



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Instituto de Oftalmología

“Fundación Conde de Valenciana”

Expresión de citocinas proinflamatorias y su efecto en la composición de
lágrima de pacientes con síndrome de disfunción lagrimal, síndrome de
Sjögren, y sujetos sanos: correlación clínica-inmunológica

TESIS DE POSGRADO

Para obtener la

Especialidad en Oftalmología

Presenta

Dra. Martha Penélope Jaimes Gutiérrez

Tutor de tesis: Dra. María del Carmen Jiménez Martínez

Asesor de tesis: Dr. Yonathan Garfias Becerra

Asesor de tesis: Dra. Concepción Santacruz Valdés

Facultad de Medicina

México, D. F., 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Enrique Luis Graue Wiechers
Profesor Titular del Curso
Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana"

Dra. Claudia Elena Murillo Correa
Jefa de Enseñanza
Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana"

Dra. María del Carmen Jiménez Martínez
Directora de Tesis
Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana"

Agradecimientos

A mi abuelo Nicolás, que siempre supo que todos mis sueños llegarían lejos y es el viento que impulsa la vela de este barco.

A mi madre, que siempre ha estado a mi lado, que me ha hecho volar y que ha velado cada uno de mis sueños a pesar de todo el esfuerzo que ha implicado.

A mi padre, que ha sido la inspiración de muchas tareas y me ha brindado la oportunidad de seguir adelante.

A Rafael, que hace que el sol salga cada mañana y que me hace olvidar la fatiga. Gracias al viento que siempre lo trajo de regreso a mi vida. Gracias porque siempre has tenido fe en mi.

A Hermanosa, que siempre me hace reír y llorar porque siempre ha creído en mi.

A mis tíos Baltazar y Alejandra que me enseñaron lo satisfactorio que es un día de arduo trabajo científico.

A Mari Carmen, Yonathan y Conchita, que me han enseñado tantas cosas y han sembrado en mi la curiosidad y necesidad de saber más.

A mis amigos David y Cynthia a los que quiero mucho y me han obligado a estudiar cuando ya no podía más.

A todos mis compañeros residentes que me han enseñado durante estos años que no todo es difícil, que siempre hay nuevas cosas que aprender y nunca es tarde para lograr más.

A todos los pacientes que con mis manos pude sanar y de ellos aprender.

ABREVIATURAS

μm : micrómetros

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-2: Interleucina 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

IFN- γ : Interferón gama

IL-5: Interleucina 5

IL-4: Interleucina 4

Th1: Respuesta T cooperadora tipo 1

Th2: Respuesta T cooperadora tipo 2

IL-13: Interleucina 13

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

IL-12: Interleucina 12

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1

IL-10: Interleucina 10

IL-8: Interleucina 8

MIP-2: proteína quimiotáctica de monocitos 2

HLA-DR: Antígeno leucocitario humano DR

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

RNA: Ácido ribonucleico

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

EGF: Factor de crecimiento epitelial

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa B

MUC5AC: Mucina formadora de gel 5AC

MUC2: Mucina 2

MUC1: Mucina 1

MUC4: Mucina 4

MUC16: Mucina 16

TRPL: tiempo de ruptura de la película lagrimal

mm: milímetros

seg: segundos

min: minutos

μ l: microlitros

PBS: Buffer de fosfatos

M: Molar

BSA: albúmina sérica bovina

IgG: Inmunoglobulina G

nm: nanómetros

HRP: Peroxidasa de rábano

N: normal

pg/ml: picogramos/mililitro

abs: absorbancia

ÍNDICE

Introducción.....	1
Los estados de inflamación de la superficie ocular.....	1
Citocinas y terapia antiglaucomatosa.....	2
Citocinas y alergia ocular.....	3
Citocinas y queratitis infecciosa.....	5
Citocinas y síndrome de disfunción lagrimal.....	6
Efectos de las citocinas en la superficie ocular.....	9
Planteamiento del problema.....	11
Justificación.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	12
Pacientes, material y métodos.....	12
Grupos de estudio.....	12
Toma de muestra de lágrima.....	13
Medición de secreción basal de lágrima: prueba de Schirmer II.....	14
Medición de tiempo de ruptura de película lagrimal.....	14
ELISA para identificar MUC5AC y MUC2.....	14
Cuantificación de citocinas solubles.....	16
Análisis estadístico.....	18
Resultados.....	20
Caracterización clínica de los pacientes que ingresaron a este estudio	20
Caracterización cuantitativa mucinas de lágrima en los pacientes que participaron en este estudio.....	22

Cuantificación de citocinas solubles en los pacientes que participaron en el estudio.....	24
Relación de citocinas Th1/Th2 en muestras de lágrima.....	29
Correlación entre la concentración de mucinas formadoras de gel, citocinas proinflamatorias y severidad clínica.....	32
Discusión.....	33
Bibliografía.....	36
Anexo 1. Cuestionario de sintomatología de síndrome de ojo seco validado por la Sociedad Española de Oftalmología aplicado a nuestros pacientes.....	42

INTRODUCCIÓN

La superficie ocular está cubierta por la película lagrimal que protege, lubrica y proporciona una mejor superficie de refracción al sistema visual. En la película lagrimal (cuyo grosor aproximado se ha estimado entre 35-40 μm)¹ se han caracterizado tres capas principales que son: lipídica, acuosa y mucinosa. Dentro de estas capas, también se encuentran electrólitos, citocinas, vitaminas y moléculas con propiedades antimicrobianas que ayudan a mantener la homeostasis ocular.²

Las lágrimas tienen una función esencial en el mantenimiento de la integridad conjuntival porque proveen de un ambiente altamente regulado, óptimo y crítico para el desarrollo adecuado de las funciones epiteliales como la defensa antimicrobiana, cicatrización de heridas y respuestas inflamatorias.²

Los estados de inflamación de la superficie ocular

Existen muchas patologías oculares que se caracterizan por inflamación de la superficie ocular y se manifiestan como afección palpebral, de la conjuntiva, la córnea y el sistema glandular productor de la película lagrimal. Estas patologías tienen diversas etiologías que se pueden clasificar como infecciosas, alérgicas, tóxicas, autoinmunes pero que tienen un factor común: la inflamación de la superficie.

Los métodos de estudio para identificación de citocinas solubles hasta el momento se han limitado a identificar la expresión génica de éstas al utilizar el principio de PCR, expresión en la lágrima mediante identificación con ELISA o Western blot, sin embargo, estos métodos tienen algunas desventajas metodológicas dado que requieren

mucho tiempo para realizarse y grandes cantidades de reactivos y muestra para poder obtener resultados significativos⁴.

Esta dificultad técnica se ha combatido al utilizar el ensayo de citocinas solubles de Becton Dickinson®, que combina los principios de inmunoensayo en sándwich con la capacidad del citómetro de flujo para medir simultáneamente las características de múltiples partículas⁵. Esta técnica permite la detección de 1 a 20 citocinas solubles humanas en una sola muestra de lágrima. El kit de citocinas tiene una adecuada correlación con la detección con ELISA y es semejante en sensibilidad, exactitud y reproducibilidad⁶.

Este método ha encontrado aplicaciones oftalmológicas importantes en el estudio de la expresión de citocinas solubles y su variación diurna en lágrima de sujetos sanos así como en estados patológicos como conjuntivitis alérgica, inflamación conjuntival asociada a medicamentos para el tratamiento de glaucoma, síndrome de disfunción lagrimal, entre otros.⁵⁻²¹

Citocinas y terapia antiglaucomatosa

El tratamiento del glaucoma con fármacos antiglaucomatosos induce cambios en la superficie ocular como ojo rojo, disminución del tiempo de ruptura de película lagrimal y queratitis punteada superficial. Se ha identificado un incremento en la expresión soluble de IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α en pacientes tratados con medicamentos antiglaucomatosos. También IFN- γ , IL-2, IL-5 e IL-4 se encontraron elevadas. Sin embargo, se notó mayor elevación de citocinas tipo Th1 en pacientes con glaucoma⁷.

Esto puede explicar muchos de los síntomas e inflamación clínicamente evidente en pacientes en estas condiciones.

Citocinas y alergia ocular

Algunas citocinas pueden estar involucradas en el reclutamiento y activación de citocinas inflamatorias en los tejidos de pacientes con conjuntivitis alérgica. Muchos estudios han demostrado expresión tisular de quimiocinas y citocinas en la superficie ocular sin realizar un análisis cuantitativo⁸⁻¹³.

En biopsias conjuntivales de pacientes con conjuntivitis alérgica se ha encontrado un perfil específico de citocinas de células T, encontrándose predominancia al perfil Th2 en queratoconjuntivitis vernal y una tendencia hacia patrón Th1 en queratoconjuntivitis atópica⁸. Se ha encontrado un incremento en la expresión de IL-4 e IL-13 en la queratoconjuntivitis estacional y se cree que los mastocitos y las citocinas Th2 promueven la respuesta tardía. Se cree que otros tipos celulares y múltiples citocinas están involucrados en la compleja patogénesis de las enfermedades alérgicas⁸⁻⁹. Se ha sugerido en estudios previos que la lágrima puede ser interpretada como una representación de las respuestas in vivo de la superficie ocular. Aunque sólo hay pequeños números de células T presentes en la lágrima, se han utilizado métodos de identificación de citocinas intracelulares para caracterizar las poblaciones de células T en queratoconjuntivitis vernal¹⁰. Estas células son IL-4 positivas, similar a lo que se ha encontrado en biopsias conjuntivales⁹.

Se ha estudiado también el patrón de expresión de citocinas solubles en queratoconjuntivitis vernal, atópica y estacional y se ha observado un incremento en la

expresión de IL-1 β ¹⁰. Este hallazgo confirma que esta citocina juega un papel crítico en la inflamación ocular alérgica, ya que la activación celular inducida por esta citocina causa activación de otros tipos celulares, incremento en los signos clínicos, degranulación de mastocitos, infiltración por eosinófilos, producción de mRNA de quimiocinas. IL-1 β también puede estimular respuestas proinflamatorias en el epitelio conjuntival que son amplificadas por TNF- α .¹⁰⁻¹¹

En ensayos de identificación de citocinas solubles se han identificado IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, MCP-1 en las muestras de lágrima en el grupo de pacientes con alergia comparados con los controles con una alta correlación entre estas citocinas.¹² Además se encontró más elevada IL-4, INF- γ e IL-10 en pacientes con conjuntivitis estacionaria comparados con la queratoconjuntivitis vernal, mientras que la eotaxina y TNF- α se encontraron incrementadas sólo en la queratoconjuntivitis vernal.¹¹⁻¹² El incremento del número de eosinófilos activados, que liberan citocinas inflamatorias y epiteliotóxicas se encuentra en lágrimas de pacientes con todo tipo de enfermedad ocular alérgica.

