

Caracterización del perfil de expresión del micro-RNA 146a cuantificado en lágrima y suero de pacientes con enfermedad de ojo seco comparada con una población sin patología ocular.

Characterization of the expression profile of micro-RNA 146a quantified in tears and serum of patients with dry eye disease compared to a population without ocular pathology.

Zamora-Rodríguez Lucero del Alba^{1*}, Álvarez-Félix Jesús Ramón², Angulo-Rojo Carla Ernestina³, Romo-García Efraín⁴, Perdomo-Martínez Rómulo⁵

1. Residente de oftalmología en Hospital Civil de Culiacán / Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud
2. Cirujano oftalmólogo con alta especialidad en Córnea de Departamento de córnea de Hospital Civil de Culiacán/CIDOCs
3. Doctora en ciencias y biomedicina molecular/ Investigadora Universidad Autónoma de Sinaloa
4. 4Cirujano oftalmólogo con alta especialidad en Retina y Vítreo, Jefe del Servicio de Oftalmología Hospital Civil de Culiacán/CIDOCs
5. Cirujano oftalmólogo con alta especialidad en Órbita y Oculoplástica, Jefe de curso de Oftalmología Hospital Civil de Culiacán/CIDOCs

*Autor de correspondencia: Lucero del Alba Zamora Rodríguez

dirección: Agustín Verdugo #1380, Col. Gabriel Leyva, CP 80030, Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

e-mail: dra.zamora.lucero@gmail.com

DOI <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v11.n3.005>

Recibido 02 de Febrero 2021, aceptado 20 de Marzo 2021

RESUMEN

OBJETIVO: Analizar la expresión del micro-RNA 146a en pacientes sanos y en pacientes con ojo seco para determinar su relación con esta enfermedad. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se realizó una investigación observacional, descriptiva y transversal en pacientes sanos y con ojo seco (EOS) del Hospital Civil de Culiacán mediante la medición con el test de OSDI, test de Schirmer, TRPL y AML, PCR de muestra de lágrima y sanguínea para cuantificar el miRNA 146a, durante el periodo comprendido de octubre a diciembre del 2020. **RESULTADOS:** Se estudiaron un total de 40 pacientes, 20 pacientes con enfermedad de ojo seco y 20 sin patología ocular, encontrándose un promedio de edad de 53,2 y de 52,4 años respectivamente, se encontró una clasificación severa de ojo seco por OSDI, patológica por prueba de Schirmer, y baja producción por TRPL y AML en el grupo EOS, con resultados dentro de parámetros normales en grupo control. El perfil de expresión del miRNA 146a en lágrima con una tasa de cambio de 1,706 (DE 1,869) en los casos y de 0,4144 (DE 0,3136) en los controles ($p= 0.0155$); mientras que en suero 1,798 (DE 2,159) en los casos y 0,6540 (DE 0,4447) en los controles ($p= 0.2526$). **CONCLUSIONES:** Se encontró una tasa de sobreexpresión en lágrima del miRNA 146a en 14 de 20 sujetos con enfermedad de ojo seco, siendo 2 veces más respecto a los pacientes controles, con una p estadísticamente significativa, lo cual sugiere una posible asociación con el desarrollo de la enfermedad de ojo seco.

Palabras claves: miRNA 146a, enfermedad de ojo seco (EOS), OSDI, Schirmer, tiempo de ruptura de la película lagrimal (TRPL).

SUMMARY

Objective. To analyze the expression of micro-RNA 146a in healthy patients and in patients with dry eye to determine its relationship with this disease. **Material and Methods.** An observational, descriptive and cross-sectional investigation was carried out in healthy patients with dry eye from Hospital Civil de Culiacán by measuring with the OSDI test, Schirmer's test, TRPL and AML, PCR of tear and blood samples to quantify the miRNA 146a, during the period from October to December 2020. Results. A total of 40 patients were studied, 20 with dry eye disease and 20 without ocular pathology, finding an average age of 53.2 and 52.4 years old respectively, a severe classification of dry eye was found by OSDI, pathological by Schirmer's test, and low production by TBUT an TMH in the DED group, with normal results in control patients. The expression profile of the miRNA 146a in tear with a rate of change of 1.706 (SD 1.869) in the cases and 0.4144 (SD 0.3136) in the controls ($p = 0.0155$); while in serum 1.798 (SD 2.159) in the cases and 0.6540 (SD 0.4447) in the controls ($p = 0.2526$). **Conclusions.** A rate of overexpression of miRNA 146a in tears was found in 14 of 20 subjects with dry eye, being 2 times more than in control patients, which a statistically significant p , which suggest a possible association with the development of dry eye disease.

Key words. miRNA 146a, dry eye disease (DED), OSDI, Schirmer, tear film breakdown time (TBUT).

