



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES (TSHR) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA 1 (IGF1R) EN LAS GLÁNDULAS DE MEIBOMIO HUMANAS

Mario Alejandro Jimenez Mora

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía, Unidad de Oftalmología

Bogotá, Colombia

2024

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES (TSHR) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA 1 (IGF1R) EN LAS GLÁNDULAS DE MEIBOMIO HUMANAS

Mario Alejandro Jimenez Mora

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título

de:

Especialista en Oftalmología

Director (a):

Marcel Yecid Ávila Castañeda, MD

Médico Oftalmólogo

Profesor de Oftalmología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía, Unidad de Oftalmología

Bogotá, Colombia

2024

Agradecimientos

A mi director del trabajo final de especialidad, el Dr. Marcel Yecid Ávila Castañeda, y a la Dra. Maria Amparo Mora Villate, por acoger la idea de investigación, por los aportes metodológicos, por su apoyo y acompañamiento permanente durante la realización del trabajo. Un especial agradecimiento a la Dra. Mora Villate por su aporte fundamental en la obtención de las muestras de tarsos utilizados para el presente estudio.

A todos los profesores de la Unidad de Oftalmología, por el excelente entrenamiento que me brindaron en el programa, y por los comentarios constructivos al trabajo final de especialidad.

Al Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina, y especialmente a Heidy Acosta, histotecnóloga, por su valioso apoyo con el procesamiento de las muestras incluídas para este estudio.

A la Dra. Maribel Palencia, profesora de Patología de la Facultad de Medicina, por su colaboración con la interpretación de los hallazgos de inmunohistoquímica.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Declaró bajo juramento que soy el verdadero autor de la obra referida, y que no se ha vulnerado derechos de autor o de propiedad intelectual de terceros. De ser el caso, responderé por cualquier reclamo que se pueda presentar, exonerando de cualquier responsabilidad a la Universidad Nacional de Colombia.

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Mario Jiménez Mora

Mario Alejandro Jimenez Mora

Fecha 17/10/2024

Resumen

Expresión del Receptor de la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSHR) y del Factor de Crecimiento Similar a La Insulina 1 (IGF1R) en las Glándulas De Meibomio Humanas

Las glándulas de Meibomio se ubican en el tarso de los párpados superior e inferior. Su función es secretar la capa lipídica de la película lagrimal, la cual es vital para el adecuado funcionamiento de la superficie ocular, ya que impide que la porción acuosa de la lágrima se evapore. La prevalencia de la disfunción de las glándulas de Meibomio ha sido reportada entre el 3.5% hasta el 70% en diferentes poblaciones, siendo este uno de los principales motivos de consulta. Se conocen algunos determinantes de su función y regulación, sin embargo, quedan muchos aspectos por dilucidar. En la enfermedad ocular tiroidea, se producen autoanticuerpos que llevan a la activación del receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR) y del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R), lo que desencadena las diferentes manifestaciones de la enfermedad. La enfermedad ocular tiroidea ha sido estrechamente asociada con la Enfermedad de Ojo Seco, y una altísima proporción de los pacientes sufren disfunción de las glándulas de Meibomio. Este hecho sugiere la posibilidad de que la vía de la hormona estimulante de la tiroides intervenga en la función de las glándulas de Meibomio y sea responsable de su disfunción en el estado distiroideo. El objetivo del estudio es evaluar la presencia o ausencia de expresión del TSHR e IGF1R en las glándulas de Meibomio de 9 cadáveres adultos jóvenes sanos. Se exploró la expresión proteica de los receptores por medio de inmunohistoquímica. Se encontró que las glándulas de Meibomio humanas expresan, con alta probabilidad, receptores para la hormona estimulante de la tiroides (TSHR) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R). Estos resultados permitirán entender mejor la fisiopatología del ojo seco en la enfermedad de Graves, avanzar en el entendimiento de la fisiología de la glándula de Meibomio, y plantear estudios futuros que permitan encontrar objetivos terapéuticos en pacientes con ojo seco y disfunción de glándulas de Meibomio.

Palabras clave: Glándulas de Meibomio, Síndromes de Ojo Seco, Enfermedades tiroideas, Receptores de tirotropina, Receptor de IGF Tipo 1.

Abstract

Expression of Thyroid Stimulating Hormone Receptor (TSHR) and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1R) in Human Meibomian Glands

Meibomian glands are located in the tarsus of the upper and lower eyelids. Their function is to secrete the lipid layer of the tear film, which is vital for the proper functioning of the ocular surface, as it prevents the aqueous portion of the tear from evaporating. The prevalence of Meibomian gland dysfunction has been reported between 3.5% and 70% in different populations, and this is one of the main reasons for consultation. Some determinants of their function and regulation are known, however, many aspects remain to be elucidated. In thyroid eye disease, autoantibodies lead to the activation of the thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and the insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R), which triggers the different manifestations of the disease. Thyroid eye disease has been closely associated with Dry Eye Disease, and a very high proportion of patients suffer from Meibomian gland dysfunction. This fact suggests the possibility that the thyroid-stimulating hormone pathway intervenes in the function of the meibomian glands and is responsible for their dysfunction in the dysthyroid state. The aim of the study was to evaluate the presence or absence of TSHR and IGF1R expression in the meibomian glands of 9 healthy young adult cadavers. Protein expression of the receptors was explored by immunohistochemistry. It was found that human meibomian glands express, with high probability, receptors for thyroid-stimulating hormone (TSHR) and insulin-like growth factor 1 (IGF1R). These results will allow us to better understand the pathophysiology of dry eye in Graves' disease, advance in the understanding of meibomian gland physiology, and propose future studies that will allow us to find therapeutic targets in patients with dry eye and meibomian gland dysfunction.

Keywords: Meibomian Glands, Dry Eye Syndromes, Thyroid Diseases, Receptors, Thyrotropin, Receptor, IGF Type 1.

Contenido

	Pág.
Introducción	1
1. Planteamiento del problema de investigación, Justificación, Objetivos e Hipótesis	3
1.1 Justificación	3
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivos generales.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
1.3 Hipótesis.....	4
2. Métodos	5
2.1 Tipo de investigación	5
2.2 Muestra.....	5
2.3 Técnicas y procedimientos	5
2.4 Aspectos éticos	7
3. Resultados	9
4. Discusión.....	19
5. Conclusiones y recomendaciones	21
5.1 Conclusiones.....	21
5.2 Recomendaciones	21
Bibliografía	23

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1: Sección de tarso, tinción de hematoxilina y eosina, 10X.....	9
Figura 3-2: Sección de tarso, tinción de hematoxilina y eosina, 10X.....	10
Figura 3-3: Sección de tarso, tinción de hematoxilina y eosina, 40X.....	11
Figura 3-4: Sección de tarso, inmunohistoquímica para IGF1R, 40X.....	13
Figura 3-5: Sección de carcinoma de mama, inmunohistoquímica para IGF1R, 40X	14
Figura 3-6: Sección de tarso, inmunohistoquímica para TSHR, 10X (A) y 40X (B)...	15
Figura 3-7: Sección de tarso, inmunohistoquímica para TSHR, 40X.....	16
Figura 3-8: Sección de glándula tiroidea, inmunohistoquímica para TSHR, 10X.....	17

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1: Nivel y patrón de marcaje de los controles positivos externos y de las glándulas de Meibomio para los anticuerpos TSHR E IGF1R.....	12
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
TSHR	Receptor de la hormona estimulante de la tiroides
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1

Introducción

Las glándulas de Meibomio son glándulas sebáceas modificadas ubicadas en el tarso de los párpados superior e inferior. Están compuestas de acinos secretores conectados por medio de ductos pequeños a un ducto central principal que terminan en la parte posterior del margen palpebral. Su función es sintetizar y secretar las proteínas y lípidos que componen la capa lipídica superficial de la película lagrimal. Esta capa evita la evaporación de la porción acuosa de la lágrima se evapore y disminuye la tensión superficial de la lágrima, aumentando de esta manera su estabilidad(1).