Otra citocina muy importante es IL-8, que está presente en todas las lágrimas de sujetos control y no se encontró una elevación significativa en los grupos de pacientes con alergia. Se encontraron correlaciones fuertes entre IL-4, IFN- γ e IL-13. IL-1 β , IL-12, IL-13, IFN- γ , eotaxina-1 y MCP-1 se encontraron fuertemente asociadas. No se encontró una relación significativa entre el estado clínico y nivel de citocinas en queratoconjuntivitis vernal y atópica.⁹

Utilizando el ensayo de múltiples citocinas se ha encontrado en la queratoconjuntivitis estacional, vernal y atópica un incremento de citocinas y quimiocinas principalmente tipo Th2 así como IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la

queratoconjuntivitis vernal.¹¹ El nivel de citocinas solubles tiene una pobre correlación con la citología conjuntival, lo que sugiere que las citocinas no son producidas por las células conjuntivales. Otras células de superficie incluyendo células epiteliales, linfocitos intraepiteliales, células dendríticas y mastocitos son fuentes de producción de citocinas.⁹

Citocinas y queratitis infecciosa

Se han identificado también citocinas inflamatorias asociadas a queratitis bacteriana y viral. Estudios en modelos animales han demostrado que la producción principal de citocinas en la cornea es de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- γ . IL-1 β es el principal mediador inflamatorio que regula la expresión de IL-6 e IL-8 durante la infección bacteriana de la córnea. IL-1 β e IL-6 se han encontrado elevadas en córneas con enfermedades inflamatorias como ulceración y queratitis¹⁴. Esta evidencia sugiere que las citocinas son moléculas fuertemente involucradas en la inflamación corneal.

También se ha encontrado elevación de las citocinas en la película lagrimal en enfermedades como queratitis viral, posterior a queratectomía fotorefractiva y rosácea ocular. IL-6 e IL-8 han mostrado mayor expresión en la fase aguda de la enfermedad.^{14,15}

IL-6 es un importante mediador de la inflamación ocular y su papel como una citocina multifuncional en la infección corneal se debe a que es una citocina de los sistemas de advertencia inflamatoria dado que su expresión aparece inicialmente después de infección viral y bacteriana. La IL-6 se ha reportado como una citocina que incrementa la producción de MIP-2 y 1 α que son importantes para el reclutamiento de

neutrófilos en la córnea con infección por virus herpes. El incremento de esta citocina en lágrimas de pacientes con queratitis micótica durante los estadios iniciales sugiere que esta citocina puede estar involucrada en el reclutamiento de polimorfonucleares y su activación.¹⁵

IL-8 posee una actividad quimiotáctica muy importante clave para la infiltración celular a la córnea. El incremento en IL-8 observado en lágrima de pacientes con queratitis fúngica puede ser responsable del incremento de leucocitos¹⁴⁻¹⁵.

IL-1 β es producida principalmente por macrófagos y monocitos pero también por células epiteliales corneales. La elevación sostenida de IL-1 contribuye a la destrucción corneal por un estímulo continuo de infiltración leucocitaria¹⁵.

Citocinas y síndrome de disfunción lagrimal

El síndrome de disfunción lagrimal fue propuesto por el panel de ojo seco de Delphi en 2006 como un término más adecuado para definir el término ojo seco basado en la evidencia de que existen mecanismos inflamatorios asociados en la fisiopatología de esta enfermedad.⁶ El estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en esta patología nos ha llevado a entender que existe un desequilibrio en los componentes que estabilizan la película lagrimal que a su vez, lleva a un incremento en la osmolaridad lagrimal. La exposición del epitelio a este ambiente de estrés osmótico activa vías de señalización y liberación de citocinas inflamatorias y otros mediadores que pueden iniciar una cascada de eventos inflamatorios que son responsables de la enfermedad del epitelio y el desarrollo de síntomas irritativos^{6,16}.

En pacientes con síndrome de Sjögren, el proceso patológico incluye la expresión de cambios inmunopatológicos en el epitelio corneal, infiltración de células inflamatorias, incremento en la expresión de marcadores de activación inmunológica como HLA-DR, moléculas de adhesión intercelular como ICAM-1 y CD40 además de un incremento en citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α .¹⁶

Se ha reportado un incremento de los transcritos de RNA de IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α y TGF- β en conjuntiva de pacientes con síndrome de Sjögren comparado con sujetos sanos.⁶⁻¹⁷ Los niveles de IL-1 α e IL-8 correlacionan significativamente con la intensidad de tinción epitelial corneal e inversamente con la densidad de células caliciformes. También se ha reportado un incremento significativo de TNF- α en lágrima de pacientes con Sjögren que no se encontró en sujetos sanos. La expresión de IL-6 tiene una correlación significativa con los parámetros de inflamación de superficie ocular como el tiempo de ruptura de película lagrimal.¹⁹

Se ha identificado un incremento de concentración de los niveles de citocinas inflamatorias, principalmente IL-1 α y TNF- α y el incremento en la concentración de metaloproteinasas de matriz en la lágrima y epitelio conjuntival de humanos con queratoconjuntivitis sicca.⁶

Estudios previos en sistemas de cultivo de epitelio corneal ratones han reportado que el estrés hiperosmolar o por desecación activa las vías de señalización de cinasas activadas por mitógenos que estimula a su vez la producción de citocinas y metaloproteinasas que se han encontrado en pacientes humanos con síndrome de disfunción lagrimal.¹³ También se ha observado reclutamiento de linfocitos CD4+ al epitelio conjuntival de ratones en respuesta a desecación.¹⁶

En un modelo de disfunción lagrimal experimental se utilizaron ratones BALB/c y C57BL/6 para medir con PCR y ensayo de citocinas solubles múltiple la concentración de citocinas en lágrima. En este modelo, existió un incremento significativo de los transcritos de IL-1 α , IL-6 y TNF- α en el epitelio corneal y conjuntiva de los ratones C57BL/6. Se observaron cambios en el patrón de expresión de citocinas en los ratones C57BL/6 que tuvieron concentraciones significativamente mayores de IL-1 α y TNF- α y las citocinas IL-2, IL-12 e IFN- γ en respuesta a la desecación.⁶

Se ha demostrado que en modelos de síndrome de disfunción lagrimal por desecación existe una disminución en la densidad de células caliciformes conjuntivales y hay mayor pérdida de éstas en ratones C57BL/6. Se ha demostrado que las citocinas Th1 y Th2 ayudan a la diferenciación epitelial de la mucosa.⁶

Se sabe que el síndrome de Sjögren se produce por una destrucción autoinmune de la glándula y todo el aparato lagrimal y se ha identificado una sobreexpresión sistémica de citocinas en estos pacientes, además de presencia de células inflamatorias en la glándula lagrimal principalmente linfocitos T CD4+ y CD8+.¹⁹ Las citocinas que se han identificado en suero de los pacientes con síndrome de Sjögren son: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β .⁶

Se han detectado niveles incrementados de IL-1 α en lágrima de pacientes con síndrome de disfunción lagrimal y un incremento en RNA de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-8, TNF- α y TGF- β en epitelio conjuntival de pacientes con síndrome de Sjögren.¹⁹

En publicaciones recientes se ha identificado la sobreexpresión de transcritos de citocinas proinflamatorias en epitelio conjuntival cultivado de pacientes con síndrome de Sjögren, principalmente TNF- α e IFN- γ .²¹ Existe también evidencia del incremento en la

expresión de citocinas en película lagrimal en pacientes con síndrome de Sjögren identificando mediante ELISA diversas citocinas, entre las que se encuentra EGF, TNF- α , IFN- γ e IL-2.¹⁹

En nuestros estudios previos hemos identificado alteración en la glicosilación de proteínas de superficie ocular de pacientes con síndrome de Sjögren, expresión anómala de proteínas, alteración de la concentración de mucinas formadoras de gel de lágrimas obtenidas de pacientes con síndrome de Sjögren comparados con sujetos sanos y pacientes con otro tipo de síndrome de disfunción lagrimal (manuscrito en preparación).

Efectos de las citocinas en la superficie ocular

Recientemente se ha identificado que TNF- α es capaz de activar, mediante la activación de NF- κ B la transcripción de gen de MUC5AC y MUC2 en líneas celulares de cáncer de colon y epitelio conjuntival cultivado estimulado con lipopolisacárido⁹. Y se ha demostrado en cultivos celulares de epitelio conjuntival estimulado con TNF- α e IFN- γ una regulación positiva de expresión de MUC1, MUC4, MUC16 y MUC5AC.²⁰ Es posible que la sobreexpresión de esta citocina tenga los mismos resultados en células de epitelio conjuntival in vivo que puede ser el factor causal de la alteración de la homeostasis de la película lagrimal que produce las alteraciones clínicas características en síndrome de disfunción lagrimal del tipo síndrome de Sjögren.

Existe evidencia del reclutamiento de células productoras de IFN- γ a la superficie ocular en síndrome de disfunción lagrimal. IFN- γ puede promover la pérdida de células

caliciformes y promover la producción de un ambiente queratinizante para la superficie conjuntival.¹⁸

Se sabe que IL-6 promueve la migración celular mediante un mecanismo dependiente de fibronectina, además de estimular la síntesis de colágeno y reducir la producción de metaloproteinasas de matriz en queratocitos humanos. Por otra parte, TNF- α se asocia a apoptosis y degeneración nuclear. Se ha observado que los niveles de IL-6 disminuyen con el tratamiento con ciclosporina A tópico.⁷

El IFN- γ antagoniza los efectos de IL-13 en la hiperplasia de células caliciformes.⁶

El tratamiento de células epiteliales respiratorias con IFN- γ las sensibiliza a apoptosis mediada por TNF- α y ligando de FAS.^{6, 8}

Existe evidencia de un componente tratable del síndrome de disfunción lagrimal. Los estudios clínicos que evalúan la eficacia de antiinflamatorios e inmunomoduladores como la ciclosporina A y esteroides muestran que existe mejoría en signos clínicos y el panel Delphi ha considerado utilizar agentes antiinflamatorios para enfermedad inflamatoria ocular.⁶ Dados los hallazgos la detección de citocinas pueden ser un indicador objetivo de qué pacientes se beneficiarán de tratamiento antiinflamatorio.

