

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL IMPLANTE DE CÉLULAS CALICIFORMES PROVENIENTES DE INJERTOS AUTÓLOGOS DE MUCOSA RECTAL EN CONJUNTIVA DE CONEJOS

Paulo Alves da Costa Pertuiset, MD¹
Federico Serrano Guerra, MD²
Rodrigo Acosta García, MD³
Stephanie Siegel Almendras, MD⁴
Fernando Mejía Villate, MD⁵
Lucila Martínez Salcedo⁶

Resumen

Objetivos: valorar la viabilidad de injertos autólogos de mucosa rectal, con el propósito de aumentar el recuento de células caliciformes en la superficie conjuntival de conejos sanos.

Materiales y métodos: estudio experimental en ocho ojos de siete conejos albinos, a los que se les practicó resección de mucosa rectal de 10 X 5.0 mm., la cual posteriormente se implantó sobre el lecho escleral, desprovisto de conjuntiva bulbar superior. Los ojos fueron enucleados en los días 30, 45, 60, 70 y 100 del postoperatorio, para su estudio histopatológico, evaluándose: a. Tiempo de evolución del injerto (días); b. Cambios por isquemia-atrofia del injerto, c. Reacción inflamatoria, d. Pérdida de células caliciformes en el injerto, y d. Metaplasia escamosa en el injerto.

Resultados: en la mayoría de los casos se observaron cambios isquémicos crónicos leves de la mucosa rectal injertada sin que se comprometiera la viabilidad del injerto.

Conclusión: los injertos de mucosa rectal en ojos de conejos sin patología ocular previa, son viables e inocuos para el tejido receptor a largo plazo. El comportamiento y la respuesta celular de distintos tipos de mucosa, en ojos con fibrosis subepitelial severa y desprovista de células caliciformes, aún debe ser evaluado.

Palabras clave: ojo seco, células caliciformes, injertos autólogos.

1 Residente de Oftalmología, Escuela Superior de Oftalmología, Instituto Barraquer de América (2003).

2 Oftalmólogo, Jefe Departamento de Cirugía Oculoplástica, Instituto Barraquer de América.

3 Médico Patólogo, Clínica del Country.

4 Cirujano Vascular Periférico, Hospital Militar Central de Bogotá.

5 Cirujano Vascular Periférico, Clínica Universitaria Teletón.

6 Instrumentadora Quirúrgica, Instituto Barraquer de América.

Abstract

Objective: to evaluate the feasibility of autologous rectal mucosal grafts in order to increase the number of goblet cells on the conjunctival surface of health rabbits.

Materials and Methods: experimental study on rabbits. Eight eyes of 7 albino rabbits were submitted to implantation of a 10 by 5 mm graft from the rectal mucosa on the superior bulbar conjunctiva. Eyes were enucleated 30, 45, 60, 70 and 100 days post-operatively. Histopathological studies were performed evaluating: a. survival of the graft (days) b. ischemic changes and/or graft atrophy c. inflammatory reaction d. loss of goblet cells from the graft and e. squamous cell metaplasia on the graft.

Resultados: in the majority of cases, mild chronic ischemic changes were observed without compromising the viability of the grafted tissue.

Conclusion: transplantation of rectal mucosa into the conjunctiva of health rabbit's eyes is feasible. Longterm tolerance by the receptor tissue was observed. Evaluation of the behavior and cellular response of various types of mucosal grafts in eyes with severe sub-epithelial fibrosis lacking goblet cells is still to be performed.

Key words: dry eye, goblet cells, autologous grafting.

Introducción

El papel de la capa mucosa y de las células caliciformes conjuntivales en la fisiología de la película lagrimal está claramente establecido¹⁻³. La deficiencia de células caliciformes causada por procesos patológicos como Síndrome de Sjögren, Síndrome de Steven Jonson, penfigoide cicatrizal, penfigoide buloso, pénfigo, pseudopenfigoide, dermatitis herpetiforme, tracoma, quemaduras por álcali y otros, ha sido demostrado histológica e inmunológicamente en varios estudios⁴⁻¹², acuñándose así el concepto de "ojo seco mucino deficiente"¹³⁻¹⁴. Se han propuesto diversos tratamientos para esta condición, tanto médicos¹⁵⁻¹⁷ como quirúrgicos, destacándose entre los últimos, injertos de conjuntiva (tanto autóloga como heteróloga)¹⁷⁻²⁰, injertos de mucosa de paladar duro^{17,21}, injertos de mucosa bucal^{17,22}, mucosa de seno maxilar¹⁷, mucosa nasal^{17,23}, injertos de membrana amniótica²⁴⁻²⁶ y tenoplastias²⁷. Los resultados reportados a largo

plazo, varían dependiendo del procedimiento realizado y de la patología de base²⁸⁻³⁰.

