

DETERMINACIÓN DE MUC5AC EN POBLACIONES EXPUESTAS A LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

ALMEYDA, DAIANA B. ¹; SERRADELL, MARÍA A. ² Y GUTIÉRREZ, MARÍA A. ¹

1: Programa Ambiental de Extensión Universitaria (PAEU)
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata
50 Y 115.

e-mails: daiana.almeyda@hotmail.com; mgutierrez@biol.unlp.edu.ar

2: Cátedra de Microbiología
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata
47 y 115.
e-mail: maserr@biol.unlp.edu.ar

Resumen. *La exposición crónica al material particulado (MP), aumenta el riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, respiratorias, cerebrovasculares, y cáncer de pulmón. Se han descrito alteraciones en la mucosa ocular, en la estabilidad de la película lagrimal y en la incidencia de afecciones como la blefaritis. Si bien, en pacientes con “ojo seco”, se han reportado alteraciones en la producción de mucinas y recientemente se ha asociado la exposición crónica a contaminantes aéreos a un aumento de células de Goblet, no existen reportes de efectos de la contaminación ambiental sobre la expresión de mucinas en la superficie ocular o en la secreción lagrimal.*

Nuestro trabajo pretende evaluar el efecto de la contaminación atmosférica en los niveles de MUC5AC en muestras de secreción lagrimal de individuos provenientes de dos poblaciones: una cercana al Polo Petroquímico de Ensenada, y otra en el casco urbano de La Plata, las cuales están siendo monitoreadas para MP₁₀ y MP_{2,5} por nuestro grupo de trabajo. Para ello, se está optimizando un ensayo inmunoquímico semicuantitativo de dot-blot, que emplea anticuerpos comerciales específicos para MUC5AC humana. En esta presentación se muestran la puesta a punto de la técnica y los resultados obtenidos del análisis del primer grupo de participantes.

Palabras clave: Lágrima, contaminación atmosférica, MUC5AC.

1. INTRODUCCIÓN

El ojo es el órgano de la visión y está compuesto por varias estructuras de sostén y protección [1].

El segmento externo ocular, está formado por los párpados, la conjuntiva, la córnea y la película lagrimal. La película lagrimal es una estructura altamente especializada, constituida por diferentes secreciones, las cuales se disponen específicamente, recubriendo a la córnea y al epitelio de la conjuntiva, permaneciendo en contacto directo con su medioambiente. Esta es de crucial importancia para proteger al ojo de influencias externas como desechos celulares y cuerpos extraños [2], lubrica los párpados, proporciona la primera superficie reflectante y es

útil para mantener la salud de la córnea, de la conjuntiva bulbar y la conjuntiva tarsal, con un volumen medio de 6 a 8 μ l [3]. Por lo tanto, la estabilidad óptica y la función normal del ojo dependen de una buena calidad, cantidad y estabilidad de la película lagrimal que cubre su superficie. Cuando existe una integridad de su estructura (cantidad y calidad de sus componentes, uniformidad e integración), una normal distribución (expansión o esparcimiento) y un adecuado parpadeo (frecuencia, amplitud, etc.) se considera que la lágrima es estable [4].

La lágrima posee por lo general un pH de aproximadamente 7.6 [2] y está compuesta por tres capas, la más interna es la mucosa producida por las células caliciformes, la capa intermedia es la acuosa propiamente dicha, secretada por las glándulas lagrimales y la capa oleosa, la más externa, producida por las glándulas de Meibomio. Esta última capa impide la evaporación de la lágrima manteniendo la humedad necesaria en la superficie ocular [5]. Además, la lágrima presenta proteínas, enzimas e inmunoglobulinas que son fundamentales ante determinadas enfermedades e infecciones que sufren los ojos [6].

Las mucinas (MUC) son proteínas de alto peso molecular, con repeticiones en tándem en la posición central de la proteína. La superficie ocular expresa al menos 9 de los 18 genes de mucina humana: MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC7, MUC13, MUC15, MUC16 y MUC17. Las mucinas mantienen la superficie ocular humectada y protegida de condiciones ambientales adversas. Basándose en sus secuencias de aminoácidos, las mucinas se clasifican en tres familias distintas: formadoras de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC19), solubles (MUC7 y MUC9) y transmembrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 y MUC21); otras mucinas permanecen sin clasificarse (MUC8 y MUC11) [7].