INTRODUCCIÓN

La definición de la enfermedad de ojo seco (DED) fué actualizada en el 2017 por el Dry Eye Workshop como "una patología multifactorial de

la superficie ocular caracterizada por la perdida de homeostasis de la película lagrimal y acompañada por síntomas oculares, en la que la inestabilidad de la película, la hiperosmolaridad,

la inflamación, el daño y las anormalidades neuromotoriales desempeñan un papel etiológico".¹

En el 2019, se reportó la edad mayor de 40 años como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de ojo seco, principalmente asociados al sexo femenino, diabetes mellitus (DM), hipertensión, glaucoma y al uso de medicamentos tópicos.²

La inflamación es un componente clave en el desarrollo de la DED, las citoquinas proinflamatorias se han encontrado incrementadas en el fluido lagrimal de pacientes con ojo seco severo.³ Entre las causas de ojo seco severo están las secundarias a enfermedades reumatólicas como el Síndrome de Sjögren (SJ) y la Artritis Reumatoide (AR). Las células epiteliales juegan un papel importante en la persistencia e incluso en el inicio de la inflamación crónica de la superficie ocular. Las respuestas inmunitarias y la inflamación inducidas por el estrés secundarias a la desecación de la superficie, pueden occasionar daños adicionales y un ciclo inflamatorio que se perpetúa.⁴

El estado del ojo seco se evalúa mediante cuestionarios basados en síntomas como el OSDI (índice de enfermedad de la superficie ocular), o signos como la prueba de Schirmer, tiempo de ruptura de la película lagrimal, tinción de fluoresceína o altura del menisco lagrimal realizados en la consulta regular de oftalmología.⁵

Los micro-RNA (miRNA) son parte de una clase de pequeños ARN reguladores no codificantes que se han identificado recientemente, actúan a través de la unión al ARNm mensajero (ARNm) 3b del ARNm diana y conducen a la represión transcripcional o degradación del ARNm diana a nivel postranscripcional⁶, son actores claves en procesos celulares, como el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Han surgido para desempeñar papeles importantes en varios procesos fisiológicos y patofisiológicos, como el desarrollo embrionario, la organogénesis, la tumorogénesis y otras enfermedades como la arritmia, cardiopatía, hipertrofia cardiaca, hepatitis viral y DM.⁷ Actualmente se informó que miRNAs como el miR-146 también pueden aumentar la expresión de los genes diana.⁶

Se ha observado en varios estudios, cambios en la expresión de miR-146a en trastornos autoinmunes como la AR, el lupus eritematoso sistémico (LES) y la psoriasis,⁸ Nakasa T y col han informado que miR-146a está altamente expresado en el tejido sinovial de pacientes con AR en comparación con los tejidos normales y la osteoartritis (OA).⁹

Se ha asociado una sobreexpresión del miR-146a en la progresión de la uveítis autoinmune experimental (UAE). Variaciones en el número de copias del mismo en el Síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) confirriendo un riesgo de desarrollar la enfermedad. En la oftalmopatía

de Graves (OG) el miR 146a es un regulador clave en la fibrosis del tejido orbitario y el desarrollo de OG. En el SJ una sobreexpresión aberrante del miR 146a en suero puede estar asociado con la patogenia, pudiendo afectar la inmunidad innata y contribuir al inicio y progresión del SJ.¹⁰

El objetivo de este estudio fué caracterizar el perfil de expresión del micro RNA-146a en lágrima y suero de pacientes con ojo seco y sanos; además, caracterizar clínicamente una población con ojo seco y una población control, crear un banco de lágrima y de suero de una población con ojo seco y una población control, cuantificar la expresión del micro RNA-146a en pacientes con ojo seco y en pacientes sanos, y, realizar un análisis comparativo del perfil de expresión del micro RNA 146a entre la población control y la población con ojo seco.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, descriptivo y transversal del 1ro de septiembre al 1ro de diciembre del año 2020. El presente proyecto de investigación se realizó en las instalaciones del Hospital Civil de Culiacán, Sinaloa México en el servicio de Oftalmología en el departamento de Córnea; las muestras se analizaron en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Se reclutaron 20 pacientes para cada grupo de estudio (casos y controles), pacientes del departamento de córnea con clínica de ojo seco (definido como la presencia de lagrimeo, ardor ocular, ojo rojo, sensación de cuerpo extraño) y/o con los siguientes diagnósticos (examen de ojos y de la visión, ojo seco, trastorno de la superficie ocular, Blefaritis con ojo seco, Artritis reumatoide con ojo seco, y Síndrome seco (Sjögren)), para el grupo de casos.

Además, para el grupo control se buscaron pacientes en la consulta externa de oftalmología que no acudían por sintomatología de la superficie ocular y no contaran con los siguientes diagnósticos (ojos secos, trastorno de la superficie ocular, Blefaritis con ojo seco, conjuntivitis, queratitis, Artritis reumatoide con ojo seco, y Síndrome seco (Sjögren)).

Se incluyeron pacientes de 20 a 80 años de edad de la consulta externa de oftalmología y pacientes del departamento de córnea del Hospital Civil de Culiacán, que contaran con la capacidad psíquica para colaborar con la investigación, que aprobaran y firmaran el Consentimiento informado, tuvieran disposición para participar en la investigación (anexo 1).

Específicamente para el grupo control que no presentaran clínica de trastorno de la superficie ocular o diagnóstico de ojo seco. Y para el

grupo de casos, que refieran sintomatología sugeriva o diagnóstico de ojo seco en el que descartó otra enfermedad ocular como causa.

Se revisaron y analizaron expedientes clínicos, excluyendo aquéllos pacientes con expedientes incompletos (cuya exploración física no hubiera registrado test de OSDI, altura de menisco lagrimal, TRPL o Schirmer).

