = 0.124$  y MUC 16:  $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.0845$ .

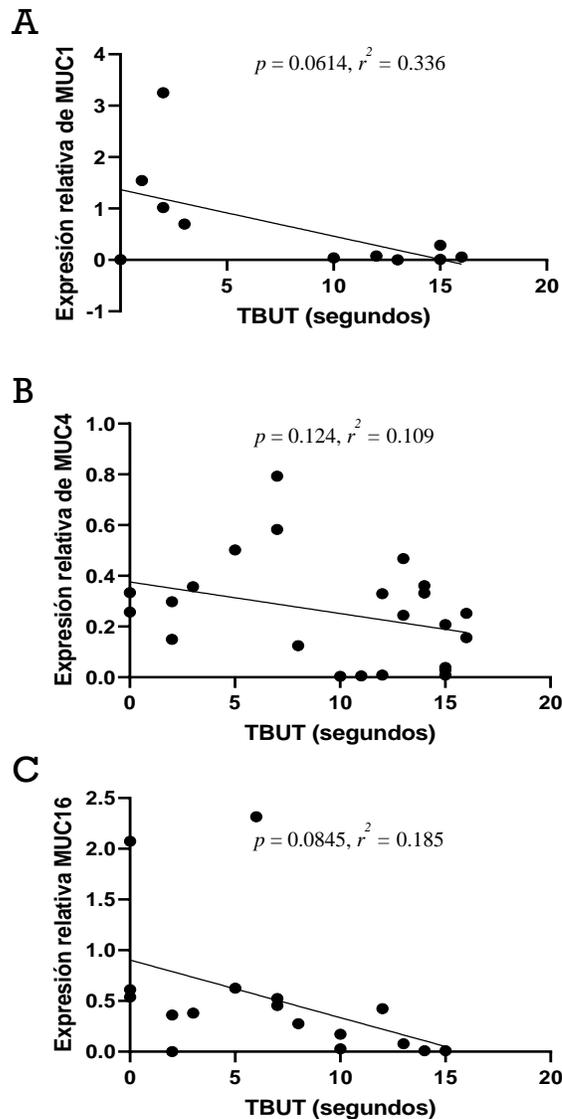


FIGURA 23. RNA MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1 (A), MUC4 (B) Y MUC16 (C) EN FUNCIÓN DEL TBUT.

**Figura 23. Expresión de RNA mensajero en células conjuntivales de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en función del TBUT.** El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. EL TBUT se determinó mediante el tiempo en que demoran en aparecer áreas sin fluoresceína en la superficie corneal luego de la instilación de una gota de esta en cada ojo. Se detalla el procedimiento en materiales y métodos.

Cuando observamos la correlación entre la expresión de mucinas y el test de Schirmer (Figura 24), esta fue significativa únicamente para MUC4 ( $R^2= 0.180$ ,  $p=0.039$ ), observándose una correlación negativa, mientras que no fue significativa para MUC1 ( $R^2=0.153$ ,  $p=0.209$ ) ni para MUC16 ( $R^2=0.0710$ ,  $p=0.301$ ).

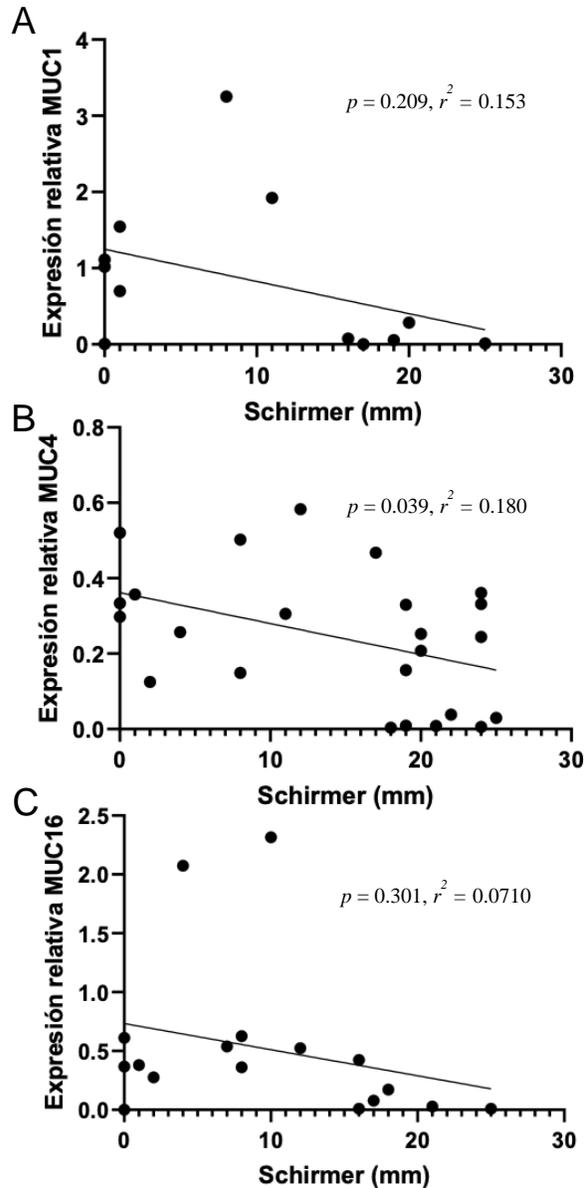


FIGURA 24. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1 (A), MUC4 (B) Y MUC16 (C) EN FUNCIÓN DEL TEST DE SCHIRMER.

**Figura 24. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en función del test de Schirmer.** El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar el ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. El test de Schirmer se realizó sin anestesia, midiendo la cantidad de lágrima producida en una tirilla de papel absorbente como se detalla también en materiales y métodos.

Cuando estudiamos la relación entre la presencia de queratopatía superficial y la expresión de mucinas (Figura 25) observamos que tanto MUC1 como MUC4 estuvieron significativamente más expresadas en pacientes con mayor grado de queratopatía ( $R^2= 0.74$ ,  $P<0.0001$  para MUC1 y  $R^2=0.19$ ,  $P=0.0295$  para MUC4). En el caso de MUC16 encontramos una relación estadísticamente no significativa en relación al grado de queratopatía ( $R^2=0.2$ ,  $P=0.0553$ ), sin embargo, se encuentra en el límite de la significancia.

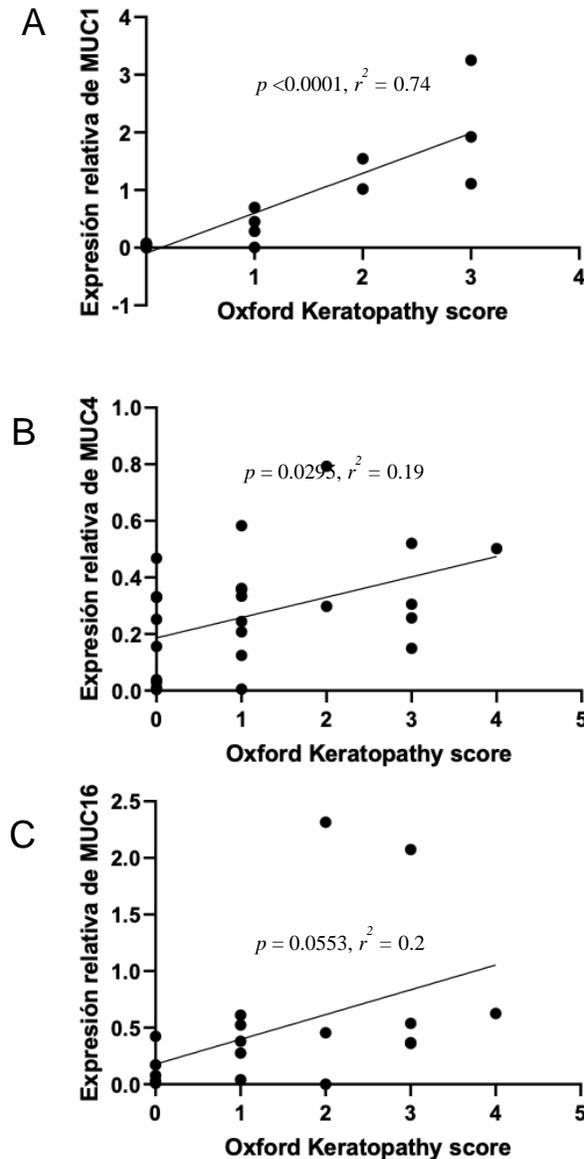


FIGURA 25. RNA MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1(A), MUC4(B) Y MUC16 (C) EN FUNCIÓN DEL GRADO DE QUERATOPATÍA.

**Figura 25. Expresión de RNA mensajero en células conjuntivales de MUC1(A), MUC4(B) y MUC16 (C) en función del grado de queratopatía.** El RNA mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. El score de queratopatía se analizó mediante la tinción con verde de lisamina de la córnea y conjuntiva también detallado en materiales y métodos.

Por otro lado, la correlación entre la expresión de las mucinas y el score de OSDI (Figura 26) fue significativa en 2 de los 3 casos ( $R^2=0.267$ ,  $p=0.0406$  para MUC1 y  $R^2=0.394$ ,  $p=0.040$  para MUC16). Esta fue sin embargo no significativa en el caso de MUC4 ( $R^2=0.0770$ ,  $p=0.179$ ).

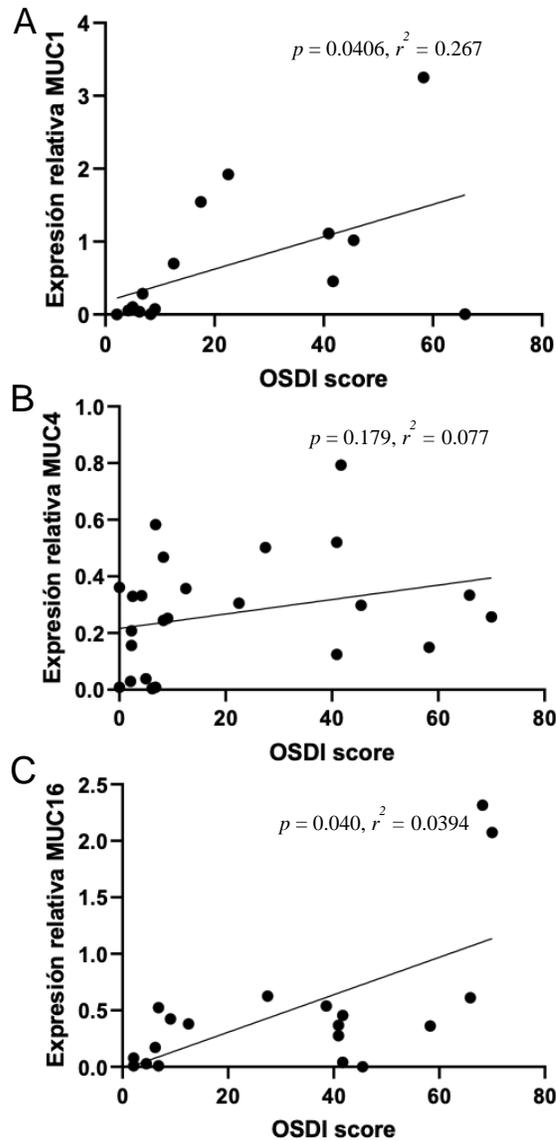


FIGURA 26. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE MUC1 (A), MUC4 (B) Y MUC16 (C) EN FUNCIÓN DEL RESULTADO OBTENIDO EN EL CUESTIONARIO OSDI.

*Figura 26. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C) en función del resultado obtenido en el cuestionario OSDI. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, utilizado para sintetizar ADN copia y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. El score de OSDI se obtiene mediante la respuesta a diferentes preguntas que se detallan en materiales y métodos.*

## CORRELACIONES ENTRE IL 17 E IL 22 Y PARÁMETROS CLÍNICOS DE SOS

La expresión de citoquinas proinflamatorias IL-17 e IL-22 fue también evaluada midiendo los niveles de mRNA en el grupo seleccionado de pacientes y se comparó con el grupo control (Figura 26). No observamos una diferencia significativa entre los dos grupos ( $p=0.867$  para IL-17 y  $p= 0.172$  para IL-22).

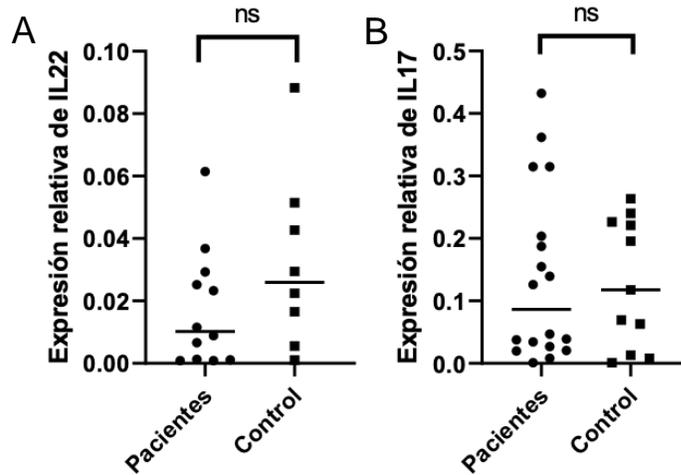


FIGURA 27. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE IL-22 (A) E IL-17 (B) EN EL GRUPO DE PACIENTES CON SS- SOS Y EN INDIVIDUOS CONTROLES

*Figura 27. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-22 (A) e IL-17 (B) en el grupo de pacientes con SS-SOS y en individuos controles. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival descrita en la sección de materiales y métodos. Ns: no significativo.*

Al igual que con las mucinas, procedimos a analizar la expresión de estas citoquinas, pero subdividiendo los pacientes esta vez entre pacientes con SSP y SSS. No observamos una diferencia significativa en la expresión de IL-17 e IL-22 tampoco en estos grupos y el grupo control mediante test de ANOVA (Figura 28).