El objetivo de este trabajo es valorar la viabilidad de injertos autólogos de mucosa rectal, con el propósito de aumentar el recuento de células caliciformes en la superficie conjuntival de conejos sanos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio experimental en ocho ojos de siete conejos albinos, adultos, que pesaban entre 3,0 y 4,1 kilos, siguiendo los protocolos sugeridos por ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) para la manipulación de estos especímenes. Bajo anestesia general con Ketamina (6 mg/kg/IM) y Clorhidrato de Xylazina al 2% (1,5 ml/100 kg IM), se efectuó eversión de la mucosa rectal sobre la línea pectínea, colocando punto de tracción en la mucosa con Vicryl 4.0, seguido de mucosectomía de 10 X 5.0 mm y mucorrafia con puntos

continuos de Vicryl 4.0. Se preparó bajo microscopio quirúrgico el injerto de mucosa, separándola junto con la submucosa, de la capa muscular mediante disección roma con tijeras y pinzas. En un ojo del mismo conejo, bajo microscopio quirúrgico, se incide con cuchilla la conjuntiva bulbar superior, paralelamente al limbo y a 1 mm de éste en una extensión de 1 cm, rechazando hacia fondo de saco superior conjuntiva y tenon. Sobre el lecho escleral se deposita la plastia de mucosa rectal con su cara epitelial hacia arriba, fijándola con nueve puntos separados de Nylon 10-0, muco-escleroconjuntivales, los paralimbares y mucoconjuntivales los demás, con un punto de anclaje central (mucoso-escleral), dejando la superficie mucosa exteriorizada. Posterior al procedimiento se aplicó una gota de ofloxacina (colirio) en el ojo intervenido quirúrgicamente. Las suturas fueron retiradas bajo anestesia tópica (proparacaína al 0,5%) al décimo día postoperatorio. Se realizó registro fotográfico de la plastia en los días 4, 10, 30, 40, 70 y 90, del postoperatorio.

Los animales fueron sacrificados bajo anestesia general (siguiendo protocolo previamente citado) y los ojos intervenidos fueron enucleados en los días 30, 45, 60, 70 y 100 del postoperatorio.

Los ojos enucleados se fijaron en formalina al 4% bufferizada con pH 7 y se practicaron cortes seriados cada tres milímetros a lo largo de toda su extensión. Los cortes se orientaron con tinta china y se incluyeron en Paraplast®. Una vez incluidos en parafina se realizaron cortes seriados de 4 micras y se montaron en láminas portaobjetos, las cuales se tiñeron con coloraciones hematoxilina-eosina y Alcian blue a un pH de 2.5.

Para la evaluación se consideraron y calificaron los siguientes aspectos: a. Tiempo de evolución del injerto (días); b. Cambios por isquemia-atrofia del injerto (severa =3, moderada =2, leve =1, ausente =0); c. Reacción inflamatoria (severa =3, moderada =2, leve =1, ausente =0); d. Pérdida de células caliciformes en el injerto (severa =3, moderada =2, leve =1, ausente =0),

e. Metaplasia escamosa en el injerto (severa =3, moderada =2, leve =1, ausente =0).

Resultados

En los ocho casos realizados no se presentaron complicaciones intraoperatorias así como tampoco en el período postoperatorio hasta el sacrificio de los especímenes. Destaca el hecho de que ninguno de los casos presentó conjuntivitis o escleritis durante el estudio. La producción de mucina proveniente de la plastia fue más abundante entre el quinto y el vigésimo día del postoperatorio (Figuras 1 y 2) después de lo cual aparentemente disminuye la producción macroscópica de mucina (Figura 3).

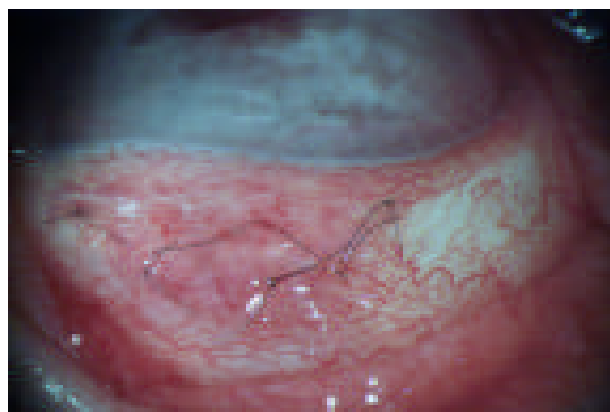


Figura 1. Caso N° 3. Plastia al cuarto día posoperatorio.