En algunos estudios se ha propuesto que la elevación de citocinas en lágrima es un mejor indicador de la severidad de la enfermedad que las pruebas clínicas utilizadas como la tinción con fluoresceína o prueba de Schirmer.¹⁸ Es posible también que la elevación de citocinas sea un marcador más sensible de diagnóstico que los signos tradicionales de síndrome de disfunción lagrimal en pacientes con síndrome de disfunción lagrimal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No hay estudios en los que se cuantifique nivel de citocinas proinflamatorias, grado de severidad clínica y su correlación con la expresión de mucinas formadoras de gel en lágrima de sujetos sanos, pacientes con síndrome de Sjögren y síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los niveles de expresión de citocinas y su correlación con expresión de mucinas formadoras de gel permitirá determinar el efecto de la inflamación en la composición protéica de la lágrima en sujetos con síndrome de Sjögren, síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren y sujetos sanos.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar citocinas proinflamatorias en muestra de lágrima de sujetos sanos, pacientes con síndrome de Sjögren y síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren y correlacionar los hallazgos inmunológicos y bioquímicos con los datos clínicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la correlación entre variables clínicas y bioquímicas

- Expresión de citocinas y mucinas formadoras de gel en una muestra de lágrima de los diferentes grupos de estudio.
- Determinar si la severidad de ojo seco correlaciona con variables bioquímicas e inmunológicas estudiadas.

PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

Grupos de estudio

- a) Sujetos sanos: se seleccionaron individuos mayores de 18 años, sanos y sin patología ocular asociada que aceptaron participar en el estudio. Criterios de inclusión: tiempo de ruptura de película lagrimal (TRPL) ≥ 7 seg, prueba de Schirmer II ≥ 7 mm en 5 min y un puntaje ≤ 12 en cuestionario sobre síntomas de ojo seco validado por la Sociedad Española de Oftalmología (ver anexo 1)²². Criterios de exclusión: individuos menores de 18 años, que no aceptaron participar en el estudio, que usaran tratamiento sustitutivo de lágrima o lentes de contacto.
- b) Pacientes con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren: Se seleccionaron individuos mayores de 18 años, sin antecedentes de síndrome de Sjögren, sin glaucoma, pterigión, estenosis del conducto nasolagrimal o conjuntivitis viral/bacteriana/química o alérgica, que aceptaron participar en el estudio y que fueron diagnosticados con síndrome de disfunción lagrimal manifestado por

TRPL \leq 7 seg, prueba de Schirmer II \leq 7 mm en 5 min y síntomas (\geq 12 en cuestionario de la Sociedad Española de Oftalmología). Los pacientes no debían utilizar algún tratamiento sustitutivo de lágrima o lentes de contacto.

- c) Pacientes con síndrome de Sjögren: Se seleccionaron individuos mayores de 18 años, con diagnóstico de síndrome de Sjögren secundario confirmado con biopsia de mucosa oral y/o anticuerpos positivos anti SS1 y SS2. Los pacientes debían tener síndrome de disfunción lagrimal manifestado por TRPL \leq 7 seg, prueba de Schirmer II \leq 7 mm en 5 min y síntomas (\geq 12 en cuestionario de la Sociedad Española de Oftalmología).

Los pacientes fueron captados del servicio de consulta externa del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” durante su evaluación inicial. Antes de pasar a su revisión oftalmológica, cada paciente leyó y firmó carta de consentimiento bajo información y contestó un cuestionario de síntomas de síndrome de disfunción lagrimal validado por la Sociedad Española de Oftalmología (anexo 1). Posterior a esto, se procedió a la toma de muestra y evaluación oftalmológica por un solo evaluador.

Toma de muestra de lágrima

Con los pacientes en posición supina y antes de realizarse su examen oftalmológico, se instilaron 60 μ l de solución salina al 0.9% en cada ojo, se pidió al sujeto parpadear en 3 ocasiones y se obtuvo una muestra de lágrima con capilar estéril de ambos ojos.

Medición de secreción basal de lágrima: prueba de Schirmer II

Posteriormente se aplicó una gota de tetracaína sódica 5 mg/ml en cada ojo. Se esperaron 5 minutos para lograr efecto óptimo del fármaco. Se colocaron tiras graduadas de papel filtro estériles (Tear Flo®) en la región externa del tarso inferior de cada ojo. El paciente permaneció por 5 minutos con los ojos cerrados y posteriormente se retiraron las tiras y se cuantificó en milímetros la secreción basal de lágrima.

Medición de tiempo de ruptura de película lagrimal

Ya que el paciente se encontraba anestesiado, se aplicó fluoresceína estéril a cada ojo y se midió con haz de luz azul de cobalto el tiempo de ruptura de película lagrimal cuantificado con cronómetro digital en segundos y microsegundos. Posteriormente se continuó con valoración oftalmológica integral para corroborar que el sujeto no cumplía con criterios de exclusión.

ELISA para identificar MUC5AC, MUC2

A cada muestra se determinó el volumen final, así como la concentración de proteína utilizando un kit de determinación de concentración de proteína de BioRad® basado en el método de Lowry modificado y utilizando 1 µl de muestra para cada ensayo por duplicado. Posteriormente, se almacenó la muestra a < 70°C hasta el momento de la adsorción en placa de ELISA.

Para realizar los ELISAs, se adsorbieron las proteínas de lágrima a una placa de ELISA Nunc® de 96 pozos con fondo plano de capacidad 400 μ l. Se ajustó cada muestra a 1 μ g de proteína total por duplicado junto con una curva de concentración decreciente de lágrima de sujeto sano partiendo de 10 μ g a 0 μ g de proteína total en diluciones consecutivas. Se añadió buffer de carbonatos con pH 9.5 para constituir un volumen final de 50 μ l. Se desecaron las placas durante 24 horas.

Posteriormente, las placas se lavaron 2 veces con PBS (phosphate buffer saline 0.154 M)-tween 0.05% y se incubó cada pozo con 300 μ l de PBS-BSA (albúmina sérica bovina) 1% durante 2 horas con el fin de bloquear posibles sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos. De nuevo se lavaron las placas 2 veces con PBS-tween 0.05% y se agregó el anticuerpo primario:

1. Anti Mucina 5AC de ratón anti humano Ab-2 Neo-Markers® (1-13M1) cuyo epítipo se encuentra entre la región TSP1 y 2 del core protéico de MUC5AC cercano a la región amino terminal. Se utilizó una dilución 1:100 con PBS-BSA 1%. Se incubó cada pozo con 100 μ l durante 2 horas.
2. Anti Mucina 2 de ratón anti humano B306.1 Abcam®, IgG1 cuyo epítipo se encuentra dirigido a una región de repetidos tandem específicos de MUC2. Se utilizó una dilución 1:1000 con PBS-BSA 1% y se incubó cada pozo con 100 μ l durante 2 horas.

Después de la incubación con el anticuerpo o lectina primarios, se lavaron las placas 2 veces con PBS-tween 0.05% y se incubaron con anticuerpo secundario goat anti mouse

IgG (H+L) conjugado con biotina de Jackson Immuno Research® a una dilución 1:1000 en PBS-BSA 1%, 100 µl por pozo durante 1 hora y 30 minutos. Posteriormente todas las placas se lavaron con PBS-tween 0.05% en 2 ocasiones y se incubaron con streptavidina-HRP (DY998 R&D Systems) a una dilución 1:200 en PBS-tween 0.05% durante 1 hora en oscuridad. Se lavaron las placas 2 veces con PBS-tween 0.05% y se incubaron con tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno (DY999 R&D Systems) durante 20 minutos en oscuridad. Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. Se leyeron las placas en lector de ELISA Multiskan Ascent de Thermo Labsystems a longitud de onda 450/540 nm.

Cuantificación de citocinas solubles

Para la cuantificación de citocinas solubles se utilizó un kit de determinación de concentración de citocinas mediante citometría de flujo (Cytometric Bead Array cytokine detection Kit), en donde se detectan seis tipos de citocinas mediante perlas con distinta intensidad de fluorescencia cubiertas con anticuerpos de captura como: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Los reactivos están conjugados con ficoeritrina y tienen el siguiente límite de detección:

Tabla 1. Características de detección de las diferentes citocinas del Kit de detección.

Citocina	Fluorescencia media	Desviación estándar	Límite mínimo de detección del kit (pg/ml)
IL-2	3.3	0.2	2.6
IL-4	2.3	0.2	2.6
IL-5	2.6	0.2	2.4
IL-10	2.4	0.2	2.8
TNF-α	2.0	0.2	2.8
IFN-γ	2.1	0.3	7.1

Para analizar las muestras se debe realizar una dilución estandarizada incluida en el kit de detección de donde se obtiene una curva estandarizada. Se realizó una mezcla de 50 μ l de lágrima a cada tubo de ensayo, 50 μ l de perlas de detección y se añadió también 50 μ l de reactivo de detección (ficoeritrina), se incubó durante 3 horas y se lavaron las muestras para ser analizadas.

El software para análisis realiza la conversión de fluorescencia a concentración a partir de la curva estandarizada. En la figura 1 se observa una curva estandarizada de detección de TNF- α .