La Disfunción de las Glándulas de Meibomio ha sido definida como una anomalía crónica y difusa de las glándulas de Meibomio, comúnmente caracterizada por obstrucción del ducto terminal y/o cambios cualitativos o cuantitativos en la secreción glandular(2). De esta manera, se producen alteraciones en la capa lipídica, llevando a síntomas de irritación ocular, y signos de inflamación de la superficie ocular(3). La Disfunción de Glándulas de Meibomio ha sido notada en un 64.6% a 74.5% de pacientes con Enfermedad de Ojo Seco, siendo probablemente la causa principal de ojo seco(1).

Las glándulas de Meibomio son densamente innervadas, por lo que podría estar regulada por medio de neurotransmisores. El crecimiento y desarrollo de las glándulas de Meibomio sucede en parte por el efecto de andrógenos, que intervienen en la diferenciación inicial. La maduración y diferenciación terminal ocurre por la activación de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos gamma (PPAR- γ). Otros reguladores del crecimiento y la función de las glándulas de Meibomio incluyen estrógenos, progestágenos, ácido retinoico y diversos factores de crecimiento(1). Las vías moleculares que participan en esta regulación siguen siendo objeto de múltiples investigaciones(4).

La enfermedad ocular tiroidea (también conocida como orbitopatía tiroidea u oftalmopatía de Graves) es una enfermedad orbitaria muy común, siendo la causa más frecuente de proptosis en adultos. Una de las principales manifestaciones de la enfermedad ocular tiroidea es el Ojo Seco(5,6). Se han planteado diferentes mecanismos(6), dentro de los cuales ha sido notoria una asociación entre enfermedad ocular tiroidea y Disfunción de las Glándula de Meibomio(7–12). El mecanismo que subyace esta asociación es desconocido.

En la enfermedad de Graves, el principal autoantígeno es el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR)(13). El TSHR se expresa principalmente en la tiroides, pero también en adipocitos, fibroblastos, células óseas y una variedad de sitios adicionales(14). Su expresión en las glándulas de Meibomio humanas es desconocida. Adicionalmente, se ha demostrado una interacción significativa entre el TSHR y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) en los fibroblastos retrooculares. La activación del receptor de hormona estimulante de la tiroides por los autoanticuerpos del TSHR conduce a la transducción de la señal de IGF1R, contribuyendo a la fisiopatología y las manifestaciones clínicas de la enfermedad(15,16). Dado que los pacientes con enfermedad ocular tiroidea han mostrado tener una mayor susceptibilidad a padecer de ojo seco, es posible que la vía de la hormona estimulante de la tiroides intervenga en la función de las células de Meibomio por medio de TSHR e IGF1R.

1. Planteamiento del problema de investigación, Justificación, Objetivos e Hipótesis

El presente proyecto busca responder la siguiente pregunta de investigación: ¿Están los receptores de hormona estimulante de la tiroides (TSHR) y de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) expresados normalmente en las glándulas de Meibomio humanas?

Tal pregunta tiene relevancia dado que:

- Si TSHR e IGF1R se encuentran expresados en las glándulas de Meibomio, es posible que las glándulas se encuentren bajo el control de estas vías hormonales.
- Si TSHR e IGF1R se encuentran expresados en las glándulas de Meibomio, posiblemente estas sean un blanco de los autoanticuerpos y la respuesta inflamatoria celular en la enfermedad ocular tiroidea, explicando la disfunción de glándulas de Meibomio en los pacientes con esta enfermedad.

1.1 Justificación

La prevalencia global de Enfermedad de Ojo Seco varía entre un 5 a 50% de la población, mientras que la prevalencia de Disfunción de Glándulas de Meibomio ha sido reportada entre el 3.5% hasta el 70% en diferentes poblaciones(17), constituyendo uno de los principales motivos de consulta en Oftalmología.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, en la actualidad no se conoce la expresión tejido-específica de los receptores para TSH e IGF1 en las células de las glándulas de Meibomio. Conocer si tales receptores se encuentran expresados en las glándulas de Meibomio humanas representaría un avance en el entendimiento de la fisiología de este tejido, siendo el primer paso del estudio del rol que estas vías de regulación hormonal podrían tener sobre regulación de la película lagrimal y la superficie ocular.

Entender mejor la fisiopatología de la disfunción de las glándulas de Meibomio permitiría ofrecer alternativas de tratamiento a los pacientes con estados distiroideos, como la enfermedad ocular tiroidea o el hipotiroidismo, dirigidas directamente a los mecanismos de su enfermedad.

En términos más generales, estudiar la fisiopatología de las glándulas de Meibomio llevará al descubrimiento de blancos terapéuticos novedosos para la enfermedad de ojo seco mediante la modulación de las vías moleculares que alteran la función de las glándulas de Meibomio.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos generales

Evaluar la presencia o ausencia de expresión del receptor de la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSHR) y el receptor del Factor de Crecimiento similar al Insulina 1 (IGF1R) en las glándulas de Meibomio de cadáveres adultos jóvenes sanos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Valorar la expresión de las proteínas TSHR e IGF1R en secciones histológicas de tejido tarsal
- Determinar la localización de su expresión en relación con las estructuras anatómicas que componen las glándulas de Meibomio y tejidos adyacentes.

1.3 Hipótesis

- **H₀ (hipótesis nula):** Los receptores de hormona estimulante de la tiroides (TSHR) y de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) **no se expresan** en las glándulas de Meibomio humanas.
- **H_a (hipótesis alterna):** Los receptores de hormona estimulante de la tiroides (TSHR) y de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) **se expresan** en las glándulas de Meibomio humanas.

2. Métodos

2.1 Tipo de investigación

El presente trabajo constituye un estudio de investigación básica con fines descriptivos y exploratorios. Específicamente, describir la presencia de expresión de los receptores de TSH e IGF1 permitirá explorar la factibilidad de realizar estudios adicionales sobre las vías de señalización y los efectos de su estimulación e inhibición en las glándulas de Meibomio.

2.2 Muestra

Para el presente estudio, se utilizaron muestras de tarso obtenidas mediante autopsia de 9 hombres y mujeres sanos entre 20 y 45 años, fallecidos por muerte violenta, sin antecedentes patológicos conocidos. El número de muestra se determinó teniendo en cuenta los siguientes factores: Históricamente, se ha considerado que tres réplicas biológicas es el número mínimo para cualquier análisis inferencial de expresión en estudios de investigación básica. Considerando la variación esperada entre las réplicas biológicas, se consideró que una muestra de nueve sería suficiente. Así mismo, dada la naturaleza exploratoria del presente estudio y teniendo en cuenta que a mayor número de muestra se incrementan los costos de este, dentro del contexto de recursos limitados, se optó por una muestra pequeña, pero con poder suficiente para mostrar demostrar la presencia vs. ausencia de expresión en individuos sanos.

2.3 Técnicas y procedimientos

Tras la recolección de las muestras de tarso cadavérico y una muestra de glándula tiroidea (para control positivo de la expresión de TSHR), se procedió a su disección y separación de los tejidos adyacentes, y posteriormente colocación en tubos Eppendorf con formol 10% v/v tamponado (pH 7.0) para su fijación.

Se procedió con el procesamiento de las muestras e inclusión en parafina.