Figura 2. Caso N° 3: Plastia al décimo día posoperatorio. Destaca la abundante producción de moco por parte de la plastia.



Figura 3. Caso N° 3: Plastia a los 60 días posoperatorios. Destaca excelente integración del injerto en la superficie receptora. Ausencia macroscópica de moco.

El examen bajo lámpara de hendidura en el postoperatorio tardío de todos los casos demostró una excelente integración del injerto a la superficie ocular.

En el examen microscópico se evaluaron las siguientes variables: tiempo de evolución, cambios de la plastia por isquemia, reacción inflamatoria, pérdida de células caliciformes y metaplasia escamosa, las cuales se resumen en la tabla. En la mayoría de los casos se observaron cambios isquémicos crónicos leves de la mucosa rectal injertada sin que se comprometiera la viabilidad del injerto (Figuras 4 y 5). También

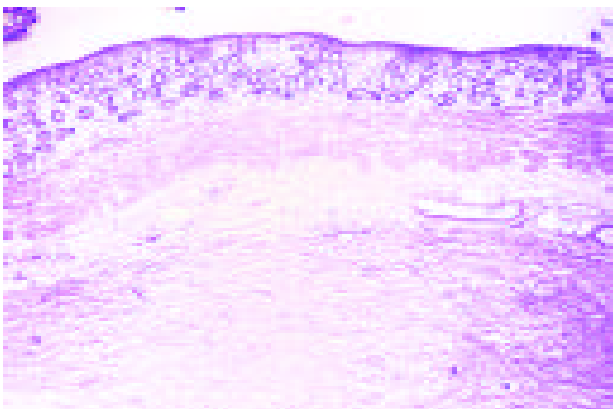


Figura 4. Caso N° 7: Injerto viable de mucosa y muscular colónica en la esclera. No se observa inflamación ni metaplasia escamosa de las criptas. Hay preservación de las células mucoproducidas. (H y E, 40 aumentos).

se observó metaplasia escamosa focal del epitelio foveolar y de las criptas del injerto con la consecuente reducción de la población de células mucoproducidas; sin embargo, en la mayoría de los casos se trata de un fenómeno focal que no compromete más del 20% de la mucosa injertada (Figura 6). Destacan los resultados desfavorables observados en el caso N° 2, en el cual la plastia fue suturada por error, con su cara epitelial hacia abajo.

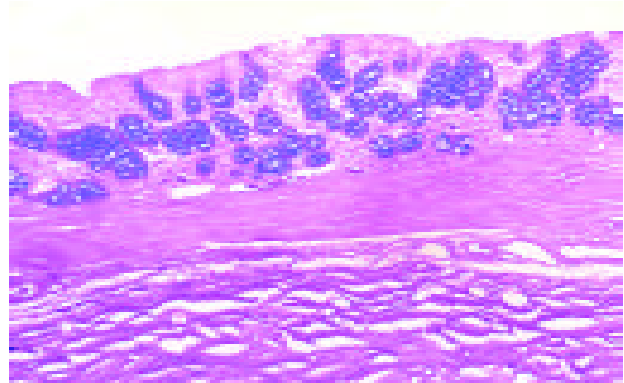


Figura 5. Caso N° 3: Coloración de Alcian blue positiva en el citoplasma de las células mucoproducidas del injerto, demostrando la presencia de moco intracitosplasmático. (AB, 100 aumentos).

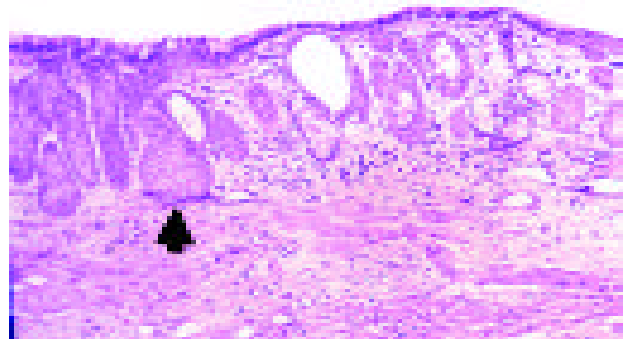


Figura 6. Caso N° 5: Injerto con metaplasia escamosa que reemplaza focalmente el epitelio mucoproducido de las criptas. Se anota, sin embargo, persistencia de células mucoproducidas, con una densidad poblacional mayor que en la conjuntiva normal (H y E, 100 aumentos).