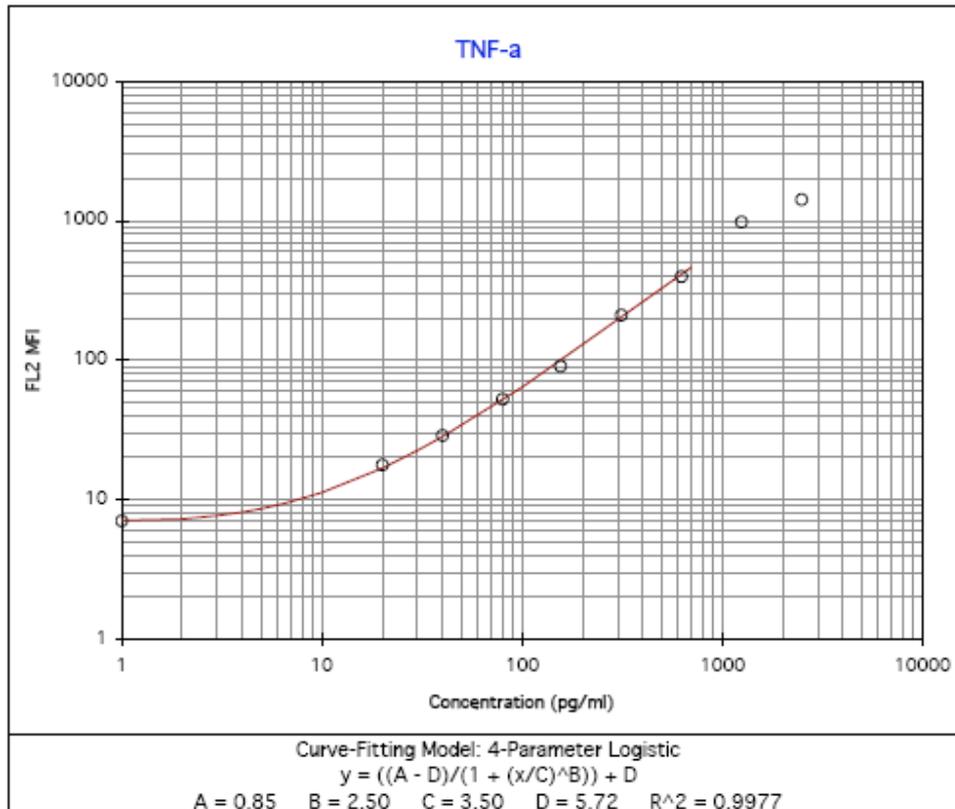


Figura 1. Ejemplo de curva modelo estandarizada de detección de TNF- α .

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo para todas las variables, utilizando medidas de tendencia central y desviación estándar. Se realizó análisis de concentración de MUC2 y 5AC (valorado en absorbancia en nanómetros) entre grupos y concentración de citocinas inflamatorias (picogramos/mililitro), relación entre citocinas Th1 y Th2 y análisis de correlación (prueba de Pearson) entre sintomatología de síndrome de disfunción lagrimal, TRPL y prueba de Schirmer II y los métodos de identificación ya mencionados, considerándose una correlación significativa ± 0.8 y una $p < 0.05$.

Se compararon las pruebas de identificación de MUC5AC y MUC2 y concentración de citocinas entre grupos utilizando la prueba de ANOVA. Se utilizó la prueba de χ^2 para determinar diferencias entre variables no paramétricas. Se consideró diferencia estadísticamente significativa a todo valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Caracterización clínica de los pacientes que ingresaron a este estudio

Se incluyeron 42 pacientes, de los cuales 11 fueron identificados como sujetos sanos, 19 con síndrome de disfunción lagrimal y 12 con síndrome de Sjögren secundario.

Debido a los resultados obtenidos en las diferentes pruebas diagnósticas, se decidió agrupar a los pacientes de acuerdo a los hallazgos obtenidos en las mismas y a su evaluación clínica. De esta forma, se identificaron 3 grupos de estudio:

- a) Sujetos sanos
- b) Pacientes con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren
- c) Pacientes con síndrome de Sjögren secundario.

La edad promedio de los sujetos fue de 44 años (rango 18-83), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a edad entre los diferentes grupos de estudio. De los pacientes que participaron en este trabajo, el 37% fueron hombres y 63% mujeres.

En la tabla 2 y la figura 2 se observa la distribución de los grupos de acuerdo a síntomas, TRPL y prueba de Schirmer II. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$ para cada uno de los parámetros evaluados excepto para edad.

Tabla 2. Características clínicas de los grupos de estudio (media, rango para edad y desviación estándar).

Grupo	Edad (años)	Síntomas (puntos)	TRPL (seg.)	Schirmer II (mm).
Sanos	33.3 (22,58)	6.36±4.22*	9.66±1.54*	18.36±8.74*
No Sjögren	44.3(18-83)	16.29±10.13*	5.38±3.03*	12.92±7.89*
Sjögren	55.36 (41,85)	29.45±14.98*	2.84±1.03*	1.95±1.19*

*p<0.05

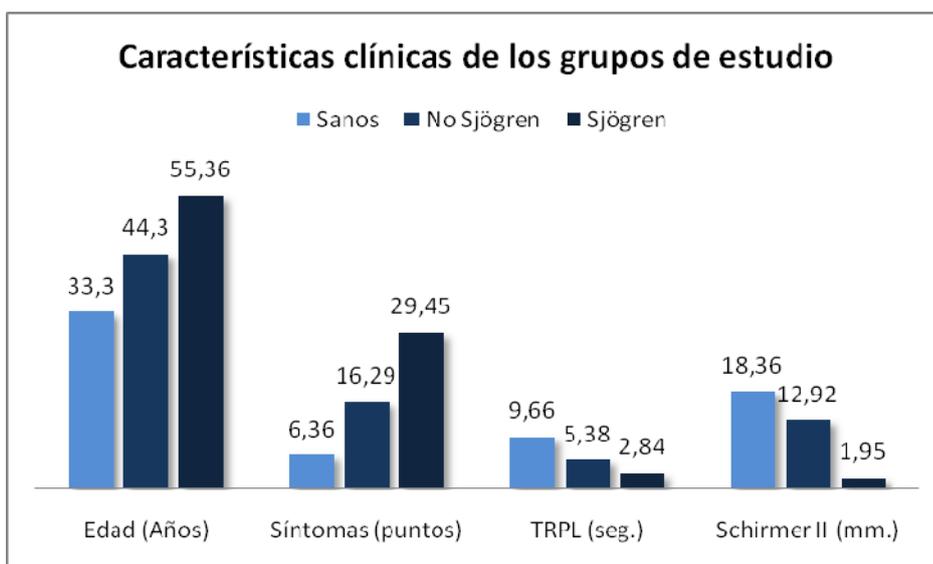


Figura 2. Características clínicas de los grupos de estudio. Pacientes Sjögren con características clínicas más severas p<0.05.

En todas las evaluaciones realizadas se observó que en el grupo de pacientes con Síndrome de Sjögren las alteraciones clínicas eran mayores y caracterizadas por filamentos mucinosos, hiperemia conjuntival y tinción con rosa de bengala en la superficie corneal y conjuntival. Cabe destacar la ausencia de estas manifestaciones en pacientes con síndrome de disfunción lagrimal y sujetos sanos.

Caracterización cuantitativa mucinas de lágrima en los pacientes que participaron en este estudio

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración total de proteínas entre cada uno de los grupos (figura 3). La cuantificación de mucinas formadoras de gel mostró que el grupo de pacientes con síndrome de Sjögren tuvo concentraciones más altas de las mismas comparados con los otros grupos (Figura 4 y 5). En la tabla 3 se representa el promedio de la concentración total de proteína obtenida en cada grupo, la absorbancia en nanómetros de MUC5AC y MUC2.

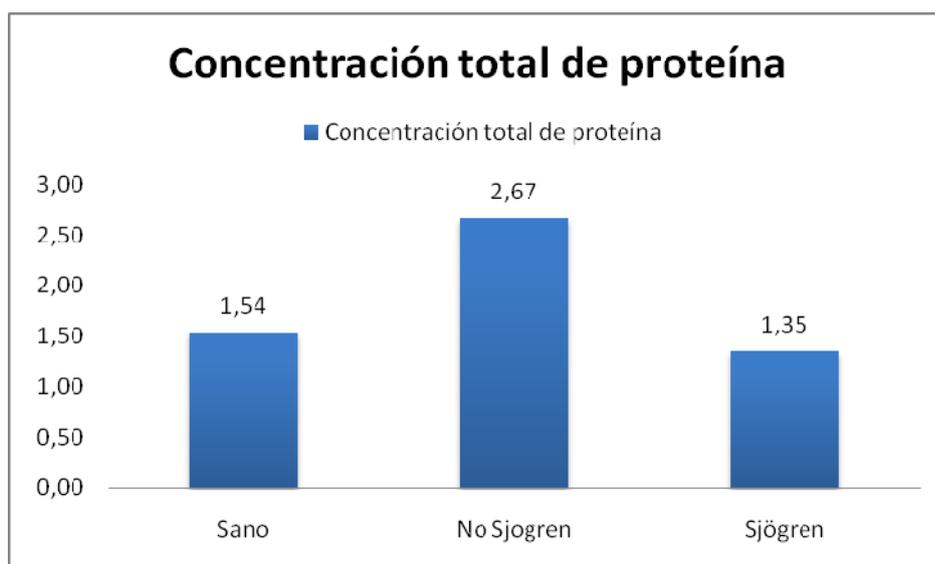


Figura 3. Promedio de concentración de proteína total de la muestra de lágrima obtenida expresado en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

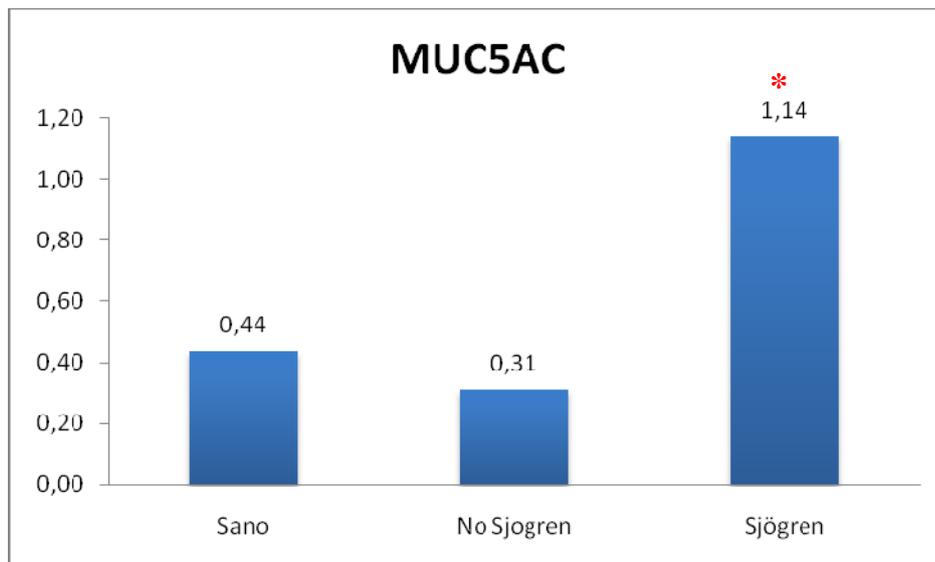


Figura 4. Gráfica de absorbancia media en nanómetros de MUC5AC para cada uno de los grupos. Existe una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de pacientes Sjögren (* $p < 0.05$).