Del grupo control, se excluyeron los pacientes en el que expediente presentaran diagnósticos oculares como ojo seco, trastorno de la superficie ocular, conjuntivitis, queratitis, enfermedades sistémicas como Síndrome de Sjögren, Diabetes Mellitus e Hipertensión arterial, así también a los pacientes con clínica de ojo seco.

Del grupo de casos, a pacientes cuyos síntomas se confirmaran fueran causados por otra enfermedad ocular.

Se eliminaron de la investigación a pacientes con expedientes con diagnóstico erróneo, expediente clínico incompleto, pacientes sin la capacidad psíquica para colaborar con la investigación, desaprobaran y no firmaran el Consentimiento Informado o que no tuvieran disposición para participar en la investigación.

Se solicitó autorización para la realización del presente protocolo al departamento de enseñanza y al comité de ética. Se realizó expe-

diente con historia clínica completa y exploración oftalmológica a pacientes con diagnóstico de ojo seco, trastorno de la superficie ocular y Síndrome de Sjögren, se solicitó al departamento de archivo la búsqueda en su base de datos de los expedientes aplicando los criterios de inclusión, exclusión y eliminación. Y la información se concentró en el formato de recolección de datos. Se realizaron pruebas complementarias a ambos grupos: Schirmer tipo I, tiempo de ruptura lagrimal con tinción de fluoresceína, medición de la altura del menisco lagrimal y cuestionario OSDI (anexo 2).

La toma de líquido lagrimal se realizó mediante succión con una pipeta Pasteur de plástico de uso pediátrico estéril, en el extremo temporal del ojo. El contenido recolectado se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL para su almacenamiento a -20°C hasta su posterior procesamiento. La toma de muestra sanguínea se realizó mediante venopunción con una jeringa de 10 ml, y una aguja 22G en la cara anterior del antebrazo. El contenido recolectado se colocó en 2 tubos al vacío para su almacenamiento a 4°C hasta su procesamiento.

Se realizó retro-transcripción (RT), síntesis de cDNA, la lágrima es un fluido con muy bajo contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos que interfieren con las reacciones de RT, por lo que no se procedió a realizar purificación de microRNAs. Los miRNAs presentes en la lágrima fueron convertidos a cDNA mediante el sistema

miScript II RT kit (QIAGEN, Hilden, Germany), el cual, utilizó oligos dT y Hispec buffer para la identificación de miRNAs maduros a partir de una incubación de 37°C durante 60 minutos y 90°C durante 5 minutos. La RT-PCR fué procesada en el equipo StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Reacción en cadena de polimerasa (PCR) tiempo real, el cDNA obtenido se procedió a cuantificar mediante qPCR utilizando el sistema mi Script SYBR Green PCR (QIAGEN, Hiden, Germany), se emplearon los ensayos para el miRNA-146 de Qiagen, Hiden, Germany. Como control constitutivo se utilizó el ensayo del RNA pequeño nucleolar 68 SNORD68 (No. Cat. 00033712).

Se utilizó como control negativo un templado sin cDNA. Las reacciones de qPCR de los miRNAs se realizarán en el termociclador tiempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Aunado a lo anterior, se desarrolló una curva de disociación de melting (Melt Curve) para demostrar la especificidad de la reacción, las cuales, se hicieron por triplicado.

La cuantificación relativa se realizó mediante el método Pfaffl, el cual se basa en las eficiencias de la muestra problema y la muestra control. Para obtener el cálculo de dichas eficiencias, se utilizó el software LinRegPCR, a partir de la fase exponencial de la fluorescencia (Ruijter y cols., 2009). Por último, se realizó una regresión lineal

de al menos 4 puntos de datos, donde la pendiente de la línea de la regresión representó la eficiencia de la PCR (Pfaffl, 2001).

El protocolo fue evaluado y aprobado por parte del Comité de Investigación y por el Comité de Ética e Investigación del Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDI-DOCS) del Hospital Civil de Culiacán para la aprobación y firma de la carta de responsabilidad.

Primero, se comprobaron si los datos obtenidos presentaron una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se calculó la media ± desviación estándar como valor estándar de los datos descriptivos para cada individuo, y para la diferencia de las medias obtenidas se utilizó la T-student y para las medianas la prueba de Mann-whitney. Las diferencias entre los grupos de estudio se calcularon mediante la prueba ANOVA Kruskal-Wallis. Dicho análisis estadístico se realizó en el programa SPSS versión 22, donde los valores de P <0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Los microRNAs, en las últimas dos décadas han sido propuestos como moléculas con potencial para ser utilizadas como biomarcadores. Con la finalidad de evaluar el perfil de expresión de un microRNA, miR-146 (hsa-miR-146), en la

enfermedad de ojo seco, se procedió a realizar experimentos de qRT-PCR. Se utilizaron muestras de lagrima y de suero de pacientes con EOS (enfermedad de ojo seco) y como referencia pacientes control (CTRL) sin problemas oftalmológicos de etiología crónica.

Se seleccionaron 20 pacientes para cada grupo, casos de EOS (1-20) y controles (21-40) que cumplieran con los criterios de inclusión y de exclusión, se registraron las comorbilidades de pacientes con ojo seco; se observa el total de pacientes control sin patologías sistémicas ni oculares negando hipertensión, diabetes, artritis reumatoide o Sx. Sjögren, se verificaron los datos en la historia clínica y se registraron en el expediente electrónico para proceder a las pruebas clínicas.