Resultados de análisis histopatológico de las plastias según tiempo de evolución

Caso	Tiempo/Días	Cambios por isquemia	Reacción inflamatoria	Pérdida de células caliciformes	Metaplasia escamosa
1	100	2	0	3	0
2	70	3	2	3	1
3	70	1	0	1	0
4	60	1	1	1	1
5	60	1	1	2	2
6	45	1	1	2	2
7	45	0	0	0	0
8	30	1	0	0	1

Discusión

La superficie ocular es un medio ambiente complejo y dinámico que cumple con el importante papel de mantener una adecuada interfase aire-película lagrimal, la cual es básica para el adecuado funcionamiento y mantenimiento de la transparencia corneal. Las propiedades refractivas, lubricantes y de protección de la película lagrimal están dadas por el delicado equilibrio existente entre sus componentes, los cuales son producidos por diferentes tipos celulares³¹. La capa más interna de la película está compuesta por mucinas, glicoproteínas de alto peso molecular secretadas por células caliciformes y no caliciformes del epitelio corneal y conjuntival^{2, 32-34} siendo una de sus principales funciones brindar estabilidad a la película lagrimal⁶⁻³⁴. Hasta la fecha, se han identificado¹⁷ genes humanos responsables de la codificación de mucinas (MUC 1-4, 5AC, 5B y MUC 6-17), nombrados según el orden en el cual eran clonadas^{2, 32-33, 35-39}. Bioquímicamente, se clasifican a partir de su porción protéica en secretadas o de transmembrana. A su vez, las mucinas secretadas, se subclasifican en solubles y en formadoras de gel. La capa mucosa de la película lagrimal (mucina formadora de gel, producida por células caliciformes de la

conjuntiva) se esparce sobre el glicocalix que contiene mucina derivada del epitelio corneal y conjuntival (mucina de transmembrana)^{2, 35}. En la superficie ocular de humanos, se han identificado mRNA correspondientes a las MUC 1, MUC 2, MUC 4, MUC 5AC, MUC 7, MUC 13, MUC 15, MUC 16 y MUC 17³⁶⁻³⁹. MUC 1, MUC 4, MUC 13, MUC 15, MUC 16 y MUC 17 son mucinas de transmembrana y son producidas por el epitelio corneal y conjuntival^{35, 37, 39}. MUC 2 y MUC 5 AC son mucinas solubles, formadoras de gel, la primera producida por el epitelio de córnea y conjuntiva y la segunda por células caliciformes de la conjuntiva^{2, 38}. La contribución relativa de cada una de estas mucinas a la manutención y un adecuado funcionamiento de la superficie ocular, aún debe ser esclarecido², al igual que el impacto que diversos procesos patológicos, puedan tener sobre su síntesis y metabolismo^{1, 4, 6, 8-9, 12, 39}.

Los tratamientos más recientes para casos de ojo seco severo contemplan la reconstrucción de la superficie ocular dañada mediante diversas técnicas quirúrgicas⁴⁰⁻⁴¹, al igual que fármacos estimulantes de la producción de mucina³¹. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos incrementa el número de células caliciformes, aunque algunos autores han logrado aumentar levemente la densidad de células caliciformes con soluciones electrolíticas de uso tópico, pero su eficacia aún debe ser establecida⁴²⁻⁴³. A través de la técnica propuesta por nosotros, se logró la