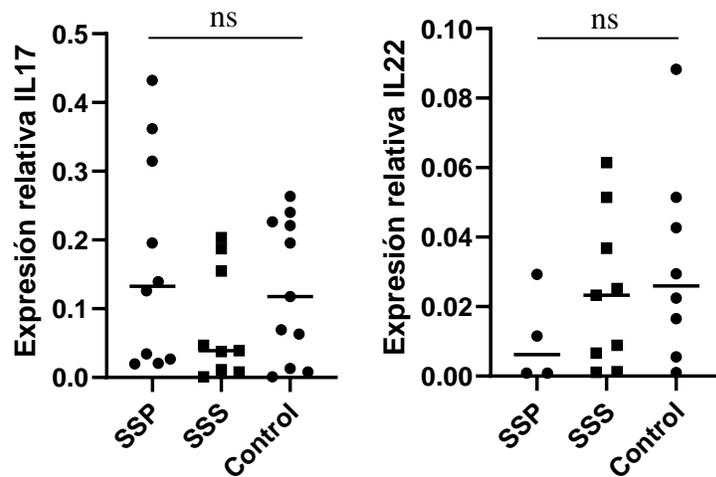


FIGURA 28. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE IL-17 E IL-22 EN EL GRUPO DE PACIENTES CON SSP, SSS Y GRUPO CONTROL.

*Figura 28. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-17 e IL-22 en el grupo de pacientes con SSP, SSS y grupo control. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival descrita en la sección de materiales y métodos.*

El análisis de la correlación en la expresión de IL-22 e IL-17 mostró una correlación positiva la cual fue estadísticamente significativa ( $R^2=0.49$ ,  $p=0.0008$ ) (Figura 29).

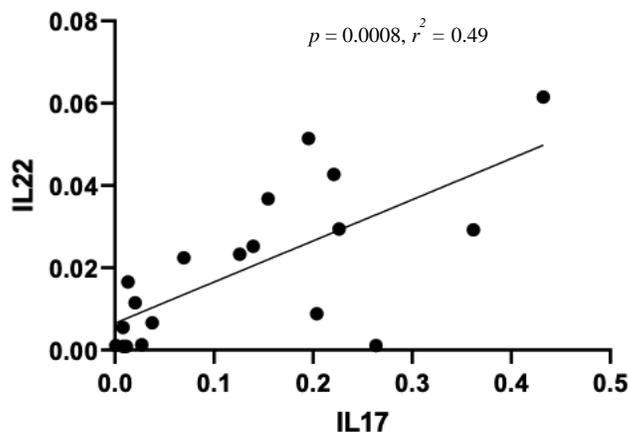


FIGURA 29. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE IL-22 E IL-17 EN LA SO DE PACIENTES E INDIVIDUOS CONTROLES.

*Figura 29. Expresión de ARN mensajero de IL-22 e IL-17 en la SO de pacientes e individuos controles. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival descrita en la sección de materiales y métodos.*

Se procedió luego a analizar la expresión de estas dos citoquinas y correlacionarse con los parámetros evaluados de la SO en todos los pacientes del estudio. Tampoco se observaron correlaciones significativas entre las mismas y el score de OSDI, TBUT, Queratopatía o test de Schirmer ( $p > 0.05$ ) (Figuras 30 y 31).

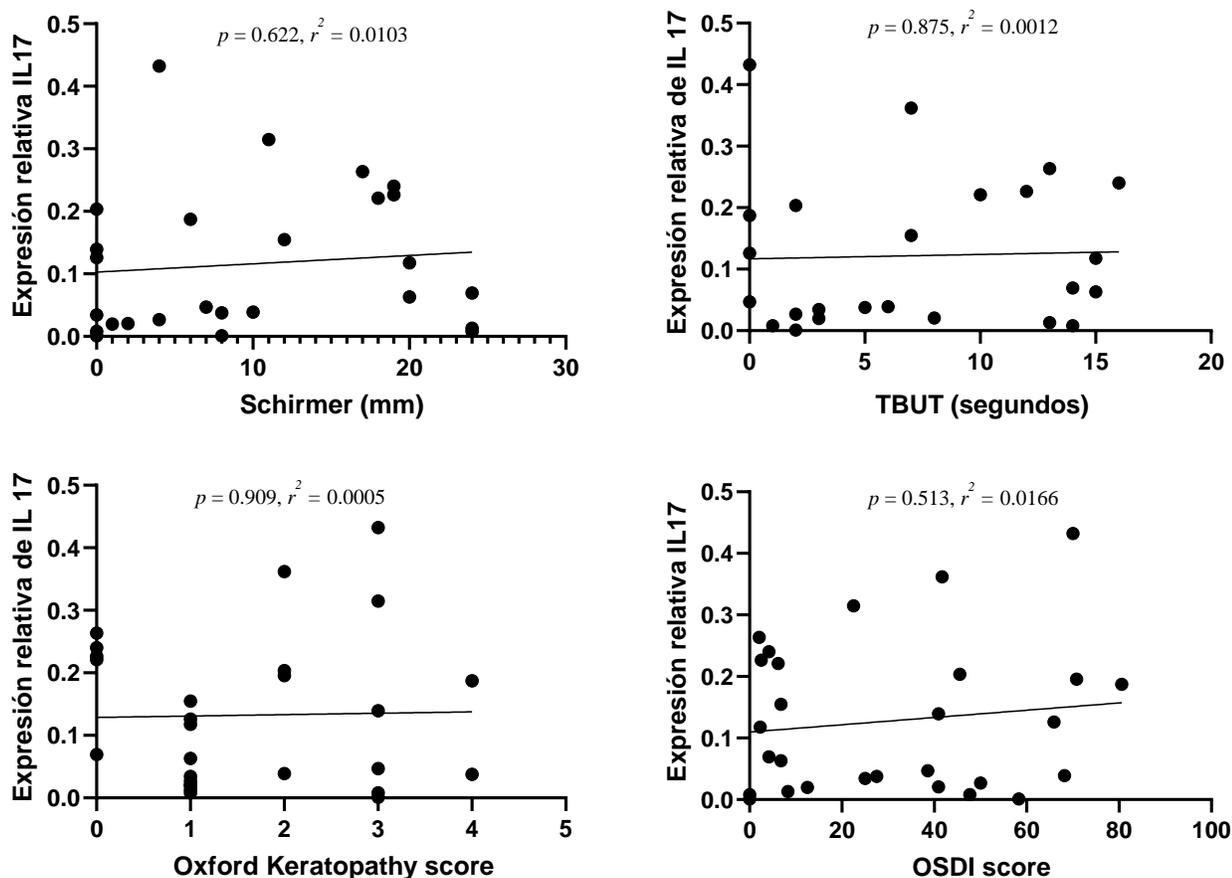


FIGURA 30. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE IL-17 EN FUNCIÓN DEL SCORE CLÍNICO DE QUERATOPATÍA, OSDI SCORE, TEST DE SCHIRMER Y DEL TBUT

*Figura 30. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-17 en función del score clínico de queratopatía, OSDI score, test de Schirmer y del TBUT. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival descrita en la sección de materiales y métodos.*

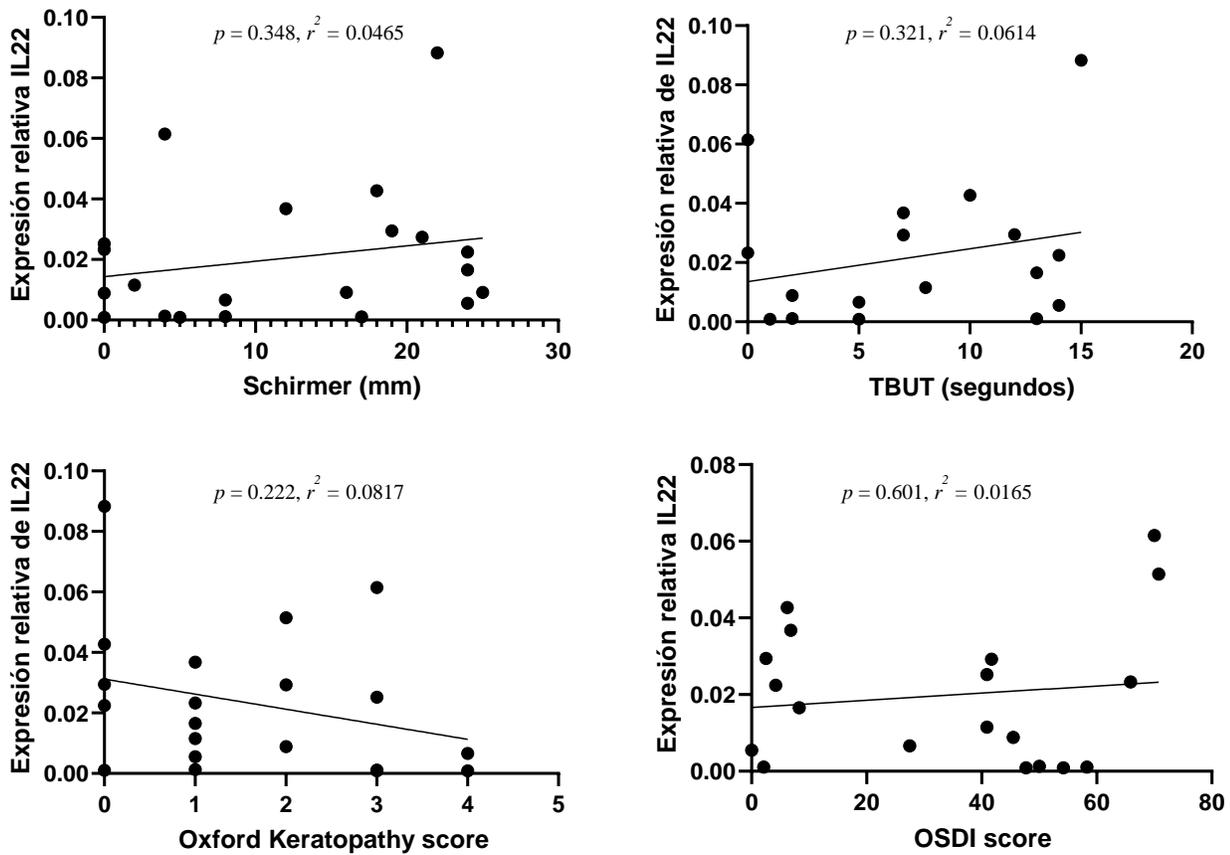


FIGURA 31. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE IL-22 EN FUNCIÓN DEL SCORE CLÍNICO DE QUERATOPATÍA, OSDI SCORE, TEST DE SCHIRMER Y DEL TBUT.

*Figura 31. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-22 en función del score clínico de queratopatía, OSDI score, test de Schirmer y del TBUT. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival descrita en la sección de materiales y métodos.*

## CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MUCINAS Y DE IL-17 E IL-22

Al analizar la correlación entre la expresión de mucinas y de citoquinas en todos los pacientes del estudio (Figuras 32 y 33) encontramos que existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de IL-22 y MUC16 ( $p=0.0189$ ), pero no con MUC1 o MUC4. A mayor MUC16 se observó mayor expresión de IL-22. Esto no se observó en ninguna de las otras combinaciones entre mucinas y citoquinas.

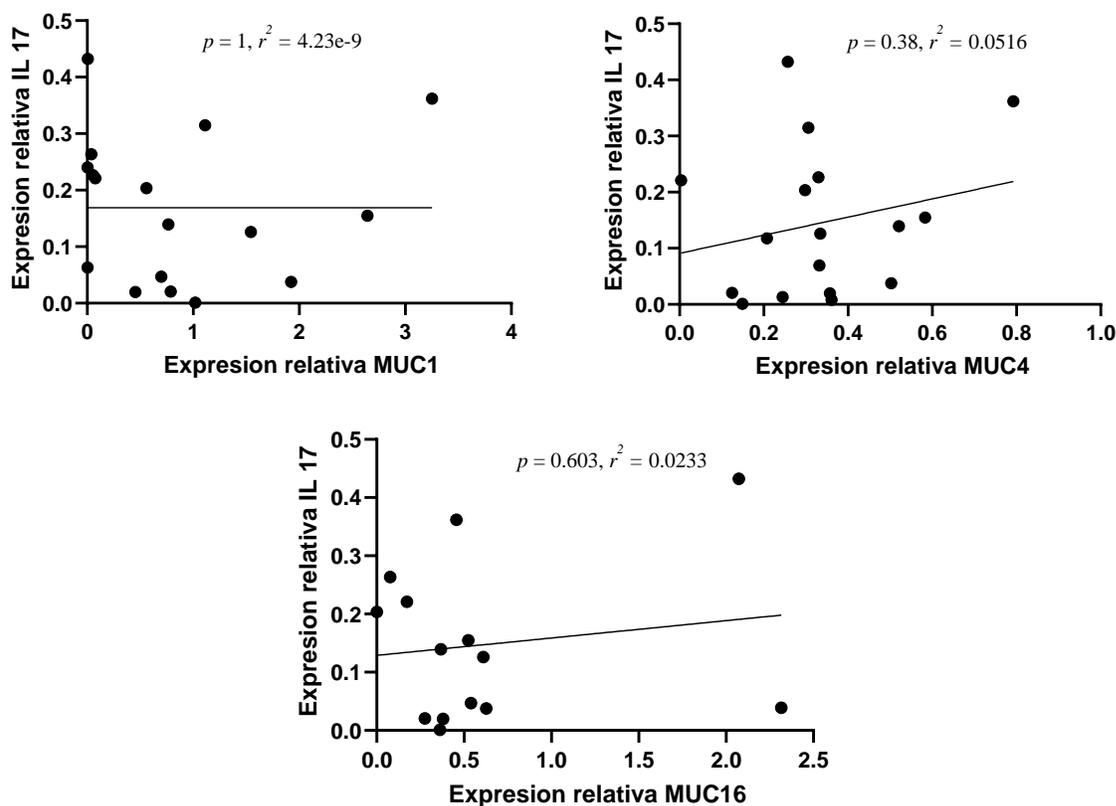


FIGURA 32. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE IL-17 EN CÉLULAS CONJUNTIVALES EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS MUCINAS DE SUPERFICIE MUC1, MUC4 Y MUC16.