Para el control positivo de la expresión de IGF1R, se utilizó un bloque de carcinoma de mama obtenido a través de biopsia de una paciente anónima, el cual había sido donado al Laboratorio de Morfología.

Estudio morfológico mediante tinción de hematoxilina y eosina:

De acuerdo al protocolo descrito en la literatura para el estudio de las glándulas de Meibomio(18), tras la inclusión de los tejidos en bloque de parafina, se realizaron cortes de secciones de 4 μm , y se realizó tinción con hematoxilina y eosina. El objetivo de esta tinción fue contextualizar la expresión de las proteínas de interés con la histología normal de las glándulas de Meibomio.

Evaluación de la expresión por medio de inmunohistoquímica:

Siguiendo los protocolos publicados en la literatura(19), se procedió de la siguiente manera:

- Corte de las piezas fijadas de placa tarsal en mitades paralelas al conducto de la glándula de Meibomio.
- Inclusión en bloque de parafina.
- Corte de secciones de 4 μm
- Deparafinización y rehidratación del tejido.
- Tamponamiento con buffer de citrato 0.01 M a pH 6.
- Bloqueo con suero de cabra normal estéril
- Incubación con anticuerpos primarios.
 - A34635 Anti-IGF-1R (Ab-1161) Antibody (antibodies.com, Cambridge, UK)
 - A15375 Anti-TSH Receptor Antibody (antibodies.com, Cambridge, UK)
- Incubación con anticuerpos secundarios conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP)
- Incubación con sustrato cromogénico (3,3'-diaminobencidina) para detectar la expresión de los receptores de TSH e IGF1 en las glándulas de Meibomio.
- Como control positivo, se realizó el mismo procedimiento con una sección de glándula tiroidea humana (para TSHR) y con una sección de carconima de mama humano (para IGF1R).
- Para control negativo, se evaluaron las áreas de las secciones donde se conoce que la proteína (TSHR e IGFR1, respectivamente) está ausente.

Las marcaciones de inmunohistoquímica fueron realizadas por el proveedor externo Immunotech Laboratorios SAS, Bogotá, Colombia.

2.4 Aspectos éticos

El presente estudio contó con aval número B.FM.1.002 CE-125-23 del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. No se recolectaron datos de pacientes ni se realizará ningún tipo de intervención con sujetos de investigación. Esto, teniendo en cuenta que se analizaron muestras obtenidas a partir de autopsia de cadáveres. Por tal motivo, se aclara que esta investigación se encuentra por fuera del ámbito de la resolución 8430 de 1993. Así mismo, la investigación no amerita la toma de consentimiento informado.

El estudio fue llevado a cabo cumpliendo con las buenas prácticas de investigación, dentro del marco de los principios bioéticos. Los investigadores han completado los cursos de *Responsible Conduct of Research*. Se observó permanentemente la Declaración de Helsinki(20), la cual establece la investigación como base del progreso de la medicina. Particularmente, el estudio fue llevado a cabo por investigadores idóneos, con capacitación y experiencia para la realización del tipo de estudio propuesto. Los procedimientos propuestos en este protocolo se encuentran en concordancia con el estándar actual de ciencia y permiten responder la pregunta de investigación de manera óptima. Así mismo, la elección del tamaño de muestra de acuerdo con los criterios discutidos en la sección “Muestra”, buscó minimizar el impacto ambiental de la investigación, ya que se empleó la mínima cantidad de reactivos e insumos que permita responder la pregunta de investigación. La Declaración establece que “la investigación médica [...] sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo y los costos”(20). En este sentido, en el presente estudio no existió riesgo para pacientes o sujetos de investigación. En términos de costos, la inversión de tiempo y recursos en este proyecto está justificada dado que permitirá avanzar en el entendimiento de la fisiopatología de una enfermedad con una prevalencia muy alta en la población general, lo cual puede conducir a desarrollos que mejoren la calidad de vida de millones de personas afectadas por la enfermedad a nivel mundial. La racionalidad científica y social del estudio ha sido discutida previamente en las secciones “Planteamiento del problema de investigación” y “Justificación”. Todos los procedimientos descritos en el presente protocolo se realizaron en concordancia con los lineamientos de bioseguridad establecidos en los laboratorios de ciencia básica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Finalmente, los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés derivado de la presente investigación.

3.Resultados

Se obtuvieron nueve muestras de tarso cadavéricas. Inicialmente, se realizó tinción de hematoxilina y eosina en las secciones de tarso para evidenciar la histología normal de las glándulas de Meibomio (glándulas tarsales), su conducto excretor, así como las estructuras histológicas adyacentes, incluyendo el estroma y las glándulas serosas (correspondientes a glándulas lagrimales accesorias) (**Figura 3-1, Figura 3-2, Figura 3-3**).

Figura 3-1: Sección de tarso, tinción de hematoxilina y eosina, 10X. En A. las glándulas acinares compuestas serosas – glándulas lagrimales, B. las glándulas sebáceas (glándulas tarsales o de Meibomio) y C. el conducto excretor de las glándulas de Meibomio.

