

**2013-2014**



**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**Máster en Subespecialidades**

**Oftalmológicas**



# **Validación externa de un modelo de predicción de síndrome de ojo seco asociado a enfermedad injerto contra huésped**

**Lidia Cocho Archiles**

**DIRECTORES:**

**Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro**

**Dra. María Jesús González García**

**Trabajo de investigación incluido dentro del proyecto:  
“Biomarcadores Moleculares y Dianas Terapéuticas en Inflamación de la superficie Ocular”**

I.P. Dra. Amalia Enríquez de Salamanca aladro. Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, dentro del programa de ayudas de Proyectos de investigación fundamental no orientada. SAF 2010,





UniversidaddeValiadoUd





# TABLA DE CONTENIDOS

1. ABREVIATURAS .....	5
2. RESUMEN DEL PROYECTO.....	6
3. INTRODUCCIÓN .....	8
4. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Diseño.....	14
5.2 Aspectos Éticos.....	14
5.3 Muestra .....	14
5.4 Test Clínicos.....	16
5.5 Análisis de expresión génica.....	22
5.6 Análisis de citoquinas/quimioquinas.....	23
5.7 Análisis estadístico .....	25
6. RESULTADOS	
6.1 Descripción de la muestra .....	27
6.2 Análisis de expresión génica diferencial.....	28
6.3 Validación del modelo.....	29
6.4 Análisis de citoquinas/ quimioquinas.....	31
7. DISCUSIÓN .....	35
7.1 Limitaciones del estudio .....	
8. CONCLUSIONES.....	41
9. BIBLIOGRAFÍA .....	32
10. ANEXOS.....	46

## 1. ABREVIATURAS

**ADNc:** ADN Complementario

**AUC:** Área Bajo la Curva

**APC:** Células Presentadoras de Antígeno

**CIC:** Citología de Impresión Conjuntival

**EICH:** Enfermedad de Injerto Contra Huésped

**EGF:** Factor de Crecimiento Epitelial

**HGF:** Factor de Crecimiento de Hepatocitos

**HLA:** Antígeno Leucocitario Humano

**IFN:** Interferón

**IL:** Interleuquina

**ONT:** Organización Nacional de Trasplantes

**OSDI:** *Ocular Surface Disease Index*

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**SOS:** Síndrome de Ojo Seco

**SS:** Síndrome de Sjögren

**T-BUT:** Tiempo de Ruptura Lagrimal

**TPH:** Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**VEGF:** Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

## 2. RESUMEN DEL PROYECTO

**OBJETIVO:** Realizar la validación externa de un modelo ajustado de predicción de SOS asociado a EICH basado en la expresión de 5 genes (IFN- $\gamma$ , EGFR, CCL18, TNFSF4 e IL-9) en epitelio conjuntival. Analizar, además, la expresión diferencial de 84 genes de citoquinas en epitelio conjuntival y determinar los niveles en lágrima citoquinas y quimioquinas en estos pacientes con SOS asociado a EICH y sujetos sanos para su comparación con los datos obtenidos anteriormente.

**MÉTODOS:** Se evaluaron 12 pacientes con SOS asociado a EICH y 11 controles sanos (edad y género comparable). Los pacientes se encontraban controlados medicamente suspendieron sus tratamientos tópicos una semana antes del estudio, que se realizó en una cámara de ambiente controlado. Se evaluó clínicamente a los pacientes, se recogieron muestras de lágrima, y se realizó una CIC para la recolección de células epiteliales de conjuntiva bulbar superior. Se estudió la expresión diferencial de 84 genes de moléculas inflamatorias mediante qRT2-PCR en la células epiteliales conjuntivales, y se determinaron en lágrima los niveles de EGF, IL-1RA, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IP-10/CXCL10, eotaxina 1/CCL11, IFN- $\gamma$ , VEGF, TNF- $\alpha$ , RANTES/ CCL5 y Fractalquina con un ensayo multianalito en un Luminex IS-100. Se realizó la validación externa del modelo de predicción y se compararon los resultados con los obtenidos en un estudio previo

**RESULTADOS:** La expresión de 15 genes se vio incrementada significativamente, y de otros 5 rozando la significación, mientras que 2 de ellos mostraron menor expresión respecto a los controles. El modelo de predicción se validó y demostró tener una alta precisión, la curva ROC obtuvo un AUC de 0.9, con sensibilidad del 100% y especificidad de 80% a la hora de clasificar nuevos casos de SOS asociado a EICH. Todas las citoquinas fueron detectadas en lágrima. La concentración de EGF e IL-17 fue menor en pacientes, mientras que la de IL-10, IL-1RA, IL-6 e IL-8 estaba aumentada respecto a los controles.

**CONCLUSIONES:** En este estudio se confirma la validez del modelo de predicción diseñado a partir de la expresión de un panel de 5 genes en epitelio conjuntival bulbar. Además, proporciona más información sobre los mecanismos etiopatogénicos del SOS asociado a EICH, observándose diferencias en la concentración de citoquinas en lágrima y la expresión génica en epitelio conjuntival.

### 3. INTRODUCCIÓN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) es usado en nuestro medio desde 1960, y desde entonces ha evolucionado rápidamente, convirtiéndose en la piedra angular del tratamiento de enfermedades hematológicas tanto malignas como no malignas (1). En el mundo se realizan actualmente más de 30.000 TPH al año, mientras que en nuestro país fueron 2699 los trasplantes realizados durante el año 2012 (2).

Sin embargo, los pacientes sometidos a TPH pueden desarrollar diversas complicaciones, entre ellas la Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH), que constituye hoy en día la primera causa de morbilidad y mortalidad en sujetos trasplantados. El EICH está causado por la respuesta inmune orquestada por las células inmunocompetentes del injerto y dirigida frente a los tejidos del donante (3).

En función de las manifestaciones clínicas, el EICH se puede clasificar como agudo o crónico. El EICH agudo comprende a) aquel que ocurre en los cien primeros días después del trasplante sin signos de formas crónicas (agudo clásico); b) el tipo persistente; c) el tipo recurrente; d) el agudo tardío, que se manifiesta a partir de los cien días con signos agudos. Por el contrario, el EICH crónico comprende a) el tipo crónico clásico, cuando ocurre pasados cien días del trasplante y sin características del tipo agudo, y b) el síndrome de solapamiento, cuando aparecen juntos signos de ambos tipos, agudo y crónico (4).

La forma aguda de EICH aparece en aproximadamente un 40% de los pacientes trasplantados con Antígeno Leucocitario Humano (HLA) compatible, afectando principalmente a la piel, tracto gastrointestinal e hígado. Por otro lado, entre un 30 y un 70% de los pacientes llegan a desarrollar formas crónicas de EICH (1,5). Las manifestaciones clínicas de este tipo de EICH se asemejan a las colagenopatías sistémicas, pudiéndose presentar en forma de dermatitis, queratoconjuntivitis, alteraciones hepáticas y bronquiales y síndrome de malabsorción, entre otros.

En ambas formas es posible la afectación ocular. Las complicaciones oftalmológicas más frecuentes en pacientes que sufren EICH agudo son la conjuntivitis pseudomembranosa y la conjuntivitis aguda hemorrágica, que se evidencian en un 12-

17% de los pacientes (6). Sin embargo, la afectación ocular es mucho más frecuente en EICH crónico, ya que se ha visto que entre un 13-80% tienen afectación ocular; y hasta un 60 - 90% de estos pacientes desarrollan síndrome de ojo seco (SOS) (7). El SOS asociado a EICH es principalmente de tipo acuodeficiente, similar al síndrome de Sjögren (SS). A nivel histológico se aprecia destrucción inmune de los acinos y conductos de la glándula lagrimal y de la conjuntiva, con intensa fibrosis, lo que resulta en una producción lagrimal deficiente, que con mucha frecuencia asocia una profunda alteración de las glándulas de Meibomio y, por tanto, un componente de ojo seco evaporativo (8).

Los signos y síntomas de la afectación oftalmológica en pacientes con EICH crónico pueden parecer los de un SOS típico, pero puede ser muy severo y difícil de controlar, produciendo alteraciones importantes de la superficie ocular que afectan seriamente a la calidad de vida del paciente, e incluso pueden amenazar la visión y la integridad del globo ocular.

En 2005 el test de Schirmer fue propuesto como el test diagnóstico principal para el SOS asociado a EICH (4). Sin embargo, en 2007 el subcomité para el diagnóstico de la enfermedad de ojo seco del *International Dry Eye Workshop* (9), reconoció la ausencia de pruebas objetivas y validadas para el diagnóstico del SOS, y actualmente, continúa la controversia acerca de si este debería recaer sobre las pruebas clínicas o sobre test más objetivos creados gracias a las nuevas tecnologías como los biomarcadores moleculares.

Ya que el SOS ha sido ya definido como una patología inflamatoria de forma cierta (10), se están buscando mediadores inflamatorios como posibles biomarcadores de SOS en general y en el asociado a EICH en particular. Hasta el momento diversos grupos de investigación han descrito ya cambios en citoquinas, quimioquinas y otras moléculas en lágrima y conjuntiva de pacientes con SOS (11-15).