Al analizar los datos comparativos se tuvo un promedio de edad del grupo de ojo seco de 53.2, y en el control de 52.4 años, siendo similares, lo mismo sucedió en la proporción de femeninos y masculinos, siendo en ambos grupos de 3 femeninos por 1 masculino (3:1), de la misma manera se descarta que el género y la edad impactan en los resultados.

Cuando se analizó la variable clínica OSDI la cual es un test que nos permite clasificar el ojo seco según su sintomatología y establecer la gravedad del mismo, encontramos que efectivamente en el grupo EOS se presentan valores promedio de 55.30, y en tanto, comparado con

el grupo control de 5.415 puntos, esto traducido en un diagnóstico significa que los pacientes con enfermedad de ojo seco tienen un OSDI severo, mientras que los controles tienen un OSDI normal. El test de Schirmer tipo I, es una prueba para determinar la producción suficiente de lágrima para mantener húmeda la superficie ocular en la cual el grupo de casos arrojó un promedio de 5.45mm, mientras que el grupo control uno de 16.55mm, lo cual se traduce en una producción baja de lagrima en el grupo de ojo seco, contrastando al control la cual es normal.

La variable clínica del TRPL (tiempo de ruptura de la película lagrimal) es una medición subjetiva del examinador para la valoración de la calidad de la película lagrimal, se cuantificó en ambos ojos encontrando una media de 2.95 y 2.8 seg (patológico) en el grupo de ojo seco, y de 10.05 y 10.1 (normal) en el grupo control. En cuanto a la altura del menisco lagrimal (AML) es una medición del volumen acuoso en base a la altura mínima del menisco sin especificar si se trata de deficiencia acuosa u ojo seco evaporativo, se aprecia un porcentaje del 55% que presentan un AML menor a 0.1mm en el grupo de ojo seco contrastado con el grupo control el cual presenta un 100% de los pacientes con AML mayor a 0.2mm siendo esto último considerado normal (Tabla 1 y 2).

Con toda esta caracterización clínica se confirmó que los pacientes que habían sido previamente diagnosticados como EOS realmente presentan la patología y se encuentra en una clasificación severa, en tanto que los pacientes control presentan resultados normales del test de OSDI, test de Schirmer I, el tiempo de ruptura lagrimal y la altura del menisco lagrimal, por lo cual una vez caracterizada la población se procedió a analizar el perfil de expresión de RNA, (Tabla 3 y 4).

En la Figura 1, se observa que en lágrima de los pacientes con EOS, se tiene una tasa de sobre-expresión para miR-146 de aproximadamente 2 veces más respecto a los pacientes controles.

En el análisis de muestra de suero, aunque se observa una tendencia similar al perfil de expresión para miR-146 observado en lágrima, no se resultó estadísticamente significativo (Figura 2).

Estos resultados sugieren que el micro RNA miR-146 podría estar implicado en la fisiopatología de Ojo Seco, y que alteraciones en esta molécula se pueden observar en lágrima más no en sangre periférica; lo cual contribuye a sugerirlo como potencial biomarcador para esta patología.

Figura 1. Tabla de dispersión del perfil de expresión del micro RNA hsa-miR-146 en pacientes enfermedad de ojo seco respecto a los pacientes control, en lágrima. Se realizó el análisis del patrón de expresión del hsa-miR-146 a partir 4 μ L de lágrima proveniente de los participantes que conformaron el grupo control (CTRL) y con Enfermedad de Ojo Seco (EOS). La cuantificación fue realizada mediante qRT-PCR y los resultados analizados mediante el método de Pfaffl, se utilizó el SNORD61 como RNA constitutivo para la normalización. Los datos representan la mediana de la tasa de cambio para cada grupo de estudio. $p=0.0155$; * $p<0.05$, prueba U de Mann Whitney.

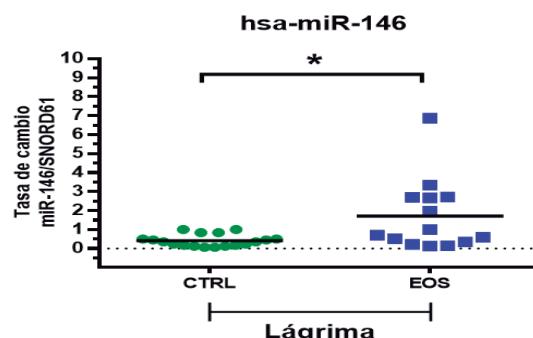


Figura 2. Perfil de expresión del micro RNA hsa-miR-146 en pacientes enfermedad de ojo seco respecto a los pacientes control, en suero. Se realizó el análisis del patrón de expresión del hsa-miR-146 a partir de 200 μ L de suero proveniente de los participantes que conformaron el grupo control (CTRL) y con Enfermedad de Ojo Seco (EOS). La cuantificación fue realizada mediante qRT-PCR y los resultados analizados mediante el método de Pfaffl, se utilizó el SNORD61 como RNA constitutivo para la normalización. Los datos representan la mediana de la tasa de cambio para cada grupo de estudio. $p=0.2526$, prueba U de Mann Whitney.