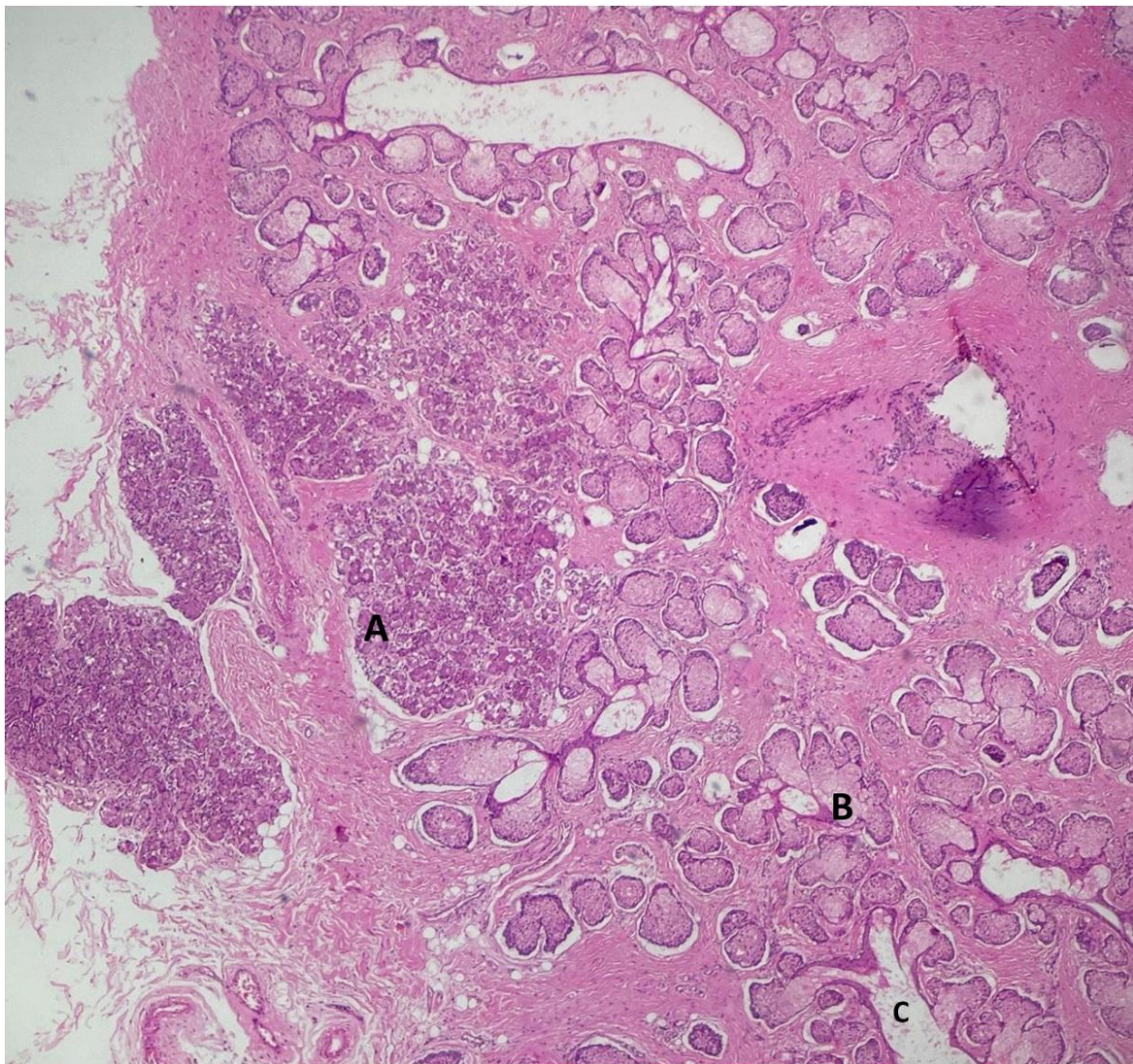


Figura 3-2: Sección de tarso, tinción de hematoxilina y eosina, 10X. Se observan las glándulas sebáceas tarsales con su conducto excretor dispuestas en un estroma de tejido conectivo denso irregular.

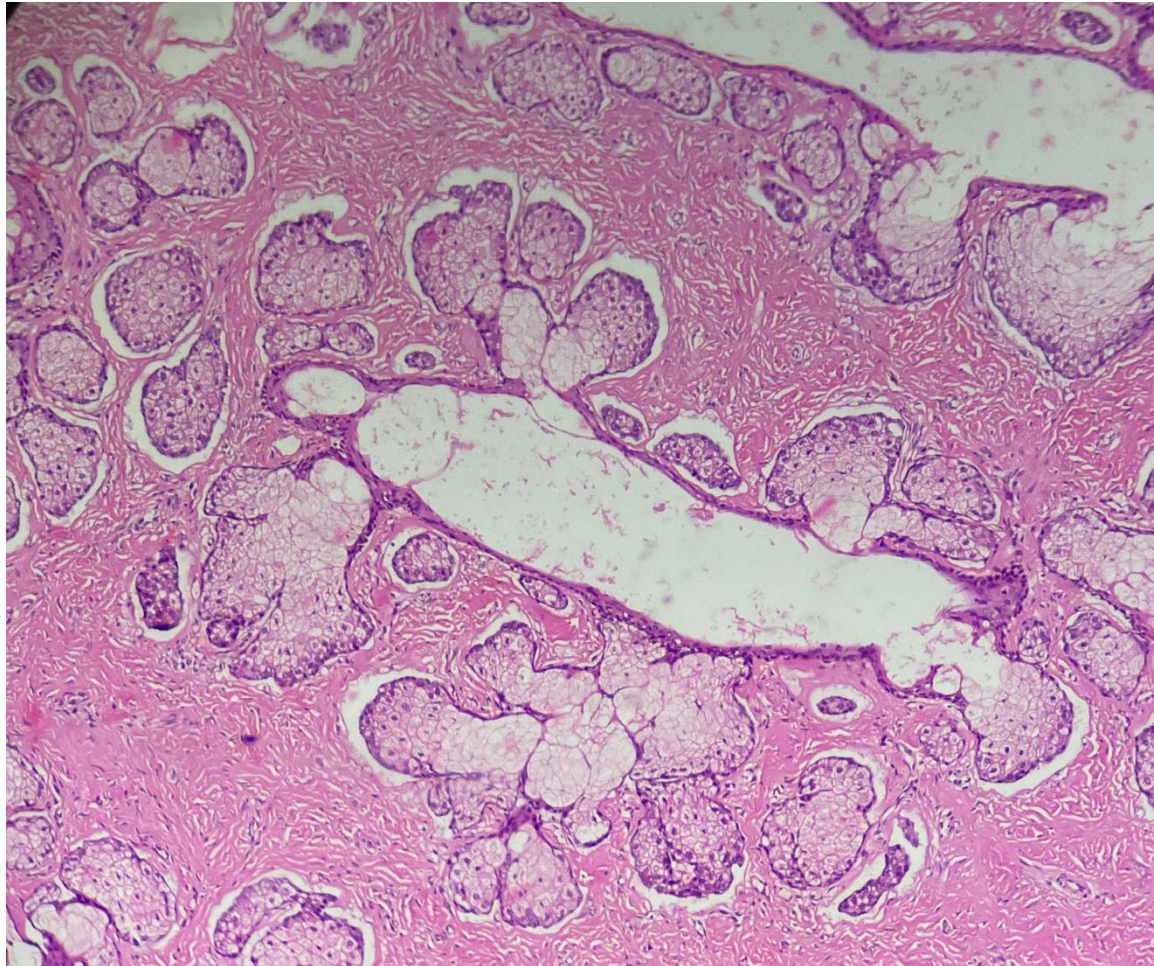
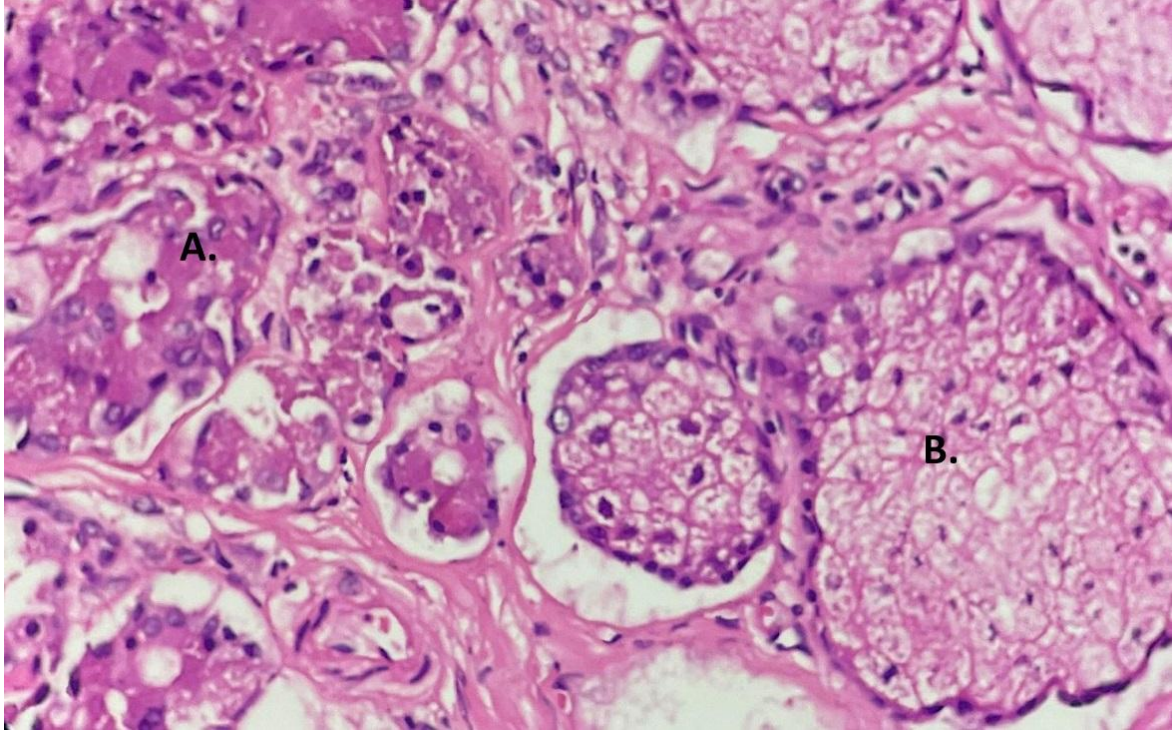


Figura 3-3: Sección de tarso, tinción de hematoxilina y eosina, 40X. En A. las glándulas con un contenido citoplasmático más eosinófilo que corresponde a la producción serosa, B. Glándulas de producción sebácea (g. tarsales), caracterizadas por un citoplasma más espumoso y amplio.