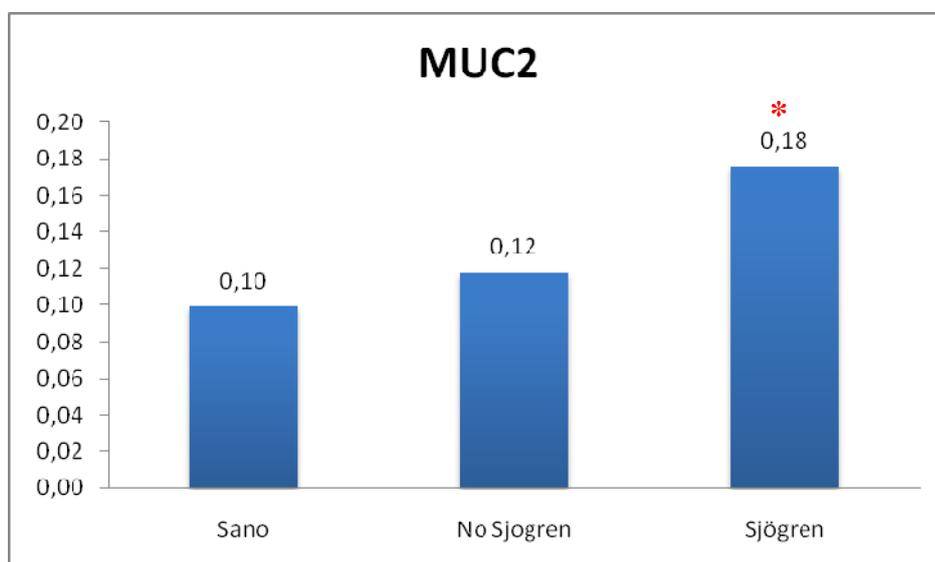


Figura 5. Gráfica de absorbancia media en nanómetros de MUC2 para cada uno de los grupos. Existe una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de pacientes Sjögren (* $p < 0.05$).

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de concentración de proteína, expresión de MUC5AC y MUC2 para cada uno de los grupos de estudio.

Grupo	Concentración proteína $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	MUC5AC, abs nm.	MUC2, abs nm.
Sano	1,54 \pm 0,94	0,44 \pm 0,26	0,10 \pm 0,06
No Sjögren	2,67 \pm 4,11	0,31 \pm 0,29	0,12 \pm 0,11
Sjögren	1,35 \pm 1,17	1,14 \pm 0,39*	0,18 \pm 0,06*

*p<0.05

Cuantificación de citocinas solubles en los pacientes que participaron en el estudio

La tabla 4 muestra la concentración media y desviación estándar de concentración de diferentes citocinas en sujetos con síndrome de Sjögren, sujetos sanos y pacientes con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren.

Las figuras 5 a 10 muestran la concentración media de citocinas en los diferentes grupos de pacientes.

Tabla 4. Media y desviación estándar (SD) de cuantificación (pg/ml) de cada una de las citocinas analizadas en los diferentes grupos.

	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
Sanos	6,31 \pm 26.75 No detectable	1,65 \pm 5.09 No detectable	2,14 \pm 7.03 No detectable	1,06 \pm 3.42 No detectable	1,13 \pm 5.46 No detectable	1,24 \pm 4.77 No detectable
No Sjögren	7,64 \pm 29.39	2 \pm 5.56 No detectable	2,59 \pm 7.69 No detectable	1,28 \pm 3.74 No detectable	1,37 \pm 6.01 No detectable	1,5 \pm 5.23 No detectable
Sjögren	37,94 \pm 64.87*	9,97 \pm 14.60*	7,43 \pm 12.34	8,75 \pm 19.41	8,73 \pm 15.01*	5 \pm 9.42

*p<0.05

Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de IFN- γ y TNF- α en los pacientes con síndrome de Sjögren comparados con los sujetos sanos y pacientes con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren ($p < 0.001$), así como IL-4 comparando pacientes Sjögren y sujetos sanos ($p < 0.05$). Es importante mencionar, que el límite de detección es menor para todas las citocinas en el grupo de sujetos sanos, en el grupo de síndrome de Sjögren se observa positividad para todas las citocinas y en el grupo de disfunción lagrimal no Sjögren sólo tuvo positividad para IFN- γ .

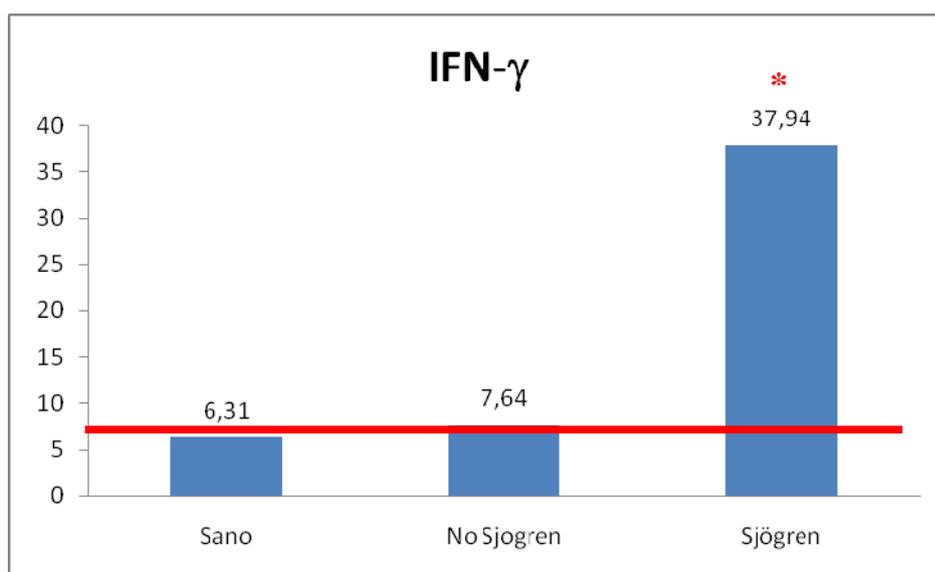


Figura 5. Expresión de IFN- γ (pg/mL) en muestras de lágrima en los diferentes grupos de estudio, se observa un incremento estadísticamente significativo en los pacientes con síndrome de Sjögren comparados con los sujetos sanos y pacientes con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren. La línea representa el límite de detección de IFN- γ por el kit de citocinas. * $p < 0.05$.

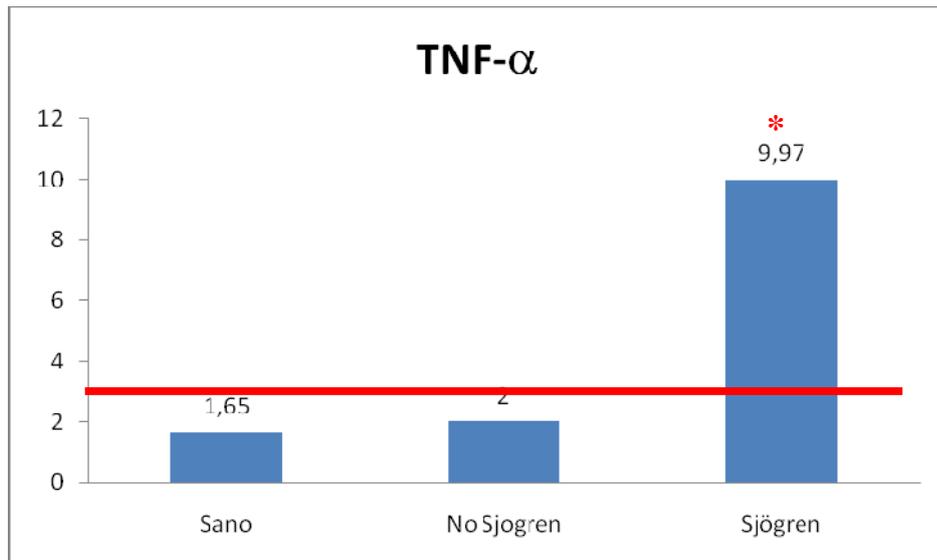


Figura 6. Expresión de TNF- α (pg/mL) en muestras de lágrima en los diferentes grupos de estudio, se observa un incremento estadísticamente significativo en los pacientes con síndrome Sjögren comparados con sujetos sanos y pacientes con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren. La línea representa el límite de detección de TNF- α por el kit de citocinas. * $p < 0.05$.

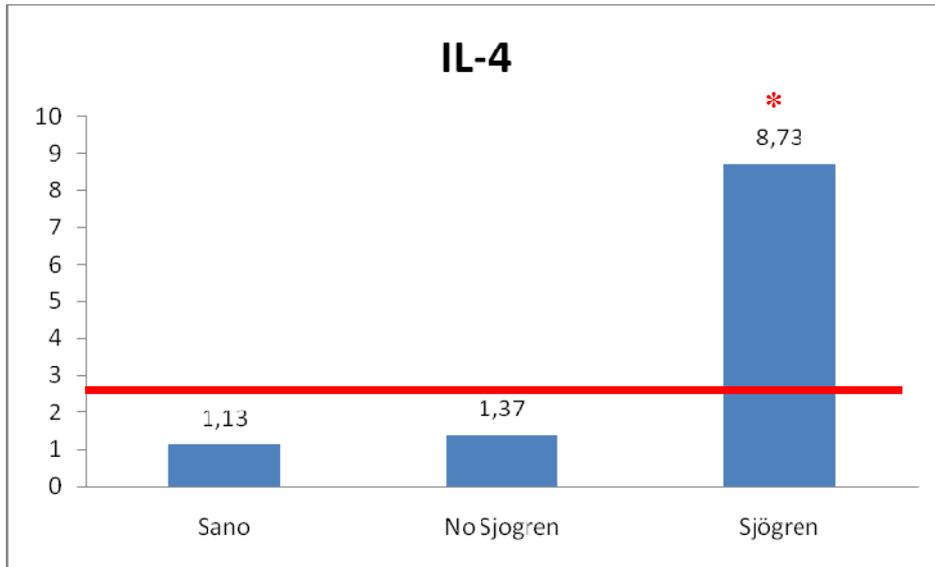


Figura 7. Expresión de IL-4 (pg/mL) en muestras de lágrima en los diferentes grupos de estudio, se observa un incremento estadísticamente significativo en sujetos con síndrome Sjögren comparados con sujetos sanos, no se pudo demostrar diferencia estadísticamente significativa con sujetos con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren. La línea representa el límite de detección de IL-4 por el kit de citocinas.