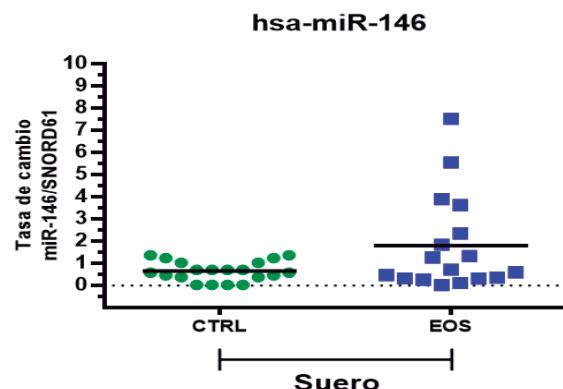


Tabla 1. Datos clínicos de pacientes con EOS. Se indican las variables clínicas test de OSDI, test de Schirmer tipo 1, tiempo de ruptura de película lagrimal (TRPL) y altura del menisco lagrimal (AML).

| DATOS CLÍNICOS | | | | | | |
|----------------|-------------|-----------|-----------------|--------------------|------------|----------|
| CASOS | EDAD (años) | SEXO | TEST OSDI (pts) | TEST SCHIRMER (mm) | TRPL (seg) | AML (mm) |
| EOS-01 | 61 | Femenino | 58.33 | 3 | 0/0 | <0.1 |
| EOS-02 | 74 | Masculino | 43.75 | 3 | 3/3 | <0.1 |
| EOS-03 | 29 | Masculino | 33.33 | 8 | 3/4 | <0.2 |
| EOS-04 | 64 | Femenino | 54.16 | 4 | 3/3 | <0.1 |
| EOS-05 | 63 | Femenino | 41.66 | 4 | 3/4 | <0.2 |
| EOS-06 | 79 | Femenino | 81.25 | 3 | 3/3 | <0.1 |
| EOS-07 | 60 | Masculino | 83.33 | 2 | 1/1 | <0.1 |
| EOS-08 | 58 | Femenino | 50.00 | 4 | 3/3 | <0.2 |
| EOS-09 | 54 | Femenino | 81.25 | 4 | 2/1 | <0.1 |
| EOS-10 | 62 | Femenino | 91.66 | 4 | 1/0 | <0.1 |
| EOS-11 | 57 | Femenino | 68.75 | 4 | 3/2 | <0.1 |
| EOS-12 | 23 | Femenino | 33.33 | 10 | 4/3 | <0.2 |
| EOS-13 | 26 | Femenino | 77.08 | 9 | 3/3 | <0.1 |
| EOS-14 | 61 | Femenino | 33.33 | 4 | 6/5 | <0.2 |
| EOS-15 | 64 | Femenino | 45.83 | 4 | 1/1 | <0.1 |
| EOS-16 | 38 | Femenino | 33.33 | 8 | 3/3 | <0.2 |
| EOS-17 | 59 | Masculino | 54.16 | 9 | 4/4 | <0.2 |
| EOS-18 | 56 | Masculino | 35.41 | 8 | 6/6 | <0.2 |
| EOS-19 | 49 | Femenino | 68.75 | 4 | 1/0 | <0.1 |
| EOS-20 | 27 | Masculino | 37.50 | 10 | 6/7 | <0.2 |
| MEDIA | 53.2 | 3.1 | 55.30 | 5.45 | 2.95/2.8 | 55%/45% |

Tabla 2. Datos clínicos de pacientes control (CTRL) sin problemas oftalmológicos de etiología crónica. Se indican las variables clínicas test de OSDI, test de Schirmer tipo 1, tiempo de ruptura de película lagrimal (TRPL) y altura del menisco lagrimal (AML).

| DATOS CLÍNICOS | | | | | | |
|----------------|-------------|-----------|-----------------|--------------------|------------|----------|
| CASOS | EDAD (años) | SEXO | TEST OSDI (pts) | TEST SCHIRMER (mm) | TRPL (seg) | AML (mm) |
| CTRL-21 | 61 | Femenino | 0 | 17 | 9/10 | >0.2 |
| CTRL -22 | 74 | Masculino | 4.16 | 17 | 10/10 | >0.2 |
| CTRL -23 | 29 | Masculino | 4.16 | 16 | 9/10 | >0.2 |
| CTRL -24 | 64 | Femenino | 6.25 | 16 | 11/10 | >0.2 |
| CTRL -25 | 63 | Femenino | 0 | 18 | 10/9 | >0.2 |
| CTRL -26 | 79 | Femenino | 6.25 | 16 | 10/11 | >0.2 |
| CTRL -27 | 60 | Masculino | 0 | 17 | 9/11 | >0.2 |
| CTRL -28 | 58 | Femenino | 0 | 17 | 10/10 | >0.2 |
| CTRL -29 | 54 | Femenino | 4.16 | 16 | 10/11 | >0.2 |
| CTRL -30 | 62 | Femenino | 8.33 | 16 | 10/10 | >0.2 |
| CTRL -31 | 57 | Femenino | 6.25 | 17 | 10/9 | >0.2 |
| CTRL -32 | 23 | Femenino | 12.5 | 16 | 10/9 | >0.2 |
| CTRL -33 | 26 | Femenino | 6.25 | 17 | 11/10 | >0.2 |
| CTRL -34 | 61 | Femenino | 8.33 | 15 | 11/11 | >0.2 |
| CTRL -35 | 64 | Femenino | 2.08 | 17 | 10/12 | >0.2 |
| CTRL -36 | 38 | Femenino | 0 | 17 | 10/9 | >0.2 |
| CTRL -37 | 59 | Masculino | 12.5 | 16 | 10/9 | >0.2 |
| CTRL -38 | 56 | Masculino | 8.33 | 16 | 10/11 | >0.2 |
| CTRL -39 | 49 | Femenino | 6.25 | 17 | 10/10 | >0.2 |
| CTRL -40 | 27 | Masculino | 12.5 | 17 | 11/10 | >0.2 |
| MEDIA | 52.4 | 3.1 | 5.415 | 16.55 | 10.05/10.1 | 100% |