A continuación, se procedió a realizar el marcaje de las secciones de tarso mediante inmunohistoquímica, evidenciando los siguientes resultados (**Tabla 3-1**):

Para IGF1R, en glándulas de Meibomio, se evidenció marcaje ausente en 1 muestra, y marcaje tenue/débil en 8 de las nueve muestras; con patrón citoplásmico y/o nuclear (**Figura 3-4**). Respecto al control externo (cáncer de mama), el marcaje fue tenue/débil con patrón citoplasmático y en algunas muestras también patrón nuclear (**Figura 3-5**).

Para TSHR, en glándulas de Meibomio, se evidenció marcaje ausente en 1 muestra, tenue/débil en 1 muestra, marcaje moderado en 3 muestras, y marcaje fuerte en 4 muestras; con patrón citoplásmico y/o nuclear (**Figura 3-6, Figura 3-7**). Respecto al control externo (glándula tiroidea), el marcaje fuerte con patrón citoplasmático y en algunas muestras también patrón nuclear (**Figura 3-8**).

Tabla 3-1: Nivel y patrón de marcaje de los controles positivos externos y de las glándulas de Meibomio para los anticuerpos TSHR E IGF1R.

MUESTRA	ANTICUERPO	CONTROL EXTERNO ¹	GLÁNDULAS DE MEIBOMIO ¹
1	IGF1R	T/D - C	T/D - C
	TSHR	F - C	T/D - C
2	IGF1R	T/D - C	T/D - N
	TSHR	F - C	F - C, N
3	IGF1R	T/D - C focal	T/D - C, N, Membrana
	TSHR	F - C	F - C, N todo
4	IGF1R	T/D M - C, N	T/D - C, N focal
	TSHR	F - C	M - C, N
5	IGF1R	T/D - C	T/D - C, N
	TSHR	F - C	M - C, N
6	IGF1R	T/D - N focal	T/D - N, C
	TSHR	F - C	M - N, C
7	IGF1R	T/D - C, N	T/D - C, N focal
	TSHR	F - C, N	F - C, N
8	IGF1R	T/D - C, N	T/D - C, N
	TSHR	F - C, N	F - C, N
9	IGF1R	T/D - C, N	AUSENTE
	TSHR	F - C	AUSENTE

¹ **Convenciones:** T/D: Tenue/débil, M: Moderada, F: Fuerte, C: Citoplasmático, N: Nuclear.

Figura 3-4: Sección de tarso, inmunohistoquímica para IGF1R, 40X. Se observa una marcación granular débil citoplasmática (C) y focal nuclear (N) en las glándulas tarsales.

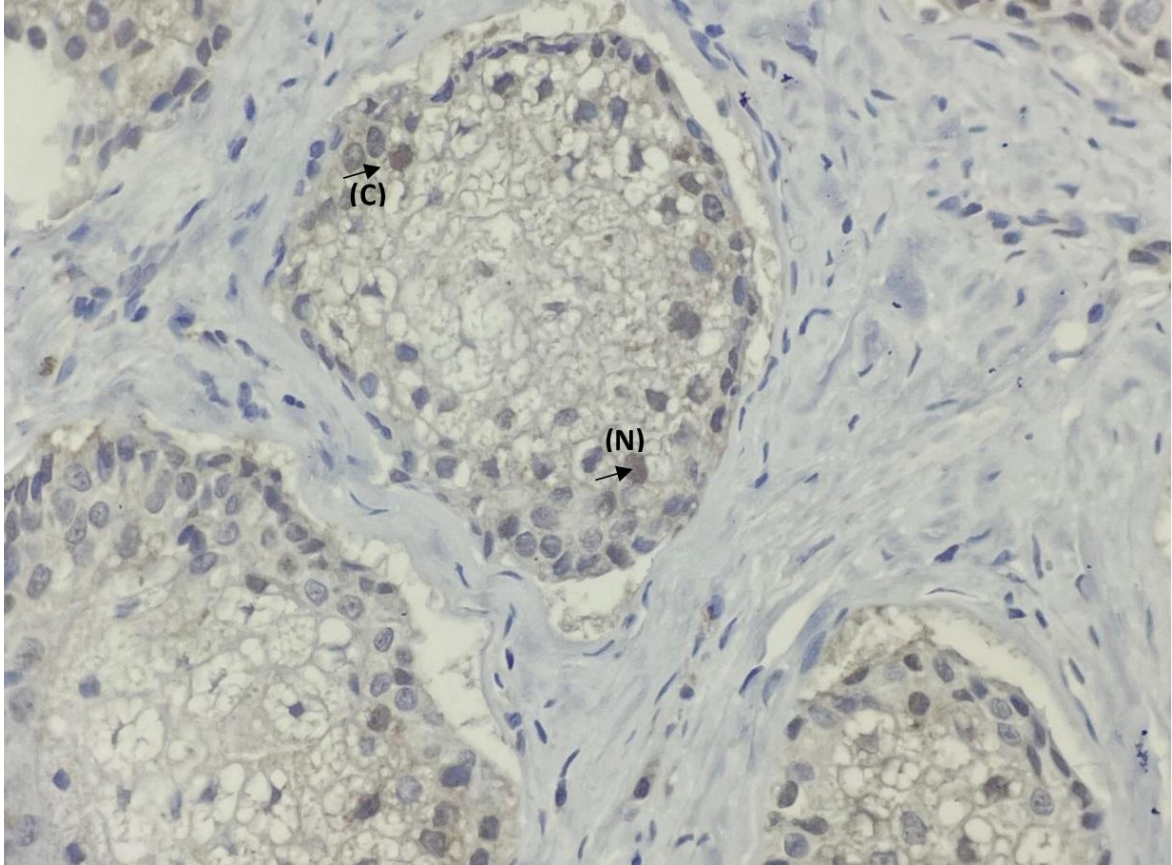


Figura 3-5: Sección de carcinoma de mama, inmunohistoquímica para IGF1R, 40X. Marcación citoplasmática y nuclear débil en las células neoplásicas con núcleos grandes e irregulares. Control negativo externo en linfocitos intersticiales.