Si frente a un factor intrínseco u extrínseco, la estabilidad lagrimal disminuye se podrán producir signos y síntomas, debido a la pérdida parcial o total de alguna o todas las funciones. Según la bibliografía, una de las causas por la que puede ocurrir esta situación es frente a la contaminación ambiental, frente a exposiciones de monóxido de carbono (CO), material particulado con un diámetro aerodinámico menor a 2,5 μ m (PM_{2,5}) [8,9], de dióxido de nitrógeno (NO₂) [10] o de hidrocarburos totales de petróleo en aguas [4]. Sin embargo, no existen reportes de efectos de la contaminación ambiental sobre la expresión de mucinas en la superficie ocular o en la secreción lagrimal, aunque estudios recientes han asociado que la exposición a largo plazo a contaminantes aéreos contribuye a un aumento de la densidad de células de Goblet, la cual podría aumentar los niveles de ARNm de MUC5AC formadoras de gel como una condición adaptativa [11]. También se ve afectada la producción de mucinas en ciertas afecciones oculares como el "ojo seco" [6]. Esta, es una enfermedad multifactorial de la película lagrimal y de la superficie ocular que causa síntomas de malestar, trastornos visuales e inestabilidad de la película lagrimal con un daño potencial en la superficie ocular. Está acompañada por un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular. El ojo seco se reconoce como un trastorno de la Unidad Funcional Lágrima (LFU), un sistema integrado formado por las glándulas lagrimales, los nervios sensoriales y los nervios motores que los conectan [12].

En el partido de La Plata se encuentra uno de los complejos industriales más importante y activos de América del Sur. En él se destaca la refinería de petróleo, elaboración de compuestos aromáticos, lubricantes, productos petroquímicos, etc.

Desde hace varios años, nuestro grupo de trabajo monitorea contaminación atmosférica en diferentes zonas del partido de La Plata y Gran La Plata, por lo que nos resulta interesante estudiar la composición de la película lagrimal expuesta directamente a diferentes concentraciones de contaminantes de la atmósfera y así comparar el efecto de la contaminación sobre parámetros asociados a la salud ocular.

En el presente trabajo, se pretende evaluar el nivel de expresión de MUC5AC en muestras de secreción lagrimal de individuos provenientes de dos poblaciones: una cercana al Polo Petroquímico de Ensenada (zona industrial), y otra en el casco urbano de La Plata (zona urbana), mediante un ensayo inmunoquímico semicuantitativo de Dot-Blot empleando anticuerpos comerciales específicos para MUC5AC humana, cuyos resultados serán analizados a ojo desnudo y mediante el software ImageJ.

1. MATERIALES Y METODOS

1.1. Población de estudio

Para evaluar el efecto de la contaminación aérea en los niveles de MUC5AC, se evaluaron dos poblaciones: una cercana al Polo Petroquímico de Ensenada (zona industrial), y otra en el casco urbano de La Plata (zona urbana), con diferentes características ambientales.

Se trabajó con personas que viven y trabajan en las zonas de estudio, constituyendo dos grupos compuestos cada uno por 16 ojos de personas sanas, cuyas edades están comprendidas en el rango etario de 25-60 años. Al momento del estudio, ninguno de los participantes del mismo se encontraba bajo tratamiento médico con fármacos de ninguna clase, no poseían patologías oculares y no eran usuarios de lentes de contacto.

Una vez que los procedimientos fueron totalmente explicados a los pacientes y comprendidos por los mismos, se obtuvo el consentimiento informado, el cual fue aprobado por el Comité consultivo de la Universidad Nacional de La Plata.

1.2. Obtención de las muestras de lágrima

La extracción de las muestras de lágrimas se realizó en ambos ojos de un mismo voluntario tal como se describe en la prueba de Schirmer I [13]. Las tiras de Schirmer (Hub Pharmaceuticals, CA 91730, USA) se colocaron en el fondo de saco temporal inferior, sin anestesia tópica por el periodo de 5 minutos.

Seguidamente se colocaron las tiras conteniendo las muestras de lágrima en tubos eppendorff. Se agregaron 100 μ l de solución fisiológica estéril en cada tubo con el fin de extraer la muestra embebida en la tira y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min (Legend Micro 17/17b centrifuge, Thermo Scientific). Las muestras extraídas se colocaron en tubos eppendorff limpios y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

1.3. Dot-Blot

El Dot-Blot es un método inmunoquímico que permite, mediante el uso de anticuerpos específicos, la detección de biomoléculas de naturaleza proteica presentes en una muestra.