Tabla 3. Cuantificación de la expresión de micro RNAs (hsa-miR-146) en lagrima de pacientes con EOS y como referencia pacientes control (CTRL) sin problemas oftalmológicos de etiología crónica. Se indica la mediana de tasa de cambio para cada micro RNA medido en este estudio, su desviación estándar (DE) y significancia estadística (valor p).

| REGISTRO | EDAD | SEXO | miR-146 |
|---------------------|---------|-----------|---------|
| EOS-01 | 61 años | Femenino | 1.00 |
| EOS-02 | 74 años | Masculino | 6.86 |
| EOS-03 | 29 años | Masculino | 0.52 |
| EOS-04 | 64 años | Femenino | 0.21 |
| EOS-05 | 63 años | Femenino | 2.70 |
| EOS-06 | 79 años | Femenino | 2.67 |
| EOS-07 | 60 años | Masculino | ND |
| EOS-08 | 58 años | Femenino | 0.59 |
| EOS-09 | 54 años | Femenino | 0.13 |
| EOS-10 | 62 años | Femenino | ND |
| EOS-11 | 57 años | Femenino | 0.70 |
| EOS-12 | 23 años | Femenino | 0.34 |
| EOS-13 | 26 años | Femenino | 1.97 |
| EOS-14 | 61 años | Femenino | 2.71 |
| EOS-15 | 64 años | Femenino | 3.34 |
| EOS-16 | 38 años | Femenino | ND |
| EOS-17 | 59 años | Masculino | ND |
| EOS-18 | 56 años | Masculino | ND |
| EOS-19 | 49 años | Femenino | ND |
| EOS-20 | 27 años | Masculino | 0.14 |
| TASA DE CAMBIO | | | 1.706 |
| DESVIACIÓN ESTANDAR | | | 1.869 |
| VALOR P | | | 0.0155 |
| | | | |
| EOS -21 | 56 años | Masculino | ND |
| EOS -22 | 62 años | Femenino | ND |
| EOS -23 | 23 años | Femenino | 0.45 |
| EOS -24 | 24 años | Femenino | 1.00 |
| EOS -25 | 29 años | Masculino | ND |
| EOS -26 | 27 años | Masculino | 0.23 |
| EOS -27 | 38 años | Femenino | 0.50 |
| EOS -28 | 56 años | Femenino | ND |
| EOS -29 | 60 años | Femenino | ND |
| EOS -30 | 63 años | Femenino | 0.12 |
| EOS -31 | 70 años | Femenino | 0.84 |
| EOS -32 | 64 años | Femenino | ND |
| EOS -33 | 78 años | Femenino | ND |
| EOS -34 | 58 años | Masculino | 0.17 |
| EOS -35 | 54 años | Femenino | 0.35 |
| EOS -36 | 57 años | Femenino | ND |
| EOS -37 | 60 años | Femenino | ND |
| EOS -38 | 59 años | Masculino | ND |
| EOS -39 | 63 años | Femenino | ND |
| EOS -40 | 49 años | Femenino | ND |
| TASA DE CAMBIO | | | 0.4144 |
| DESVIACIÓN ESTANDAR | | | 0.3136 |

Tabla 4. Cuantificación de la expresión de micro RNAs (hsa-miR-146) en suero de pacientes con EOS y como referencia pacientes control (CTRL) sin problemas oftalmológicos de etiología crónica. Se indica la mediana de tasa de cambio para cada micro RNA medido en este estudio, su desviación estándar (DE) y significancia estadística (valor p), no detectado (ND).