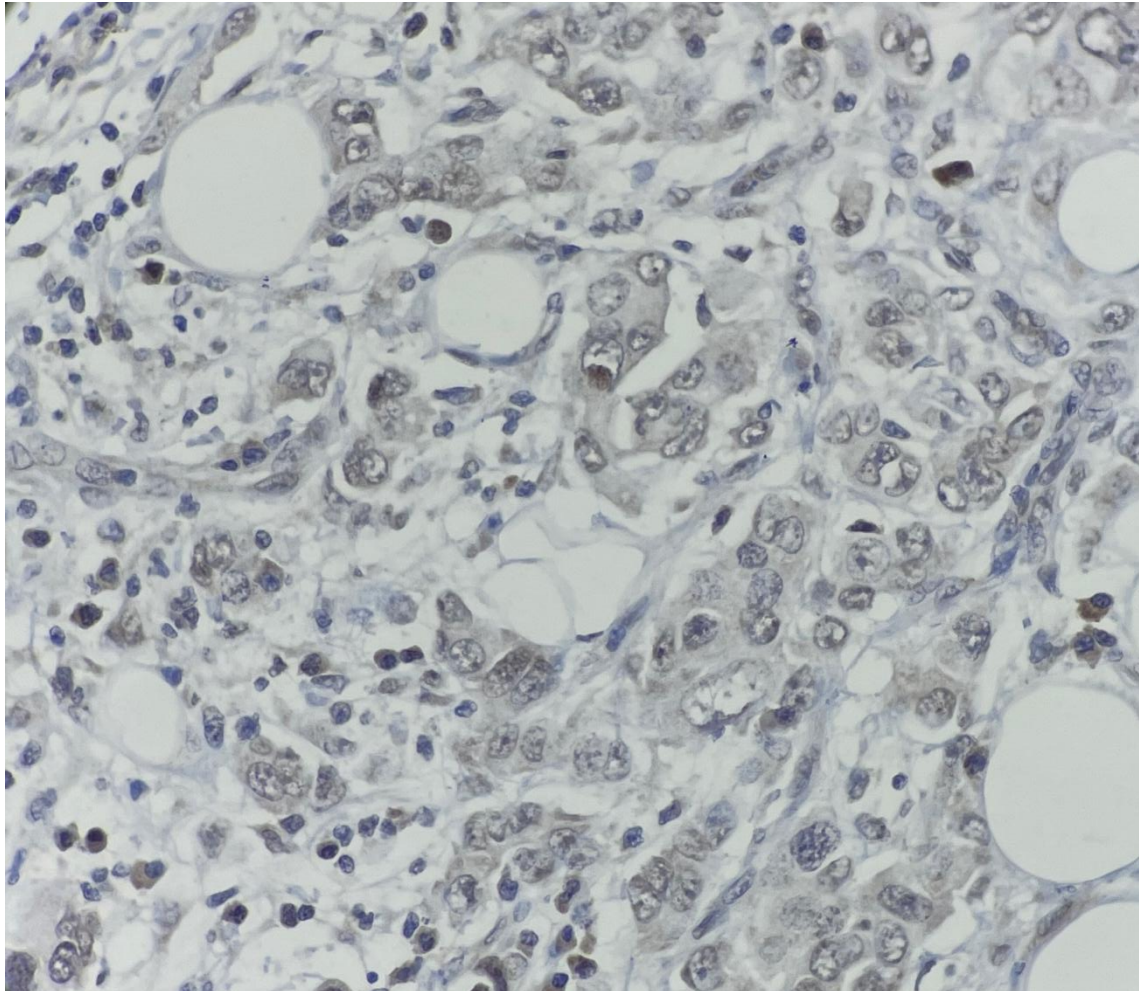


Figura 3-6: Sección de tarso, inmunohistoquímica para TSHR, 10X (A) y 40X (B). Se observó marcación nuclear intensa, citoplasmática granular, y de membrana en las glándulas tarsales.

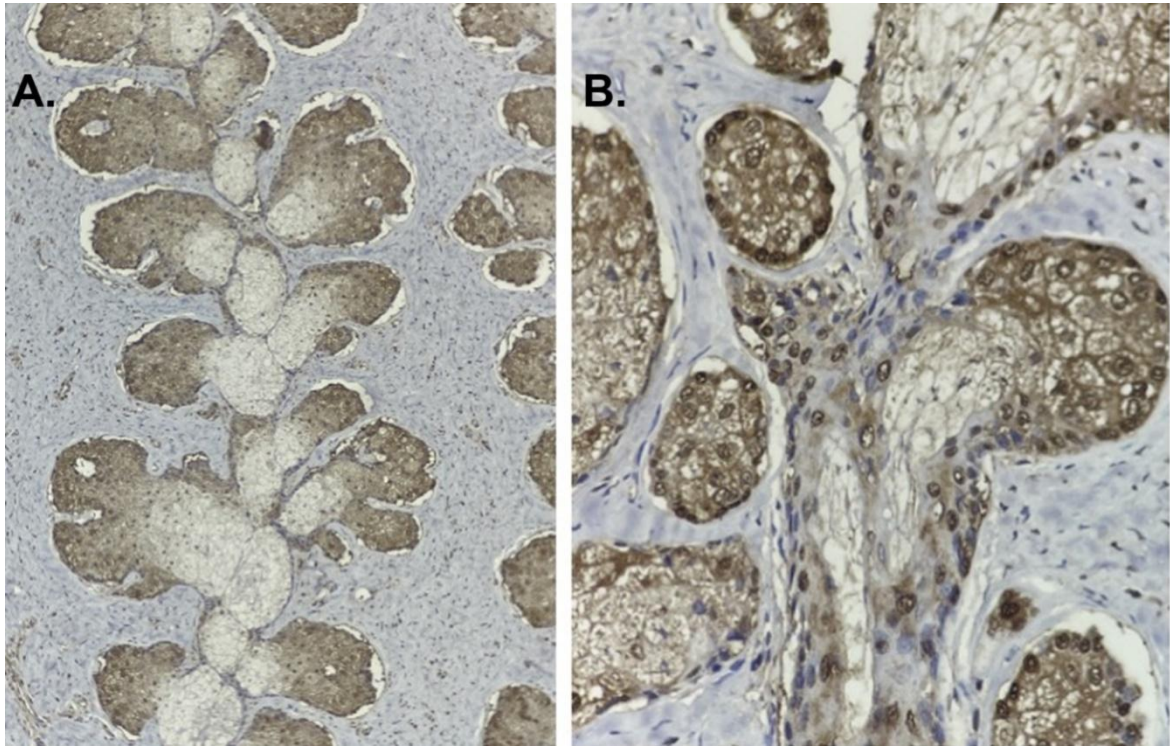


Figura 3-7: Sección de tarso, inmunohistoquímica para THSR, 40X. Se observa con mayor detalle la marcación nuclear intensa, citoplasmática granular, y de membrana en las glándulas tarsales.