* $p < 0.05$.

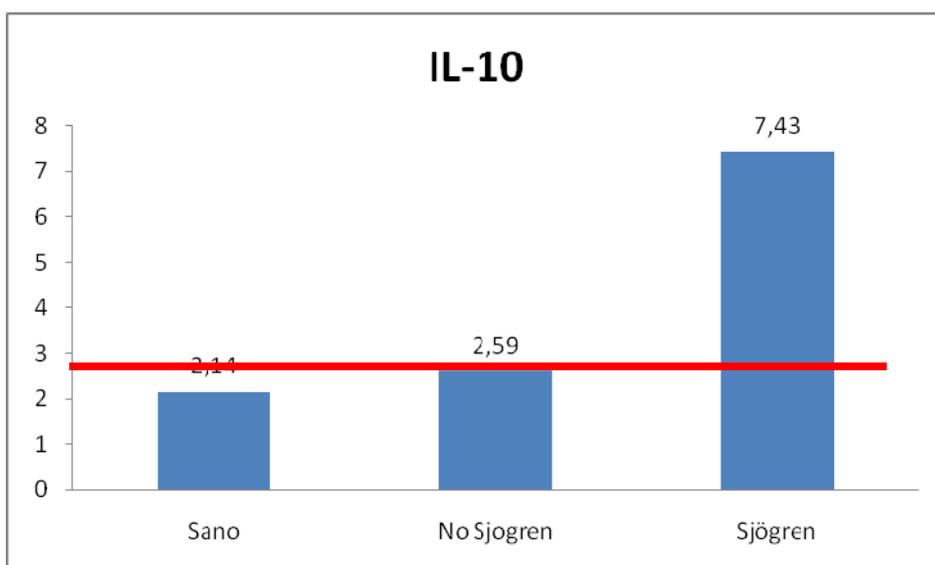


Figura 8. Expresión de IL-10 (pg/mL) en muestras de lágrima en los diferentes grupos de estudio, se observa un incremento en sujetos con síndrome Sjögren comparados con sujetos sanos y paciente con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren. La línea representa el límite de detección de IL-10 por el kit de citocinas.

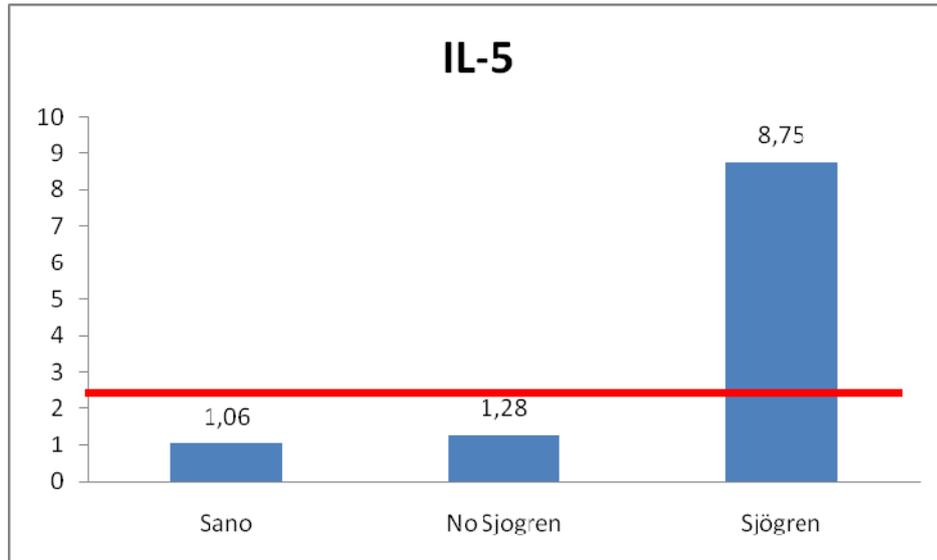


Figura 9. Expresión de IL-5 (pg/mL) en muestras de lágrima en los diferentes grupos de estudio, se observa un incremento en sujetos con síndrome Sjögren comparados con sujetos sanos y pacientes con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren. La línea representa el límite de detección de IL-5 por el kit de citocinas.

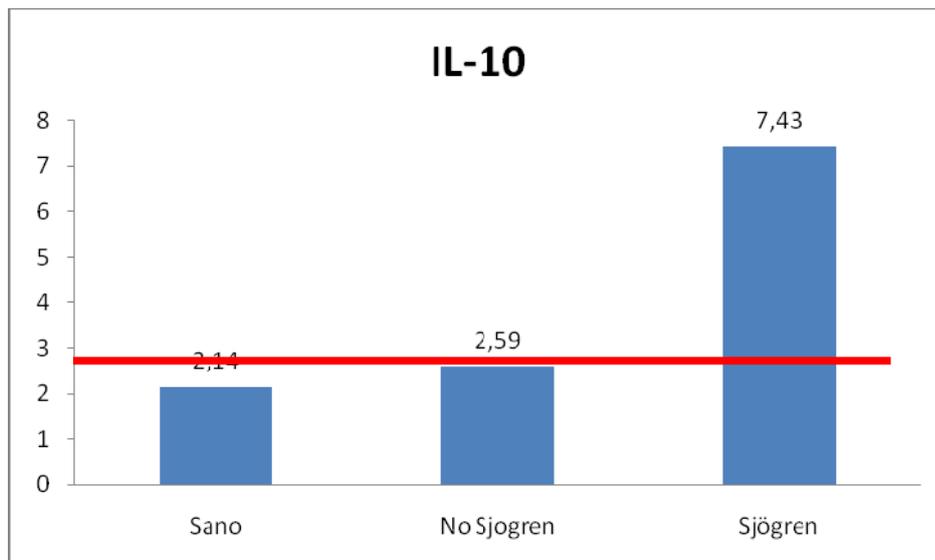


Figura 10. Expresión de IL-2 (pg/mL) en muestras de lágrima en los diferentes grupos de estudio, se observa un incremento en sujetos con síndrome Sjögren comparados con sujetos sanos y sujetos con síndrome de disfunción lagrimal no Sjögren. La línea representa el límite de detección de IL-2 por el kit de citocinas.

Relación de citocinas Th1/Th2 en muestras de lágrima

Se realizó una relación para cada una de las citocinas reportadas para identificar el patrón diferencial Th1/Th2. Se realizó media de concentración de $TNF-\alpha/IFN-\gamma$, $IL-10/IFN-\gamma$, $IL-5/IFN-\gamma$, $IL-4/IFN-\gamma$, $IL-2/IFN-\gamma$ y relación $TNF-\alpha/IL-10$, $IFN-\gamma/IL-10$, $IL-5/IL-10$, $IL-4/IL-10$, $IL-2/IL-10$. La tabla 5 y las figuras 11 y 12 muestran las relaciones obtenidas.

Tabla 5. Relación de citocinas Th1/Th2 en muestras de lágrima

Citocina	Sanos	No Sjögren	Sjögren
TNF-α/IFN-γ	0.2 \pm 0.447	0.0145 \pm 0.063	0.1978 \pm 0.273
IL-10/IFN-γ	0.2095 \pm 0.468	0.0328 \pm 0.099	0.0784 \pm 0.098
IL-5/IFN-γ	0.1619 \pm 0.362	0.0163 \pm 0.049	0.1954 \pm 0.382
IL-4/IFN-γ	0.2047 \pm 0.457	0.0107 \pm 0.046	0.0789 \pm 0.120
IL-2/IFN-γ	0.2857 \pm 0.638	0.0091 \pm 0.039	0.1474 \pm 0.386
IFN-γ/IL-10	0.1909 \pm 0.426	0.3457 \pm 1.050	2.2618 \pm 2.838*
TNF-α/IL-10	0.1909 \pm 0.426	0.1413 \pm 0.347	0.7595 \pm 0.894*
IL-5/IL-10	0.1545 \pm 0.345	0.0522 \pm 0.156	0 \pm 1.956
IL-4/IL-10	0.1954 \pm 0.437	0.0410 \pm 0.178	0.5006 \pm 0.625*
IL-2/IL-10	0.2727 \pm 0.609	0.0349 \pm 0.152	0 \pm 0.310

*p<0.05

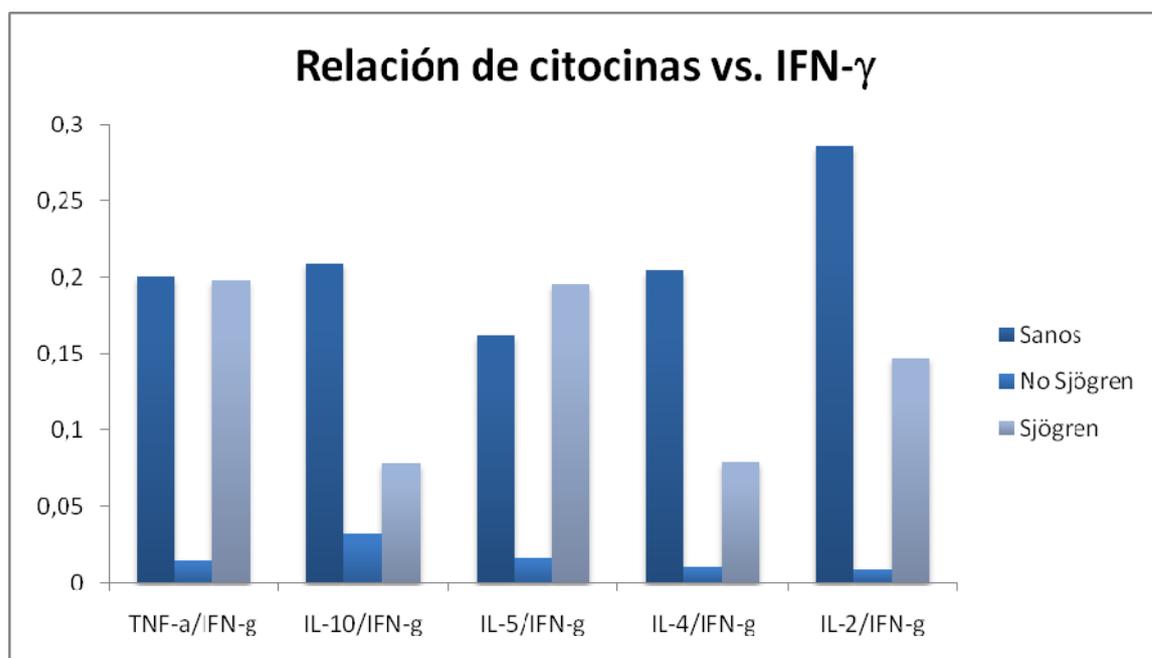


Figura 11. Relación de citocinas con IFN- γ . No se observó relación con diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