| REGISTRO | EDAD (años) | SEXO | miR-146 |
|---------------------|-------------|-----------|---------|
| EOS-01 | 61 | Femenino | 0.72 |
| EOS-02 | 74 | Masculino | 0.27 |
| EOS-03 | 29 | Masculino | 1.33 |
| EOS-04 | 64 | Femenino | 3.90 |
| EOS-05 | 63 | Femenino | 1.84 |
| EOS-06 | 79 | Femenino | 0.47 |
| EOS-07 | 60 | Masculino | ND |
| EOS-08 | 58 | Femenino | ND |
| EOS-09 | 54 | Femenino | 3.63 |
| EOS-10 | 62 | Femenino | ND |
| EOS-11 | 57 | Femenino | 0.14 |
| EOS-12 | 23 | Femenino | 0.32 |
| EOS-13 | 26 | Femenino | 0.60 |
| EOS-14 | 61 | Femenino | 0.31 |
| EOS-15 | 64 | Femenino | 2.35 |
| EOS-16 | 38 | Femenino | 0.11 |
| EOS-17 | 59 | Masculino | 5.55 |
| EOS-18 | 56 | Masculino | 1.27 |
| EOS-19 | 49 | Femenino | 7.52 |
| EOS-20 | 27 | Masculino | 036 |
| TASA DE CAMBIO | | | 1.798 |
| DESVIACIÓN ESTANDAR | | | 2.159 |
| VALOR P | | | 0.2526 |
| | | | |
| CTRL-21 | 56 años | Masculino | ND |
| CTRL-22 | 62 años | Femenino | 0.71 |
| CTRL-23 | 23 años | Femenino | 1.37 |
| CTRL-24 | 24 años | Femenino | 0.71 |
| CTRL-25 | 29 años | Masculino | 1.03 |
| CTRL-26 | 27 años | Masculino | 1.24 |
| CTRL-27 | 38 años | Femenino | ND |
| CTRL-28 | 56 años | Femenino | 0.38 |
| CTRL-29 | 60 años | Femenino | 0.58 |
| CTRL-30 | 63 años | Femenino | ND |
| CTRL-31 | 70 años | Femenino | ND |
| CTRL-32 | 64 años | Femenino | ND |
| CTRL-33 | 78 años | Femenino | ND |
| CTRL-34 | 58 años | Masculino | 0.46 |
| CTRL-35 | 54 años | Femenino | ND |
| CTRL-36 | 57 años | Femenino | ND |
| CTRL-37 | 60 años | Femenino | ND |
| CTRL-38 | 59 años | Masculino | 2.01 |
| CTRL-39 | 63 años | Femenino | ND |
| CTRL-40 | 49 años | Femenino | 1.93 |
| TASA DE CAMBIO | | | 0.6540 |
| DESVIACIÓN ESTANDAR | | | 0.4447 |

DISCUSIÓN

El ojo seco es una patología con alta prevalencia en la actualidad, dada la gran mayoría de actividades laborales, recreativas y sociales de nuestra población, aunado a eso, el conocimiento de la enfermedad por parte de las personas afectadas permite que el diagnóstico sea aún más prevalente dada la fácil accesibilidad a la atención oftalmológica en la actualidad.¹¹

Acerca de la frecuencia del ojo seco, en nuestro medio, esta es una patología bastante común, de acuerdo con la distribución en ambos grupos por sexo, edad y patología de base, no hubo diferencias respecto a la literatura ya reportada, siendo el sexo femenino el más común en presentar ojo seco, dadas las patologías de base a las que suele asociarse y los factores endocrinológicos a los que suele estar ligada la patología.^{12,13} Así mismo la frecuencia de edad, parece concordar con la ya reportada en la literatura mundial, ya que nuestro universo mostró una prevalencia mayor en el grupo etario de los 50 a los 69 años, esto ligado probablemente los cambios hormonales fisiológicos relacionados con la menopausia.²

El grado de ojo seco más prevalente en nuestro estudio fue el de tipo severo esto de acuerdo al cuestionario OSDI, probablemente debido a las características climatológicas y laborales de la mayoría de las personas en nuestro medio, ya que las altas temperaturas locales obligan a la mayoría de la población a laborar bajo sistemas

de climatización, lo cual favorece en parte la aparición de la patología en estudio.

A la fecha, son pocos o nulos los reportes que traten de demostrar una asociación directa o parcial entre la presencia del Micro RNA y la aparición de ojo seco, esto podría ser explicado por varias razones tales como la gran variabilidad de la patología de acuerdo a las características climatológicas de cada región, la poca información disponible respecto al tema y el difícil acceso a este tipo de pruebas en ciertas regiones. En nuestro estudio, se trató de demostrar la asociación entre el micro ARN 146 y el diagnóstico de ojo seco, por medio de métodos de PCR, sin embargo, en muestra de suero no hubo una asociación estadísticamente significativa, además la presencia o no de dicho ARN no mostró asociación entre la gravedad del ojo seco en nuestro estudio. La tasa de ARN mostrado en nuestra población fue muy variable, aunque el sexo femenino lo mostró con más prevalencia aunque no fue estadísticamente significativa, a su vez hubo gran cantidad de pacientes que no mostraron dicho ARN, aún con diagnóstico de ojo seco.

Nuestro universo poblacional respecto a casos y controles estuvo compuesto por más personas de sexo femenino, con promedio de edad de 52 años, lo cual concuerda con todo lo establecido a la fecha respecto a la patología en estudios previos,⁵ respecto al test de OSDI y Schirmer, los puntajes más altos fueron presen-

tados de igual manera en sujetos de género femenino, concordando además con el tiempo de ruptura de la película lagimal, observándose esta más corta en pacientes con OSDI más altos. Lo cual nos ayuda a concluir que nuestro universo poblacional de casos fue una muestra representativa de la patología, de igual manera este grupo presentó una prueba de Schirmer insuficiente.