En el caso del EICH, existe también un interés creciente en la identificación de moléculas que pudieran estar específicamente involucradas en la patogénesis de esta enfermedad, como demuestran numerosos estudios realizados tanto a nivel sistémico (16, 17, 18) como ocular, donde se han encontrado niveles elevados en lágrima de IFN-

y e IL-6 (19), así como una expresión génica incrementada de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCR3 en epitelio conjuntival de estos pacientes (20).

En un estudio anterior llevado a cabo en nuestro grupo, en que se realizó un estudio de potenciales biomarcadores para el SOS asociado al EICH, se analizó la concentración en lágrima y la expresión diferencial de sus genes a nivel de células del epitelio conjuntival de un panel de mediadores inflamatorios, comparándose con un grupo control de individuos sanos. Los resultados obtenidos en dicho estudio mostraron un aumento de niveles en lágrima de IFN- $\gamma$  e IL-12p70 y un descenso de EGF, IL-2 y CXCL10 de manera estadísticamente significativa en los pacientes EICH. Por otro lado, al analizar la expresión genética, 34 de los 84 genes estudiados se encontraron diferencialmente más expresados en los sujetos con SOS, entre ellos IFN- $\gamma$ , CCL18, IL-9 y CCL2 tuvieron una expresión incrementada en más de 15 veces. En cambio, EGFR se halló 3.36 veces menos expresado que en controles.

Partiendo de estos datos se elaboró, mediante un método estadístico de análisis discriminante, un modelo predictivo para la clasificación de los sujetos SOS asociado a EICH/no SOS asociado a EICH, a partir de la expresión génica. Este modelo se basó en la expresión de 5 genes, IFN- $\gamma$ , EGFR, CCL18, TNFSF4 e IL-9, determinándose que la expresión conjunta de estos 5 genes posee un poder discriminante para predecir la enfermedad > al 80%. La calidad del modelo como clasificador se comprobó mediante una validación interna con el mismo grupo de pacientes y controles, obteniéndose la curva ROC. El área bajo la curva (AUC) fue de 0.732, entendiendo que un modelo es un clasificador perfecto cuando el ABC es 1 y totalmente aleatorio cuando es 0.5. A su vez, la sensibilidad del modelo fue del 64.29%, y su especificidad fue del 71.43%.

Estos resultados hablan a favor de que el modelo elaborado sea un buen clasificador, pero la validación interna es una herramienta limitada, ya que se apoya en los mismos individuos usados para crear el modelo.

Por todo ello, el objetivo de este estudio es obtener una validación externa del modelo elaborado, obteniendo un nuevo grupo de casos de pacientes con SOS asociado a EICH y sujetos sanos, y a través de la expresión diferencial de genes de moléculas

inflamatorias en la conjuntiva, comprobar si se mantiene la calidad del modelo clasificador, y ajustarlo en caso de que no sea así.

## 4. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1 JUSTIFICACIÓN

El SOS asociado a EICH es una de las manifestaciones más frecuentes e incapacitantes de esta enfermedad en su variante crónica. Esta patología puede dar lugar a severas alteraciones de la superficie ocular, afectar mucho a la calidad de vida de estos pacientes y además es potencialmente invalidante, ya que puede resultar en una pérdida total de la agudeza visual del paciente. Sin embargo, aún hoy en día, no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de esta afectación a nivel ocular, ni se cuenta con método fiable y objetivo de diagnóstico, basándose este en un conjunto de pruebas clínicas con baja sensibilidad, especificidad y repetitividad. Por todo ello existe un creciente interés en la identificación de biomarcadores a nivel de la superficie ocular y en la creación de modelos predictivos de esta enfermedad que trasladados a la clínica deriven en un diagnóstico más temprano y un tratamiento eficaz de estos pacientes.

En base a la expresión génica de moléculas inflamatorias analizadas en pacientes con SOS asociado a EICH se estableció un modelo predictivo, que conforme a los datos que se obtuvieron de la validación interna, tenía un 64.29% de sensibilidad, y un 71.43% de especificidad, con un valor de AUC de 0.7.

Para asegurar la fiabilidad de dicho modelo es necesario validarlo con una nueva muestra, que confirme dichos datos o que en su defecto nos ayude a afinarlo.

## **4.2 HIPÓTESIS**

Es posible clasificar a pacientes nuevos con el diagnóstico de SOS asociado a EICH siguiendo el modelo previamente ajustado de predicción, basado en la expresión diferencial de un grupo de 5 genes de moléculas inflamatorias en el epitelio conjuntival bulbar.

## **4.3 OBJETIVOS**

### **4.3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Realizar la validación externa de un modelo ajustado de predicción de SOS asociado a EICH.

### **4.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Análisis de la expresión de 84 genes de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y sus receptores en epitelio conjuntival de pacientes con SOS asociado a EICH y en sujetos sanos.
2. Clasificación de los nuevos individuos atendiendo a la expresión de los genes de IFN- $\gamma$ , EGFR, CCL18, TNFSF4 e IL-9 en casos y controles de la enfermedad.
3. Identificación y determinación de los niveles en lágrima de EGF, eotaxina1, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IP-10/CXCL10, RANTES, TNF- $\alpha$  y VEGF en pacientes con SOS secundario a EICH y en sujetos sanos y comparación con los datos obtenidos anteriormente.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. DISEÑO**

Se trata de un estudio analítico, observacional tipo casos-controles.

### **5.2. ASPECTOS ÉTICOS**

Este trabajo fue aprobado tanto por la comisión de investigación del IOBA como por el Comité ético del Hospital Clínico de Valladolid (Anexos I y II), y se llevó a cabo siguiendo las normas de Buena Práctica Clínica, la Declaración de Helsinki sobre estudios clínicos y lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm. 298, de 14-12-1999, pp. 43088-43099). Además se cumplió la normativa que regula el almacenamiento de muestras humanas recogida en la Ley 14/2007, RD 223/2004 sobre investigación con muestras humanas en investigación biomédica, así como en el Real Decreto 1716/2011 de 18 de noviembre.

Todos los sujetos que formaron parte del estudio firmaron un consentimiento informado (Anexo III) y fueron libres de interrumpir su participación en el estudio en cualquier momento.

### **5.3. MUESTRA**

Se incluyó un grupo de pacientes con diagnóstico de SOS asociado a EICH de entre los que acuden a la consulta de inmunología ocular del IOBA, Universidad de Valladolid, y derivados de la consulta de hematología del Hospital Clínico de Salamanca.

Con el fin de que los resultados no se vieran influenciados por la medicación tópica, así como por otras situaciones, en la medida de lo posible, los criterios de inclusión y exclusión intentaron asegurar la estabilidad de los pacientes, lo que llevó a la exclusión de las formas más graves.

Se incluyó además un grupo de sujetos sanos (controlados en edad y sexo según grupo de pacientes) como grupo control.

### **Criterios de inclusión del grupo de pacientes**

- Hombres o mujeres de edad comprendida entre 18 y 75 años.
- Pacientes remitidos con diagnóstico confirmado de EICH crónico.
- Pacientes con diagnóstico de SOS en el contexto de EICH crónico.
- Pacientes en los que sea posible la retirada de medicación tópica durante una semana a juicio del oftalmólogo.
- Valores alterados de al menos tres de los siguientes test diagnósticos de ojo seco:
  - Test de OSDI con una puntuación  $\geq 12$ .
  - T-BUT  $< 10$  segundos.
  - Tinción corneal con fluoresceína  $\geq 1$  (escala de Oxford).
  - Tinción conjuntival con verde de Lisamina  $\geq 1$  (escala de Oxford).
  - Test de Schirmer sin anestesia  $< 5$  mm en 5 min.

### **Criterios de exclusión del grupo de pacientes**

- Pacientes que no hayan suspendido su tratamiento tópico con inmunomoduladores, corticoides, AINES u otra medicación tópica diferente de lágrimas artificiales, una semana previa a la toma de muestra.
- Uso de lentes de contacto en los 3 meses anteriores a este estudio.
- Cualquier patología ocular activa, excepto SOS y patologías asociadas a esta enfermedad.
- Cualquier cirugía ocular 6 meses antes del estudio.
- Pacientes que no estén de acuerdo en participar en el estudio o en firmar el consentimiento informado.

### **Criterios de inclusión grupo control**

- Hombres o mujeres en el mismo rango de edad y con la misma distribución en género que el grupo de pacientes reclutado, de modo que ambos grupos sean comparables en edad y género.

- Personas sin patología oftalmológica activa, sin síntomas ni signos de enfermedad inflamatoria de la superficie ocular.
- Valores normales en al menos tres de las siguientes pruebas de superficie ocular:
  - Test de OSDI con una puntuación <12.
  - T-BUT  $\geq$  10 segundos.
  - Tinción con fluoresceína corneal  $\leq$  1 (escala Oxford).
  - Tinción con verde de Lisamina en conjuntiva  $\leq$  1(escala Oxford).
  - Test de Schirmer sin anestesia  $\geq$  5mm en 5 min.

