

Etiología Autoinmune de ojo seco en pacientes con Síndrome de Sjögren.

Autoimmune Etiology of Dry Eye in Patients with Sjögren's Syndrome.

Paulina A. Aragón-Arreola^{*1}, Jesús R. Álvarez-Félix², Carla E. Angulo-Rojo³, Efraín Romo-García⁴

1. Residente tercer año, servicio de Oftalmología, Hospital Civil de Culiacán, Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud
2. Cirujano Oftalmólogo adscrito al departamento de Córnea, servicio de Oftalmología, Hospital Civil de Culiacán, Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud.
3. Doctora en Ciencias con especialidad en Biomedicina molecular adscrita al Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Sinaloa.
4. Jefe de servicio de Oftalmología y departamento de Retina y Vítreo Hospital Civil de Culiacán, Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud.

***Autor de correspondencia:** Dra. Paulina Aurora Aragón Arreola
Eustaquio Buelna No.91 Col. Gabriel Leyva. C.P. 80030. Culiacán Sinaloa,
Tel. (667) 7135984, Cel. (667) 1182821 Correo: pau.aragon@hotmail.com

DOI <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v11.n4.006>

Recibido 08 de febrero 2021, aceptado 16 de julio 2021

RESUMEN

El ojo seco es una patología multifactorial dada por diversos mecanismos fisiopatológicos según sea el padecimiento del paciente. Patologías inflamatorias como el Síndrome de Sjögren es una exocrinopatía dada por aumento de mediadores proinflamatorios. Los microRNA (miRNA) son biomoléculas compuestas por nucleótidos de 25 a 30 pares de bases están implicados en la regulación de estos mediadores proinflamatorios. **El objetivo** de este trabajo es caracterizar el perfil de expresión de biomoléculas miRNAs 155 y 181 en de pacientes con Sjögren primario y secundario como marcadores de etiología autoinmune en quienes presenten ojo seco. Estudios previos han realizado esta medición para el miRNA 155 en saliva, plasma y para el 181 solo en plasma. Por lo que su medición en lágrima no se ha realizado en ningún estudio que haya sido publicado. Este estudio se llevó a cabo en el servicio de oftalmología con pacientes subsecuentes de la consulta de córnea. En total se incluyeron 40 pacientes divididos en 20 pacientes con enfermedad de ojo seco (EOS) incluyendo a 8 pacientes con Síndrome de Sjögren primario y secundario y 20 pacientes sanos (CTRL) pareados por misma edad y sexo. Se analizaron muestras de plasma y lágrima por PCR de cada uno de los pacientes encontrando una sobreexpresión significativa en el miR-155 en lágrima para los pacientes con EOS. Para el miRNA 181 no se encontró la misma sensibilidad por lo que se sugiere un tamaño muestral mayor.

Palabras clave: Sjögren, microRNA, lágrima.

ABSTRACT

Dry eye is a multifactorial pathology caused by various pathophysiological mechanisms depending on the patient's condition. Inflammatory pathologies such as Sjögren's Syndrome is an exocrinopathy caused by an increase in pro-inflammatory mediators. MicroRNAs (miRNAs) are biomolecules composed of nucleotides of 25 to 30 base pairs that are involved in the regulation of these pro-inflammatory mediators. The objective of this work is to characterize the expression profile of miRNAs 155 and 181 biomolecules in patients with primary and secondary Sjögren Syndrome as autoimmune etiology markers in those with dry eye. Previous studies have made this measurement for miRNA 155 in saliva, plasma and for 181 only in plasma. Therefore, its measurement in tears has not been carried out in any study that has been published. This study was carried out in the ophthalmology service with subsequent patients from the corneal consultation. In total, 40 patients were included, divided into 20 patients with dry eye disease (EOS), including 8 patients with primary and secondary Sjögren's syndrome and 20 healthy patients (CTRL) matched by the same age and sex. Plasma and tear samples were analyzed by PCR from each of the patients, finding a significant overexpression of miR-155 in tears for patients with EOS. For miRNA 181 the same sensitivity was not found, therefore a larger sample size is suggested.