*Figura 32. Expresión de ARN mensajero de IL-17 en células conjuntivales en función de la expresión de las mucinas de superficie MUC1, MUC4 y MUC16. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival descrita en la sección de materiales y métodos.*

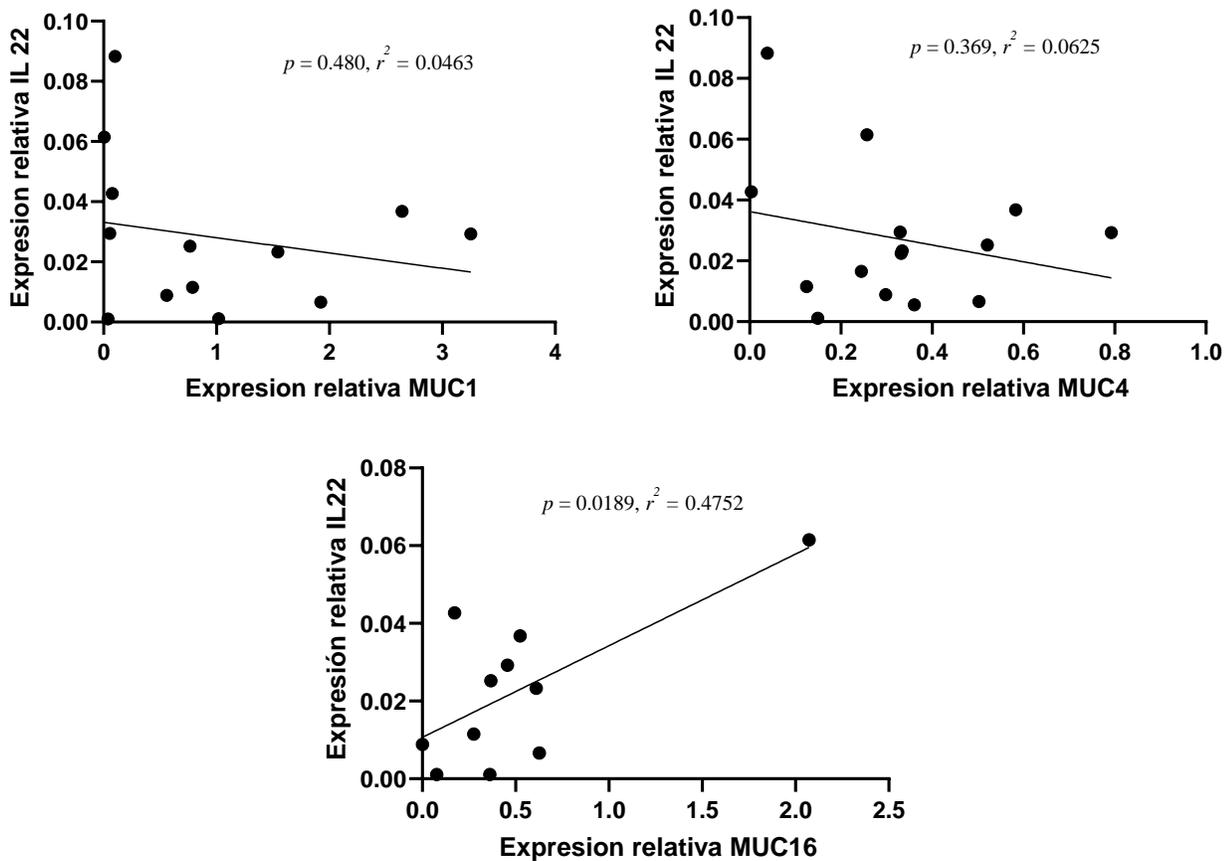


FIGURA 33. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE IL-17 EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS MUCINAS DE SUPERFICIE MUC1, MUC4 Y MUC16.

*Figura 33. Expresión de ARN mensajero en células conjuntivales de IL-17 en función de la expresión de las mucinas de superficie MUC1, MUC4 y MUC16. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival descrita en la sección de materiales y métodos.*

## IMPACTO DEL TRATAMIENTO INMUNORREGULADOR SISTÉMICO

Posteriormente, procedimos a dividir los pacientes en función de la presencia de tratamientos inmunomoduladores (hidroxicloroquina, metotrexate o azatioprina). Observamos que la expresión de MUC1 ( $p=0.0019$ ) y MUC4 ( $p=0.0165$ ), pero no de MUC16, IL-17 e IL-22, fue significativamente mayor en los pacientes tratados en relación con el grupo control (Figura 34).

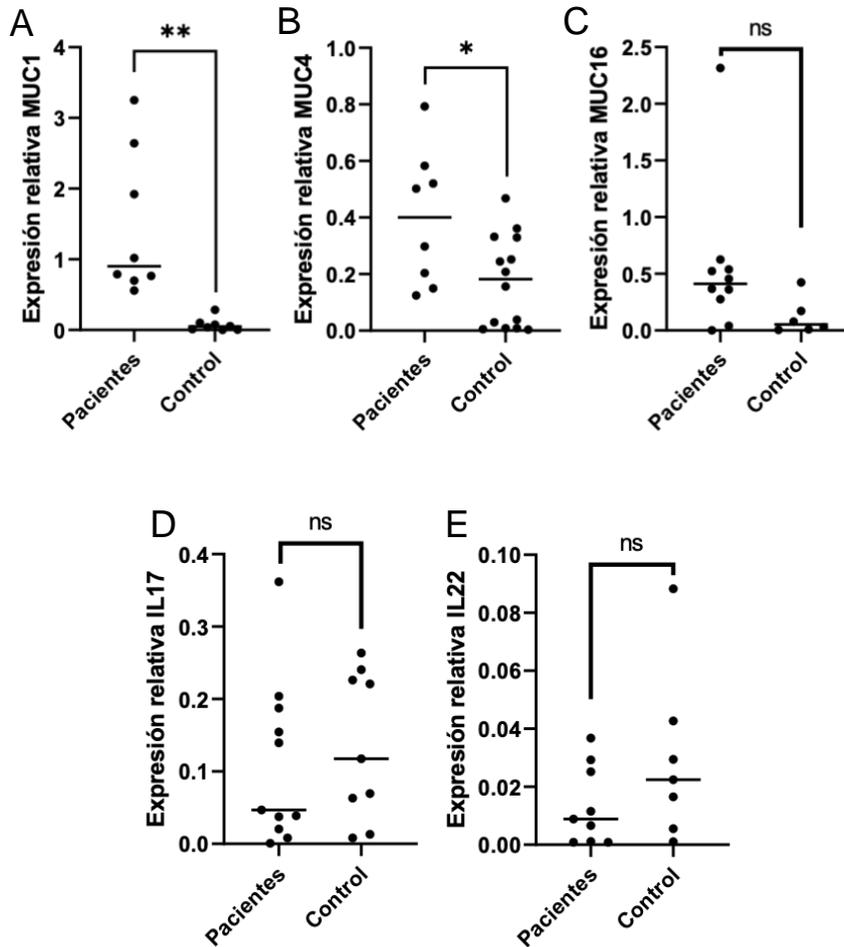


FIGURA 34. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE MUC1 (A), MUC4 (B), MUC16 (C), IL-17 (D) E IL-22 (E) EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE PACIENTES SOS-SSP Y SOS-SSS EN TRATAMIENTO INMUNOMODULADOR EN COMPARACIÓN CON LOS CONTROLES

**Figura 34. Expresión de ARN mensajero de MUC1 (A), MUC4 (B), MUC16 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) en células conjuntivales de pacientes con SOS-SSP y SOS-SSS en tratamiento inmunomodulador en comparación con los controles. El ARN mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, extraído y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. \*corresponde a  $p < 0.05$ , \*\*corresponde a  $p < 0.01$ , ns = no hay una diferencia significativa entre los grupos.**

Cuando analizamos el grupo de pacientes con SOS sin tratamiento, se observó que MUC1 ( $p=0.0055$ ) y MUC16 ( $p=0.0408$ ) presentaron un aumento en su expresión génica en relación con los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de la expresión génica de MUC4, IL-17 e IL-22 (Figura 35). En la Figura 35b se comparan los tres grupos: pacientes tratados, no tratados y controles.

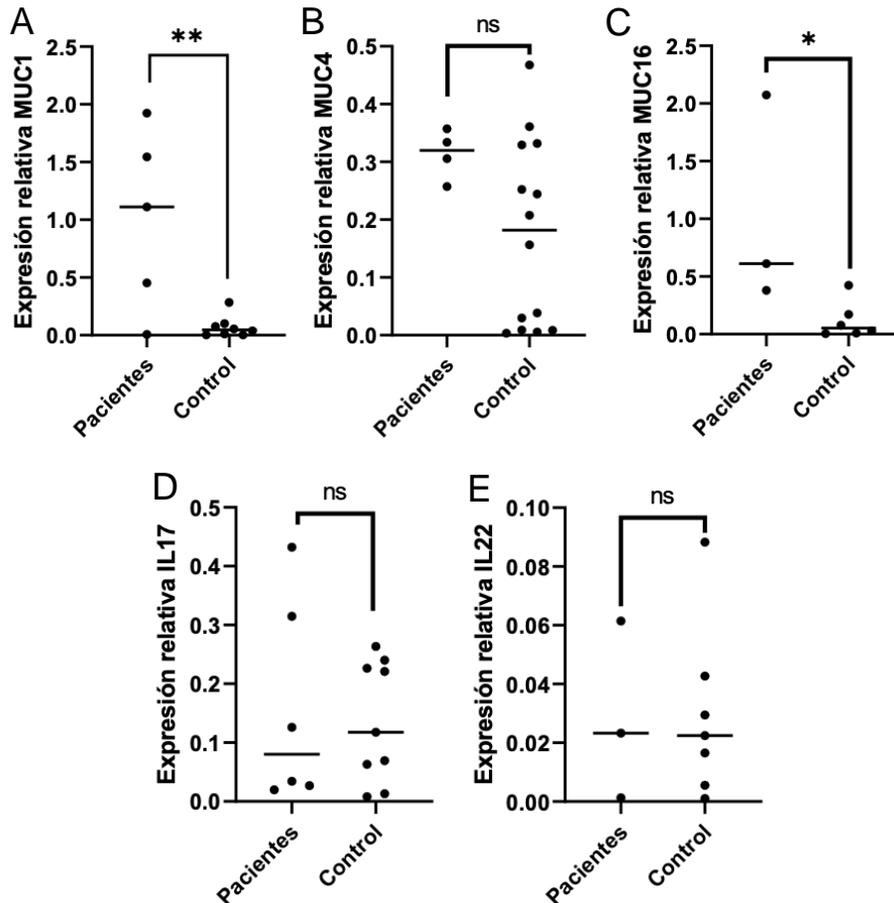
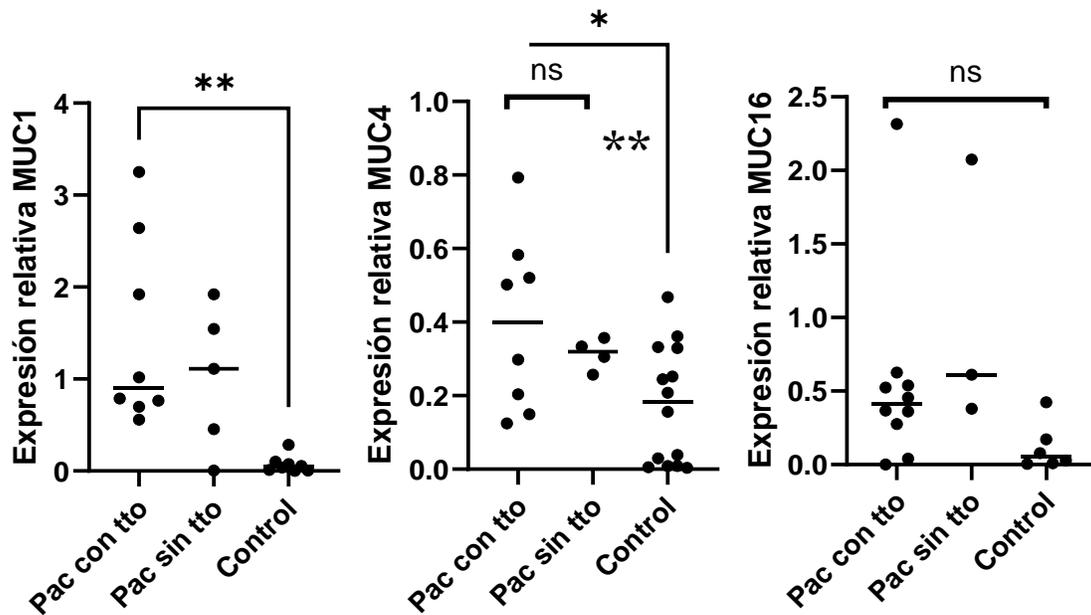


FIGURA 35. EXPRESIÓN DE ARNA MENSAJERO DE MUC1 (A), MUC4 (B), MUC16 (C), IL-17 (D) E IL-22 (E) EN CÉLULAS CONJUNTIVALES DE PACIENTES CON SOS SIN TRATAMIENTO INMUNOMODULADOR EN COMPARACIÓN CON LOS CONTROLES

**Figura 35a. Expresión de ARNA mensajero de MUC1 (A), MUC4 (B), MUC16 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) en células conjuntivales de pacientes con SOS sin tratamiento inmunomodulador en comparación con los controles.** El ANA mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, extraído y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. \*corresponde a  $p<0.05$ , \*\*corresponde a  $p<0.01$ , ns = no hay una diferencia significativa entre los grupos.



**Figura 35b.** Expresión de ARNA mensajero de MUC1 (A), MUC4 (B), MUC16 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) en células conjuntivales de pacientes con SOS con y sin tratamiento inmunomodulador en comparación con los controles. El ANA mensajero fue extraído de células conjuntivales obtenidas mediante técnica de impresión conjuntival, extraído y amplificado de la forma descrita en la sección de materiales y métodos. \*corresponde a  $p < 0.05$ , \*\*corresponde a  $p < 0.01$ , ns = no hay una diferencia significativa entre los grupos.

## EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON SUERO AUTÓLOGO AL 20% EN PACIENTES CON SS Y SOS

Ocho (44%) de los dieciocho pacientes se presentaron a su cita de seguimiento 8 semanas después de la evaluación inicial y una vez cumplidas las 8 semanas de tratamiento con SA 20% tal como fue indicado y protocolizado. El score de OSDI promedio previo al inicio del tratamiento fue de  $42.46 \pm 17.70$  el cual mejoró significativamente a  $13.76 \pm 6.67$  ( $p < 0.001$ ). A su vez hubo una mejoría significativa en el TBUT ( $p < 0.001$ ). No obstante, no hubo una diferencia significativa en la graduación de la queratopatía ( $p > 0.05$ ) o en el resultado de la prueba de Schirmer ( $p = 0.07$ ) (Tabla 5).

TABLA 5. Parámetros clínicos de daño de la superficie ocular y lagrima de los pacientes antes y después del tratamiento con suero autólogo.