#### **Criterios de exclusión del grupo control**

- Sujetos con alguna enfermedad ocular activa.
- Sujetos con cirugía ocular previa en los últimos 6 meses.
- Sujetos que estén bajo tratamiento ocular tópico.
- Usuarios de lentes de contacto.

#### **5.4. TEST CLÍNICOS**

Tanto la toma de muestras como la valoración de parámetros clínicos de los pacientes se llevó a cabo en una cámara de ambiente controlado (CerLab, Visión I+D) bajo condiciones estándares de humedad relativa (45%), presión atmosférica (930 – 940 mbar), y temperatura (23º C). Tanto los pacientes como los controles permanecieron en dicha cámara durante 20 minutos antes de la evaluación clínica y la toma de las muestras, tiempo que se aprovechó para la entrega y firma del consentimiento informado y la valoración de la sintomatología.

La secuencia de realización de las diferentes pruebas y evaluaciones siguió el orden que se relata a continuación.

### 5.4.1 Sintomatología de ojo seco

La sintomatología de ojo seco fue evaluada utilizando la versión española homologada del test OSDI (Ocular Surface Disease Index), que incluye 12 preguntas, cada una con valoración de 0 a 4; para hallar el resultado se aplica la siguiente ecuación ( \_\_\_\_\_ ), siendo el máximo valor de este test de 100 puntos (Figura 1).

VERSIÓN ESPAÑOLA HOMOLOGADA DEL "OCULAR SURFACE DISEASE INDEX" (OSDI).

**¿Ha experimentado algunos de los siguientes síntomas durante la pasada semana?**

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)
1. Ojos sensibles a la luz					
2. Sensación de tener arena en los ojos					
3. Ojos doloridos (dolor/escozor)					
4. Visión Borrosa					
5. Mala Visión					

**¿Los problemas con sus ojos le han limitado a la hora de realizar alguna de las siguientes actividades durante la pasada semana?**

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)	No procede
6. Lectura.						
7. Conducir de noche						
8. Usar un ordenador o un cajero automático						
9. Ver la televisión						

**¿Ha sentido molestias en los ojos en alguna de las siguientes situaciones, durante la pasada semana?**

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	Mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)	No procede
10. Cuando hacía viento						
11. En lugares con una humedad baja (muy secos)						
12. En lugares con aire acondicionado						

**Figura 1.** Versión española homologada del *Ocular Surface Disease Index* (OSDI). (Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. Arch Ophthalmol. 2000 May;118(5):615-21).

#### 5.4.2 Recolección de muestra de lágrima

El siguiente procedimiento realizado fue la recolección de la muestra de lágrima para el posterior análisis de las citoquinas/quimioquinas. Las muestras fueron tomadas del ojo con mayor sintomatología en el grupo de pacientes, mientras que en el grupo control así como en casos en que la sintomatología era similar en ambos ojos, la elección del ojo se realizó al azar, siguiendo para ello una tabla de aleatorización.

La recogida de la muestra de lagrima se hizo antes de la instilación de cualquier colorante, con el fin de evitar posibles interferencias posteriores con estos en su análisis.

Se recogió 1  $\mu\text{l}$  de lágrima basal en el grupo de pacientes, mientras que fueron 4  $\mu\text{l}$  en el grupo control. Todas las muestras se recogieron mediante capilaridad del canto externo del ojo, de forma no traumática, a fin de producir la menor secreción refleja posible. Se empleó un capilar de vidrio de 1 o 4  $\mu\text{l}$  (Drumond Scientific Co, VW International USA) (Figura 2).



**Figura 2.** Método de recogida de lágrima mediante capilar de vidrio

Las muestras recogidas se depositaron en tubos estériles conteniendo bien 9  $\mu\text{l}$  de *Cytokine Assay Buffer* (Millipore, Watford, UK) para las muestras de pacientes (dilución final de la muestra: 1/10), o 16  $\mu\text{l}$  para las muestras de controles (dilución final de la muestra: 1/5), y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que terminó la evaluación del paciente. Posteriormente se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### 5.4.3 Medida de hiperemia conjuntival

Seguidamente, se realizó la evaluación de la superficie ocular con lámpara de hendidura, donde se valoró la hiperemia de la conjuntiva bulbar, utilizando para su gradación la escala de Nathan Efron (escala subjetiva de 0 a 4), (Figura 3).



Enrojecimiento conjuntival	
Clasificación	Descripción
<b>0 Normal</b>	Conjuntiva bulbar blanca Un vaso más grande Cornea transparente
<b>1 Indicios</b>	Leve aumento del enrojecimiento conjuntival Vasos grandes más ingurgitados
<b>2 Leve</b>	Mayor aumento del enrojecimiento conjuntival Enrojecimiento límbico Leve inyección ciliar
<b>3 Moderado</b>	Conjuntiva muy enrojecida Mayor enrojecimiento límbico Inyección ciliar
<b>4 Grave</b>	Enrojecimiento conjuntival extremo Limbo muy enrojecido Inyección ciliar intensa Reflujo en los vasos grandes

**Figura 3.** Escala de Nathan Efron para la valoración de la hiperemia conjuntival. (Efron N, Morgan PB, Jagpal R. Validation of computer morphs for grading contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2002;22(4):341-9).

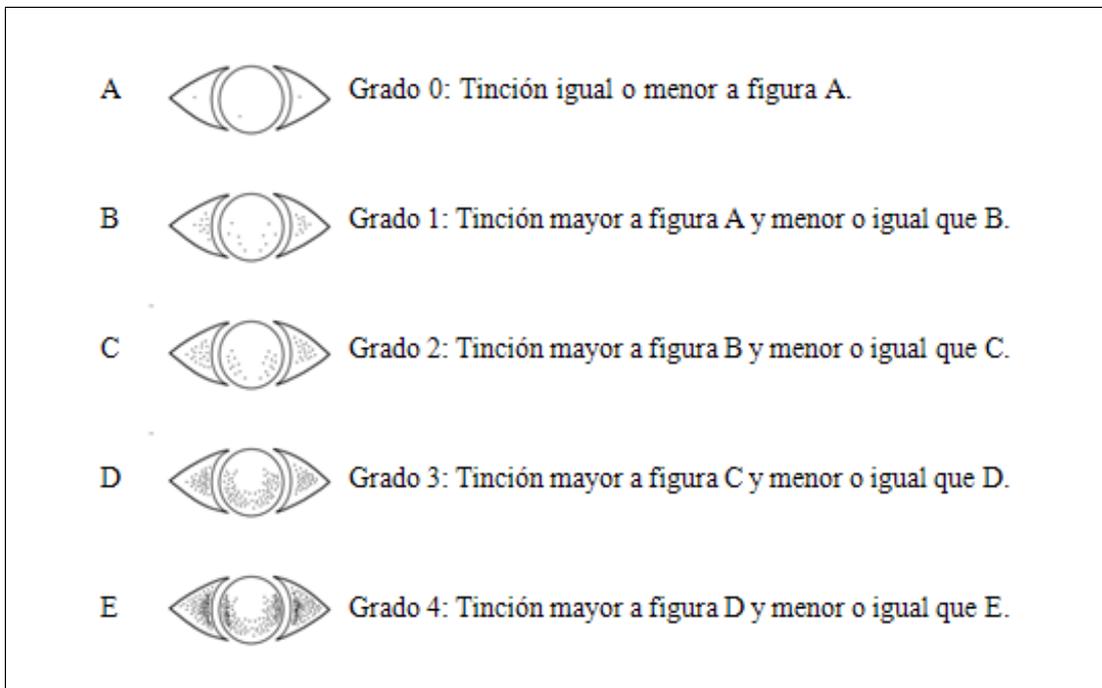
### 5.4.4 Medida de estabilidad lagrimal

Se evaluó la estabilidad de la película lagrimal mediante la medida del *Tear Break-Up Time* (T-BUT) o tiempo de ruptura lagrimal. Para ello se instilaron 5 µl de fluoresceína sódica al 2% con una pipeta en el fondo de saco inferior, y se evaluó con lámpara de hendidura con 10x de aumento, bajo iluminación de azul de cobalto y a través del filtro amarillo Wratten #12; se anotó en segundos el intervalo de tiempo entre el último de

tres parpadeos y la aparición del primer punto negro (discontinuidad de la tinción con fluoresceína). Se realizaron tres medidas, considerándose la media de ellas el valor final.

#### 5.4.5 Tinciones corneal y conjuntival

Tras dos minutos de haber instilado la fluoresceína, se evaluó la integridad corneal examinando la superficie ocular mediante lámpara de hendidura con un objetivo de 16x y a través del filtro azul cobalto y del filtro amarillo Wratten #12 y , utilizando para su evaluación la escala de Oxford, con gradación de 0 a 5 (Figura 4).



**Figura 4.** Escala Oxford para la evaluación de tinción corneal con fluoresceína y tinción conjuntival con verde de Lisamina (Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea*. 2003;22(7):640-50).