- Se realizaron diluciones seriadas al $\frac{1}{2}$ de las muestras en TBS (Buffer Tris-Salino, pH 7,4) hasta la dilución 1/128.
- Una vez hecho eso, se sembraron las diluciones y la muestra pura en una membrana de nitrocelulosa y se dejaron secar.
- Luego se bloquearon las membranas con una suspensión de leche descremada en polvo al 3% p/v en TBS, durante 1 h en estufa a 37°C.
- Finalizada la incubación, se retiró el líquido y se agregó el anticuerpo anti-MUC5AC (anticuerpo policlonal de conejo; Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:1000 en leche descremada en polvo al 3% p/v en TBS, y se incubó toda la noche a 4°C.
- Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces con TBS + Tween 20 0,05% v/v y por último con TBS solo. Posteriormente, se agregó el anticuerpo anti-IgG conjugado con la enzima peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1/1000 en TBS y se incubó en estufa a 37°C durante 1 hora.
- Luego de lavar las membranas 3 veces con TBS + Tween 20 0,05% v/v, y de realizar un último lavado con TBS solo, las mismas se revelaron con una mezcla de reacción de 4-cloronaftol (1-2 mg) en 1 ml de metanol + 5ml de TBS + 10 μ l de H₂O₂.

La aparición del producto coloreado de la reacción enzimática se visualizó a ojo desnudo y mediante el software ImageJ.

1.4. Análisis del Dot-Blot por ImageJ

Las imágenes de los Dot-Blot fueron procesadas con el software ImageJ versión 2006.02.01, y las mismas se utilizaron para estimar las intensidades relativas de las diferentes diluciones de las muestras.

1.5. Análisis Estadístico

Se determinaron los valores estadísticos descriptivos sobre los resultados obtenidos tanto a ojo desnudo como con el software ImageJ. Para el caso de la lectura a ojo desnudo, se determinó la dilución máxima a la cual se observa revelado positivo para cada muestra a criterio del operador. Para el caso del análisis con el software, se tomó la máxima dilución a la cual se registra una intensidad diferente al basal. Se obtuvieron valores de la media (μ), su desviación estándar (DE) así como las diferencias estadísticamente significativas entre dos medias se determinaron mediante la prueba Mann Whitney (p-valor).

2. RESULTADOS

2.1. Dot-Blot

Luego de haber realizado el revelado del Dot-Blot, se pudo evidenciar la presencia de

MUC5AC en todas las muestras de secreción lagrimal sometidas a estudio. El análisis digital de las imágenes permitió la cuantificación relativa de la intensidad de revelado de cada una de las diluciones.

En la **Figura 1** se observan los resultados obtenidos en 6 muestras representativas de ambas poblaciones de estudio, donde a simple vista, se puede ver como varía la intensidad del revelado entre muestras, y a su vez como disminuye la misma al aumentar la dilución de cada muestra.

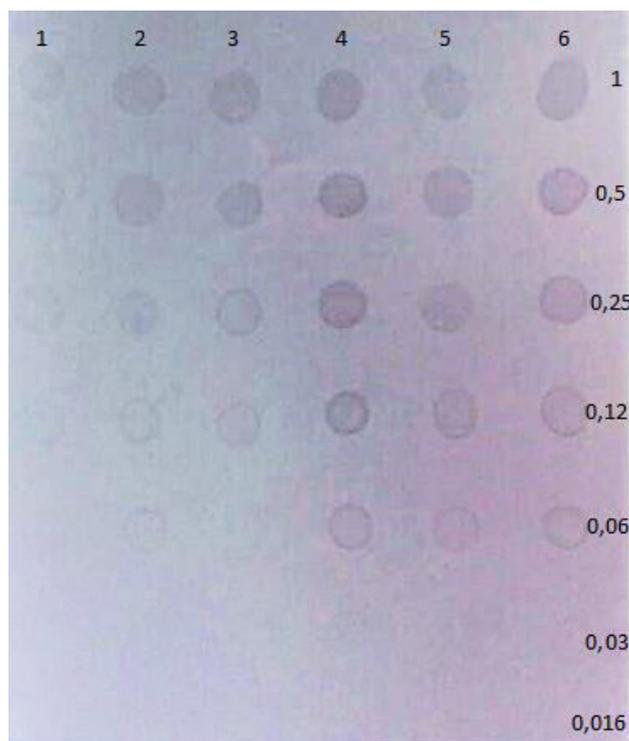


Figura 1: Revelado de la membrana de nitrocelulosa. Muestras de individuos, de la zona industrial (calle 1-3) y de la zona urbana (calle 4-6) a distintas diluciones (1-0,016).