Key words: Sjögren, microRNA, tears.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Sjögren se trata de una enfermedad autoinmune con gran importancia actual. Henrik Sjögren utilizó el término de “síndrome seco” para describir a las enfermedades

que estuvo estudiando al largo de su vida.¹ Es una exocrinopatía crónica, por pérdida de la tolerancia central con datos de inflamación epitelial y atrofia acinar gracias a infiltrados celulares predominantemente linfocíticos en glándulas

exocrinas y tejidos extra glandulares traduciendo clínicamente en xeroftalmia y xerostomía.²

El impacto del ojo seco en la calidad de vida diaria de los pacientes radica en: la irritación ocular que genera dolor y sensación de cuerpo extraño, impacto en la función visual y por último el bienestar personal.³

Los pocos parámetros que podemos utilizar en la práctica clínica son el tiempo de la ruptura de la película lagrimal la cual se estima un tiempo óptimo de 10 segundos para ésta⁴, así como pruebas sencillas como el test de Schirmer y OSDI. donde podemos clasificar en leve, moderado y severo según sean los signos y síntomas referidos por el paciente.

La fisiopatología está dada por la infiltración de los linfocitos T a las glándulas lagrimales y salivales, causando la apoptosis de los acinos y los conductos, además de un fenómeno de hiposecreción de saliva y lágrimas. Estos fenómenos conllevan a la activación de las vías de inflamación en las glándulas lagrimales en donde se expresan auto antígenos de superficie sobre todo Ro y La, aumento en aparición de linfocitos T CD4 y CD8.⁵

Recientemente se ha estado estudiando la presencia de microRNA's (miRNAs). Estas son moléculas de RNA no codificante compuestas de 18 a 23 pares de bases los cuales son encargados de regular procesos biológicos según sea su expresión genética.⁶ En el caso de pacientes

con síndrome de Sjögren estos miRNAs derivados de células epiteliales y de monocitos, se encuentran en tejidos periféricos diana como la glándula lagrimal, glándula salival por mencionar las principales afectaciones glandulares. Algunos de los más encontrados son miR -155,⁷ miR -181a, miR 19a, miR -20a, miR-19b-1 y miR-92a-1⁸ incluso se han estudiado como marcadores de respuesta terapéutica.⁹

Los principales que han sido estudiados en plasma son el miR-151 y miR-181^{10,11}. También se han encontrado los miR-223-5p, miR-150-5p, y miR-342-3 implicados en patología inflamatoria.¹² Existe solamente una descripción previa en la literatura donde se han medido la expresión de miR155 en lágrima, siendo significativo su nivel de expresión comparado con saliva y plasma.¹³ La ventaja de estas biomoléculas es que han podido ser determinadas mediante la técnica de PCR¹⁴. Y al ser la lágrima un fluido bajo en contenido de hidratos de carbono, proteínas y lípidos no necesita ser sometido a purificación. Del miR-155 se ha aislado también en pacientes con patologías inflamatorias como Artritis Reumatoide¹⁵ y Lupus¹⁶ en saliva y plasma.

MATERIALES Y METODOS

Se trata de un estudio descriptivo, transversal, prospectivo y observacional en pacientes que cuenten con diagnóstico de Síndrome de

Sjögren primario y secundario, así como en pacientes sin presencia de enfermedad que muestren síntomas de ojo seco como sensación de cuerpo extraño, ardor, hiperemia conjuntival, y que no presenten patología autoinmune, ya sea que tengan disfunción glandular por edad o enfermedad infecciosa de párpado y anexos como blefaritis. Se incluyeron un total de 40 pacientes que acudieron a consulta de oftalmología de primera vez y subsecuentes de la subespecialidad de córnea del Hospital Civil de Culiacán que contaban con diagnóstico de Síndrome de Sjögren primario y secundario de enero del 2020 a diciembre del 2020.

Los criterios de inclusión fueron: Pacientes mayores de 50 años, ambos sexos, diagnóstico serológico de Síndrome de Sjögren primario y secundario (Presencia de anticuerpos ANA >1:320, Factor Reumatoide, Anti-Ro/La, péptido citrulinado cíclico, HLAB27), pacientes con síntomas de ojo seco en ausencia de enfermedad autoinmune, que aceptaran y firmaran consentimientos informados.