Parámetros	Pre-tratamiento SA	8 semanas post tratamiento SA
OSDI score	$42.46 \pm 17.70$	$13.76 \pm 6.67^*$
TBUT (s)	$2.9 \pm 2.6$	$7.0 \pm 3.4^*$
Escala de queratopatía de Oxford	$2.0 \pm 1.1$	$1.9 \pm 0.6$
Schirmer I test (mm)	$3.5 \pm 3.6$	$6.1 \pm 4.1$

Abreviaciones: SA: Suero autólogo 20%. Todos los parámetros se expresaron como media  $\pm$  desvío estándar. El análisis estadístico entre los grupos y los controles se muestra junto al valor. \* $p < 0.05$ , pacientes vs. controles.

## DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

---

### PREVALENCIA E INCIDENCIA DEL SOS EN SS

---

Varios estudios epidemiológicos han reportado que la prevalencia del SOS varía significativamente entre diferentes regiones geográficas, desde el 5 al 50% de la población siendo afectada [118]. Un estudio reciente estimó una prevalencia global del SOS de 9.12% (con una desviación estándar (SD) de 0.04) [119]. Subdividido según sexo, las mujeres tendrían una prevalencia de 9.5% (SD = 0.05) y hombres 6.8% (SD = 0.06) [119]. Esto determina que el SOS sea una de las patologías oculares más frecuentes y con mayor repercusión en la calidad de vida de pacientes en una visión global. A su vez, la incidencia de SOS está en aumento consecuencia del mayor uso de pantallas digitales [120], contaminación ambiental [121] y el envejecimiento de la población.

A pesar de esta elevada prevalencia mundial de SOS, el principal desafío de nuestro trabajo fue la captación de pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión propuestos. Para este estudio, desde diciembre de 2017 a diciembre de 2019 se vieron 203 pacientes en la policlínica de enfermedades autoinmunes y patología ocular. Estos pacientes presentaron manifestaciones oculares de sus enfermedades autoinmunes sistémicas. En su mayoría, se trataba de pacientes con diagnóstico de uveítis, la cual se define como la inflamación de la úvea (ésta comprende el iris, cuerpo ciliar y coroides)[122]. La segunda patología observada en frecuencia fue la escleritis, generalmente asociada a vasculitis como por ejemplo la granulomatosis con poliangeítis. En relación al SOS, se capturaron un total de 45 pacientes los cuales habían sido diagnosticados con SSP o SSS y SOS. El diagnóstico de SS se basó en la presencia de anticuerpos en sangre anti-Ro y anti-La, sumado a la presencia de cualquier otro de los criterios descritos en la Tabla 1. A su vez, estos pacientes debían cumplir con los criterios para el diagnóstico de SOS (score de OSDI mayor a 12 y un TBUT menor a 10 segundos) y tener un déficit de secreción de lágrima (el punto de corte elegido fue un test de Schirmer menor a 13 mm).

A continuación, se descartaron los pacientes con comorbilidades oculares que requerían un tratamiento tópico que no fuera lágrimas artificiales (como el glaucoma o infecciones intercurrentes de la superficie ocular o margen palpebral) o que afectan directamente la SO (infecciones, trauma o cirugía ocular previa (en los últimos 3 meses) o usuarios de lentes de contacto. Además, se excluyeron pacientes con antecedentes de radiación en cabeza/cuello, infecciones o enfermedades neoplásicas activas intercurrentes o con uso concomitante de drogas anticolinérgicas dado que pueden confundir los hallazgos y/o síntomas del SOS. Al final de este estricto proceso de selección, se capturaron 18 pacientes con SOS y SS que cumplían todos los criterios. Los pacientes del grupo control fueron evaluados de la misma forma, registrando los parámetros ya descritos.

La literatura reporta que el SOS asociado a enfermedades autoinmunes va del 10% al 95% mundialmente. Por ejemplo, 38 – 47% de los pacientes con AR presentan SOS [24, 123], 13.4 – 39.5% de los pacientes con LES [124, 125] y 37 – 79% de los pacientes con esclerosis sistémica [35]. 95% de los pacientes con SS tienen SOS [126]. Los 18 pacientes finalmente captados con SOS y SS (9 de ellos con SSP y 9 con SSS) representaron un 9% de los pacientes vistos en esta clínica en este tiempo. Estos eran pacientes que cumplían con todos los criterios de inclusión y exclusión. Si analizamos el total de pacientes en los cuales hicimos diagnóstico de SOS asociado a SS estos fueron 45, representando un 22% de los pacientes con condiciones autoinmunes vistos. Como describimos anteriormente, dentro de

los pacientes con patología autoinmune, se estima que la prevalencia de SOS es generalmente mayor, en general superior al 35% en los casos de SSS como detallamos en el párrafo anterior, con la excepción del LES en el cual el porcentaje es algo menor. Pensamos que diferentes factores llevaron a incluir menos pacientes de lo estimado: en primer lugar, la exigencia de los criterios de inclusión. En segundo lugar, consideramos que fue un factor determinante el sesgo debido al sub reporte de síntomas de ojo seco por los pacientes al no considerar el SOS como una patología invalidante. Debemos recordar que estos son pacientes que tienen un diagnóstico de una condición sistémica, el SS, asociado o no a otra como el LES, ES o AR y por lo tanto, son pacientes generalmente polisintomáticos para los cuales los síntomas de ojo seco pueden representar un problema menor. Esto lleva a que únicamente pacientes con SOS severo fueran generalmente captados y valorados. El hecho que no exista una estimación de la incidencia o prevalencia de SOS en Uruguay da mayor relevancia incluso a nuestro trabajo. Una prevalencia del 22% dentro del grupo de pacientes con patología autoinmune es posiblemente una subestimación, pero de cualquier forma constituye la primera aproximación a la prevalencia de SOS secundario a SS primario o secundario en este grupo de pacientes en nuestro medio.

### LA PATOGENIA DEL SOS EN SS

---

En un intento de racionalizar los mecanismos causales y poder desarrollar terapias más efectivas, el SOS se ha clasificado en evaporativo (por disfunción de las glándulas de Meibomio - DGM) y por déficit de secreción del componente acuoso (como en el caso de pacientes con SS). Existe una diferencia fundamental entre estas dos categorías dado que, en aquellos con SOS secundario a ausencia o disfunción de las glándulas de Meibomio, la principal falla en el film lagrimal es la ausencia de la capa lipídica producida por estas glándulas lo que conduce a un aumento de la tasa de evaporación de la lágrima. Por el contrario, en pacientes con SOS por déficit de secreción del componente acuoso de la lágrima, el mecanismo troncal sería un déficit o hipofunción de las glándulas lagrimales y/o de la SO con una alteración del glicocálix y menor estabilidad lagrimal. Esto es lo que sucede en el SS, el cual es la patología objeto de este estudio.

El SS es la tercera enfermedad reumática más prevalente después de la AR y el LES. Se estima que la prevalencia del SSP va del 0.1 al 4.8% dependiendo de la edad [127, 128], y 90% de estos pacientes son mujeres. A pesar de su alta prevalencia, aún hay gran desconocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el SS-SOS.

El SS es una enfermedad inflamatoria autoinmune crónica, que se caracteriza histopatológicamente por la infiltración linfocítica de las glándulas exocrinas, principalmente las salivares y lagrimales con hiperactividad de los linfocitos B activados por autoantígenos, en particular generan anticuerpos contra partes de ribo-nucleoproteínas denominadas SSA/Ro y SSB/La. La función glandular se ve impedida por el infiltrado celular inflamatorio con producción de autoanticuerpos y destrucción de estructuras glandulares por mecanismos celulares involucrando la producción de interferones [126].

Se estima que el 10% de los SOS son pacientes con SS [129]. El SS-SOS nos resulta de particular interés por ser generalmente severo y de difícil tratamiento. A su vez, a diferencia del ojo seco secundario a DGM, aún hay un gran desconocimiento de los mecanismos subyacentes a esta afección. En particular, al día de hoy no existe un biomarcador claro que permita el diagnóstico y valoración de la respuesta terapéutica de estos pacientes ni tampoco un tratamiento efectivo para el mismo. Abordaremos nuestros hallazgos a continuación, los cuales brindan una aproximación a los cambios en

la producción de las mucinas mencionadas y su correlación con los parámetros clínicos, así como con la presencia de citoquinas del perfil Th17 como la IL-17 e IL-22.

### EL ROL DE LAS MUCINAS EN EL SOS POR SSP Y SSS

---

Nuestro conocimiento actual sobre la expresión de mucinas de la SO en pacientes con SS sigue siendo escasa y conflictiva. En particular en el SS también la evidencia es conflictiva en relación a las modificaciones en la expresión de mucinas. Por un lado, Argueso et al. no observaron cambios significativos en la expresión de ARNm de MUC1 y MUC4 en las lágrimas de pacientes con SS y SOS, mientras que los niveles del ARNm de MUC5AC estaba disminuido, al compararlo con las lágrimas de individuos normales [52]. Por otro lado, Caffery et al. observaron un aumento en la expresión de MUC1 y MUC16 en pacientes con SOS y SS al compararlos con individuos normales [84, 85].

En nuestro trabajo de investigación, nos planteamos como uno de nuestros objetivos determinar las diferencias en la expresión de estas 3 mucinas transmembrana (MUC1, MUC4 y MUC16) en un grupo de pacientes con SOS secundario a SS (tanto primario como secundario) y compararlo a un grupo control. En la Figura 36 se observa la estructura molecular de estas mucinas. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la expresión de MUC1 y MUC4, así como una tendencia al aumento de MUC16 que no llegó a ser estadísticamente significativa en el global de los pacientes, pero sí cuando analizamos el subgrupo de pacientes con SSP. A su vez, y como es esperable, se observó una correlación significativa en la cual los pacientes con mayor expresión de MUC1 también tenían mayores cantidades de ARNm de MUC4. Es importante aclarar que esta correlación fue significativa solo en pacientes con SSP.

Nuestra hipótesis inicial era que observaríamos una disminución en la expresión de estas mucinas en relación al daño de la superficie ocular. Esta hipótesis se basó en el conocido rol protector que las mucinas juegan normalmente en las superficies epiteliales, atrapando agentes patógenos y su estudiada naturaleza inmunorreguladora. Sin embargo, obtuvimos resultados opuestos a los que esperábamos. Investigando lo que ocurre en otros tejidos que expresan gran cantidad de mucinas, podemos hipotetizar cual es el mecanismo subyacente a lo que nosotros observamos. Estos se aclaran a continuación.

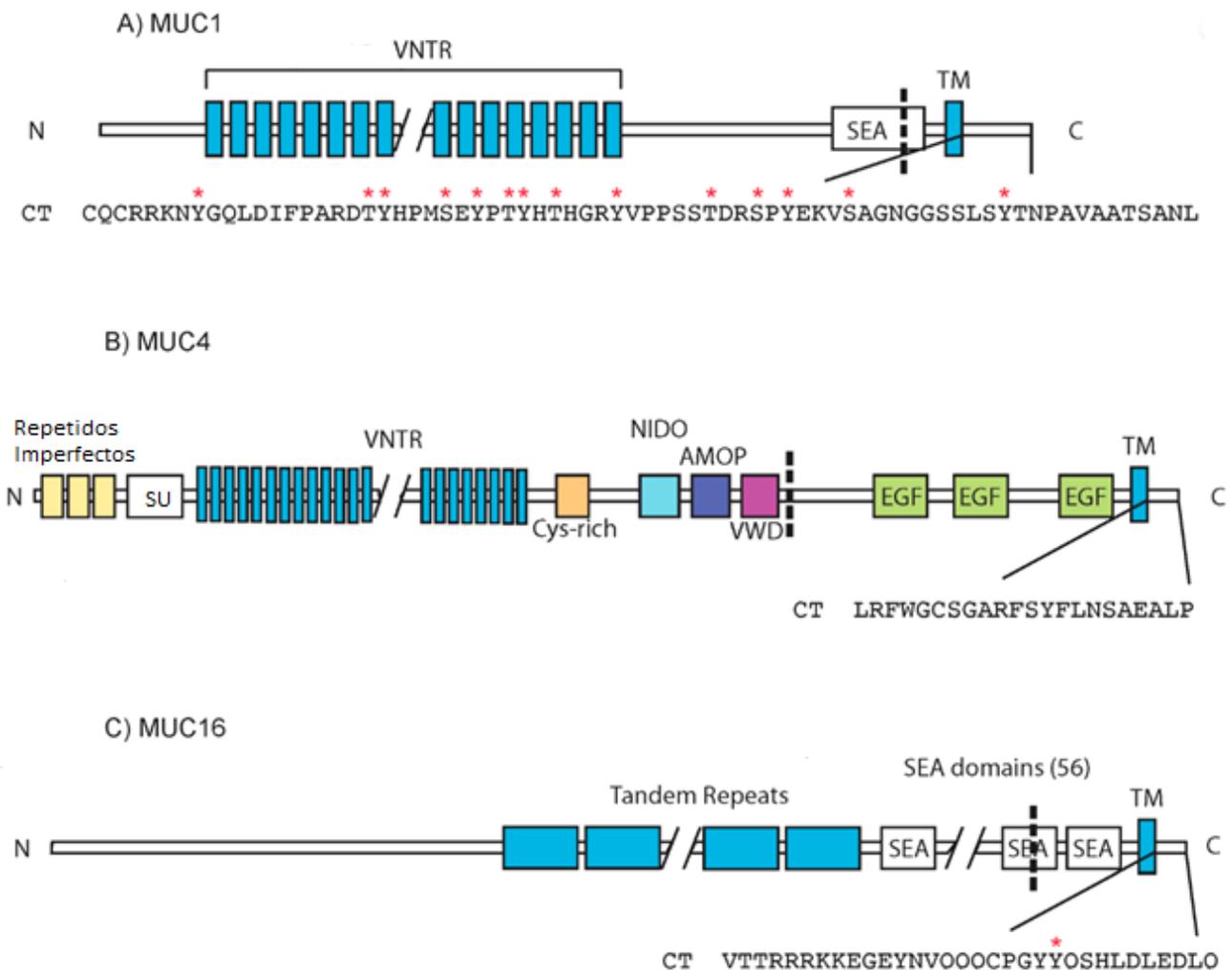


FIGURA 36. ESTRUCTURA DE MUC1, MUC4 Y MUC16.