2.2. Análisis de las MUC5AC con el Software ImageJ

Mediante el software ImageJ, se evaluaron las intensidades de cada dilución de las muestras de ambas poblaciones.

En la **Tabla 1** se muestran esos valores para un par de muestras a base de ejemplo.

Núm. muestra	Población	Dilución	Intensidad	%Intensidad
1	Industrial	1	1.081	100,0
		0,5	1.086	100,5
		0,25	1.076	99,5
		0,125	1.083	100,2

		0,0625	1.086	100,5
		0,03125	1.078	99,7
17	Urbana	1	1.652	100,0
		0,5	1.624	98,3
		0,25	1.583	95,8
		0,125	1.592	96,4
		0,0625	1.573	95,2
		0,03125	1.554	94,1

Tabla 1: Valores de intensidad y porcentaje de intensidad relativa para las distintas diluciones de una muestra representativa de cada población.

En las **Figuras 2 y 3** se representan la intensidad relativa (porcentaje) para cada una de las diluciones de las muestras correspondientes a cada población.

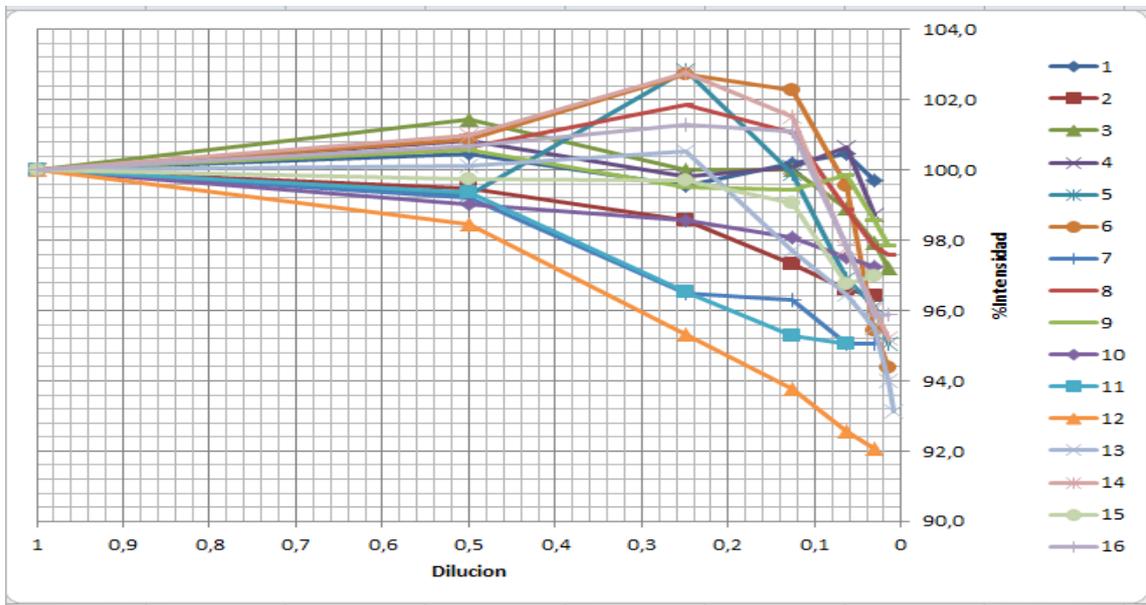


Figura 2: Representación gráfica del % intensidad vs dilución de las muestras de la población de zona Industrial