Los criterios de exclusión fueron: menores de 50 años, antecedente de cirugías oculares previas, diagnóstico de glaucoma, disfunción de glándulas de meibomio, procesos infecciosos como conjuntivitis y blefaritis.

Se eliminaron a todos los pacientes que no hayan cumplido con expediente completo, así

como aquellos que no hayan firmado consentimiento informado.

Se incluyeron a un total de 20 pacientes para el grupo de ojo seco (EOS) incluyendo a 8 pacientes con diagnóstico serológico de Síndrome de Sjögren primario y secundario (14 mujeres y 6 hombres) con una media de edad de 53.2 y 20 pacientes para el grupo sin enfermedad de ojo seco (CTRL) un total de 14 mujeres y 6 hombres con una media de edad de 52.2. Ambos grupos pareados por edad y sexo. A todos se les realizó interrogatorio e historia clínica completa, test de Schirmer, TRPL, test de OSDI (Tabla 1).

Tabla 1. Media de resultados de las variables obtenidas entre pacientes del grupo EOS, control y SJ.

	EOS		CONTROLES		SJ	
Schirmer	5.7		15.95		4.62	
OSDI	27.55		3.8		32.5	
TRP	OD	OI	OD	OI	OD	OI
	2.9	2.8	8.45	8.21	2.6	2.3
Menisco lagrimal	<0.1		>0.2		<0.1	

Posteriormente se procedió a la toma de muestra de lágrima con tubos de Eppendorf de 1.5 ml, toma de muestra de plasma con jeringa de 10 ml en dos tubos de ensayo para posteriormente ser procesados en el laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Uni-

versidad Autónoma de Sinaloa. Para la realización de PCR se realizó el proceso de retrotranscripción para obtener DNA complementario (cDNA) y ser analizado por el dispositivo StepOne Plus. La cuantificación relativa se realizará mediante el método Pfaffl¹⁷, el cual se basará en las eficiencias de la muestra problema y la muestra control (SNORD61).

RESULTADOS

Se observó una sobreexpresión en lágrima para el miR-155 (figura 1) con una tasa de cambio aproximadamente 1.5 veces más respecto a los pacientes CTRL ($p=0.0310$), en el análisis de muestra de suero (Figura 2), aunque se observa una tendencia similar al perfil de expresión para miR-155 observado en lágrima, no se resultó estadísticamente significativo ($p=0.7130$), los valores obtenidos con tasa de cambio, desviación estándar y valores de p para miR-155 se resumen en la tabla 2. Estos resultados sugieren que el miR-155 podría estar implicado en la fisiopatología de Ojo Seco. No siendo así para el miR-181 en lágrima (figura 3) y plasma (figura 4) los cuales ambos valores de p no fueron estadísticamente significativos (tabla 3).

Al analizar de formas individual el miRNA 155 en los pacientes con diagnóstico de Síndrome de Sjögren encontramos que al compararse con el grupo control tanto en lágrima como en sangre, no muestran resultados estadísticamente

significativos. Esto puede deberse por el bajo número de la muestra.

Figura 1. Perfil de expresión del microRNA hsa-miR-155 en pacientes enfermedad de ojo seco respecto a los pacientes control, en lágrima.

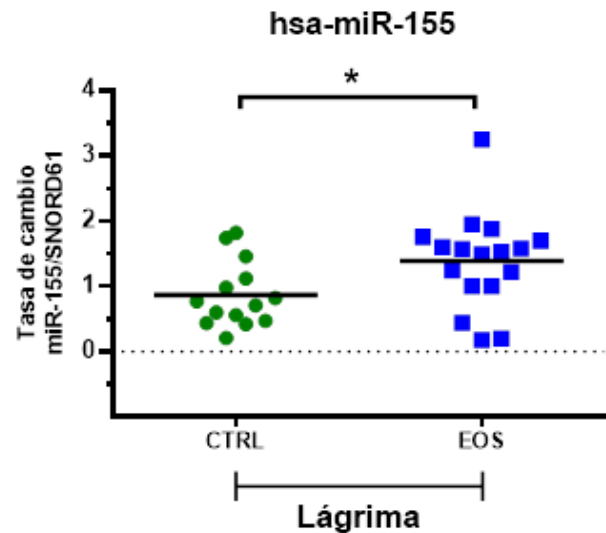


Figura 2. Perfil de expresión del microRNA hsa-miR-155 en pacientes enfermedad de ojo seco respecto a los pacientes control, en suero.