**Figura 36. Estructura de MUC1, MUC4 y MUC16.** Estructuras de dominio generales para MUC1 (A), MUC4 (B) y MUC16 (C). Los sitios de escisión están representados por líneas discontinuas y la secuencia de la cola citoplasmática se representa para cada mucina. Los residuos fosforilados confirmados se indican con asteriscos rojos. Las proteínas no se dibujan a escala. VNTR: dominio de repetición en tándem de número variable; SEA: proteína espermática, enteroquinasa, dominio agrina; TM: dominio transmembrana; TC: cola citoplasmática; NIDO: dominio tipo nidogen; AMOP: dominio asociado a adhesión en MUC4; VWD: dominio tipo D del factor de von Willebrand; EGF: dominio similar al factor de crecimiento epidérmico[56].

MUC1 es una mucina unida a una membrana con una cola citoplasmática expresada además de en la córnea y conjuntiva, en células epiteliales secretoras de las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal y el tracto reproductivo femenino. Por ejemplo, en el caso del síndrome inflamatorio intestinal, la expresión de MUC1 está aumentada frente a la presencia de citoquinas proinflamatorias [130]. Se ha visto que MUC1 activaría la vía del inhibidor del factor nuclear quinasa kappa beta (IKKb) y el factor nuclear kappa beta (NF-kb) el cual estaría involucrado en la tumorigénesis inducida por inflamación [131]. De esta forma, nuestros resultados con un aumento de MUC1 frente a una situación de daño podría representar una respuesta similar a otros epitelios del organismo con aumento de la expresión de MUC1 en circunstancias pro inflamatorias.

MUC4 es otra mucina unida a membrana también presente en los epitelios donde encontramos a MUC1. Su expresión en las células epiteliales de las vías respiratorias parece estar localizada de manera no específica en las células basales, ciliadas y caliciformes [132]. La literatura publicada ha reportado que IL-4, IL-9 y la elastasa secretada por neutrófilos aumentan la expresión de MUC4 en las células epiteliales de las vías respiratorias. En el caso de IL-4 e IL-9, se creía que el mecanismo era la activación transcripcional [133, 134], mientras que para la elastasa proveniente de neutrófilos se produjo un aumento en la estabilidad del ARNm [135]. Se ha visto que MUC4 aumenta su expresión en condiciones de inflamación intestinal como la colitis y en el cáncer colorrectal [136]. En este sentido se ha visto que ratones MUC4 -/- son resistentes al desarrollo de colitis viéndose una regulación al alza de la expresión de MUC2 y MUC3. A su vez se observó que tenían menor desarrollo de tumores intestinales [136]. En la misma línea, y como dato interesante, en otra patología autoinmune de la SO, el pénfigo ocular cicatrizable, se ha visto que en sus etapas tempranas ocurre un aumento en la distribución de polipeptidil-GalNAc'Transferasas, las cuales están encargadas del inicio del agregado de O-glicanos al esqueleto de residuos de serina o treoninas en las mucinas (Figura 37) [137]. Esto sugeriría que las células epiteliales de la superficie ocular tendrían una respuesta compensatoria al ataque autoinmunitario sintetizando O-glicanos para mantener la superficie húmeda a nivel del epitelio apical.

También se ha observado que la expresión de MUC16 está regulada positivamente en respuesta a factores inflamatorios, incluyendo LPS, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ , en el epitelio reproductivo de pacientes con cáncer de ovario a través de NF- $\kappa$ B [138]. Curiosamente, los estímulos inflamatorios como la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  regulan negativamente la expresión y producción de MUC16 por células epiteliales corneales [139]. Por el contrario, estas citocinas, así como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , aumentan la eliminación de MUC16 de células epiteliales conjuntivales cultivadas [140]. Como los niveles de citoquinas proinflamatorias están regulados positivamente en las lágrimas de pacientes con síndrome de Sjogren [141] la desregulación de MUC16 podría ser un mecanismo que contribuye al empeoramiento de la enfermedad del ojo seco en estos pacientes.

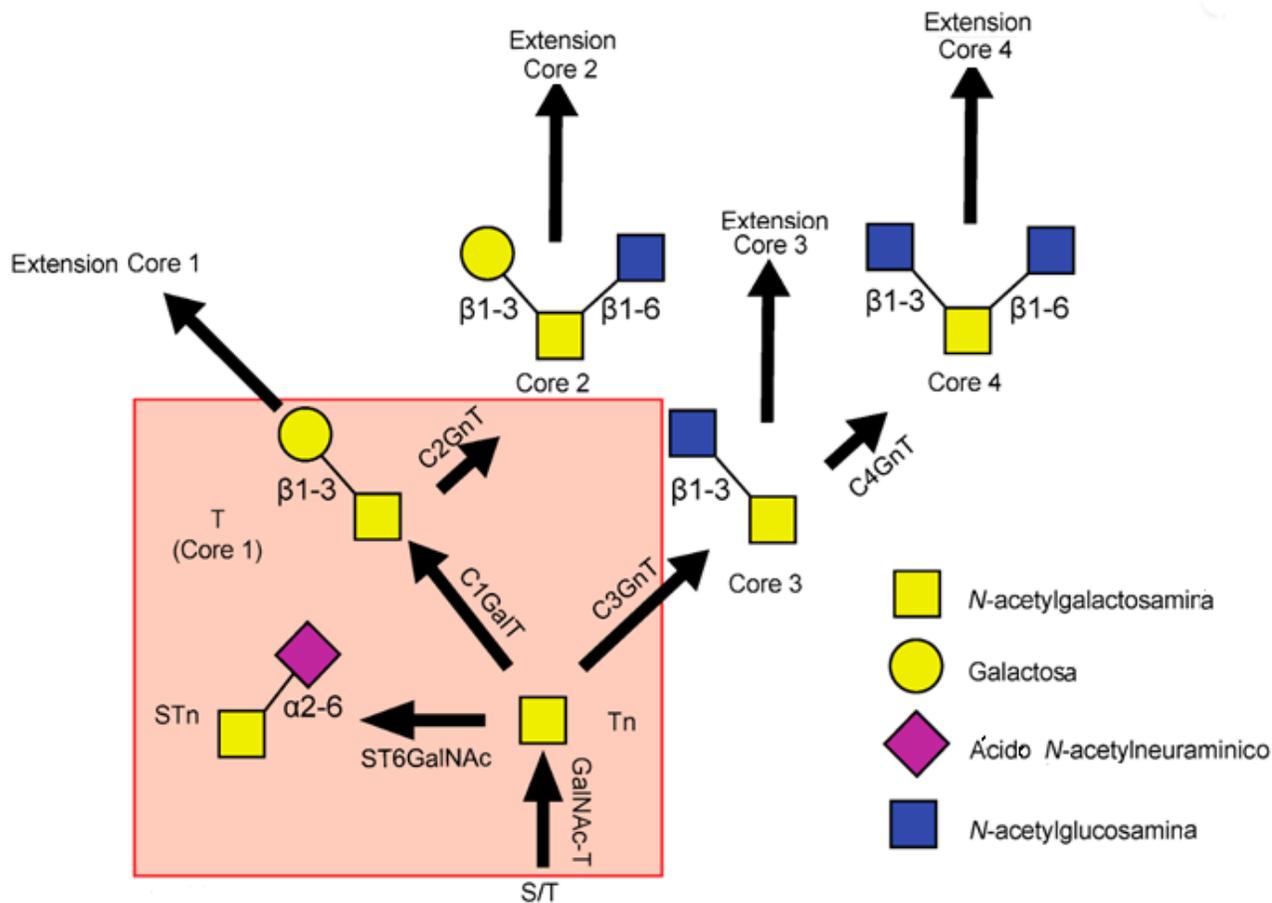


FIGURA 37. O-GLICOSILACIÓN DE TIPO MUCINA

**Figura 37. O-Glicosilación de tipo mucina.** Representación esquemática de la glicosilación tipo O de mucinas. La misma comienza mediante la adición de N-acetilglucosamina (GalNAc) a los residuos de serina o treonina presentes en la cadena principal de mucina. Estas estructuras luego se extienden a las estructuras Core 1, Core 2, Core 3 y Core 4 mediante la adición del glúcido indicado. La enzima involucrada en cada reacción se indica con la flecha y las líneas de enlace indican la unión de cada glúcido. Los epítipos T, Tn y sialil-Tn (STn) asociados se encuentran en el recuadro, estos están asociados a cáncer. Gal: galactosa; GalNAc-T: GalNAc-transferasa; C3GnT: Core 3. N-acetilglucosamina transferasa; C4GnT: Core 4 N-acetilglucosamina transferasa[56].

## PARÁMETROS CLÍNICOS Y LA EXPRESIÓN DE MUCINAS

---

En nuestro estudio evaluamos como se relacionaron la expresión de las distintas mucinas y los diferentes parámetros clínicos de ojo seco evaluados. En relación a la sintomatología de ojo seco, observamos que tanto MUC1 como MUC16 se correlacionaron positivamente con la mayor expresión de síntomas de ojo seco. No fue así en el caso de MUC4 con la cual no hubo una correlación significativa. Esto pensamos podría haberse observado de haber tenido un mayor reclutamiento de pacientes.

Cuando analizamos ahora los signos clínicos en el examen oftalmológico, se apreció una correlación positiva entre la expresión de MUC1 y MUC4 y el grado de la queratopatía en la escala de Oxford. En el caso de MUC16, esta relación fue marginalmente significativa con un  $p=0.55$ . Es posible que aumentando el número de pacientes MUC16 demostrara la misma asociación. Esto iría de la mano que, a mayor daño, mayor secreción de estas mucinas como discutimos en la sección anterior.

Cuando nos centramos en la producción del componente acuoso de la lágrima, valorado mediante el test de Schirmer, este se correlaciono de forma directa de forma significativa únicamente con MUC4. Aquellos pacientes con menor producción de lágrimas tenían mayores niveles de expresión de esta mucina. Esto va de la mano con el concepto delineado anteriormente que la expresión de esta mucina aumenta en el SOS. No observamos correlación en el caso de MUC1 y MUC16. Es importante remarcar que hubo una diferencia significativa en el resultado del test de Schirmer entre pacientes con SSP y SSS. Los pacientes con SSP tenían significativamente menor producción de lágrimas comparado con los pacientes con SSS. Esto pensamos pueda deberse a que el SSP haya una mayor afectación de la glándula lagrimal en relación al SSS, generando así una menor producción del componente acuoso de la lagrima.

Al observar el tiempo de rotura de la lágrima (TBUT) no se correlacionó significativamente con ninguna de las tres mucinas estudiadas. Sin embargo, en la literatura se ha observado que determinados patrones de rotura de la lágrima se asocian a la alteración en la expresión de mucinas específicas. Por ejemplo, se ha observado un menor TBUT en pacientes con menor expresión conjuntival de MUC1, MUC16 y MUC20 en pacientes con SOS no SS [137]. Pensamos que no haber confirmado estos hallazgos puede deberse a que esto ha sido únicamente descrito para pacientes con SOS no-SS. Otra posibilidad, es que como el tiempo de rotura también depende de la expresión de otras mucinas, principalmente MUC5AC la cual no fue incluida en nuestro estudio, este puede no haber sido afectado. La misma no fue incluida por no ser una mucina transmembrana, y por lo tanto, a diferencia de MUC1, MUC4 y MUC16 que presentan un componente citoplasmático, MUC5AC no tendría a priori un efecto directo en la expresión de citoquinas proinflamatorias. En tercer lugar, es también posible que esto se observe al aumentar el número de pacientes incluidos en el estudio.

## EL TRATAMIENTO INMUNOMODULADOR Y LA EXPRESION DE MUCINAS

---

Uno de los factores más relevantes en nuestro estudio es que dos tercios de nuestros pacientes reclutados se encontraban ya bajo alguna forma de tratamiento inmunorregulador, lo cual aporta un ejemplo más realista de lo que ocurre en pacientes diagnosticados con SS. Dos tercios de los pacientes bajo tratamiento recibían hidroxiclороquina 200 mg al día. Del tercio restante, 50% recibían metotrexate a una dosis de 15 mg semanal, 25% estaba bajo tratamiento combinado con mofetil micofenolato y 25% combinado con azatioprina 10 mg al día. Al separar el grupo de pacientes tratados del conjunto total de pacientes, existiría una diferencia en el tipo de mucina sobre-expresada, en los pacientes en tratamiento hay un aumento de MUC1 y MUC4, mientras que en los pacientes no tratados MUC1 y MUC16 fueron significativamente más expresadas que en los controles. Debemos confirmar estos resultados en estudios con un mayor número de pacientes ya que esto podría potencialmente tener implicancias terapéuticas, favoreciendo la estimulación dirigida a una u otra mucina de contar con esta posibilidad en el futuro.

## LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

---

Tanto la inmunidad innata como adaptativa participan de la patogenia del SOS asociado a SS. Estudios previos encontraron que tanto un perfil Th1 como Th17 serían los principales actores [142]. Por este motivo, elegimos el estudio de las citoquinas IL 17 e IL 22 las cuales son las principales citoquinas efectoras de este perfil linfocitario. Estas citoquinas mantienen la integridad de la barrera epitelial estimulando la formación de proteínas que conforman las uniones estrechas [143]. En especial IL-22 tiene un rol importante en la supervivencia y proliferación celular. Por su parte IL-17 tendría un rol estimulando la producción de péptidos antimicrobianos y quimioquinas que atraen leucocitos cuando la barrera epitelial es penetrada [144]. Inicialmente la polarización de las células Th17 se inicia por las células dendríticas en los nodos linfáticos que drenan las glándulas salivares y lagrimales, mientras que en fases más tardías de la enfermedad de Sjögren también ocurre localmente en el tejido glandular inflamado. Estas células dendríticas secretan citoquinas polarizantes hacia el perfil celular Th17, incluyendo TGF- $\beta$  e IL-23. Las células epiteliales ductales de estas glándulas también producen citoquinas importantes para la polarización hacia Th17 como la IL-1 $\beta$  [145]. Los linfocitos Th17 activados promueven la inflamación estimulando la liberación de citoquinas proinflamatoria en las glándulas exocrinas, incluyendo IL-6 y TNF $\alpha$ , al secretar IL-17 e IL-22 las cuales se unen a sus receptores expresados en células epiteliales y estromales [146]. La IL-17 también promueve la producción de metaloproteasas de la matriz como MMP-9, la que se asocia al daño acinar [147].