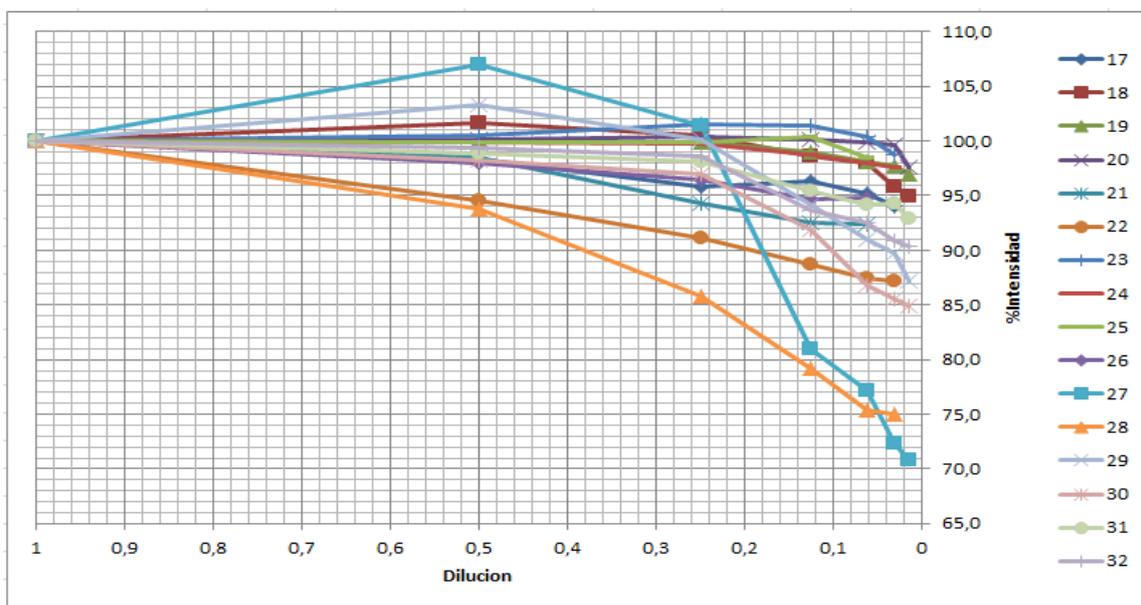


Figura 3: Representación gráfica del % intensidad vs dilución de las muestras de la población de zona Urbana

Podemos ver que la tendencia de ambas gráficas es igual, al aumentar la dilución la intensidad disminuye. También se ve que el porcentaje de intensidad a la dilución máxima llega a valores en el rango de 92-99% en las muestras de la zona Industrial, mientras que en las muestras de la zona Urbana los porcentajes de intensidad relativa alcanzan valores entre 70-97,5% para la dilución máxima. En esta última zona, la mayoría de los casos alcanzan una intensidad relativa de entre 82 y 97,5% a máxima dilución.

2.3. Análisis Estadístico de los resultados

En la **Tabla 2** podemos observar el análisis realizado para un n=16 en cada una de las poblaciones en estudio, donde los valores de la media fueron obtenidos a partir de las diluciones máximas en la cual se observa presencia de MUC5AC.

Variable	Zona	n	μ	DE	p-valor
MUC5AC Ojo Desnudo	Industrial	16	0,04	0,02	0,3745
	Urbano		0,03	0,03	
MUC5AC Software	Industrial		0,04	0,03	0,3034
	Urbano		0,05	0,04	

Tabla 2: Análisis estadístico mediante la prueba Mann Whitney aplicada a dos poblaciones (zona Industrial y zona Urbana). Valores medios (μ) y desviaciones estándar (DE) de concentraciones de MUC5AC determinados a ojo desnudo y por el software ImageJ.

Por lo tanto, como se puede ver, para un n=16 no hay diferencia significativa entre ambas

poblaciones sobre los valores de MUC5AC.

3. DISCUSION

Existen evidencias del efecto de la contaminación aérea sobre la estabilidad lagrimal, la cual a su vez depende de la composición de la lágrima [4, 8, 9, 10]. En particular, las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que mantienen la superficie ocular húmeda y protegida. Aunque aún no se han reportado efectos de la contaminación ambiental sobre la expresión de mucinas en la superficie ocular o en la secreción lagrimal, existen estudios recientes que han asociado la exposición a largo plazo a contaminantes aéreos a un aumento de las células de Goblet productoras de mucinas [7]. En este contexto, nos propusimos comenzar con el estudio del efecto de la contaminación aérea sobre la expresión de mucinas formadoras de gel (MUC5AC) en muestras de lágrima.

Para ello, comenzamos con la optimización de un ensayo de Dot-Blot, que emplea un anticuerpo comercial anti-MUC5AC humana, con el fin de detectar la presencia de dicha mucina en muestras de secreción lagrimal de individuos provenientes de dos poblaciones con diferente calidad de aire (zona Industrial y zona Urbana).

En primer lugar, es importante destacar que este es el primer estudio de este tipo que se lleva cabo en el marco del Programa Ambiental de Extensión Universitaria, y que el mismo forma parte de un proyecto que incluirá también la determinación de otros mediadores asociados a la inflamación de la mucosa conjuntival como son ciertas citoquinas que pueden encontrarse en la película lagrimal (ej. IL-6).