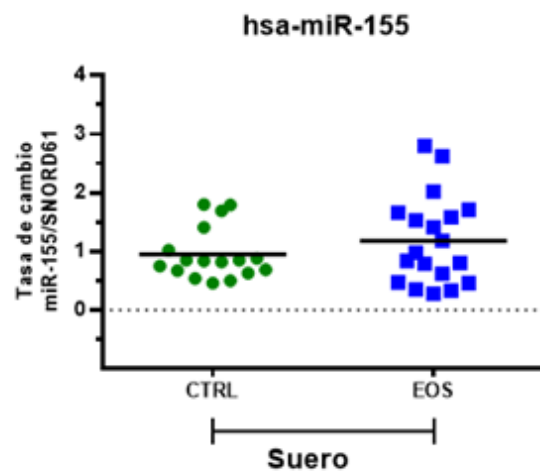


Figura 3. Perfil de expresión del microRNA hsa-miR-181a en pacientes enfermedad de ojo seco respecto a los pacientes control, en lágrima.

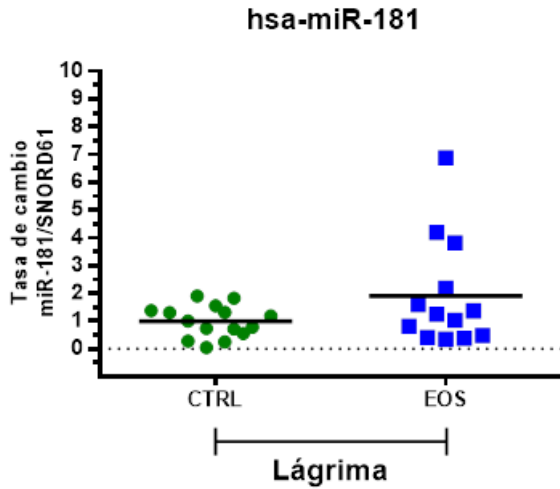


Figura 4. Perfil de expresión del microRNA hsa-miR-181a en pacientes enfermedad de ojo seco respecto a los pacientes control, en suero.

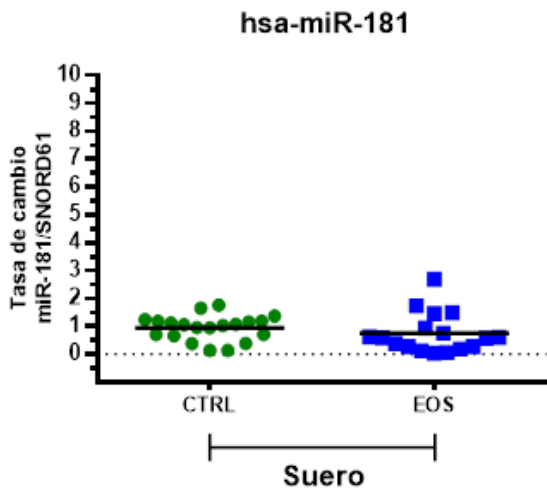


Tabla 2. Cuantificación de la expresión de microRNAs (hsa-miR-155 y hsa-miR-181) en lagrima de pacientes con EOS y como referencia pacientes control (CTRL) sin problemas oftalmológicos de etiología crónica. Se indica la mediana de tasa de cambio para cada microRNA medido en este estudio, su desviacion estandar (SD) y significancia estadística (P valor).