A su vez, la integridad de la conjuntiva bulbar se valoró mediante la tinción con verde de Lisamina. Se instilaron 25  $\mu$ l de suero fisiológico mediante una pipeta sobre una tira de verde de Lisamina (GreenGlo; HUB Pharmaceuticals, LLC, Rancho Cucamonga, CA ), humedeciéndola y a continuación se aplicó una gota en el fondo de saco conjuntival inferior. A los dos minutos se evaluó en lámpara de hendidura la conjuntiva, usando para ello la escala de Oxford, con gradación de 0 a 5 (Figura 4).

#### 5.4.6 Medida de la producción lagrimal

La evaluación de la producción lagrimal basal se realizó mediante el test de Schirmer sin anestesia o tipo I. Para ello, se insertó una tira de Schirmer (Tearflo, HUB Pharmaceuticals, LLC, Rancho Cucamonga, CA, EEUU) en el canto externo del margen palpebral; el paciente permaneció cinco minutos con los ojos cerrados, tras los cuales la tira fue retirada y se anotó en milímetros la porción de la tira humedecida con lágrima, considerándose patológico un valor inferior a 5 mm en 5 minutos.

#### 5.4.7 Citología de impresión conjuntival

Se recogió una muestra de células epiteliales conjuntivales mediante citología de impresión conjuntival (CIC) (Figura 5). Previamente a la toma de muestra de la CIC, se realizó un lavado de la superficie ocular con suero fisiológico al 0.9% y se dejó el ojo en reposo durante diez minutos, con el fin de tratar de eliminar todos los restos de colorantes de la superficie ocular.

A continuación se instilaron 2 gotas del anestésico proparacaína al 5% (Anestésico Doble 5%. Alcón Cusí, S.A. Barcelona, España). Tras esperar dos minutos, se aplicaron sucesivamente sobre la conjuntiva bulbar superior y temporal superior, 2 mitades de filtro de polietersulfona (Supor 200, tamaño del poro 0.20  $\mu\text{m}$ , 13 mm de diámetro; Gelman Laboratory, MI, USA) a 4 mm del área límbica y se mantuvo en su lugar diez segundos antes de retirarlo con cuidado (Figura 5). El filtro fue guardado en 1 ml de solución tampón de lisis RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para el aislamiento del ARN total.



**Figura 5.** Recogida de la CIC.

## 5.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EPITELIO CONJUNTIVAL

### 5.5.1. Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc

Para el análisis de la expresión génica en las células de epitelio conjuntival, obtenido mediante citología de impresión conjuntival, se procedió primeramente a la extracción del ARN total de las citologías utilizando un Kit comercial (RNeasy Micro Kit, Qiagen, USA) bajo condiciones estándares, con tratamiento con ADNasa libre de ARNasas siguiendo las instrucciones de fabricante. El análisis de las muestras fue individual, pero debido a la escasa cantidad de ARN encontrado en algunas de ellas, fue necesario agrupar las de los pacientes 2,5, 6 y 14.

Posteriormente se procedió a la transcripción inversa del ARN extraído a cADN, usando el kit comercial *RT<sup>2</sup> HT First Strand* (Qiagen). Se sintetizaron 100 ng de cada muestra.

### 5.5.2. Análisis por RT-PCR-Real time

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante el ensayo cuantitativo tipo array (SuperArray SABioscience, Qiagen, Izasa, S.A., Barcelona, Spain) de PCR con retrotranscripción en tiempo real (RT-PCR array). El ensayo se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se estudió la expresión un panel a la carta de 84 genes (Tabla 1) y además la expresión de 5 genes control (*housekeeping*), 3 controles de retrotranscripción, 3 controles positivos de PCR, y 1 control de contaminación de ADN genómico.

Se mezclaron 102  $\mu$ l (100ng) de ADNc de cada muestra con 1.275  $\mu$ l de 2 $\times$  *SuperArray PCR Master Mix* y con 1,173  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada libre de ARNasas. Se añadieron 25  $\mu$ l de esta mezcla a cada pocillo de la placa del array de PCR. La amplificación se llevó a cabo en un equipo *Real time* PCR (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) de la siguiente manera: 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, y 1 minuto a 60 °C. Se utilizó un programa de la curva de fusión y se hizo una curva de disociación para cada pocillo de la placa para verificar la identidad de cada producto de amplificación de genes.

**Tabla 1.** Panel de genes analizados.

GEN	Descripción	GEN	Descripción
<b>AIMP1</b>	Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1	<b>IL13</b>	Interleukin 13
<b>BMP2</b>	Bone morphogenetic protein 2	<b>IL15</b>	Interleukin 15
<b>CCL1</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 1	<b>IL16</b>	Interleukin 16
<b>CCL11</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 11	<b>IL17A</b>	Interleukin 17A
<b>CCL17</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 17	<b>IL17B</b>	Interleukin 17B
<b>CCL18</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 18	<b>IL17C</b>	Interleukin 17C
<b>CCL2</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	<b>IL17E</b>	Interleukin 17E
<b>CCL24</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 24	<b>IL17F</b>	Interleukin 17F
<b>CCL26</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 26	<b>IL17RA</b>	Interleukin 17 receptor A
<b>CCL3</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	<b>IL17RC</b>	Interleukin 17 receptor C
<b>CCL4</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 4	<b>IL18</b>	Interleukin 18
<b>CCL5</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	<b>IL1A</b>	Interleukin 1, alpha
<b>CCL7</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 7	<b>IL1B</b>	Interleukin 1, beta
<b>CCR1</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 1	<b>IL1RN</b>	Interleukin 1 receptor antagonist
<b>CCR2</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 2	<b>IL2</b>	Interleukin 2
<b>CCR3</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 3	<b>IL22R</b>	Interleukin 22 receptor
<b>CCR4</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 4	<b>IL27</b>	Interleukin 27
<b>CCR5</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 5	<b>IL4</b>	Interleukin 4
<b>CCR6</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 6	<b>IL5</b>	Interleukin 5
<b>CD40LG</b>	CD40 ligand	<b>IL5RA</b>	Interleukin 5 receptor, alpha
<b>CSF2</b>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	<b>IL6</b>	Interleukin 6
<b>CSF3</b>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	<b>IL8</b>	Interleukin 8
<b>CX3CL1</b>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	<b>IL9</b>	Interleukin 9
<b>CX3CR1</b>	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	<b>IL9R</b>	Interleukin 9 receptor
<b>CXCL1</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	<b>LTA</b>	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
<b>CXCL10</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	<b>LTB</b>	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
<b>CXCL11</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	<b>MIF</b>	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
<b>CXCL12</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	<b>NAMPT</b>	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
<b>CXCL13</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>CXCL2</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	<b>TNFRSF11B</b>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
<b>CXCL3</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	<b>TNFSF10</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
<b>CXCL9</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	<b>TNFSF11</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
<b>XCL1</b>	XCL1 chemokine (C motif) ligand 1	<b>TNFSF4</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
<b>CXCR1</b>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1	<b>VEGFA</b>	Vascular endothelial growth factor A
<b>CXCR2</b>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2	<b>EFG</b>	Epidermal growth factor
<b>CXCR3</b>	CXCR3 chemokine (C-X-C motif) receptor 3	<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>FASLG</b>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	<b>MMP9</b>	matrix metalloproteinase 9
<b>IFNA2</b>	Interferon, alpha 2	<b>TGFB1</b>	transforming growth factor, beta 1
<b>IFNG</b>	Interferon, gamma	<b>TGFB2</b>	transforming growth factor, beta 2
<b>IL10</b>	Interleukin 10	<b>TGFB3</b>	transforming growth factor, beta 3
<b>IL12A</b>	Interleukin 12A	<b>TLR2</b>	toll-like receptor 2
<b>IL12B</b>	Interleukin 12B	<b>TLR4</b>	toll-like receptor 4

## 5.6. ANÁLISIS DE CITOQUINAS/QUIMIOQUINAS EN LÁGRIMA

Los niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima se determinaron utilizando un ensayo multianálisis comercial (Milliplex 15x-MPXHCYTO-60 Human

Cytokine/chemokine panel, Millipore, Watford, UK) mediante tecnología XMAP en un Luminex IS-100 (Luminex Corporation, Austin TX, EEUU). Se analizaron un total de 15 moléculas: EGF, IL-1RA, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IP-10/CXCL10, eotaxina 1, IFN- $\gamma$ , VEGF-A, TNF- $\alpha$ , y RANTES/CCL5.

Las muestras se midieron siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello se incubaron 10  $\mu$ l de la muestra de lágrima almacenada (dilución 1/10) con microesferas recubiertas de anticuerpos específicos para cada citoquina/quimioquina durante la noche a 4 C $^{\circ}$ ; posteriormente se lavaron y se incubaron con anticuerpos anti-citoquinas humanas biotinilados durante 1 hora, seguido de una incubación con estreptavidina-ficoeritrina durante 30 minutos. Se utilizaron curvas estándares, obtenidas a partir de muestras de concentración conocidas de citoquinas humanas recombinantes, para convertir las unidades de fluorescencia en concentración (pg/ml). Los datos se almacenaron y analizaron usando el “Bead View Software” (Upstate-Millipore, Dundee, UK). En el caso de que la concentración de una molécula resultara indetectable, se le asignó el valor mínimo detectable proporcionado por el fabricante, con el fin de poder realizar el análisis estadístico. Sin embargo, las moléculas detectadas en menos del 50% de las muestras no fueron consideradas para el posterior análisis.