No lo abordamos en este estudio, pero las citoquinas del perfil Th1, principalmente el IFN- $\gamma$ , estarían involucrados en la muerte de células caliciformes [148]. Éste juega un rol central en la metaplasia conjuntival y la disminución del número de CC. Además, el estrés por la desecación produce un aumento de IFN $\gamma$  el cual a su vez induce una disminución de la producción de interleucina (IL)-13, la cual está asociada a un rol protector en las CC [148]. En este sentido, se ha propuesto que una expresión constitutiva de IL-13 sería requisito para un control homeostático de las CC al estimular la producción de MUC5AC y MUC2 [76, 77].

En un estudio previamente realizado en el que se compararon 20 pacientes sanos con 20 pacientes con SOS no SS y 20 pacientes con SOS – SS se observó que los niveles de IL-17 e IL-22 se encontraban aumentados en pacientes con SOS-SS significativamente en relación a los no SS y a los controles sanos [87]. A su vez, el nivel de estas citoquinas se correlacionaba positivamente con el cuestionario de queratopatía OSDI y negativamente con el TBUT y el resultado del test de Schirmer [87]. En nuestro estudio, observamos como era esperable una fuerte correlación entre la expresión del mRNA de ambas citoquinas, es decir, aquellos pacientes con mayor expresión del mRNA de IL17 presentaban mayor expresión también de IL-22. Esto tiene sentido ya que ambas citoquinas corresponden a un perfil Th17. A su vez, observamos que aquellos pacientes con mayor expresión de MUC16 presentaban mayor expresión de IL 22 de forma significativa. Esto va en la misma línea que el estudio mencionado anteriormente ya que vimos que pacientes con mayor expresión de MUC16 eran pacientes significativamente más sintomáticos y probablemente con mayor nivel de queratopatía (esta fue marginalmente significativa en relación a MUC16).

Sin embargo, no logramos reproducir los resultados que muestran que IL -17 e IL-22 se correlacionan directamente con los parámetros clínicos, demostrando una asociación que refleja que mayor producción de estas citoquinas se asocian a SOS más severos. Debemos destacar que el cuestionario utilizado en el estudio referido no fue el OSDI en el cual nos basamos nosotros y el índice de queratopatía fue basado en la tinción con fluoresceína a diferencia del verde de lisamina que nosotros utilizamos. Esto puede generar una cierta variabilidad, aunque no debería ser de significancia ya que son alternativas válidas para la evaluación clínica. La medición de producción de citoquinas en el estudio referido fue mediante ELISA en lágrimas de pacientes detectando directamente la presencia de proteínas. Pensamos que sería importante como hemos remarcado anteriormente repetir este mismo análisis incluyendo un mayor número de pacientes para poder confirmar o no la literatura al respecto.

También es importante remarcar que IL-17 e IL-22 pueden no detectarse en caso de que con la impresión no haya tomado linfocitos de la superficie ocular. En este sentido, el estudio de citoquinas que favorezcan la diferenciación y proliferación de un perfil Th17 y que son secretadas por células epiteliales como IL-6 e IL-23 podría haber sido una buena alternativa. En el mismo sentido, se ha visto que IL-22 es secretada a nivel de la glándula lacrimal y esto podría explicar porqué no observamos una sobre expresión en nuestras muestras.

## EL TRATAMIENTO DE ESTOS PACIENTES CON SUERO AUTÓLOGO

---

Este estudio, a su vez, apoya los resultados obtenidos por Tsubota et al. demostrando un claro beneficio en usar SA al 20% en pacientes con SOS asociado a SS. A pesar del desarrollo de nuevas terapias, incluyendo estimulantes de la producción de mucinas, el SA sigue siendo una excelente alternativa terapéutica. La ventaja en nuestro medio es que, a partir del desarrollo de la policlínica especializada de ojo seco en el Hospital de Clínicas, la cual se realiza en coordinación entre integrantes del departamento de oftalmología y hemoterapia, se consigue una alternativa con mínimo costo y accesible a nuestra población objetivo. Esto contrasta con la falta de acceso a medicaciones como el diquafosol trisódico y rebamipide, los cuales no solo no se encuentran disponibles en nuestro medio, sino que su costo los torna prácticamente prohibitivas en el sistema de atención sanitaria público. El mayor desafío encontrado es la concurrencia de los pacientes a sus visitas de seguimiento. Hemos observado que aquellos pacientes que utilizaron el SA normalmente no encontraron mayores dificultades en la

conservación del mismo (en el freezer cuando los colirios aun no estaban en uso y en la heladera mientras se encontraban abiertos y siendo utilizados). A su vez, la mejoría clínica hizo que el cumplimiento de la posología del mismo (usualmente de libre uso, en promedio 6 aplicaciones diarias) fuera bueno de acuerdo con lo reportado por los pacientes.

Como describimos anteriormente, múltiples componentes del film lagrimal son fundamentales para la mantener una superficie ocular saludable, entre ellos el factor de crecimiento epitelial (EGF) y la vitamina A al regular la proliferación, diferenciación y maduración del epitelio de la superficie ocular todos los cuales se han demostrado están presentes en el SA. Esta sería la base fisiológica detrás de su efectividad en estos pacientes. Consideramos será de crucial importancia estudiar la expresión de mucinas en pacientes luego del tratamiento con SA y nos proponemos llevar adelante esto en una segunda etapa.

Metodológicamente este sería el mismo procedimiento midiendo los mismos parámetros clínicos y de expresión de RNA mediante PCR, pero luego del tratamiento con SA 20%, por ejemplo, a los 4, 8 y 12 meses del tratamiento. Esto podría dar una idea más completa de cómo cambia la expresión de MUC1, MUC4 y MUC16 al mejorar la superficie ocular.

## **EL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE VALORACIÓN Y TRATAMIENTO FOCALIZADA EN ESTA PATOLOGÍA EN NUESTRO MEDIO**

---

Es importante también valorar, que este proyecto ha sido el motor no sólo para la generación de un equipo multidisciplinario para valorar y tratar pacientes con ojo seco, lo cual no tiene precedentes en el sistema público o privado de nuestro país, sino también se ha logrado sistematizar la evaluación de estos pacientes, estandarizando el examen clínico, agilizando la atención y optimizando el registro de los marcadores clínicos que evidencian y permiten graduar el daño a la superficie ocular. Esto ha permitido generar y registrar una gran cantidad de información en relación a esta subpoblación lo cual puede ser explotado para consiguientes trabajos de investigación.

A su vez, se ha logrado establecer una comunicación ágil e integración en la valoración y tratamiento de pacientes que son vistos a través de la unidad de enfermedades autoinmunes sistémicas del Hospital de Clínicas. De esta forma se ha optimizado la atención fluida y eficaz de pacientes con patologías autoinmunes que en muchos casos sufren de SOS por SS secundario.

Es de fundamental relevancia destacar que se ha conseguido a partir de este proyecto desarrollar y poner a punto la técnica de toma de biopsia por impresión conjuntival, el correcto almacenamiento de las muestras y la optimización para las condiciones de realización de RT PCR a partir de este material biológico, el cual plantea un especial desafío por la escasez de muestra que se consigue obtener. Esto abre la puerta a valorar nuevos marcadores inflamatorios y glicoproteínas de la superficie ocular.

Este estudio también invita a continuar utilizando la logística desarrollada de captación y seguimiento de pacientes con ojo seco y continuar evaluando los mismos parámetros bajo diferentes condiciones terapéuticas, así como otras moléculas potencialmente involucradas en el desarrollo de síntomas y signos del ojo seco de diferente etiología.

Una pregunta natural que surge es cuáles son los cambios en la expresión de citoquinas y mucinas que explican la mejoría sintomática y clínica de los pacientes tratados con suero autólogo. De esta manera, sería interesante estudiar estas mismas mucinas y citoquinas a distintas marcas temporales luego de iniciado el tratamiento de los pacientes con suero autólogo. Nos proponemos incluir más pacientes y controles de manera de poder detectar correlaciones que posiblemente no fueron significativas en nuestro estudio debido a esta limitación.

Por otro lado, la glicosilación de las mucinas de la SO también se encuentra alterada en los pacientes con SOS producto de una alteración en la expresión de glicosiltransferasas que participan en este proceso. El bloqueo en la síntesis de O-glicanos conduce a la liberación de Galectina 3 al film lagrimal, una proteína que se une selectivamente a los mismos, manteniendo la estabilidad del glicocáliz. Por este motivo, se ha sugerido que la Galectina 3 podría constituir un biomarcador del SOS. De la misma manera las ppGalNAc-Transferasas podrían estar involucradas en el inicio de la O-glicosilación. Otro elemento importante es que se ha observado que los niveles de metaloproteinasas de la matriz (MMP) 9 se encuentran aumentadas en estos pacientes. Estas metaloproteinasas degradarían la Galectina 3, aumentando los monómeros de galectina que interferirían en la oligomerización de mucinas dependiente de galectina [83]. De la misma forma, sería interesante el estudio de la glicosilación de mucinas mediante el uso de lectinas e incluso poder medir los niveles de expresión de diferentes glicosil-transferasas. Sabemos que tanto la expresión diferencial de la parte proteica como de su glicosilación van a afectar potencialmente la función de las mucinas.

Por supuesto desearíamos estudiar directamente la presencia de mucinas mediante western blot y citoquinas mediante ELISA en la lagrime. La principal limitante que encontramos fue que dado que estos pacientes de por si tienen una deficiencia en la producción de la lagrime, obtener muestras es dificultoso y muchas veces involucra la dilución de la muestra, lo que confunde los resultados si la dilución de la muestra de lagrime no es exacta en todos los pacientes.

Sería de gran interés caracterizar como cambia la expresión de mucinas y citoquinas dependiendo del tratamiento sistémico o tópico con suero autólogo.

Proyectándonos incluso más allá de lo mencionado, podríamos estudiar marcadores de actividad en sangre de las diferentes condiciones inflamatorias como por ejemplo componentes del sistema de complemento o título de anticuerpos específicos como los antinucleares y correlacionarlos con cambios en la expresión de mucinas en la superficie. De la misma manera, los cambios en las mucinas podrían ser un predictor de un empuje de la enfermedad.

Las principales debilidades de nuestro estudio fueron un bajo número de pacientes, la escasez del material genómico obtenido lo que limitó la capacidad de repetir ensayos, un corto seguimiento luego de iniciado el tratamiento con suero autólogo y que la mayoría de nuestros pacientes se encontraban bajo tratamiento inmunomodulador sistémico. Esto último en parte confunde el análisis de los resultados, pero al mismo tiempo hace este estudio uno que refleja la realidad más frecuente de estos pacientes, haciendo sus resultados más extrapolables a los que vemos en nuestra práctica clínica. En trabajos subsiguientes sería importante aumentar el número de pacientes incluido y aumentar el tiempo de seguimiento para poder tener más resolución en los resultados.



## CONCLUSIONES

---

A lo largo de este trabajo de doctorado PROINBIO, se utilizó una combinación de diversas estrategias experimentales y clínicas para estudiar la superficie ocular en pacientes con síndrome de Sjögren y síndrome de ojo seco y la correlación de estos hallazgos con la clínica del paciente. Ambas patologías poseen alta prevalencia e impacto en la calidad de vida de la población objetivo.

A partir de los resultados obtenidos podemos arribar a las siguientes conclusiones:

- Conseguimos articular un servicio dirigido a los pacientes con SOS con la participación de un equipo multidisciplinario integrado por médicos oftalmólogos pertenecientes a la cátedra de oftalmología (valoración- seguimiento - indicación terapéutica), hemoterapia (desarrollo del colirio de suero autólogo) y servicio de enfermedades autoinmunes (captación de los pacientes con síndrome de Sjögren primario o secundario) del Hospital de Clínicas en Montevideo, Uruguay,
- Desarrollamos y pusimos a punto la toma de biopsias de células conjuntivales mediante impresión conjuntival. Este procedimiento no se había realizado anteriormente en nuestro medio para la realización de estudio de expresión génica. También conseguimos sistematizar el correcto almacenamiento y procesamiento de las muestras para la realización de RT-PCR. Esto permitirá continuar el estudio de nuevos marcadores en esta y otras patologías de la SO.
- Determinamos la primera estimación de prevalencia de SOS en una población de pacientes con diagnóstico de otras patologías autoinmunes en nuestra población la cual fue discretamente menor a la reportada en la literatura. Esta fue de 22% de los pacientes, constituyendo la primera estimación en Uruguay de SOS en pacientes con patología autoinmune.
- Logramos determinar la expresión génica de las tres principales mucinas transmembrana de la SO en nuestro grupo de pacientes estudiados e individuos sanos. Observamos un aumento significativo de la expresión de MUC 1 y MUC 4 en nuestro grupo de pacientes.
- Detectamos una diferencia en la expresión del ARNm estas mucinas entre pacientes con SSP (aumento de MUC1 y MUC4) y SSS (únicamente MUC1 se vio significativamente elevada).
- Asimismo, correlacionamos estos hallazgos con la clínica (síntomas y signos de ojo seco) observando que MUC4 correlaciona significativamente tanto con menor producción del film lagrimal, así como una mayor queratopatía superficial.
- La expresión de ARNm de MUC1 y MUC16 se correlacionaron positivamente con una presencia de síntomas mas severos de SOS.
- Evaluamos la expresión de citoquinas pro inflamatorias del perfil Th17 como son IL 17 e IL 22. Observamos como la IL 22 se correlaciona con la expresión génica de MUC16, la cual a su vez aumenta en pacientes con mayor sintomatología de SOS y aumenta en pacientes con mayor grado de queratopatía. Encontramos una correlación significativa entre la expresión de ambas citoquinas como era esperable ya que ambas son citoquinas que corresponden a un mismo perfil de respuesta linfocitaria.

- No pudimos reproducir los resultados vistos en la literatura, aunque escasa ya que solo conocemos un estudio previo que aborda la relación entre IL 17 e IL 22 en SOS SSP o SSS la cual reporta que los pacientes con SOS presentan un aumento de estas citoquinas en relación a una mayor severidad clínica del SOS. En nuestro estudio no observamos diferencia entre nuestro grupo de pacientes y grupo control ni una correlación con los síntomas o signos del SOS.
- Evidenciamos los beneficios del tratamiento de estos pacientes con suero autólogo al 20% el cual es una opción terapéutica disponible en nuestro medio que está subutilizada por la falta de evidencia clínica hasta el momento. Estos resultados son un sustento objetivo de la efectividad del tratamiento para este grupo de pacientes.