EXPRESIÓN DE microRNAs EN LÁGRIMA				
REGISTRO	EDAD	GENERO	miR-155	miR-181
EOS-12	23 años	Femenino	1.88	0.48
EOS-13	26 años	Femenino	1.58	3.81
EOS-20	27 años	Masculino	1.70	4.19
EOS-03	29 años	Masculino	0.44	0.20
EOS-16	38 años	Femenino	1.24	0.34
EOS-19	49 años	Femenino	ND	ND
EOS-09/SJ-03	54 años	Femenino	1.57	0.38
EOS-18	56 años	Masculino	1.76	6.88
EOS-11/SJ-08	57 años	Femenino	0.18	0.81
EOS-08 /SJ-02	58 años	Femenino	1.22	1.37
EOS-17	59 años	Masculino	ND	ND
EOS-07/SJ-01	60 años	Masculino	0.20	0.12
EOS-01	61 años	Femenino	1.00	0.13
EOS-14	61 años	Femenino	1.53	0.41
EOS-10/SJ-04	62 años	Femenino	ND	ND
EOS-05 /SJ-05	63 años	Femenino	1.00	ND
EOS-04	64 años	Femenino	1.95	1.24
EOS-15	64 años	Femenino	1.49	1.60
EOS-02/SJ-07	74 años	Masculino	1.60	1.03
EOS-06/SJ-06	79 años	Femenino	3.25	2.18
TASA DE CAMBIO			1.388	1.902
DESVIACIÓN ESTANDAR			0.730	1.947
VALOR P			0.0310	0.3133
EOS-23	23 años	Femenino	0.82	0.78
EOS-24	24 años	Femenino	0.44	1.31
EOS-26	27 años	Masculino	3.47	1.55
EOS-25	29 años	Masculino	2.65	1.00
EOS-27	38 años	Femenino	0.56	ND
EOS-40	49 años	Femenino	ND	ND
EOS-35	54 años	Femenino	0.77	0.28
EOS-21	56 años	Masculino	0.60	1.38
EOS-36	57 años	Femenino	1.12	1.18
EOS-28	56 años	Femenino	ND	ND
EOS-38	60 años	Masculino	1.82	0.74
EOS-34	58 años	Masculino	1.74	1.90
EOS-29	60 años	Femenino	ND	ND
EOS-22	62 años	Femenino	0.71	ND
EOS-30	63 años	Femenino	1.46	1.83
EOS-39	63 años	Femenino	0.21	0.25
EOS-37	60 años	Femenino	ND	ND
EOS-32	64 años	Femenino	0.42	0.72
EOS-31	70 años	Masculino	0.98	1.30
EOS-33	78 años	Femenino	0.47	0.55
TASA DE CAMBIO			0.8657	0.9880
DESVIACIÓN ESTANDAR			0.5017	0.5696
VALOR P			NA	NA

Tabla 3. Cuantificación de la expresión de microRNAs (hsa-miR-155 y hsa-miR-181) en suero de pacientes con EOS y como referencia pacientes control (CTRL) sin problemas oftalmológicos de etiología crónica