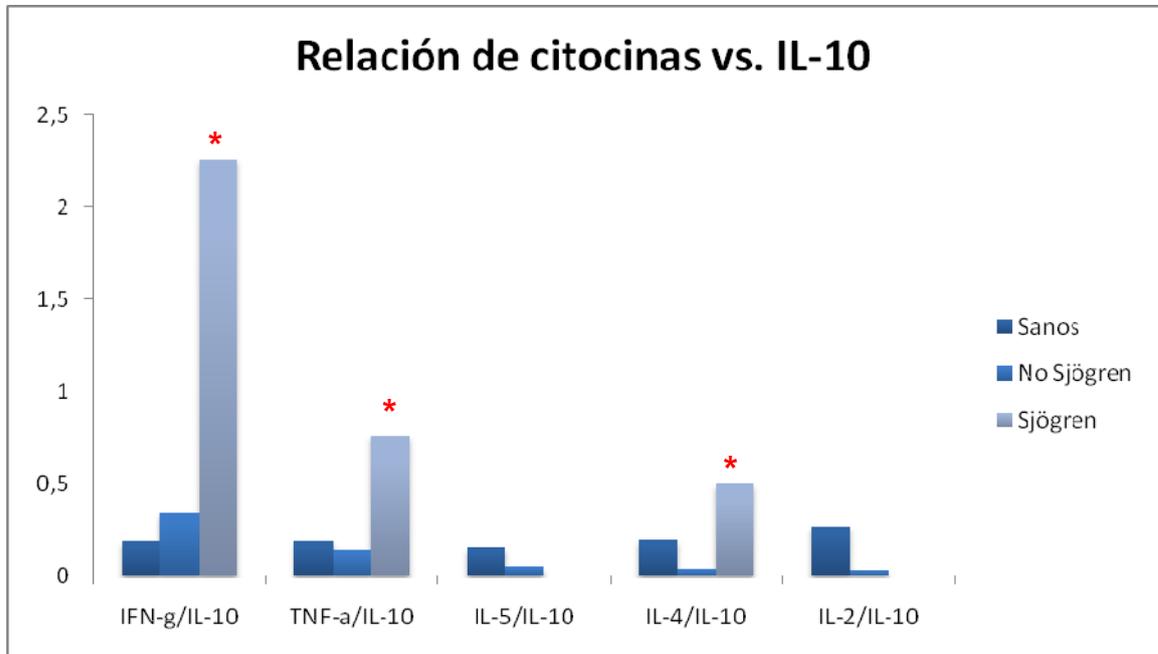


Figura 12. Relación de citocinas con IL-10. Se observó relación con diferencia estadísticamente significativa entre Sjögren para IFN- γ /IL-10, TNF- α /IL-10 e IL-4/IL-10 (* $p < 0.02$).

Se encontró una relación estadísticamente significativa con $p < 0.02$ de la proporción de IFN- γ /IL-10, TNF- α /IL-10 e IL-4/IL-10 en pacientes Sjögren comparados con los otros grupos. Esto implica un balance positivo de la expresión de citocinas proinflamatorias más que inmunomoduladoras en las muestras de lágrima de nuestros pacientes.

Correlación entre la concentración de mucinas formadoras de gel, citocinas proinflamatorias y severidad clínica

El análisis de correlación para cada uno de los parámetros no demostró correlación estadísticamente significativa entre las características clínicas y los parámetros bioquímicos estudiados o entre la expresión de MUC5AC y MUC2 y la expresión de citocinas solubles.

En el análisis de cada uno de los grupos se obtuvo una correlación fuerte (>0.90) respecto a la expresión de todas las citocinas comparadas entre los diversos grupos.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue la identificación de citocinas solubles y la expresión de mucinas formadoras de gel así como determinar si existe correlación entre los parámetros clínicos que se utilizan para el diagnóstico de síndrome de disfunción lagrimal, la concentración de citocinas y la expresión de mucinas formadoras de gel que puedan ayudar a explicar los procesos fisiopatológicos que ocurren en la superficie ocular en estos pacientes y que puedan explicar la severidad de las manifestaciones clínicas observadas.

El síndrome de disfunción lagrimal es una condición patológica muy heterogénea que se manifiesta clínicamente con síntomas irritativos y signos clínicos como TRPL y prueba de Schirmer II alterados dependiendo de su etiología⁶. En el caso del síndrome de disfunción lagrimal, ésta es muy diversa caracterizándose principalmente 2 grupos:

1. Secundario a deficiencia de fase acuosa de la película lagrimal
2. Secundario a evaporación de la película lagrimal.

La queratoconjuntivitis sicca es una condición en la cual existen muchas alteraciones en el aparato lagrimal (que incluye la glándula lagrimal, superficie ocular, párpados y conducto nasolagrimal), lo que culmina con inestabilidad de la película lagrimal, con grados variables de desecación y cambios estructurales en las glicoproteínas formadoras de gel de la superficie ocular.² Una manifestación común es el síndrome de Sjögren, en el que existe una destrucción autoinmune a la glándula lagrimal, lo que produce una reducción en la secreción acuosa de la película lagrimal, disminución en la densidad de células caliciformes y acúmulo de grandes cantidades de secreción mucosa anómala muy viscosa.³⁷

En nuestro estudio se identificó una mayor concentración de mucinas formadoras de gel en las muestras de pacientes con síndrome de Sjögren, por lo que es posible que la regulación positiva de las mucinas formadoras de gel sea un mecanismo de adaptación a la desecación secundaria al proceso etiológico principal que consiste en la destrucción autoinmune de la glándula lagrimal principal.

Las diferencias en cuanto a concentración de mucinas formadoras de gel observadas en los pacientes con síndrome de Sjögren secundario sugieren algún factor relacionado con mecanismos compensadores de la desecación de superficie secundario a activación de factores de transcripción como NF- κ B dependiente de citocinas proinflamatorias, particularmente TNF- α que presenta una regulación positiva en estados inflamatorios de la superficie ocular como es el síndrome de Sjögren, fenómeno también observado en nuestro estudio, aunque no se observó una fuerte correlación entre estos parámetros esto quizá debido al tamaño de la muestra.

Se observó un incremento significativo de IFN- γ también en paciente con síndrome Sjögren y una tendencia al incremento en la expresión en las otras citocinas identificadas con este nuevo método de estudio. La importancia de esto radica en la posible utilidad de este método de detección para monitorización clínica y determinación de actividad inflamatoria en la superficie ocular en pacientes con enfermedades inflamatorias como el síndrome de Sjögren dado que es un método rápido y sencillo de realizar.⁹

En nuestro estudio se observó también una tendencia a la expresión de citocinas proinflamatorias tipo Th1 en pacientes con síndrome de Sjögren. Estos hallazgos son semejantes a lo publicado por algunos otros autores que sugieren que la relación de citocinas Th1/Th2 es un método confiable de caracterización de la inflamación en

diferentes patologías como rosácea, estados alérgicos como asma y conjuntivitis alérgica.¹⁰ La implicación clínica de este hallazgo debe enfocarse a modificar el tratamiento de tal forma que se produzca una modificación de la respuesta celular y la producción de citocinas proinflamatorias.

Este estudio también muestra la importancia de la expresión de citocinas solubles en el síndrome de Sjögren, que se caracteriza por lesión epitelial conjuntival significativa. Es posible que la alta expresión de citocinas esté relacionada con el mecanismo fisiopatológico y sea útil para la monitorización clínica de estos pacientes, ya que en la actualidad los métodos de detección de actividad inflamatoria de la superficie ocular son metodológicamente complejos, no existe una correlación significativa entre los hallazgos clínicos y los métodos básicos y en algunos otros estudios la actividad clínica se monitoriza mediante detección sistémica de citocinas y esto no tiene una adecuada correlación con el estado de inflamación local.¹³

Los resultados de este estudio se han presentado en el congreso anual de la Association for Research in Vision and Ophthalmology, que se llevó a cabo en Fort Lauderdale, Florida en el mes de mayo del presente año.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gipson IK, Yuichi H, Argüeso P. Character of Ocular Surface Mucins and Their Alteration in Dry Eye Disease. *The Ocular Surface* 2004; 2(2): 131-48.
2. Carrington SD, Hicks SJ, Corfield AP, Kaswan RL, Packer N, Bolis S, Morris CA. Structural Analysis of secreted Ocular Mucins in Canine Dry Eye. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 438: 253-63.
3. Johnson ME, Murhpy PJ. Changes in the Tear Film and Ocular Surface From Dry Eye Syndrome. *Prog Ret Eye Res* 2004; 23: 449-74.
4. Argüeso P, Gipson IK. Epithelial Mucins of the Ocular Surface: Structure, Biosynthesis and Function. *Exp Eye Res.* 2001; 73: 281-89.
5. BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit. 2007 Becton Dickinson and Company.
6. Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Am. Tear Cytokine Profiles in Dysfunctional Tear Syndrome. *Am J Ophthalmol* 2009;147:198-205.
7. Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C, Lizard G. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol* 2007;91:29-32.
8. Cook EB, Stahl JL, Lowe L, Chen R, Morgan E, Wilson J, VArro R, Chan A, Graziano FM, Barney NP. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *J Immunol Methods* 254, 2001;254:109-118.