## **5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó utilizando *The R software* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de la media (DEM). Para la comparación de muestras de grupos independientes se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Withney. Para comprobar la asociación entre variables cualitativas se utilizó el test exacto de Fisher.

Para el análisis de datos se utilizó el método comparativo de Ct. El Ct es un ciclo umbral y su valor está determinado por el número de ciclos necesarios para amplificar cada gen sobre un valor umbral (determinado por el operador). Se calculó el valor del incremento en Ct ( $\Delta$ Ct) para cada gen en controles y pacientes, usando como factor de normalización el promedio de los valores de Ct de los genes housekeeping incluidos en la placa del array y se calculó el valor “fold change” (número de veces en que se

incrementa la expresión) de cada gen con respecto al grupo control mediante el cociente del valor  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  para cada gen entre las muestras de los pacientes y los controles. Los resultados fueron reportados como Fold up-regulation o Fold down-regulation (expresión aumentada o disminuida). Para la normalización de los valores se usó el programa NormqPCR, mientras que para el análisis de la expresión diferencial se usó el programa HTqPCR (Bioconductor, EEUU) en R (R Core Team).

Para validar externamente el modelo ajustado en el trabajo anterior se utilizó una segunda muestra de casos y controles. Como medida global de la precisión del modelo predictivos se utilizó el *Brier Score*, que se refiere a las diferencias, a nivel de individuo, entre los riesgos predichos en términos de probabilidad y los resultados finalmente observados, siendo 0 cuando el grado de acuerdo sea perfecto y 1 en caso contrario.

La calibración de un modelo es el grado de acuerdo entre los valores predichos y los observados. Para evaluar la calibración se estiman dos medidas, “*calibration-in-the-Large*” (CL) que en un modelo perfectamente calibrado será 0 y “*calibration Slope*” (CS) que en este tipo de modelos será 1.

La capacidad de discriminación del modelo, hace referencia a su capacidad de clasificar los nuevos individuos correctamente, en sanos y enfermos. Para ello se usa el área bajo la curva (AUC) ROC y a partir de ella se extraen las medidas de discriminación, como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y la exactitud global del modelo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se incluyeron un total de 23 sujetos en este estudio, divididos en dos grupos: un grupo de 12 sujetos con SOS asociado a EICH y otro grupo de 11 sujetos sanos o controles.

De los 12 pacientes con SOS asociado a EICH, 9 fueron varones y 3 mujeres, la edad media fue de  $59.5 \pm 8.23$ , con un rango de 46-69 años. Para el grupo control fueron reclutados 11 sujetos sanos, de los cuales 8 fueron varones y 3 mujeres. La edad media en este grupo fue de  $57.45 \pm 7.17$  con un rango de 46-67 años.

Los resultados de los test clínicos así como las diferencias significativas entre los dos grupos se representan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de los test clínicos de los grupos de estudio

TEST CLINICO	GRUPO EICH	GRUPO CONTROL	p-VALOR
Edad (años)	$59.5 \pm 8.23$	$57.45 \pm 7.17$	0.5338
OSDI <sup>1</sup>	$54.83 \pm 18.21$	$6.39 \pm 6.05$	<b>&lt;0.0001</b>
Hiperemia*	1	0	<b>0.0001</b>
T-BUT <sup>2</sup>	$1.8 \pm 1.72$	$7.42 \pm 3.27$	<b>0.0002</b>
Tinción Corneal con Fluoresceína*	3	0	<b>0.0001</b>
Tinción conjuntival con Verde de Lisamina*	2	0	<b>&lt;0.0001</b>
Test de Schirmer 1	$4 \pm 3.3$	$16.68 \pm 11.76$	<b>0.0051</b>

<sup>1</sup>Ocular Surface Disease Index. <sup>2</sup>Tiempo de ruptura lagrimal. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DT Excepto en donde indicado con \*, que se expresan como mediana.

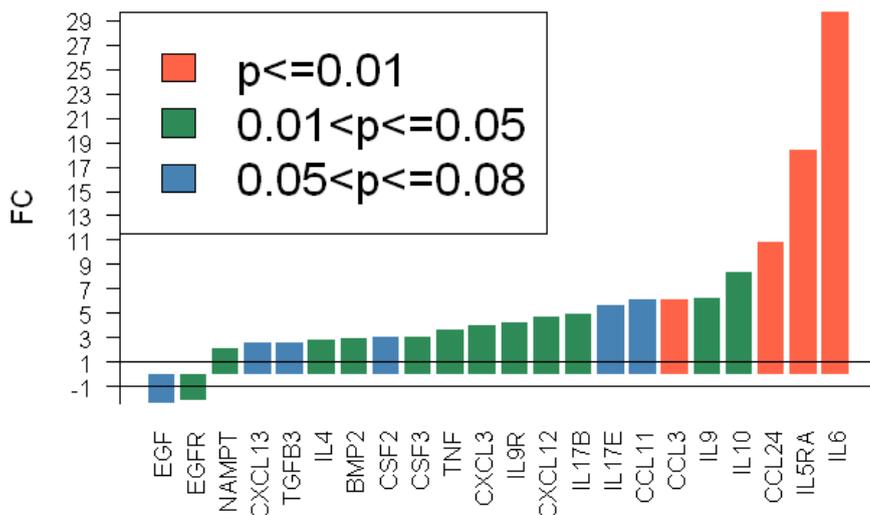
### 6.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

De los 84 genes estudiados (detallados en la tabla 1), se encontraron diferencias en la expresión en epitelio conjuntival de 16 de ellos de forma estadísticamente significativa (Tabla 3, Figura 6). Esta expresión fue mayor en el grupo de casos respecto a los controles (*up-regulation*) en los siguientes genes: BMP2, CCL24, CCL3, CSF3, CXCL3, CXCL12, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-17B, IL-5RA, IL-9R, NAMPT y TNF. Por el contrario,

solamente la expresión del gen EGFR se encontró diferencialmente disminuida en los pacientes EICH (*down-regulation*).

**Tabla 3:** *Fold up-down regulation* (expresión en número de veces aumentados o disminuidos) de genes en epitelio de conjuntiva en el grupo EICH respecto al grupo control. Se muestran solo genes cuya expresión diferencial era significativa ( $p < 0.05$ ) o *bordeline* a la significación ( $p < 0.08$ ).

GEN	EXPRESIÓN ( <i>Fold change</i> EICH vs Controles)	P-valor
IL-6	29.6720	<b>0.0050</b>
IL-5RA	18.3104	<b>0.0008</b>
CCL24	10.8202	<b>0.0016</b>
IL-10	8.3267	<b>0.013</b>
IL-9	6.2575	<b>0.022</b>
CCL3	6.1464	<b>0.0048</b>
CCL11	6.0782	0.064
IL-17E	5.6686	0.0780
IL-17B	4.9214	<b>0.0138</b>
CXCL12	4.6347	<b>0.0178</b>
IL-9R	4.1893	<b>0.0102</b>
CXCL3	3.9872	<b>0.0130</b>
TNF	3.5820	<b>0.0234</b>
CSF3	3.0626	<b>0.0326</b>
CSF2	2.9951	0.0650
BMP2	2.879	<b>0.0480</b>
IL-4	2.7529	<b>0.0446</b>
TGFβ3	2.6043	0.0650
CXCL13	2.5783	0.0642
NAMPT	2.0217	<b>0.0130</b>
EGFR	-2.1949	<b>0.0246</b>
EGF	-2.3551	0.0660



**Figura 6.** *Fold up-down regulation* de genes con cambios estadísticamente significativos (barras rojas y verdes) o *borderline* (barras azules) en grupo SOS asociado a EICH respecto al grupo control. FC: Fold Change.

Además, la expresión de otros 6 genes se encontró al borde de la significación estadística. Entre ellos, CXCL13, TGFB3, CSF2, IL-17E y CCL11 se mostraron sobreexpresados en los pacientes respecto a los controles, mientras que sólo la expresión de EGF fue menor en pacientes que en los controles (Tabla 3, Figura 6).

### 6.3. VALIDACIÓN DEL MODELO

Se utilizaron las nuevas muestras de casos de SOS asociado a EICH y controles para validar externamente el modelo ajustado en el trabajo anterior. El ajuste y la validación interna del modelo se realizó utilizando técnicas de análisis discriminante. Este tiene en cuenta la expresión obtenida en los siguientes 5 genes: IFN- $\gamma$ , EGFR, CCL18, TNFSF4 e IL-9.