En las condiciones ensayadas, la presencia de MUC5AC fue detectada en todas las muestras bajo estudio. Dado que se realizaron diluciones seriadas de cada muestra, la intensidad de revelado disminuye a medida que aumenta la dilución de la misma, lo que confirma la especificidad de la prueba. Esto no solo se observa a ojo desnudo, sino que también se corrobora con el análisis digitalizado de las imágenes mediante el software ImageJ. En este sentido, la posibilidad de analizar cuantitativamente las muestras estudiadas permite independizarse de la subjetividad del operador.

En las condiciones ensayadas y con el número de muestras analizadas (n=16), no se registraron diferencias estadísticamente significativas en la dilución máxima a la cual se observa positividad entre ambas poblaciones, ya sea con la lectura a ojo desnudo o con el ImageJ. Sin embargo, el análisis con el software mostraría una tendencia hacia niveles inferiores de MUC5AC en los individuos que provienen de la zona Urbana. Por un lado, esta situación podría modificarse al analizar un mayor número de muestras, pero también es cierto que sería necesario llevar a cabo el Dot-Blot ampliando la serie de diluciones ensayadas, de manera de estudiar el comportamiento del sistema a menor concentración de muestra de secreción lagrimal.

Estos resultados preliminares nos alientan no solo a continuar con nuestros estudios, sino a considerar el futuro diseño y desarrollo de un enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA) que permita cuantificar MUC5AC de manera absoluta en cada muestra. Para ello, deberemos contar con un segundo anticuerpo anti-MUC5AC y una preparación estandarizada del antígeno.

4. REFERENCIAS

- [1] Ulrich Welsoh, Johannes Sobotta “*Histologia*” Panamericana (2006).
- [2] Ashok Garg, John D. Sheppard, Eric D. Donnenfeld, David Meyer and Cyres K. Mehta “*Clinical diagnosis and managment of dry eye and ocular Surface disorders (xero-dacryology)*”, Panamericana medical, (2006).
- [3] Gipson, I.K., et al., Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease. *Ocul Surf*, 2004. 2(2): p. 131-48.
- [4] San Sebastián, M., et al., La salud de mujeres que viven cerca de pozos y estaciones de petróleo en la Amazonía ecuatoriana. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 2001. 9: p. 375-383.
- [5] Montero Iruzubieta, Cap. 5: J. *Ojo seco - Dry Eye*. Murube J. Tecnimedia editorial 1997.p. 55-58.
- [6] Spalton DJ, Hitchings RA, Hunter PA. *Oftalmología clínica* (2ª edición). Editorial Mosby/Doyma libros. 1995; 5.13-5.16.
- [7] Rosa M. Corrales, Srihari Narayanan, Itziar Fernández, Agustín Mayo, David J. Galarreta, Graciana Fuentes-Páez, Felipe J. Chaves, José´ M. Herreras and Margarita Calonge “*Ocular Mucin Gene Expression Levels as Biomarkers for the Diagnosis of Dry Eye Syndrome*” 2011, Vol. 52, No. 11
- [8] A. Ellegård, "Tears while Cooking: An Indicator of Indoor Air Pollution and Related Health Effects in Developing Countries", *Environmental Research*. **75**. 12-22 (1997)
- [9] A.R. Siddiqui, K. Lee, et al., "Eye and respiratory symptoms among women exposed to wood smoke emitted from indoor cooking: a study from southern Pakistan", *Energy for Sustainable Development*. **9**. 58-66 (2005)
- [10] Novaes, P., et al., The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environmental Research*. 2010. 110(4): p. 372-374.
- [11] Torricelli AAM, Matsuda M, Novaes P, Braga ALF, Saldiva PHN, Alves MR, et al. Effects of ambient levels of traffic-derived air pollution on the ocular surface: Analysis of symptoms, conjunctival goblet cell count and mucin 5AC gene expression. *Environmental Research* 2014;131:59–63. doi:10.1016/j.envres.2014.02.014.
- [12] Stern, M.E., Beuerman, R.W., Fox, R.I., Gao, J., Mircheff, A.K., Pflugfelder, S.C., (1998). The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 17, 584–589.
- [13] E.B. Gil del Río, P., "Lentes de Contacto", *Ed. Jims, S.A.* (1981)