## **ANEXO I – PREGUNTAS DE SCREENING SOS**

---

- 1- ¿Cuál es la severidad de las molestias?
- 2- ¿Boca seca o agrandamiento glandular?
- 3- ¿Tiempo de duración de los síntomas y si ha identificado algún factor desencadenante?
- 4- ¿Afecta la visión? ¿Mejora con el parpadeo?
- 5- ¿Son los síntomas y el enrojecimiento igual en ambos ojos?
- 6- ¿Picazón, edema, costras, secreciones?
- 7- ¿Usa lentes de contacto?
- 8- ¿Enfermedad sistémica (incluso infecciones respiratorias recientes), o medicación sistémica?
- 9- Examen de segmento anterior para identificar diagnósticos diferenciales.

## ANEXO II - HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

---

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

---

**"Interfase inmunológica de la superficie ocular:** Expresión de MUC1, MUC 4 y MUC 16 y producción de citoquinas proinflamatorias en pacientes con síndrome de ojo seco secundario a enfermedad de Sjogren".

**Estudiante:** Dra. Natalie Brossard - Residente de Oftalmología de primer año.

**Director Académico Científico:** Dra. Teresa Freire, Dra. María Elena Vergara, Dr. Ernesto Cairoli.

**Lugar de ejecución:** Cátedra de Oftalmología, Facultad de Medicina, UdelaR y Departamento de Inmunobiología.

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Facultad de Medicina, UdelaR.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

#### PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

#### DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

El síndrome de ojo seco es un trastorno de la lágrima y la superficie del ojo que causa grandes dificultades en la vida diaria de los pacientes afectados. Este proyecto pretende demostrar la importancia de uno de los componentes de la superficie ocular (mucinas y sustancias producidas en una reacción inflamatoria) en vistas a conocer mejor la enfermedad y poder desarrollar mejores tratamientos en el futuro y así mejorar la sintomatología y calidad de vida de los sujetos afectados.

#### PROPÓSITO DEL ESTUDIO:

Demostrar que la alteración de MUC1 se asocia a síntomas más severos de ojo seco y a un aumento en la inflamación de la superficie ocular.

#### PROCEDIMIENTOS/EXPLICACIÓN DEL ESTUDIO:

Una vez diagnosticado en consulta se procederá a lo siguiente: Se formulará una serie de preguntas sobre su calidad de vida actual, una exploración oftalmológica completa y se tomará muestra de su lágrima, así como de células de la superficie ocular con un papel, todos los procedimientos son indolores y habituales de la consulta oftalmológica.

En la consulta se observará el estado de sus párpados (examen oftalmológico con lámpara de hendidura), realizando el Test de Schirmer (consiste en la instilación de 1 gota de anestésico tópico en ambos ojos y la introducción en conjuntiva inferior de un papel milimetrado para cuantificar la lágrima producida) para valorar la sequedad de sus ojos y que no presenta ninguna molestia para el paciente.

La finalidad de este estudio es valorar la importancia de mucinas y sustancias asociadas a la inflamación en esta patología. Los resultados obtenidos se aplicarían en el desarrollo eventual de tratamientos que lleven a una mejora de la calidad de vida de los pacientes. El sujeto o el representante legal del sujeto será informado en todo momento si se dispone de nueva información que pueda ser relevante para la decisión del sujeto de continuar participando en el estudio.

No existe contraprestación económica de ningún tipo en este estudio. El número total de personas que realizarán el estudio es de 33. El investigador del estudio, es responsable de informar y contestar al sujeto sobre sus dudas y preguntas.

#### BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

No existen riesgos derivados de su participación en el estudio, es posible que no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio.

#### CONFIDENCIALIDAD

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones (si existe alguna situación especial por la que se necesitará conocer la identidad del sujeto para cumplir con algún requisito del estudio se debe explicar en este apartado), en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

#### COMPENSACIÓN ECONÓMICA

Usted no tendrá que pagar por el estudio de las muestras tomadas en la consulta.

DATOS DE CONTACTO: Dra. Natalie Brossard. Cátedra de Oftalmología, Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay. nataliebrossard@fmed.com.uy tel. 099913179

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

---

**"Interfase inmunológica de la superficie ocular: Expresión de MUC1, MUC 4 y MUC 16 y producción de citoquinas proinflamatorias en pacientes con síndrome de ojo seco secundario a enfermedad de Sjögren".**

Yo (nombre y apellidos) .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas. He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: .....

La Dra. Natalie Brossard

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio: 1o.- Cuando quiera. 2o.- Sin tener que dar explicaciones. 3o.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Wolffsohn, J.S., et al., *TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report*. Ocul Surf, 2017. **15**(3): p. 539-574.
2. DelMonte, D.W. and T. Kim, *Anatomy and physiology of the cornea*. J Cataract Refract Surg, 2011. **37**(3): p. 588-98.
3. Foulsham, W., et al., *When Clarity Is Crucial: Regulating Ocular Surface Immunity*. Trends Immunol, 2018. **39**(4): p. 288-301.
4. Bolanos-Jimenez, R., et al., *Ocular Surface as Barrier of Innate Immunity*. Open Ophthalmol J, 2015. **9**: p. 49-55.
5. Takahashi, Y., et al., *Anatomy of secretory glands in the eyelid and conjunctiva: a photographic review*. Ophthalmic Plast Reconstr Surg, 2013. **29**(3): p. 215-9.
6. Shumway, C.L., M. Motlagh, and M. Wade, *Anatomy, Head and Neck, Eye Conjunctiva*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
7. Saornil, M.A., et al., *Tumores de la conjuntiva*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 2009. **84**: p. 7-22.
8. Wotherspoon, A.C., S. Hardman-Lea, and P.G. Isaacson, *Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva*. J Pathol, 1994. **174**(1): p. 33-7.
9. Fernández, A., et al., *Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 2008. **31**: p. 53-69.
10. Tsubota, K., et al., *New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society*. Ocul Surf, 2017. **15**(1): p. 65-76.
11. Goto, T., et al., *Tear film stability analysis system: introducing a new application for videokeratography*. Cornea, 2004. **23**(8 Suppl): p. S65-70.
12. Shigeyasu, C., et al., *Characteristics and Utility of Fluorescein Breakup Patterns among Dry Eyes in Clinic-Based Settings*. Diagnostics (Basel), 2020. **10**(9).
13. Karampatakis, V., et al., *Comparison between normal values of 2- and 5-minute Schirmer test without anesthesia*. Cornea, 2010. **29**(5): p. 497-501.
14. Nocturne, G. and X. Mariette, *Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome*. Nat Rev Rheumatol, 2013. **9**(9): p. 544-56.
15. Brito-Zeron, P., et al., *Sjogren syndrome*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16047.
16. Sebastian, A., A. Szachowicz, and P. Wiland, *Classification criteria for secondary Sjogren's syndrome. Current state of knowledge*. Reumatologia, 2019. **57**(5): p. 277-280.
17. Shiboski, C.H., et al., *2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjogren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts*. Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(1): p. 35-45.
18. Ogawa, Y., T. Takeuchi, and K. Tsubota, *Autoimmune Epithelitis and Chronic Inflammation in Sjogren's Syndrome-Related Dry Eye Disease*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(21).
19. Lu, M.C., et al., *Increased risk of primary Sjögren's syndrome in female patients with thyroid disorders: a longitudinal population-based study in Taiwan*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77210.
20. Floreani, A., et al., *Extrahepatic autoimmunity in autoimmune liver disease*. European Journal of Internal Medicine, 2019. **59**: p. 1-7.

21. Theander, E. and L.T. Jacobsson, *Relationship of Sjögren's syndrome to other connective tissue and autoimmune disorders*. Rheumatic Disease Clinics of North America, 2008. **34**(4): p. 935-947.
22. Choudhary, M.M., R.A. Hajj-Ali, and C.Y. Lowder, *Gender and ocular manifestations of connective tissue diseases and systemic vasculitides*. Journal of ophthalmology, 2014. **2014**.
23. Conforti, A., et al., *Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis*. Autoimmunity reviews, 2021. **20**(2): p. 102735.
24. Fujita, M., et al., *Correlation Between Dry Eye and Rheumatoid Arthritis Activity*. American Journal of Ophthalmology, 2005. **140**(5): p. 808-813.
25. Villani, E., et al., *Inflammation in dry eye associated with rheumatoid arthritis: Cytokine and in vivo confocal microscopy study*. Innate Immunity, 2013. **19**(4): p. 420-427.
26. Somers, E.C., et al., *Population-Based Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus: The Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance Program*. Arthritis & Rheumatology, 2014. **66**(2): p. 369-378.
27. Alani, H., et al., *Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of polyautoimmunity in Sjögren's syndrome (secondary Sjögren's syndrome) focusing on autoimmune rheumatic diseases*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2018. **47**(2): p. 141-154.
28. Mirzayan, M.J., R.E. Schmidt, and T. Witte, *Prognostic parameters for flare in systemic lupus erythematosus*. Rheumatology, 2000. **39**(12): p. 1316-1319.
29. Chen, A., et al., *Severity of dry eye syndrome is related to anti-dsDNA autoantibody in systemic lupus erythematosus patients without secondary Sjogren syndrome: A cross-sectional analysis*. Medicine, 2016. **95**(28): p. e4218.
30. Resch, M.D., et al., *Dry Eye and Corneal Langerhans Cells in Systemic Lupus Erythematosus*. Journal of Ophthalmology, 2015. **2015**: p. 543835.
31. Denton, C.P. and D. Khanna, *Systemic sclerosis*. The Lancet, 2017. **390**(10103): p. 1685-1699.
32. Chiffhot, H., et al., *Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis: A Systematic Literature Review*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2008. **37**(4): p. 223-235.
33. Tailor, R., et al., *Ocular Manifestations of Scleroderma*. Survey of Ophthalmology, 2009. **54**(2): p. 292-304.
34. Modena, B.D., K. Dazy, and A.A. White, *Emerging concepts: mast cell involvement in allergic diseases*. Translational Research, 2016. **174**: p. 98-121.
35. de A. F. Gomes, B., et al., *Evaluation of dry eye signs and symptoms in patients with systemic sclerosis*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2012. **250**(7): p. 1051-1056.
36. Mancel, E., et al., *Conjunctival Biopsy in Scleroderma and Primary Sjögren's Syndrome*. American Journal of Ophthalmology, 1993. **115**(6): p. 792-799.
37. Grondin, J.A., et al., *Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**.
38. Giancchetti, E. and A. Fierabracci, *Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**.
39. Mircheff, A.K., et al., *Mucosal immunity and self-tolerance in the ocular surface system*. Ocul Surf, 2005. **3**(4): p. 182-92.

40. Galletti, J.G., M. Guzmán, and M.N. Giordano, *Mucosal immune tolerance at the ocular surface in health and disease*. Immunology, 2017. **150**(4): p. 397-407.
41. Gendler, S.J. and A.P. Spicer, *Epithelial mucin genes*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 607-34.
42. Shirai, K. and S. Saika, *Ocular surface mucins and local inflammation—studies in genetically modified mouse lines*. BMC Ophthalmology, 2015. **15**(1): p. 154.
43. Spurr-Michaud, S., P. Argüeso, and I. Gipson, *Assay of mucins in human tear fluid*. Exp Eye Res, 2007. **84**(5): p. 939-50.
44. Mantelli, F. and P. Argüeso, *Functions of ocular surface mucins in health and disease*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(5): p. 477-83.
45. Inatomi, T., et al., *Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(9): p. 1818-27.
46. Inatomi, T., et al., *Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**(8): p. 1684-92.
47. Argüeso, P., et al., *MUC16 mucin is expressed by the human ocular surface epithelia and carries the H185 carbohydrate epitope*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(6): p. 2487-95.
48. Dogru, M., et al., *Atopic ocular surface disease: implications on tear function and ocular surface mucins*. Cornea, 2005. **24**(8 Suppl): p. S18-s23.
49. Dogru, M., et al., *Alterations of the ocular surface epithelial mucins 1, 2, 4 and the tear functions in patients with atopic keratoconjunctivitis*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(12): p. 1556-65.
50. Argüeso, P. and M. Sumiyoshi, *Characterization of a carbohydrate epitope defined by the monoclonal antibody H185: sialic acid O-acetylation on epithelial cell-surface mucins*. Glycobiology, 2006. **16**(12): p. 1219-28.
51. Danjo, Y., et al., *Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(13): p. 2602-9.
52. Argüeso, P., et al., *Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(4): p. 1004-11.
53. Yu, D.F., et al., *MUC19 expression in human ocular surface and lacrimal gland and its alteration in Sjögren syndrome patients*. Exp Eye Res, 2008. **86**(2): p. 403-11.
54. Kardon, R., et al., *Bacterial conjunctivitis in Muc1 null mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(7): p. 1328-35.
55. Danjo, Y., L.D. Hazlett, and I.K. Gipson, *C57BL/6 mice lacking Muc1 show no ocular surface phenotype*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(13): p. 4080-4.
56. Hanson, R.L. and M.A. Hollingsworth, *Functional Consequences of Differential O-glycosylation of MUC1, MUC4, and MUC16 (Downstream Effects on Signaling)*. Biomolecules, 2016. **6**(3).
57. Martinez-Carrasco, R., P. Argüeso, and M.E. Fini, *Membrane-associated mucins of the human ocular surface in health and disease*. Ocul Surf, 2021. **21**: p. 313-330.
58. Willcox, M.D.P., et al., *TFOS DEWS II Tear Film Report*. Ocul Surf, 2017. **15**(3): p. 366-403.
59. Gipson, I.K., *Distribution of mucins at the ocular surface*. Exp Eye Res, 2004. **78**(3): p. 379-88.
60. Dartt, D.A. and S. Masli, *Conjunctival epithelial and goblet cell function in chronic inflammation and ocular allergic inflammation*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2014. **14**(5): p. 464-70.