implantación exitosa de un gran número de células caliciformes, las cuales permanecieron viables y presentaron escasa metaplasia escamosa durante todo el estudio. Los cambios por isquemia en grados moderados a severos que se obtuvieron en los primeros casos, son atribuibles a inadecuada manipulación del injerto, lo cual se superó con el perfeccionamiento de la técnica quirúrgica a través de la curva de aprendizaje en los casos subsecuentes (ver tabla). Aunque la pérdida de células caliciformes fue moderada a severa en cuatro de los ocho casos, la microscopía demostró una densidad poblacional de células caliciformes evidentemente mayor que en la conjuntiva normal (Figura 6). En los ocho especímenes operados, se logró realizar la técnica sin dificultad y sin complicaciones intra o postoperatorias. Se destaca el hecho de que ningún caso presentó conjuntivitis en el postoperatorio. La producción macroscópica de moco se inició al tercer día postoperatorio y se mantuvo por un plazo de 20 días disminuyendo progresivamente su producción, hasta estabilizarse, sin producir inflamación a los tejidos receptores. Esto puede explicarse por factores mecánicos (roce palpebral sobre la mucosa injertada) o estimulación hormonal residual de sustancias mucossecretoras colónicas remanentes en el injerto. Observamos, además, que a largo plazo el injerto fue integrado al tejido receptor sin respuesta inflamatoria importante. Esto se debe a que se trata de un injerto autólogo, por lo que hay reacción de rechazo a cuerpo extraño, sin necesidad de usar terapias de inmunosupresión.

En relación a la mucosa de colon donante, cabe destacar que la producción de MUC 5 AC se realiza en situaciones patológicas y que esta mucosa en humanos normalmente produce MUC 1, MUC 2, MUC 3 y MUC 4⁴⁴. Sin embargo, es abundantemente producida por la mucosa gástrica en humanos⁴⁵⁻⁴⁶, siendo esta mucosa un extenso y accesible (vía endoscópica) reservorio de células mucoproducidas de MUC 5 AC. El

comportamiento de la mucosa gástrica y colónica en la superficie ocular aún debe ser evaluado en modelos animales al igual que la respuesta celular de distintos tipos de mucosa en ojos con fibrosis subepitelial severa y desprovista de células caliciformes. Pensamos que el futuro desarrollo de esta técnica puede mejorar la calidad de vida de algunos de nuestros pacientes, eventualmente aumentar la sobrevida de trasplantes heterólogos de limbo o mejorar la superficie ocular para el implante de queratoprótesis.

Agradecimientos

Dra. Juanita Carvajal Puyana, MD, Dr. Alejandro Arciniegas Castilla, MD, Dra. Carmen Barraquer Coll, MD, Sr. Alberto Pinilla Mendoza y al Directorio del Instituto Barraquer de América.

Referencias

1. Kinoshita S, Kiorpes T, Firend J, Thoft R. Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 1284-1287.
2. Watanabe H. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea* 2002; 21(Suppl. 1): S17-S22.
3. Holly FJ, Lemp MA. Wettability and wetting of corneal epithelium. *Exp Eye Res* 1971; 11: 239-250.
4. Nelson JD, Wright J. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 1049-1051.
5. Ralph R. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Invest Ophthalmol* 1975; 14: 299-302.
6. Pflugfelder S, Tseng S, Yoshino K, Monroy D, Felix C, Reis B. Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose Bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology* 1997; 104: 223-235.
7. Blodi BA, Byrne KA, Tabbara KF. Goblet cell population among patients with inactive trachoma. *Int Ophthalmol* 1988; 12: 41-45.