La validación significa evaluar lo correcto o firme que es un procedimiento, en este caso lo próximo que es el modelo matemático a la realidad que trata de representar. La validación externa lo lleva cabo usando una muestra diferente a la usada para su construcción. A la hora de evaluar un modelo es necesario tener en cuenta tres cualidades: la precisión, la calibración y la discriminación.

- **Precisión**

La precisión es una cuantificación del grado de aproximación de los datos observados y esperados en un modelo. Como medida de la precisión del modelo predictivo se utilizó el *Brier Score*, que evalúa, valor a valor, la distancia entre los valores observados (1 o 0) y la probabilidad asignada por el modelo. El riesgo que asigna el modelo a cada individuo del estudio se muestra en la tabla 3. El *Brier Score* obtenido resultó de 0.1703, con un IC 95% de 0.0606 - 0.2909. Dicho valor corresponde a un modelo bastante preciso.

**Tabla 3.** Probabilidad de padecer SOS asociado a EICH que asigna el modelo a cada individuo.

Muestra	Probabilidad de SOS asociado a EICH
Control 1	0.0659
Control 2	0.4274
Control 3	0.1171
Control 4	0.0718
Control 5	0.0059
Paciente 1	0.3796
Paciente 3	0.7747
Paciente 4	0.7723
Paciente 9	0.3474
Paciente 10	0.8695
Paciente 11	0.2046
Paciente 13	0.3164
Pacientes 2,5,6,14	0.9521

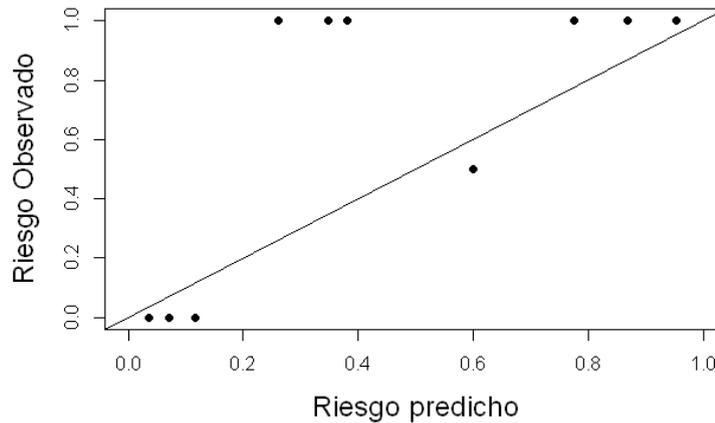
- **Calibración**

Trata de evaluar el grado de acuerdo entre valores predichos y los observados (calibración modelo), se evaluaron las medidas *Calibration in the Large* (CL) y *Calibration Slope* (CS), cuyos valores fueron de 2.35, con un IC 95%: -0.638 - 5.339 y 1.811, con un IC 95%: -0.296 - 3.917 respectivamente.

A su vez, se utilizó el Test de Hosmer-Lemeshow, que evalúa el equilibrio entre los valores observados y los valores esperados por tramos del modelo, y que es significativo para modelos mal calibrados. En nuestro caso se obtuvo un p-valor no

significativo de 0.2617, indicando que nuestro modelo de validación está bien calibrado.

El plot de calibración muestra gráficamente la calibración del modelo (Figura 7).

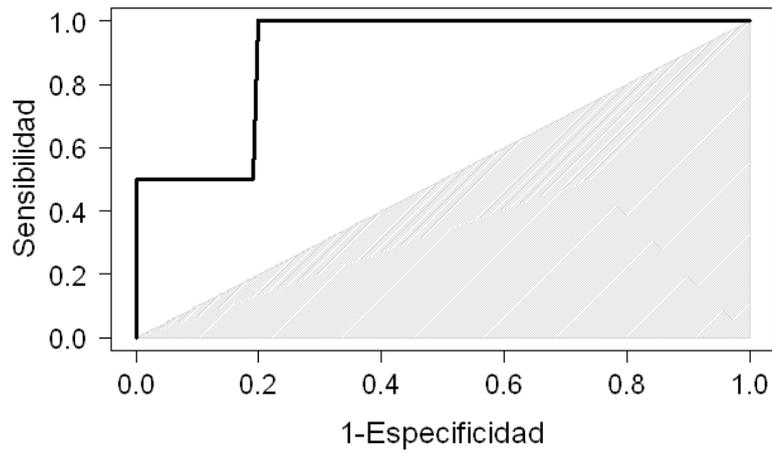


**Figura 7.** Plot de calibración entre el riesgo observado vs el riesgo predicho para cada una de las muestras estudiadas

En él se observan 3 puntos (sujetos) con riesgos observados de 1, que se predicen por el modelo con riesgos de entre 0.2 y 0.4, lo que indica que el modelo tiende a infraestimar en pacientes de riesgo observado alto

- **Discriminación**

La característica más importante de un modelo de predicción es su capacidad de discriminación, es decir, dado un valor de una variable independiente, dar una probabilidad acertada de si aquel individuo tendrá o no tendrá la enfermedad. La discriminación del modelo se evaluó mediante la curva ROC y el AUC. Se obtuvo un valor de AUC para la curva ROC de 0,9 (Figura 8).



**Figura 8.** Curva ROC en el modelo de validación externa

Los valores obtenidos de las medidas de discriminación a partir de dicha curva ROC, y que hablan acerca de su calidad a la hora de cumplir con su función clasificadora se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Medidas de discriminación del modelo

	Valor	IC 95%	
	(%)	Inferior	Superior
<b>Sensibilidad</b>	100	100	100
<b>Especificidad</b>	80	44.94	100
<b>Valor predictivo positivo</b>	88.89	68.36	100
<b>Valor predictivo negativo</b>	100	100	100
<b>Exactitud</b>	92.31	77.82	100

## 6.4. ANÁLISIS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÁGRIMA

### 6.4.1. Porcentaje de detección

El porcentaje de detección de citoquinas y quimioquinas en el grupo EICH y control se encuentra detallado en la figura 1.

En el grupo control el porcentaje de detección fue mayor al 80% en el 93.75% de las moléculas, y solamente la IL-1 $\beta$  fue detectada en el 58.3% de las muestras. En el grupo de pacientes el porcentaje de detección fue mayor a un 80% en el 81.25% de las muestras, y en este caso las moléculas detectadas en menor proporción de muestras fueron IL-17, IL-1 $\beta$  e IL-2, con un porcentaje de 41.6% la primera y 66.67% las dos últimas respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de detección de ninguna molécula entre ambos grupos (Figura 9).

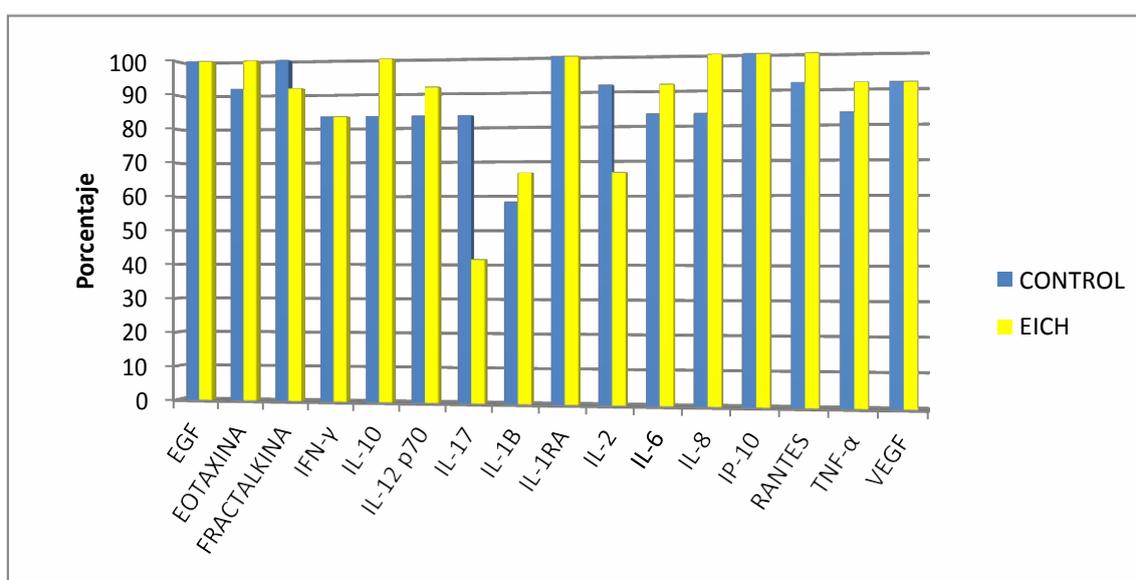


Figura 9: Porcentaje de detección de citoquinas y quimioquinas en lágrima de pacientes y grupo control.