61. Albertsmeyer, A.C., et al., *Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells*. *Exp Eye Res*, 2010. **90**(3): p. 444-51.
62. Nakamura, T., et al., *Elevated Expression of Transglutaminase 1 and Keratinization-Related Proteins in Conjunctiva in Severe Ocular Surface Disease*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2001. **42**(3): p. 549-556.
63. Tseng, S.C., et al., *Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders*. *Ophthalmology*, 1984. **91**(6): p. 545-52.
64. Turner, J.E., B. Stockinger, and H. Helmby, *IL-22 mediates goblet cell hyperplasia and worm expulsion in intestinal helminth infection*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(10): p. e1003698.
65. Contreras-Ruiz, L., et al., *Modulation of conjunctival goblet cell function by inflammatory cytokines*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 636812.
66. Baudouin, C., et al., *Reconsidering the central role of mucins in dry eye and ocular surface diseases*. *Prog Retin Eye Res*, 2019. **71**: p. 68-87.
67. Hodges, R.R. and D.A. Dartt, *Tear film mucins: front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins*. *Exp Eye Res*, 2013. **117**: p. 62-78.
68. Jumblatt, J.E., et al., *Characterization of Human Ocular Mucin Secretion Mediated by 15(S)-HETE*. *Cornea*, 2002. **21**(8): p. 818-824.
69. Samarawickrama, C., S. Chew, and S. Watson, *Retinoic acid and the ocular surface*. *Survey of Ophthalmology*, 2015. **60**(3): p. 183-195.
70. Jun, B.S., et al., *Effects of Dexamethasone on Mucins of Human Corneal Epithelial Cells*. *J Korean Ophthalmol Soc*, 2002. **43**(12): p. 2527-2533.
71. Xiong, L., A.M. Woodward, and P. Argüeso, *Notch signaling modulates MUC16 biosynthesis in an in vitro model of human corneal and conjunctival epithelial cell differentiation*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(8): p. 5641-6.
72. Alam, J., C.S. de Paiva, and S.C. Pflugfelder, *Immune - Goblet cell interaction in the conjunctiva*. *Ocul Surf*, 2020. **18**(2): p. 326-334.
73. Ko, B.Y., et al., *Goblet cell loss abrogates ocular surface immune tolerance*. *JCI Insight*, 2018. **3**(3).
74. Contreras-Ruiz, L. and S. Masli, *Immunomodulatory Cross-Talk between Conjunctival Goblet Cells and Dendritic Cells*. *PLOS ONE*, 2015. **10**(3): p. e0120284.
75. Ueta, M. and S. Kinoshita, *Innate immunity of the ocular surface*. *Brain Res Bull*, 2010. **81**(2-3): p. 219-28.
76. De Paiva, C.S., et al., *Homeostatic control of conjunctival mucosal goblet cells by NKT-derived IL-13*. *Mucosal Immunology*, 2011. **4**(4): p. 397-408.
77. Tukler Henriksson, J., et al., *IL-13 Stimulates Proliferation and Expression of Mucin and Immunomodulatory Genes in Cultured Conjunctival Goblet Cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015. **56**(8): p. 4186-97.
78. Paulsen, F., et al., *Regulation of MUC16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines*. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 2008. **190**(1): p. 59-70.
79. Chung, S.-H., et al., *Multi-layered culture of primary human conjunctival epithelial cells producing MUC5AC*. *Experimental Eye Research*, 2007. **85**(2): p. 226-233.
80. Menon, B.B., et al., *Suppression of Toll-like receptor-mediated innate immune responses at the ocular surface by the membrane-associated mucins MUC1 and MUC16*. *Mucosal Immunology*, 2015. **8**(5): p. 1000-1008.

81. Corrales, R.M., et al., *Ocular mucin gene expression levels as biomarkers for the diagnosis of dry eye syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(11): p. 8363-9.
82. Zhang, J., X. Yan, and H. Li, *Analysis of the correlations of mucins, inflammatory markers, and clinical tests in dry eye*. Cornea, 2013. **32**(7): p. 928-32.
83. Argüeso, P., *Disrupted Glycocalyx as a Source of Ocular Surface Biomarkers*. Eye Contact Lens, 2020. **46 Suppl 2**(Suppl 2): p. S53-s56.
84. Caffery, B., et al., *MUC16 expression in Sjogren's syndrome, KCS, and control subjects*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 2547-55.
85. Caffery, B., et al., *MUC1 expression in Sjogren's syndrome, KCS, and control subjects*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 1720-7.
86. Jones, D.T., et al., *Alterations of ocular surface gene expression in Sjögren's syndrome*. Adv Exp Med Biol, 1998. **438**: p. 533-6.
87. Tan, X., et al., *Analysis of Th17-associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome*. Eye (Lond), 2014. **28**(5): p. 608-13.
88. Zhang, M. and C. Wu, *The relationship between intestinal goblet cells and the immune response*. Bioscience Reports, 2020. **40**(10).
89. Jones, L., et al., *TFOS DEWS II Management and Therapy Report*. Ocul Surf, 2017. **15**(3): p. 575-628.
90. Schmidt, T.A., et al., *Transcription, translation, and function of lubricin, a boundary lubricant, at the ocular surface*. JAMA Ophthalmol, 2013. **131**(6): p. 766-76.
91. Garcia-Zaliskak, D., D. Nash, and E. Yeu, *Ocular surface diseases and corneal refractive surgery*. Curr Opin Ophthalmol, 2014. **25**(4): p. 264-9.
92. Kinoshita, S., et al., *Rebamipide (OPC-12759) in the Treatment of Dry Eye: A Randomized, Double-Masked, Multicenter, Placebo-Controlled Phase II Study*. Ophthalmology, 2012. **119**(12): p. 2471-2478.
93. Uchino, Y., A.M. Woodward, and P. Argüeso, *Differential effect of rebamipide on transmembrane mucin biosynthesis in stratified ocular surface epithelial cells*. Exp Eye Res, 2016. **153**: p. 1-7.
94. De Paiva, C.S., et al., *Apical Corneal Barrier Disruption in Experimental Murine Dry Eye Is Abrogated by Methylprednisolone and Doxycycline*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. **47**(7): p. 2847-2856.
95. De Paiva, C.S., et al., *Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye*. Exp Eye Res, 2006. **83**(3): p. 526-35.
96. Strong, B., et al., *Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca*. Cornea, 2005. **24**(1): p. 80-5.
97. Pflugfelder, S.C., et al., *Effects of sequential artificial tear and cyclosporine emulsion therapy on conjunctival goblet cell density and transforming growth factor-beta2 production*. Cornea, 2008. **27**(1): p. 64-9.
98. Kunert, K.S., A.S. Tisdale, and I.K. Gipson, *Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine*. Arch Ophthalmol, 2002. **120**(3): p. 330-7.
99. Brignole, F., et al., *Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(1): p. 90-5.

100. Moscovici, B.K., et al., *Treatment of Sjögren's syndrome dry eye using 0.03% tacrolimus eye drop: Prospective double-blind randomized study*. Contact Lens and Anterior Eye, 2015. **38**(5): p. 373-378.
101. Aragona, P., et al., *Effects of the topical treatment with NSAIDs on corneal sensitivity and ocular surface of Sjögren's syndrome patients*. Eye, 2005. **19**(5): p. 535-539.
102. Zhong, M., et al., *Discovery and Development of Potent LFA-1/ICAM-1 Antagonist SAR 1118 as an Ophthalmic Solution for Treating Dry Eye*. ACS Med Chem Lett, 2012. **3**(3): p. 203-6.
103. Abidi, A., P. Shukla, and A. Ahmad, *Lifitegrast: A novel drug for treatment of dry eye disease*. J Pharmacol Pharmacother, 2016. **7**(4): p. 194-198.
104. Murphy, C.J., et al., *The pharmacologic assessment of a novel lymphocyte function-associated antigen-1 antagonist (SAR 1118) for the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(6): p. 3174-80.
105. Li, J.X., et al., *Lifitegrast Ophthalmic Solution 5% Is a Safe and Efficient Eyedrop for Dry Eye Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Clin Med, 2022. **11**(17).
106. Jain, P., et al., *An NGF mimetic, MIM-D3, stimulates conjunctival cell glycoconjugate secretion and demonstrates therapeutic efficacy in a rat model of dry eye*. Exp Eye Res, 2011. **93**(4): p. 503-12.
107. Fox, R., *Anti-malarial drugs: possible mechanisms of action in autoimmune disease and prospects for drug development*. Lupus, 1996. **5 Suppl 1**: p. S4-10.
108. Fox, R.I., *Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug*. Semin Arthritis Rheum, 1993. **23**(2 Suppl 1): p. 82-91.
109. de Bouteiller, O., et al., *Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38133-45.
110. Eugenia Schroeder, M., et al., *Pro-inflammatory Ca(++)-activated K(+) channels are inhibited by hydroxychloroquine*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 1892.
111. van den Borne, B.E., et al., *Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells*. J Rheumatol, 1997. **24**(1): p. 55-60.
112. Huskisson, E.C., *Azathioprine*. Clin Rheum Dis, 1984. **10**(2): p. 325-32.
113. Cronstein, B.N., *THE MECHANISM OF ACTION OF METHOTREXATE*. Rheumatic Disease Clinics of North America, 1997. **23**(4): p. 739-755.
114. Fox, R.I., et al., *Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca*. Arthritis Rheum, 1984. **27**(4): p. 459-61.
115. Tsubota, K., et al., *Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome*. Br J Ophthalmol, 1999. **83**(4): p. 390-5.
116. Noble, B.A., et al., *Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(5): p. 647-52.
117. Figueroa-Ortiz, L.C., et al., *Estudio de la función lagrimal y la superficie conjuntival en pacientes diabéticos*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 2011. **86**.
118. Stapleton, F., et al., *TFOS DEWS II Epidemiology Report*. The Ocular Surface, 2017. **15**(3): p. 334-365.
119. Papas, E.B., *The global prevalence of dry eye disease: A Bayesian view*. Ophthalmic Physiol Opt, 2021. **41**(6): p. 1254-1266.

120. Mehra, D. and A. Galor, *Digital screen use and dry eye: a review*. The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology, 2020. **9**(6): p. 491-497.
121. Mandell, J.T., et al., *Impact of Air Pollution and Weather on Dry Eye*. J Clin Med, 2020. **9**(11).
122. Fuseau, M., et al., *Uveitis and immunosuppressive treatment: Experience in a multidisciplinary uveitis unit*. Revista Colombiana de Reumatología (English Edition), 2023. **30**(3): p. 230-237.
123. Kemeny-Beke, A. and P. Szodoray, *Ocular manifestations of rheumatic diseases*. International Ophthalmology, 2020. **40**(2): p. 503-510.
124. Dammacco, R., *Systemic lupus erythematosus and ocular involvement: an overview*. Clinical and Experimental Medicine, 2018. **18**(2): p. 135-149.
125. El-Shereef, R.R., A.S. Mohamed, and L. Hamdy, *Ocular manifestation of systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int, 2013. **33**(6): p. 1637-42.
126. Mavragani, C.P. and H.M. Moutsopoulos, *Sjögren syndrome*. Cmaj, 2014. **186**(15): p. E579-86.
127. Mavragani, C.P. and H.M. Moutsopoulos, *The geoepidemiology of Sjögren's syndrome*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A305-10.
128. Haugen, A.J., et al., *Estimation of the prevalence of primary Sjögren's syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria: the Hordaland Health Study*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2008. **37**(1): p. 30-34.
129. Akpek, E.K., et al., *Dry Eye Syndrome Preferred Practice Pattern®*. Ophthalmology, 2019. **126**(1): p. P286-p334.
130. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
131. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 749-59.
132. Buisine, M.P., et al., *Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(2): p. 209-18.
133. Damera, G., et al., *IL-9 modulated MUC4 gene and glycoprotein expression in airway epithelial cells*. Biosci Rep, 2006. **26**(1): p. 55-67.
134. Damera, G., B. Xia, and G.P. Sachdev, *IL-4 induced MUC4 enhancement in respiratory epithelial cells in vitro is mediated through JAK-3 selective signaling*. Respir Res, 2006. **7**(1): p. 39.
135. Fischer, B.M., et al., *Neutrophil elastase increases MUC4 expression in normal human bronchial epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(4): p. L671-9.
136. Das, S., et al., *Mice deficient in Muc4 are resistant to experimental colitis and colitis-associated colorectal cancer*. Oncogene, 2016. **35**(20): p. 2645-54.
137. Argüeso P, Tisdale A, Mandel U, Letko E, Foster CS, Gipson IK. The cell-layer- and cell-type-specific distribution of GalNAc-transferases in the ocular surface epithelia is altered during keratinization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Jan;44(1):86-92. doi: 10.1167/iovs.02-0181. PMID: 12506059.
138. Liu, J., et al., *Inflammatory signals induce MUC16 expression in ovarian cancer cells via NF-κB activation*. Exp Ther Med, 2021. 47221(2): p. 163. 473
139. Paulsen, F., et al., *Regulation of MUC16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines*. Annals of Anatomy -Anatomischer Anzeiger, 2008. 190(1): p. 59-70. 475

140. Solomon, A., et al., Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42(10): p. 2283-92.
141. Duan, H., et al., *Comparison of mucin levels at the ocular surface of visual display terminal users with and without dry eye disease*. *BMC Ophthalmol*, 2023. 23(1): p. 189.
142. De Paiva, C.S., et al., *IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress*. *Mucosal Immunol*, 2009. 2(3): p. 243-53.
143. Lee, J.S., et al., *Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability*. *Immunity*, 2015. 43(4): p. 727-738.
144. Abusleme, L. and N. Moutsopoulos, *IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome*. *Oral Diseases*, 2017. 23(7): p. 854-865.
145. Vakrakou, A.G., et al., *Impaired anti-inflammatory activity of PPAR $\gamma$  in the salivary epithelia of Sjögren's syndrome patients imposed by intrinsic NF- $\kappa$ B activation*. *Journal of autoimmunity*, 2018. 86: p. 62-74.
146. Iwakura, Y., et al., *Functional specialization of interleukin-17 family members*. *Immunity*, 2011. 34(2): p. 149-162.
147. Durbin, K., et al., *Pulmonary neutrophilia changes in the airway and drives derived IL-17 mediates epithelial  $\bar{A}$  T cell T cellederived IL-17 mediates epithelial changes in the airway and drives pulmonary neutrophilia*. *J. Immunol.* by Guest Sept. *J. Immunol*, 2017. 8.
148. García-Posadas, L., et al., *Interaction of IFN- $\gamma$  with cholinergic agonists to modulate rat and human goblet cell function*. *Mucosal Immunol*, 2016. 9(1): p. 206-17.