Cabe señalar además que los pacientes del grupo poblacional de casos posé una variable cantidad de patologías de base asociadas, que probablemente podrían influir de manera sustancial en los resultados de las pruebas, siendo así 7 del total de estos pacientes presentaban patologías como Diabetes, Hipertensión arterial, hipotiroidismo y enfermedades autoinmunes tales como Lupus eritematoso y uno de ellos asociado a espondilitis anquilosante, además 8 de ellos contaban ya con diagnóstico de síndrome de Sjögren caso contrario a lo observado en nuestro universo de controles. Lo cual concuerda además con la literatura publicada hasta la fecha.^{8,14,15}

Respecto a la expresión de micro RNA en muestras de lágrima, del universo de casos y controles un total de 18 sujetos, 6 de casos y 12 de controles no expresó micro RNA en las muestras tomadas. 14 sujetos del total de casos expresaron micro RNA presentando una media de 1.705 con una desviación standard de 1.869 ($p= 0.0155$). En el grupo de controles, 8 sujetos

del total, expresaron dicho RNA, con una media de 0.4575 y una desviación standard de 0.3136. Respecto a la expresión de micro ARN en muestras tomadas de suero, del universo de casos y controles, un total de 13 sujetos no expresaron dicho ARN en muestras, 3 de los casos y 10 de los controles. 17 sujetos del total de casos expresaron micro ARN con una media de 1.805 con una desviación standard de 2.159 ($p= 0.2526$). En el grupo de controles, 10 sujetos expresaron micro ARN con una media de 0.947 y una desviación estándar de 0.4447.

Como fue previamente aclarado, en este estudio se trató de demostrar la asociación de dicha enfermedad con la presencia o no del micro RNA 146-a, no encontrando una asociación del mismo en el suero pero si en lagrima, esto pudiendo ser explicado por la alta variabilidad de la prevalencia dadas las características previamente comentadas, así como la gran asociación a patologías de base que pueden ser encontradas en pacientes con ojo seco. Dada la carencia de estudios previos con mismos o similares objetivos, es difícil comparar los resultados obtenidos con los resultados de algún otro investigador.

De acuerdo con lo señalado y los resultados demostrados en estudios previos, el ojo seco es una enfermedad multifactorial que afecta con mayor frecuencia la población femenina y aumenta el riesgo con la edad, se encuentra asociada a enfermedades de etiología autoinmune

como Síndrome de Sjögren y Artritis reumatoide.

El objetivo principal de nuestro estudio fue demostrar la asociación entre la expresión del micro ARN 146-a y el desarrollo de la enfermedad de ojo seco, una asociación que hasta el momento no había sido estudiada en lagrima. Existe poca bibliografía disponible respecto al tema, lo cual lo torna un campo amplio y blanco de investigación, haciendo de esta manera que la información obtenida hasta la fecha no sea concluyente o definitiva.

CONCLUSIÓN

En base a la información obtenida durante nuestro estudio podemos concluir que la sobreexpresión del micro ARN 146-a en lágrima pudiese representar un marcador indicativo de aparición o desarrollo de la enfermedad de ojo seco ($p= 0.0155$), más no su expresión en suero ($p= 0.2526$) al no ser estadísticamente significativa.

Por lo que no se descarta que este micro RNA podría ser utilizado como biomarcador en enfermedades inflamatorias, por ejemplo, la enfermedad de ojo seco de etiología autoinmune.

Se necesitarían más estudios con universos más extensos para poder demostrar la causa de la ausencia de asociación en suero, la cual se pudiera deber a las características bioquímicas para su cuantificación y no con la ausencia del desarrollo de dicha enfermedad.

REFERENCIAS

1. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II definition and classification report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):276-83.
2. Yasir ZH, Chauhan D, Khardekar R, Souru C, Varghese S. Prevalence and determinants of dry eye disease among 40 years and older population of Riyadh, Saudi Arabia. *Mid Eas Afr J Opht.* 2019;26(1):27–32.
3. Tsubota K, Yokoi N, Shimazaki J, Watanabe H, Dogru M, Yamada M, et al.; Asia Dry Eye Society. New perspectives on dry eye definition and diagnosis: a consensus report of the Asia Dry Eye Society. *Ocul Surf.* 2017;15(1):65–76.
4. Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, et al. TFOS DEWS II management and therapy report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575–628.
5. Obaid A, Mohammed B, Ahmedfouad S, Aloataibi A, Yousuf B, Nezar M, et al. Etiology, prevalence, risk factors, and treatment of dry eye disease. *IJMDC.* 2020;4(1):137-142.
6. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 431:350-5.
7. Li L, Chen XP, Li YJ. MicroRNA-146a and human disease. *Scand J Immunol.* 2010;71(4):227-31.
8. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4): R101.

9. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1284-92.
10. Wei Y, Li N, Zhao L, Yang C, Ma B, Li X, et al. MicroRNAs and Autoimmune-Mediated Eye Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; (8):818.
11. Ellwein LB, Urato CJ. Use of eye care and associated charges among the Medicare population: 1991-1998. *Arch Ophthalmol.* 2002;120(6):804-11.
12. Janine AS. The epidemiology of dry eye disease: report of the epidemiological subcommittee of the international dry eye workshop. *Ocul Surf.* 2007;5(2):93-107.
13. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophtalmol.* 2003;136(2):318-26.
14. Bron AJ, Tomlinson A, Foulks GN, Pepose JS, Baudouin C, Geerling G, et al. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul Surf.* 2014;12(2): S1-31.
15. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(4):1922-9.