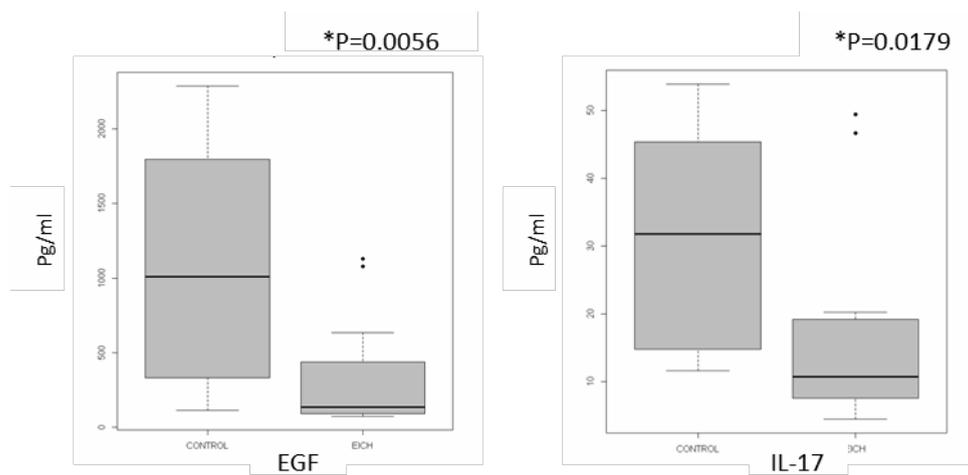
### 6.4.2. Concentración de citoquinas y quimioquinas

Con respecto a la concentración de citoquinas y quimioquinas en lágrima, encontradas en ambos grupos, los resultados se encuentran detallados en la tabla 5.

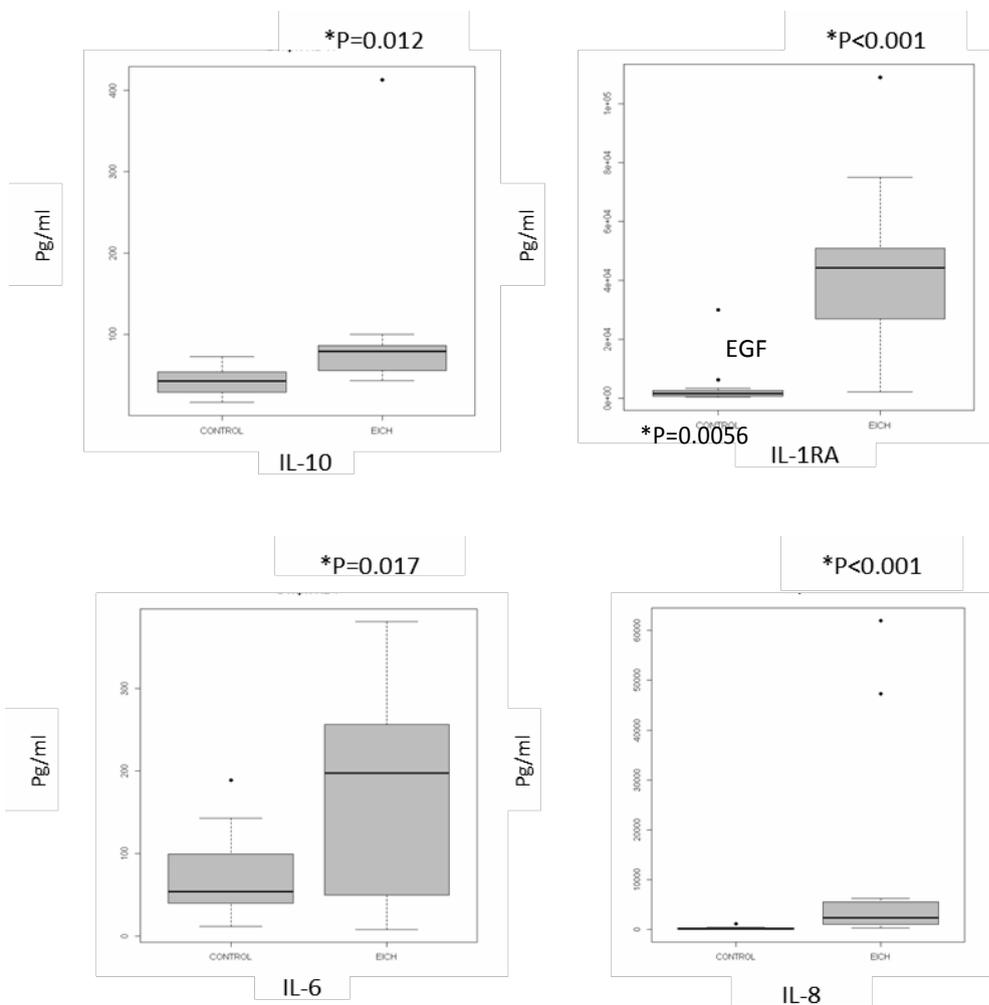
**Tabla 5:** Concentración de citoquinas y quimioquinas en lágrima (media  $\pm$  DE).

	GRUPO EICH (pg/ml)	GRUPO CONTROL (pg/ml)	P-valor
<b>EGF</b>	331.75 $\pm$ 392.44	1095.42 $\pm$ 798.99	<b>0.0056</b>
<b>EOTAXINA</b>	104.67 $\pm$ 53.98	109.6 $\pm$ 55.9	0.8279
<b>FRACTALQUINA</b>	1033.33 $\pm$ 553.04	1014.83 $\pm$ 564.28	0.9361
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	47.73 $\pm$ 25.11	41.74 $\pm$ 28.02	0.5871
<b>IL-10</b>	100.31 $\pm$ 99.95	42.18 $\pm$ 17.52	<b>0.0012</b>
<b>IL-12 p70</b>	84.8 $\pm$ 52.65	90.57 $\pm$ 40.71	0.7666
<b>IL-17</b>	17.04 $\pm$ 15.22	31.83 $\pm$ 15.71	<b>0.0179</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	137.42 $\pm$ 404.62	11.41 $\pm$ 8.28	0.5443
<b>IL-1RA</b>	42797.5 $\pm$ 29209.56	4136 $\pm$ 8306.76	<b>&lt;0.0001</b>
<b>IL-2</b>	30.06 $\pm$ 17.44	33.98 $\pm$ 15.49	0.567
<b>IL-6</b>	180.32 $\pm$ 127.46	73.19 $\pm$ 52.8	<b>0.017</b>
<b>IL-8</b>	11043.58 $\pm$ 20681.83	284.69 $\pm$ 413.7	<b>&lt;0.0001</b>
<b>IP-10</b>	15829.25 $\pm$ 26071.56	18717.5 $\pm$ 16305.17	0.1277
<b>RANTES</b>	187.57 $\pm$ 110.85	196.16 $\pm$ 84.84	0.47
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	56.8 $\pm$ 98.39	21.55 $\pm$ 10.15	0.184
<b>VEGF</b>	673.52 $\pm$ 423.77	510.75 $\pm$ 342.4	0.3119

- Las moléculas EGF e IL-17 demostraron niveles inferiores en el grupo de casos de EICH que en el de controles sanos, con  $p=0.0056$  y  $p=0.017$  respectivamente (Figura 10).
- A su vez, IL-10, IL-1RA, IL-6 e IL-8 mostraron niveles aumentados en el grupo de pacientes respecto a los controles de forma estadísticamente significativa, con  $p=0.0012$ ,  $p<0.0001$ ,  $p=0.017$  y  $p<0.0001$  respectivamente (Figura 11).



**Figura 10.** Concentración disminuida de EGF e IL-17 en lágrima en pacientes con SOS asociado a EICH.



**Figura 11.** Concentración aumentada de IL-10, IL-1RA, IL-6 e IL-8 en lágrima en pacientes con SOS asociado a EICH

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se quiso validar externamente un modelo predictivo de SOS asociado a EICH previamente desarrollado por nuestro grupo, basado en la expresión diferencial de 5 genes en epitelio conjuntival bulbar superior. Para ello, se recogió una nueva muestra de pacientes con SOS asociado a EICH y un nuevo grupo de sujetos sanos. En la nueva muestra de sujetos, se estudiaron la expresión diferencial de genes de moléculas relacionadas con la inflamación, así como además los niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima, comparándolas entre sujetos sanos y enfermos y comparándose, además, a los resultados obtenidos en el estudio anterior.

Los pacientes de SOS asociado a EICH que participaron en este estudio tenían un grado de inflamación moderado, ya que estaban siendo controlados en las Unidades de Inmunología Ocular del IOBA, el Hospital clínico universitario de Valladolid y el Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Por ello, se les pudo suspender toda la medicación tópica durante una semana, siendo sólo esto posible en aquellos pacientes que estaban bajo un cierto control inflamatorio, pues de otra forma, esto no hubiera sido ético. Se consideró relevante excluir el efecto de las medicaciones tópica sobre los niveles de moléculas inflamatorias, ya que este hecho habría introducido una considerable variabilidad y error en los datos.

Pese a ello, el grupo de pacientes con SOS asociado a EICH mostró diferencias estadísticamente significativas en los resultados de todos los test clínicos realizados, incluyendo la valoración subjetiva de síntomas a través del test de OSDI y la exploración objetiva de la superficie ocular, así como el test de Schirmer. Estos resultados, pese a que los pacientes se mantenían con un control relativo y tratamiento sistémico, demuestran una forma más grave de SOS.