EXPRESION DE microRNAs EN SUERO				
REGISTRO	EDAD	GENERO	miR-155	miR-181
EOS-12	23 años	Femenino	0.33	0.27
EOS-13	26 años	Femenino	0.46	0.75
EOS-20	27 años	Masculino	1.71	1.49
EOS-03	29 años	Masculino	0.47	0.94
EOS-16	38 años	Femenino	0.80	0.59
EOS-19	49 años	Femenino	2.62	2.69
EOS-09/SJ-03	54 años	Femenino	1.66	0.62
EOS-18	56 años	Masculino	0.98	0.60
EOS-11/SJ-08	57 años	Femenino	0.62	0.28
EOS-08/SJ-02	58 años	Femenino	1.58	0.19
EOS-17	59 años	Masculino	2.02	1.46
EOS-07/SJ-01	60 años	Masculino	0.35	0.13
EOS-01	61 años	Femenino	1.18	ND
EOS-14	61 años	Femenino	1.41	ND
EOS-10/SJ-04	62 años	Femenino	ND	ND
EOS-05/SJ-05	63 años	Femenino	2.80	0.39
EOS-04	64 años	Femenino	0.84	ND
EOS-15	64 años	Femenino	0.28	0.57
EOS-02/SJ-07	74 años	Masculino	1.53	0.12
EOS-06/SJ-06	79 años	Femenino	0.79	1.73
TASA DE CAMBIO			1.181	0.7518
DESVIACIÓN ESTANDAR			0.7550	0.7157
VALOR P			0.7130	0.0924
EOS-23	23 años	Femenino	0.54	1.06
EOS-24	24 años	Femenino	ND	ND
EOS-26	27 años	Masculino	0.88	1.16
EOS-25	29 años	Masculino	0.63	ND
EOS-27	38 años	Femenino	0.69	0.38
EOS-40	49 años	Femenino	1.45	1.18
EOS-35	54 años	Femenino	0.75	0.14
EOS-21	56 años	Masculino	1.91	ND
EOS-36	57 años	Femenino	0.46	0.14
EOS-28	56 años	Femenino	1.02	0.66
EOS-38	60 años	Masculino	1.80	1.76
EOS-34	58 años	Masculino	1.79	0.95
EOS-29	60 años	Femenino	0.85	1.12
EOS-22	62 años	Femenino	0.85	ND
EOS-30	63 años	Femenino	0.67	1.65
EOS-39	63 años	Femenino	0.84	1.18
EOS-37	60 años	Femenino	0.50	0.96
EOS-32	64 años	Femenino	0.82	ND
EOS-31	70 años	Masculino	1.69	1.07
EOS-33	78 años	Femenino	ND	ND
TASA DE CAMBIO			0.9524	0.9430
DESVIACIÓN ESTANDAR			0.4434	0.4453
VALOR P			NA	NA

De la misma manera para el miRNA 181a, al comparar sus resultados con el grupo con enfermedad de ojo seco (EOS) con el grupo con-

rol, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. De forma particular se cree que este miRNA tenga poca sensibilidad por lo que se sugieren estudios futuros con mayor tamaño muestral.

En cuanto a los resultados en el grupo control, no se pudieron medir expresión de estos miRNA posiblemente a la hipótesis planteada, en la que se determina que el hecho de padecer una patología inflamatoria dictamina el perfil de expresión de estos miRNA en población enferma respecto a la sana, es por eso que no se pudo someter a las mismas determinaciones con respecto al grupo de EOS y pacientes con Sjögren así como fue imposible determinar tasa de cambio y valores de p.

DISCUSIÓN

En conclusión, encontramos que la expresión del miRNA 155 coincide con lo antes descrito por el trabajo de Reale y cols.⁶ en pacientes con síndrome de Sjögren lo cual respalda la teoría de ser un potente biomarcador de respuesta inflamatoria en la patogénesis de esta enfermedad así como de otro tipo de enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, lupus como lo previamente comentado en el trabajo de Ji-Qing Chen y cols. Donde encontraron expresado el miR155 junto con miR-223-5p, miR-150-5p, y miR-342-3¹² que los encuentran altamente vinculado con linfocitos B encontrados en células mononucleares de sangre periférica

en pacientes con estas patologías antes mencionadas.

En sí el miR-155 cuenta con un papel importante ante la patogénesis de enfermedades inflamatorias como lo es el Síndrome de Sjögren primario y secundario, el obtenerlo expresado en muestras de lágrima en pacientes con enfermedad de ojo seco serviría no solo como biomarcador de respuesta inflamatoria si no también con miras hacia la información de respuesta a tratamiento. Este resultado coincide con el único estudio realizado en lágrima por los autores Yu Jeong Kim y cols.¹³ Dicho estudio reporta la expresión de 14 microRNAs expresados en lágrima de pacientes con síndrome de Sjögren, entre ellos el miR-155 así como lo fue representativo en nuestro estudio. El valor agregado que damos al siguiente trabajo es además su determinación en suero y poder obtener un análisis comparativo sobre el uso futuro de este miR-155 no solo como diagnóstico si no como marcador a respuesta de tratamiento.

En cuanto al miRNA 181a el cual no se encontró estadísticamente expresado en lágrima o en sangre no se puede descartar del todo su rol en la patogenia de la respuesta inflamatoria en pacientes con ojo seco por Síndrome de Sjögren. Se sugiere realizarse en un tamaño muestral más grande en caso de que tengan menor sensibilidad para su determinación.