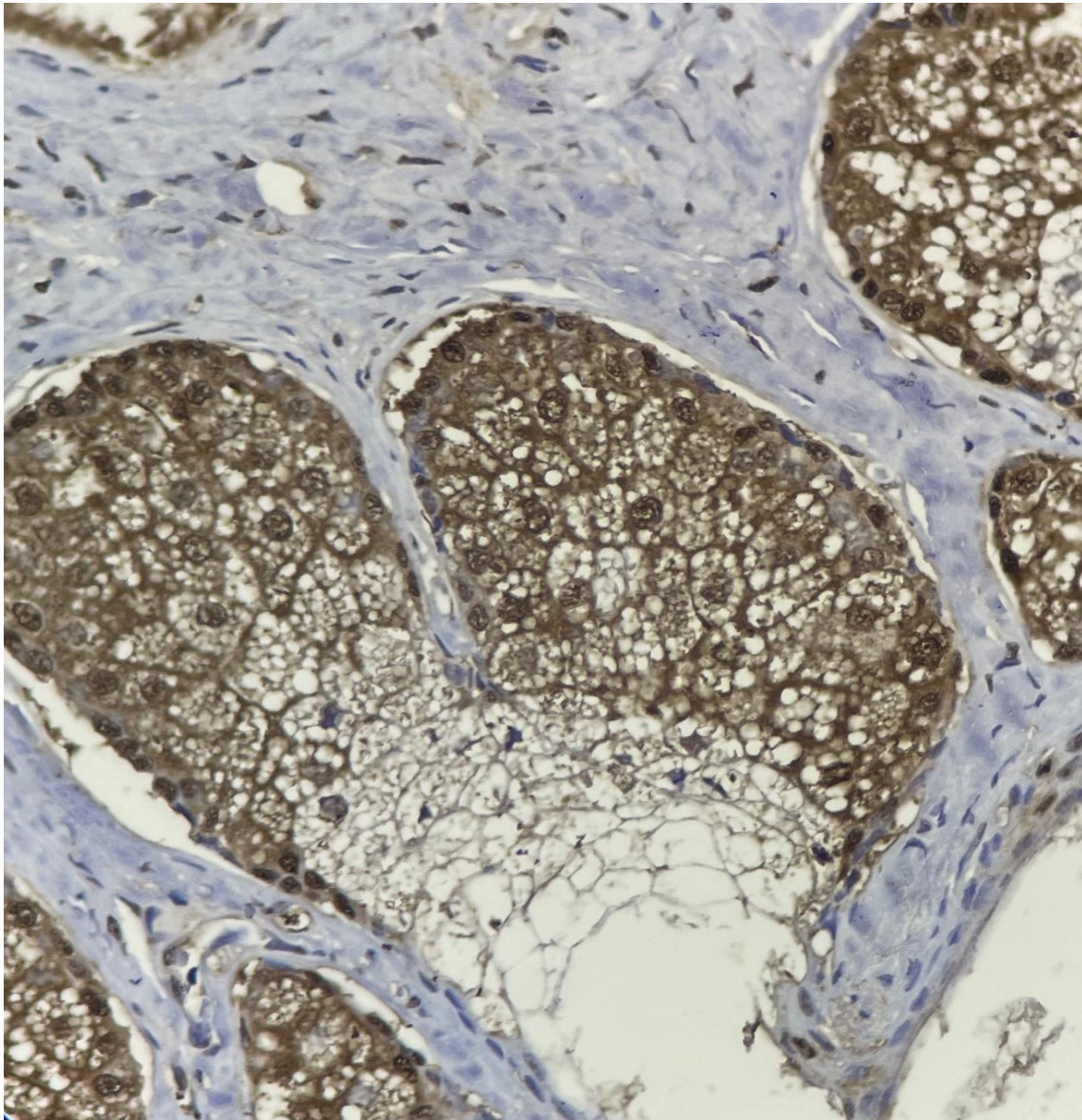
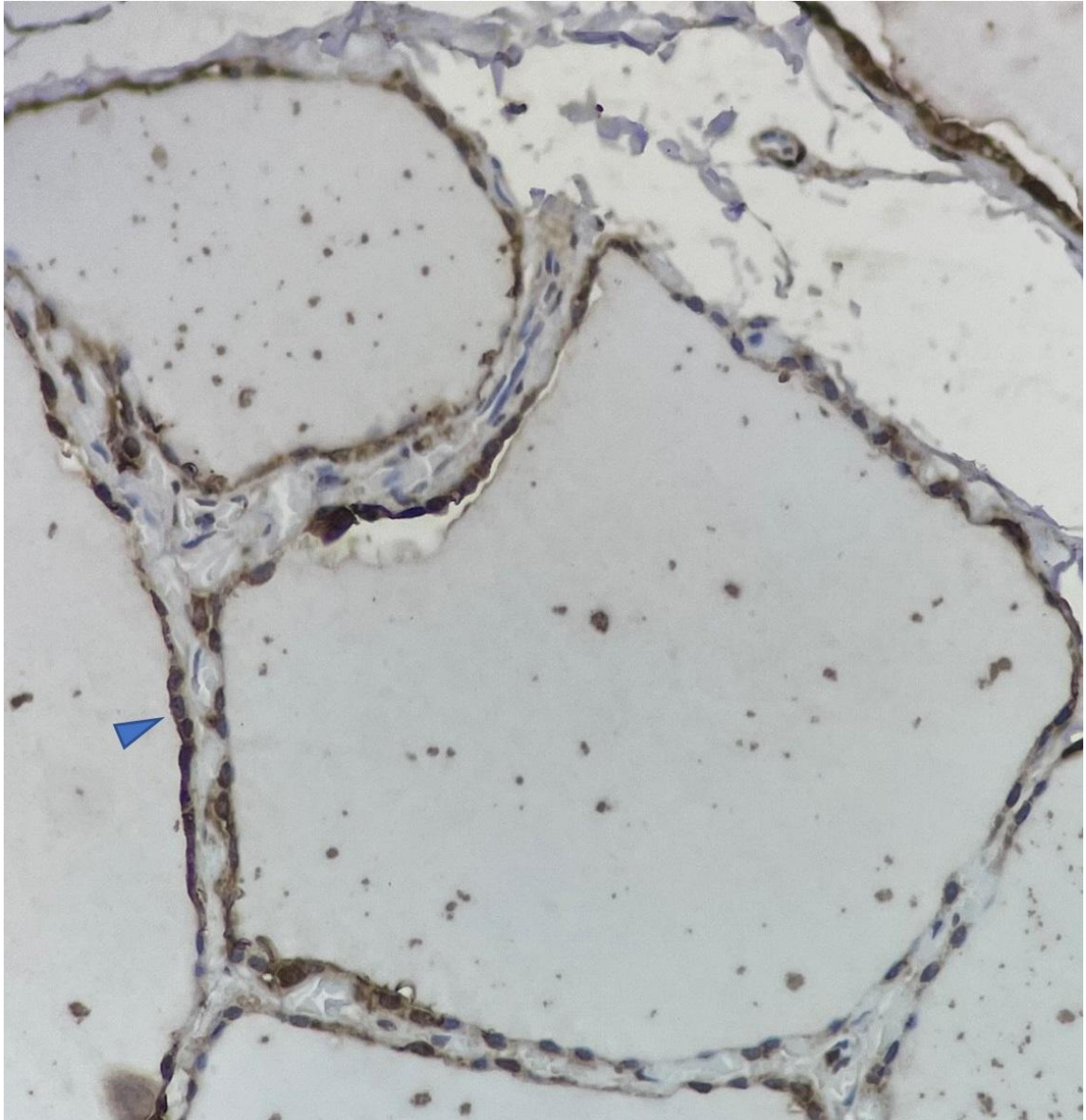


Figura 3-8: Sección de glándula tiroidea, inmunohistoquímica para TSHR, 10X. Marcación de membrana intensa (punta de flecha), la tinción al interior del coloide corresponde a artefactos del procesamiento.



4. Discusión

En el presente trabajo, evaluamos la presencia o ausencia de expresión de los receptores TSHR e IGF1R en glándulas tarsales (de Meibomio) humanas mediante inmunohistoquímica. Los resultados son altamente sugestivos de la presencia de expresión de TSHR e IGF1R de manera fisiológica en las glándulas de Meibomio humanas. En la medida de nuestro conocimiento, este es el primer estudio en evaluar la expresión de proteínas de la vía tiroidea, y en particular, de estas proteínas, en las glándulas de Meibomio humanas(11).

La expresión de TSHR e IGF1R ha sido demostrada previamente en los fibroblastos orbitarios(21), los cuales interactúan con los anticuerpos y las células T autorreactivas en la enfermedad de Graves. Así mismo, se conoce el efecto sinérgico de la activación simultánea cuando están presentes ambos receptores, lo cual, en los fibroblastos orbitarios, conlleva a un aumento de la secreción de hialuronato comparado con la activación de cada uno de los receptores de manera independiente(16,22). La expresión de ambos receptores en las células de las glándulas de Meibomio permitiría la activación simultánea de los mismos en la enfermedad de Graves, conllevando a un efecto sinérgico en las vías de señalización de estos receptores y en su efecto biológico, ya sea estimulatorio o inhibitorio.