9. Cook EB. Tear cytokines in acute and chronic ocular allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:441-445.
10. Stern ME, Siemasko KF, Niederkorn JY. The Th1/Th2 paradigm in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:446-450.
11. Sack R, Conradi L, Beaton A, Sathe S, McNamara N, Leonardi A. Antibody array characterization of inflammatory mediators in allergic and normal tears in the open and closed eye environments. *Exp Eye Res* 2007;85:528-538.
12. Leonardi A, Crunow SJ, Zhan H, Calder VL. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Experim Allergy*, 2006;36:777-784.
13. Leonardi A. In-vivo diagnostic measurements of ocular inflammation. *Curr Opin Aller Clin Immunol* 2005;5:464-472.
14. Vasanthi M, Prajna NV, Lalitha P, Mahadevan K, Muthukkaruppan V. A pilot study on the infiltrating cells and cytokine levels in the tear of fungal keratitis patients. *Indian J Ophthalmol* 2007;55:27-31
15. Uchino E, Sonoda S, Kinukawa N, Sakamoto T. Alteration pattern of tear cytokines during the course of a day: Diurnal rhythm analyzed by multicytokine assay. *Cytokine* 2006;33:36-40.
16. Corrales RM, Villarreal A, Farley W, Stern ME, Li DQ, Pflugfelder SC. Strain-Related Cytokine Profiles on the Murine Ocular Surface in Response to Desiccating Stress. *Cornea* 2007;26:579-584.
17. Sonoda S, Uchino E, Nakao K, Sakamoto T. Inflammatory cytokine of basal and reflex tears analysed by multicytokine assay. *Br J Ophthalmol* 2006;90:120-122

18. Macri A, Pflugfelder S. Correlation of the Schirmer 1 and fluorescein clearance test with the severity of corneal epithelial and eyelid disease. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1632-1638.
19. Yoon KC, Jeong IN, Park YG, Yang SY. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea* 2007;26:431-437.
20. Chung SH, Lee JH, Yoon JH, Lee HK, Seo KY. Multi-layered culture of primary human conjunctival epithelial cells producing MUC5AC. *Exp Eye Res* 2007;85:226-233.
21. Prada J, Noelle B, Baatz H, Hartmann C, Pleyer U. Tumour necrosis factor α and interleukin 6 gene expression in keratocytes from patients with rheumatoid corneal ulcerations. *Br J Ophthalmol* 2003;87:548-550.
22. Donate J, Benítez del Castillo JM, Fernández C, García Sánchez J. Validation of a Questionnaire for the Diagnosis of Dry Eye. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 2002; 9.
23. Corfield AP, Carrington SD, Hicks SJ, Berry M, Ellingham R. Ocular Mucins: Purification, Metabolism and Functions. *Prog Ret Eye Res* 1997; 16(4):627-56.
24. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Tisdale A, Ng FT, Russo CL. Mucin Gene Expression in Immortalized Human Corneal-Limbal and Conjunctival Epithelial Cell Lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 2496-506.
25. Jumblatt MM, McKenzie RW, Steele PS, Emberts CG, Jumblatt JE. MUC7 Expression in the Human Lacrimal Gland and Conjunctiva. *Cornea*. 2003; 22(1):41-5.
26. 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; 44: 86-92.
27. Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Zhan Q, Feldman ST, Gipson IK. Expression of Secretory Mucin Genes by Human Conjunctival Epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37 (8): 1684-92.
28. Hibino SH, Watanabe H. Mucins and Ocular Surface Disease. *Adv Exp Med Biol* 2002; 506(Pt A): 275-81.
29. Argüeso P, Spurr-Michaud S, Russo CL, Tisdale A, Gipson IK. MUC 16 Mucin Is Expressed by the Human Ocular Surface Epithelia and Carries the H185 Carbohydrate Epitope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(6): 2487-95.
30. Corrales RM, Galarreta DJ, Herreras JM, Calonge M, Chaves FJ. Normal Human Conjunctival Epithelium Expresses MUC13, MUC15, MUC16 and MUC17 Mucin Genes. *Arch Soc Esp Oftalm* 2003; 78: 375-82.
31. Jiang T, Jumblatt JE. Expression of Membrane-Associated Mucins in Human Cornea and Conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 837.
32. Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argüeso P, Gipson IK. Differential Regulation of Membrane-Associated Mucins in the Human Ocular Surface Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 114-22.
33. Gipson IK. Distribution of Mucins at the Ocular Surface. *Exp Eye Res.* 2004; 78: 379-88.
34. Kunert KS, Keane-Myers AM, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Alteration in Goblet Cell Numbers and Mucin Gene Expression in a Mouse Model of Allergic Conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(11): 2483-89.

35. Argüeso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased Levels of the Goblet Cell Mucin MUC5AC in Tears of Patients with Sjögren Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(4): 1004-11.
36. Garcher C, Bron A, Baudouin C, Bildstein L, Bara J. CA 19-9 ELISA Test: A New Method For Studying Mucus Changes in Tears. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 88-90.
37. Corrales RM, Galarreta DJ, Herreras JM, González MJ, Arranz I, Saez V, Mayo A, García-Vázquez C, Calonge M, Chaves FJ. Prospective Variation in the Expression of the Conjunctival Mucin Genes MUC5AC, MUC7, MUC16 and MUC17 Before, During and After Contact Lens Wear. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1476.
38. Herreras J, Galarreta DJ, Corrales RM, González MJ, Arranz I, Saez V, García C, Mayo A, Calonge M, Chaves FJ. Comparison of Mucin Genes Expression Alterations in Conjunctival Epithelium Induced by High and Low Water Content Hydrogel Contact Lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2498.
39. Danjo Y, Watanabe H, Tisdale AS, George M, Tsumura T, Abelson MB, Gipson IK. Alteration of Mucin in Human Conjunctival Epithelia in Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(13): 2602-09.
40. Berry M, Ellingham RB, Corfield AP. Human Preocular Mucins Reflect Changes in Surface Physiology. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88: 377-83.
41. Calonge MC, Corrales RM, Saez V, Mayo A, Herreras JM, Stern ME, Chaves FJ. Alteration of Conjunctival Mucin Gene Expression In Tear-deficient Dry Eye Syndrome. *Invest .Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 837.
42. Jass JR, Walsh MD. Altered Mucin Expression in the Gastrointestinal Tract: A Review. *J Cell Mol Med*. 2001; 5(3): 327-51.

43. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J*, 1995; 21:221-232.
44. Corfield, AP, Donapaty SR, Carrington SD, Hicks SJ, Schauer R, Kohla G. Identification of 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic Acid in Normal Canine Pre-ocular Tear Film Secreted Mucins and Its Depletion in Keratoconjunctivitis Sicca. *Glycoconj J*. 2005; 22:409-416.
45. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Alfonso A, Monroy D. Altered Cytokine Balance in the Tear Fluid and Conjunctiva of Patients with Sjögren's Syndrome Keratoconjunctivitis Sicca. *Curr Eye Res*, 1999; 19(3):201-211.
46. Ahn DH, Crawley SC, Hokari R, Yang SC, Li JD, Kim YS. TNF-alpha Activates MUC2 Transcription NF-kappaB but Inhibits via JNK Activation. *Cell Physiol Biochem*, 2005; 15:29-40.
47. *Acta Ophthalmol Scand*, 2000; 78 (s231):7-37
48. Corfield AP, Higa H, Paulson JC, Schauer R. The Specificity of Viral and Bacterial Sialidases for Alpha(2-3)- and Alpha(2-6)- Linked Sialic Acids in Glycoproteins. *Biochem Biophys Acta*, 1983; 744(2):121-6.
49. Hazlett L, Rudner XW, Masininck S, Ireland M, Gupta S. In the Immature Mouse, *Pseudomonas aeruginosa* Pili Bind a 57-kD (alpha 2-6) Sialylated Corneal Epithelial Cell Surface Protein: A First Step in Infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995; 36:634-41.
50. Kuizenga AB, van Agtmaal EJ, van Haeringen NJ, Kijlstra A. Sialic Acid in Human Tear Fluid. *Exp Eye Res*, 1990; 50(1):45-50.

Anexo 1. Cuestionario de sintomatología de síndrome de ojo seco validado por la Sociedad Española de Oftalmología aplicado a nuestros pacientes

Fecha: ___/___/09

No. _____

Nombre: _____

Edad: _____ Género: F() M()

Dirección: _____

Ocupación: _____

1. ¿Padece Ud. Alguna enfermedad? Si _____ No _____

2. ¿Cuál? _____

3. Motivo de consulta: _____

4. ¿Utiliza lentes? Si _____ No _____

5. ¿Son de contacto? Si _____ No _____

6. ¿Desde hace cuánto tiempo? _____

7. ¿Alguna vez le han diagnosticado ojo seco? Si _____ No _____

8. Si es así, ¿qué clase de tratamiento ha recibido? _____

9. ¿Utiliza gotas o sustitutos de lágrima más de tres veces al día? Si _____ No _____

En la siguiente sección, califique cada uno de los síntomas de acuerdo con la siguiente puntuación:

0: No tiene este síntoma

1: Pocas veces tiene este síntoma

- 2: A veces tiene este síntoma pero no le molesta
- 3: Frecuentemente tiene este síntoma, le molesta, pero no interfiere con sus actividades
- 4: Frecuentemente tiene este síntoma, le molesta e interfiere con sus actividades

Enrojecimiento ocular	_____
Borde de párpados inflamados	_____
Escamas o costras en párpados	_____
Ojos pegados al levantarse	_____
Secreciones (legañas)	_____
Sequedad de ojo	_____
Sensación de arenilla	_____
Sensación de cuerpo extraño	_____
Ardor/quemazón	_____
Picor	_____
Malestar de ojos	_____
Dolor agudo (pinchazos en los ojos)	_____
Lagrimo	_____
Ojos llorosos	_____
Sensibilidad a la luz (fotofobia)	_____
Visión borrosa transitoria que mejora con parpadeo	_____
Cansancio de ojos o párpados	_____
Sensación de pesadez ocular o palpebral	_____