Los resultados antes presentados son gracias a la obtención de una muestra de lágrima lo que presume una técnica menos invasiva y rápida de fácil obtención sin menores efectos adversos.

CONCLUSIÓN

La expresión del miRNA-155 se encontró aumentada estadísticamente significativa en lágrima en pacientes con ojo seco secundario a Síndrome de Sjögren primario y secundario lo que supone un potente biomarcador de respuesta inflamatoria con fácil obtención. No así el miRNA-181 el cual no mostro sobreexpresión en comparación con los controles.

AGRADECIMIENTOS:

Esta investigación se llevó a cabo gracias al Hospital Civil de Culiacán en su Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud en el servicio de Oftalmología y al laboratorio de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Referencias

1. Baer AN. Up date on Sjögren Syndrome and Other Causes of Sicca in Older Adults. 2018;44:21224.
2. Seror R, Theander E, Bootsma H, Bowman SJ, Tzioufas A, Gottenberg JE, et al. Outcome measures for primary Sjögren's syndrome: A comprehensive review. J Autoimmun [Internet]. 2014;51:51–6. Available

- from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.010>
3. Garcia-Catalan M, Jerez-Olivera E, Benitez-Del-Castillo-Sanchez J. Dry eye and quality of life. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2009;84:84:451–458.
 4. Fuentes-Páez G, Herreras JM, Cordero Y, Almaraz a, González MJ, Calonge M. Lack of concordance between dry eye syndrome questionnaires and diagnostic tests. *Arch Soc Esp Oftalmol* [Internet]. 2011;86(1):3–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2173-5794\(11\)70002-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2173-5794(11)70002-0)
 5. Da Cunha AP, Zhang Q, Prentiss M, Wu XQ, Kainz V, Xu YY, et al. The Hierarchy of Proinflammatory Cytokines in Ocular Inflammation. *Curr Eye Res*. 2018;43(4):553–65.
 6. Reale M, Angelo CD, Costantini E, Laus M, Moretti A, Croce A. Review Article MicroRNA in Sjögren ' s Syndrome : Their Potential Roles in Pathogenesis and Diagnosis. 2018;2018.
 7. Mahesh G, Biswas R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interf Cytokine Res*. 2019;39(6):321–30.
 8. Shi H, Zheng L yan, Zhang P, Yu C qi. miR-146a and miR-155 expression in PBMCs from patients with Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(10):792–7.
 9. Dudics S, Venkatesha SH, Moudgil KD. The micro-RNA expression profiles of autoimmune arthritis reveal novel biomarkers of the disease and therapeutic response. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
 10. Xie W, Li Z, Li M, Xu N, Zhang Y. MiR-181a and inflammation: MiRNA homeostasis response to inflammatory stimuli in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;430(2):647–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.097>
 11. Peng L, Ma W, Yi F, Yang YJ, Lin W, Chen H, et al. MicroRNA profiling in Chinese patients with primary sjögren syndrome reveals elevated miRNA-181a in peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol*. 2014;41(11):2208–13.
 12. Chen JQ, Zilahi E, Papp G, Sipka S, Zeher M. Simultaneously increased expression of microRNA-155 and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) gene in the peripheral blood mononuclear cells of patients with primary Sjögren's syndrome. *Int J Rheum Dis*. 2017;20(5):609–13.
 13. Kim YJ, Yeon Y, Lee WJ, Shin YU, Cho H, Sung YK, et al. Comparison of microRNA expression in tears of normal subjects and Sjögren syndrome patients. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(14):4889–95.
 14. Talotta R, Mercurio V, Bongiovanni S, Vittori C, Boccassini L, Rigamonti F, et al. Evaluation of salivary and plasma microRNA expression in patients with Sjögren's syndrome, and correlations with clinical and ultrasonographic outcomes. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37:S70–7.
 15. Su LC, Huang AF, Jia H, Liu Y, Xu WD. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2017;20(11):1631–7.
 16. Tong L, Wong TY, Cheng Y. Level of tear cytokines in population-level participants

and correlation with clinical features. Cytokine [Internet]. 2018;(February):0–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.05.013>

17. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May;29(9):e45.