Estudios previos demostraron la presencia de TSHR en otros componentes del sistema lagrimal, específicamente, en las glándulas lagrimales(23). Dado que la expresión de TSHR se encuentra estrechamente regulada, su presencia resalta la importancia fisiológica que podría tener, ya que es muy probable que las células que expresan TSHR se encuentren bajo el control metabólico de la tirotrópina y las vías hormonales tiroideas. Se ha planteado que la interacción patológica entre los autoanticuerpos y los receptores de TSHR en las células de la glándula lagrimal contribuiría a la disfunción de la glándula lagrimal en la enfermedad de Graves y al síndrome de ojo seco en estos pacientes(23). De manera similar, es posible que los autoanticuerpos contra TSHR contribuyan a la pérdida estructural y a la disfunción de las glándulas de Meibomio en pacientes con enfermedad ocular tiroidea(11).

Los resultados del presente estudio no son solamente relevantes en la enfermedad ocular tiroidea, sino que pueden tener implicaciones para pacientes con cualquier desbalance en la función tiroidea, e incluso para pacientes con síndrome de ojo seco y disfunción de glándulas de Meibomio de cualquier etiología. Numerosos estudios a nivel global demuestran que existe un mayor riesgo de tener síndrome de ojo seco en pacientes con enfermedad tiroidea(5). Nuestros resultados representan el primer paso hacia el estudio del rol de las vías tiroideas en la fisiología y regulación de las glándulas de Meibomio, lo cual en un futuro puede llevar a descubrir objetivos terapéuticos novedosos para la enfermedad de ojo seco mediante la modulación de las vías moleculares que alteran la función de las glándulas de Meibomio.

Dentro de las limitaciones del estudio, es pertinente mencionar que solo se analizó la expresión de TSHR e IGF1R mediante inmunohistoquímica. En el presente estudio, los ensayos de TSHR mostraron marcaje a nivel citoplásmico y también nuclear. De acuerdo con el Human Protein Atlas, el patrón de marcaje esperado es citoplasmático(24). En glándula lagrimal, se encontró marcación membranal y citoplasmática(23). Así mismo, estudios en diversos tejidos (endometrio, carcinoma de tiroides) reportan marcación para TSHR a nivel citoplasmático. Se ha reportado el marcaje nuclear y perinuclear en tejidos de pacientes con carcinoma hepatocelular(25). Sin embargo, dada la ausencia de respaldo en estudios previos sobre el mecanismo de transducción de señales a nivel nuclear en la mayoría de tejidos, estos resultados sugieren la necesidad de investigaciones adicionales sobre el receptor de TSH mediante técnicas de biología molecular alternativas que podrán ser importantes para confirmar de manera definitiva la expresión antigénica y comprender la biología del receptor en estas glándulas específicas.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Las glándulas de Meibomio humanas expresan, con alta probabilidad, receptores para la hormona estimulante de la tiroides (TSHR) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R).

Los resultados de este estudio permitirán entender mejor la fisiopatología del ojo seco en la enfermedad de Graves, avanzar en el entendimiento de la fisiología de la glándula de Meibomio, y plantear estudios futuros que permitan encontrar objetivos terapéuticos en pacientes con ojo seco y disfunción de glándulas de Meibomio.

5.2 Recomendaciones

Se sugiere complementar el presente estudio con pruebas moleculares para confirmar la expresión de los genes de TSHR e IGF1R en glándulas de Meibomio humanas.

Bibliografía

1. Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA. The international workshop on meibomian gland dysfunction: Report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(4):1938–78.
2. 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.
3. Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocular Surface*. 2017;15(3):438–510.
4. Call M, Fischesser K, Coulson-Thomas VJ, Zhang S, Kao WWY. Regulation of Meibomian Gland Formation and Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Jun 11;56(7):3199.
5. Galor A, Feuer W, Lee DJ, Florez H, Carter D, Pouyeh B, et al. Prevalence and risk factors of dry eye syndrome in a United States Veterans Affairs population. *Am J Ophthalmol*. 2011;152(3):377–84.
6. Selter JH, Gire AI, Sikder S. The relationship between Graves' ophthalmopathy and dry eye syndrome. *Clinical Ophthalmology*. 2014;9(31):57–62.
7. Inoue S, Kawashima M, Arita R, Kozaki A, Tsubota K. Investigation of meibomian gland function and dry eye disease in patients with graves' ophthalmopathy. *J Clin Med*. 2020;9(9):2814.
8. Park J, Kim J, Lee H, Park M, Baek S. Functional and structural evaluation of the meibomian gland using a LipiView interferometer in thyroid eye disease. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 2018;53(4).
9. Yılmaz Tuğan B, Özkan B. Evaluation of Meibomian Gland Loss and Ocular Surface Changes in Patients with Mild and Moderate-to-Severe Graves' Ophthalmopathy: Meibomian gland loss in Graves' Ophthalmopathy. *Semin Ophthalmol*. 2022;37(3):271–6.
10. Kim YS, Kwak AY, Lee SY, Yoon JS, Jang SY. Meibomian gland dysfunction in Graves' orbitopathy. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 2015;50(4):278–82.
11. Park J, Baek S. Dry eye syndrome in thyroid eye disease patients: The role of increased incomplete blinking and Meibomian gland loss. *Acta Ophthalmol*. 2019;97(5):e800–6.

12. Wang CY, Ho RW, Fang PC, Yu HJ, Chien CC, Hsiao CC, et al. The function and morphology of Meibomian glands in patients with thyroid eye disease: A preliminary study. *BMC Ophthalmol.* 2018;18(1):90.
13. Davies TF, Andersen S, Latif R, Nagayama Y, Barbesino G, Brito M, et al. Graves' disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2020;6(1):52.
14. Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: From adenomata to Graves disease. Vol. 115, *Journal of Clinical Investigation.* 2005. p. 1972–83.
15. Pritchard J, Han R, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ. Immunoglobulin Activation of T Cell Chemoattractant Expression in Fibroblasts from Patients with Graves' Disease Is Mediated Through the Insulin-Like Growth Factor I Receptor Pathway. *The Journal of Immunology.* 2003;170(12):6348–54.
16. Krieger CC, Neumann S, Place RF, Marcus-Samuels B, Gershengorn MC. Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2015;100(3):1071–7.
17. Schaumberg DA, Nichols JJ, Papas EB, Tong L, Uchino M, Nichols KK. The international workshop on meibomian gland dysfunction: Report of the subcommittee on the epidemiology of, and associated risk factors for, MGD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(4):1994–2005.
18. Obata H. Anatomy and histopathology of human meibomian gland. *Cornea.* 2002;21(7 SUPPL.):S70-4.
19. Crowe A, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio Protoc.* 2019;9(24):e3465.
20. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM– Principios Éticos Para Las Investigaciones Médicas En Seres Humanos [Internet]. 2017 [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
21. Shan SJC, Douglas RS. The pathophysiology of thyroid eye disease. *Journal of Neuro-Ophthalmology.* 2014;34(2):177–85.
22. Krieger CC, Neumann S, Gershengorn MC. Is there evidence for IGF1R-stimulating abs in graves' orbitopathy pathogenesis? *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):6561.
23. Eckstein AK, Finkenrath A, Heiligenhaus A, Renzing-Köhler K, Esser J, Krüger C, et al. Dry eye syndrome in thyroid-associated ophthalmopathy: Lacrimal expression

- of TSH receptor suggests involvement of TSHR-specific autoantibodies. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82(3 Pt 1):291–7.
24. The Human Protein Atlas. Tissue expression of TSHR [Internet]. [cited 2024 Oct 18]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165409-TSHR/tissue>
 25. Shih YL, Huang YH, Lin KH, Chu Y De, Yeh CT. Identification of functional thyroid stimulating hormone receptor and TSHR gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2018;38(5):2793–802.