8. Argüeso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann H, Dana R, Jipson I. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1004-1011.
9. Tseng S, Hirst L, Maumenee E, Kenyon K, Sun T, Green R. Possible mechanisms for the loss goblet cells in mucin-deficient disorders. *Ophthalmology* 1984; 91: 545-552.
10. Friend J, Kiorpes T, Thoft A. Conjunctival goblet cell frequency after alkali injury is not accurately reflected by aqueous tear mucin content. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 612-618.
11. Abdel-Khalek L, Williamson J, Lee W. Morphological changes in the human conjunctival epithelium II in keratoconjunctivitis sicca. *Br J Ophthalmol* 1978; 62: 800-806.
12. Danjo Y, Watanabe H, Tisdale A, y cols. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 2602-2609.
13. Lemp MA, Dohlman C, Holly F. Corneal desiccation despite normal tear volume. *Annals of Ophthalmology* 1970; 2(3): 258-261, 284.
14. Lemp MA, Dohlman CH, Kuwabara T, Holly FJ, Carroll JM. Dry eye secondary to mucus deficiency. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1971; 75: 1223-1227.
15. Brent D, Karcioğlu Z. Effect of topical corticosteroids on goblet cell density in an alkali burn model. *Ann Ophthalmol* 1991; 23: 221-223.
16. Calonge M. The treatment of dry eye. *Surv ophthalmol* 2001; 45(Supple. 2): S227-S239.
17. Chiou A, Florakis J, Kazim M. Management of conjunctival cicatrizing disease in severe ocular surface dysfunction. *Surv Ophthalmol* 1998; 43: 19-46.
18. Herman W, Doughman D, Lindstrom R. Conjunctival autograft transplantation for unilateral ocular surface disease. *Ophthalmology* 1983; 90: 1121-1126.
19. Vastine DW, Stewart W, Schwab I. Reconstruction of the periocular mucous membrane by autologous conjunctival transplantation. *Ophthalmology* 1982; 89: 1072-1081.
20. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S, y cols. Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995; 102: 1020-1025.
21. Mannor G, Mathers W, Wolfley D, Martinez A. Hard palate mucosa graft in Stevens Johnson Syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 1994; 118: 786-791.
22. Shore J, Foster C, Westfall C, Rubin P. Results of buccal mucosal grafting for patients with medically controlled ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1992; 99: 383-395.
23. Naumann G, Lang G, Rummelt W, Wigand M. Autologous nasal mucosa transplantation in severe bilateral conjunctival mucus deficiency syndrome. *Ophthalmology* 1990; 97: 1011-1017.
24. Shimazaki J, Yang H, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997; 104: 2068-2076.
25. Barabino S, Rolando M, Bentivoglio G, y cols. Role of amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction in ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 2003; 110: 474-480.
26. Batmanov IuE, Egorova KS, Kolesnikova LN: Use of fresh amnion in the treatment of corneal diseases. *Invest Ophthalmol* 1990; 106(5): 17-19.
27. Kuckelkorn R, Redbrake C, Reim M. Tenoplasty: A New surgical approach for the treatment of severe eye burns. *Ophthalmic Surgery and Lasers* 1997; 28: 105-110.
28. Wenkel H, Rummelt V, Naumann G. Long term results after autologous nasal mucosal transplantation in severe mucus deficiency syndromes. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 279-284.
29. Tsai R, Sun T, Tseng S. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 1990; 97: 446-455.
30. Heiligenhaus A, Shore J, Rubin P, Foster C. Long term results of mucous membrane grafting in ocular cicatricial pemphigoid: implications for patient selection and surgical considerations. *Ophthalmology* 1993; 100: 1283-1288.

31. Jumblatt J, Cunningham L, Lee Y, Jumblatt M. Characterization of Human Ocular Mucin Secretion Mediated by 15(S)-HETE. *Cornea* 2002; 21(8): 818-824.
32. Zhao H, Jumblatt M, Wood T. Quantification of MUC5AC Protein in human tears. *Cornea* 2001; 20(8): 873-877.
33. Shatos M, Rios J, Tepavcevic W, Kano H, Hodges R, Dartt D. Isolation, Characterization and Propagation of Rat Conjunctival Goblet Cells in Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(7): 1455-1464.
34. Greiner J, Henriquez A, Covington H, Weidman T, Allansmith M. Goblet Cells of the human conjunctiva. *Arch Ophthalmol* 1981; 99: 2190-2197.
35. Langer G, Jagla W, Bebrems-Baumann W, Watter S, Hoffmann W. Secretory Peptides TFF1 and TFF3 Synthesized in Human Conjunctival Goblet Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2220-2224.
36. Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 1818-1827.
37. Pflugfelder SC, Liu Z, Monroy D, y cols. Detection of sialomucin complex MUC4 in human ocular surface epithelium and tear fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 1316-1326.
38. McKenzie RW, Jumblatt JE, Jumblatt MM. Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 703-708.
39. Corrales RM; Galarreta DJ, Herreras JM, Calonge M, Chavez FJ. Expresión de los genes de mucinas MUC13, MUC15, MUC16 y MUC17 en el epitelio conjuntival normal humano in vivo. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2003; 78: 375-382.
40. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Subuta K. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002; 109: 1285-1290.
41. Luca I, Sheraz D. Long-term outcomes of keratolimbal allografts for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002; 109: 1278-1284.
42. Gilbard J, Rossi SR. An electrolyte-based solution that increases corneal glycogen and conjunctival goblet cell density in a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology* 1992; 99: 600-604.
43. Gilbard JP. Dry eye: pharmacological approaches, effects, and progress. *CLAO J*. 1996; 22(2): 141-145.
44. Buisine M, Janin A, Maunoury V, y cols. Aberrant Expression of a Human Mucin Gene (MUC5AC) in Rectosigmoid Villous Adenoma. *Gastroenterology* 1996; 110: 84-91.
45. Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin M, Gosselin B, Aubert JP. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1479-1485.
46. Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester P, y cols. Coordinated localization of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000; 47: 792-800.