Utilizando el método de análisis discriminante, a partir de los datos de expresión génica obtenidos en el trabajo anterior de pacientes con SOS asociado a EICH, se elaboró un modelo de predicción de la enfermedad. Este modelo se sometió a una validación interna (con las mismas muestras con los que fue diseñado), obteniendo unos resultados positivos, con un poder discriminante de enfermedad >80%. Se

elaboró la curva ROC y se determinó que *a priori*, el modelo tenía una sensibilidad y especificidad buenas (64.29% y 71.43%), por lo tanto era una herramienta muy aceptable para discriminar entre casos /no casos de enfermedad.

La validación externa del modelo, llevada a cabo con la nueva serie de pacientes con SOS asociado a EICH y controles sanos, se realizó con el fin de confirmar estos resultados, es decir, catalogar en función de la expresión de los 5 genes seleccionados a esta nueva serie de individuos y observar su capacidad de discriminación.

Los resultados obtenidos confirmaron que en base al *Brier Score* que se obtuvo (muy bajo), el modelo es muy preciso en la estimación del riesgo que cada nuevo sujeto presenta de tener la enfermedad en base a la expresión de sus genes en la conjuntiva. Esto ocurre porque la probabilidad de tener EICH predicha por el modelo es, en general, baja para los controles y más alta en los casos; tan solo uno de los controles sería clasificado como caso, sin que existan datos clínicos que puedan justificar dicho hallazgo.

Por otro lado la calibración del modelo reveló que éste no muestra problemas graves, y a pesar de que los riesgos predichos de enfermedad sean bajos, esto no ofrece problemas a la hora de discriminar adecuadamente los que son y no casos de enfermedad, si bien presentó cierta infraestimación en 3 casos con riesgo observado alto pero con riesgo predicho relativamente bajo, que aun así, son bien clasificados.

Los valores de discriminación obtenidos con la curva ROC probaron que el modelo basado en la expresión de estos cinco genes proporciona un alto poder de discriminación con un valor de AUC de 0.9, una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80%. Estos valores son aún mayores que los logrados con la validación interna, lo cual es poco frecuente, ya que esta primera validación se hace con los propios datos de los sujetos de la muestra original y la segunda con sujetos diferentes. Todo esto habla a favor de que este modelo es capaz de predecir bien la presencia o ausencia de enfermedad, al analizar el nivel de expresión de dicho grupo de genes en epitelio conjuntival bulbar. Se podría afirmar así, que el modelo es extraordinariamente bueno a la hora de cumplir su función, la predicción de casos de

enfermedad, no obstante siempre con precaución, al contar con una muestra relativamente pequeña.

Dada la importancia de la enfermedad que tratamos, muchos grupos de investigación han tratado de establecer sus propios modelos de predicción de EICH tanto agudo, como crónico, basándose en técnicas de proteómica y de expresión génica. Entre ellos destacan Weissinger y cols., que desarrollan un modelo de EICH agudo basado en un panel de 17 proteínas en orina (moléculas asociadas a la inflamación, activación de células T y elementos de la matriz extracelular), asociando parámetros demográficos y clínicos para aumentar la precisión. En su estudio encontraron que a la hora de clasificar pacientes con un EICH agudo avanzado, el ABC fue de 0.85, mientras que la sensibilidad y la especificidad fueron de un 82.4% y 77.3% respectivamente (21).

Por su parte Cuzzola y cols., en una serie de 59 pacientes sometidos a TPH, utilizan para elaborar un modelo automatizado de predicción de EICH agudo, la expresión de 47 genes en células de sangre periférica, obteniendo que 4 de ellos mostraban un buen poder clasificador: FOXP3 (factor de transcripción con dominio “forkhead”), ICOS (coestimulador inducible de células T), CD52 y CASP1 (caspasa 1). Al realizar una validación interna, esta arroja un AUC de 0.96, con una sensibilidad de 1 y una especificidad de 0.96. Al contrario que en el presente trabajo, estos autores no realizan una validación externa del modelo (22).

Kohrt y cols., a su vez, a través de *microarrays* de expresión génica en células de sangre periférica, obtuvieron una serie de genes candidatos que no se habían estudiado hasta entonces, como ADAMTS2, ADAMTS3 e IL-1R2. Codifican todos ellos proteínas de respuestas compensadoras y responsables del control de la inflamación, por lo que este grupo preconiza la importancia de estas respuestas compensadoras en pacientes EICH frente a las realmente proinflamatorias causantes de la enfermedad a la hora de diagnosticar a estos pacientes (23).

El grupo de Paczesny y cols., elaboraron un modelo basado en un panel de 4 proteínas plasmáticas (IL-2R $\alpha$ , TNFR1, IL-8 y HGF), que discriminaban bien pacientes con y sin EICH agudo. En los estudios de validación el ABC fue de 0.86, con una especificidad del 94% (24).

En el presente trabajo, además, se analizó la expresión de los mismos 84 genes que en el trabajo anterior, para comparar sus resultados y observar si estos se repiten en muestras distintas. El panel de genes medido, corresponde exactamente con los genes elegidos en el anterior trabajo, en cuya expresión se basó la elaboración del modelo de predicción. A pesar de ello, se encontraron diferencias entre ambos estudios, al valorar la expresión diferencial de los genes.

En este estudio, el gen más sobre-expresado fue el de la IL-6, que fue 29.67 veces más expresado en pacientes que en controles. De forma interesante, en el estudio anterior la expresión de IL-6 se encontró también aumentada en pacientes, rozando la significación estadística. Esta molécula ha sido ampliamente estudiada en el contexto de EICH sistémico, y Tanaka y cols. encontraron una mayor expresión de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica durante el desarrollo de esta enfermedad, tanto en su forma aguda, como crónica (16), mientras que Barak y cols., además correlacionaron la concentración de esta molécula con la severidad del cuadro (25). DiCarlo y cols. encontraron un aumento de esta molécula, junto al Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a las dos semanas del TPH en pacientes que desarrollan EICH, a diferencia de los que no lo desarrollaban (26).

Además, el resultado a nivel de expresión génica concuerda con el hallado en lágrima de estos pacientes, donde la concentración de IL-6 fue significativamente mayor, al igual que en el trabajo de Riemens y Cols., que demuestra un incremento de la concentración de IL-6 en lágrima de casos de EICH ocular (20). Por todo ello IL-6 es una molécula importante y prometedora tanto a nivel sistémico como a nivel ocular, a la hora de predecir los pacientes que sufrirán EICH tras un trasplante.

La expresión de las moléculas IL-5RA, CCL24 e IL-10 se encontró así mismo aumentada de manera significativa en los pacientes con SOS asociado a EICH 18.31, 10.82 y 8.32 veces respectivamente. De entre ellas, la expresión aumentada de IL-10 confirma el valor obtenido en el estudio anterior, con un aumento significativo de 12.68 veces respecto a los controles. Además, la concentración en lágrima de IL-10 se vio, a su vez, incrementada en pacientes, por lo que nos encontramos ante un hallazgo sólido.

IL-10 es una citoquina con un conocido efecto antiinflamatorio e inmunoregulador y por otro lado se ha visto que también es capaz de estimular respuestas Th2, como las que se ven en el EICH crónico, lo que puede explicar sus niveles aumentados que se han observado en estos pacientes.

Otros grupos han estudiado la importancia de IL-10 en EICH. Liem y cols. reportaron que un aumento de IL-10 en el suero de pacientes trasplantados estaba asociado con el desarrollo de EICH agudo o crónico (27), mientras que Visentainer y cols. a su vez, observaron un aumento de esta molécula en pacientes que más adelante desarrollaban EICH agudo (17). Skert y cols. en 2009 corroboraron estos hallazgos en pacientes sometidos a TPH que desarrollaron EICH crónico (18).

IL-9 es otra de las moléculas cuya expresión en células del epitelio conjuntival se ha visto aumentado respecto a los controles, tanto en el presente estudio, donde se observa 6.25 veces aumentada, como en nuestro trabajo anterior, con una sobreexpresión 18.85 veces mayor en pacientes. IL-9 es una citoquina producida por diversos tipos celulares, entre ellos las recién descritas Th 9 (28). Se ha descrito su participación en procesos alérgicos, pero actualmente también se la relaciona con la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes (29). Esta molécula no había sido descrita hasta el momento en pacientes con SOS asociado a EICH, y el hallazgo puede resultar interesante, ya que se ha excluido la patología alérgica específicamente en todos los sujetos del estudio.

EGF y su receptor EGFR, son las únicas moléculas cuya expresión génica se ha encontrado disminuida en pacientes EICH en relación a los controles, siendo 2.19 veces superior en controles y significativa la expresión de EGFR, mientras que la de EGF ha resultado 2.35 veces superior, rozando la significación estadística, y coincidiendo con la concentración de esta molécula en lágrima de estos pacientes. EGF, como hemos mencionado anteriormente, se ha encontrado repetidas veces disminuido en lágrima de pacientes con SOS hiposecretor (12, 30, 31).

Por otro lado, su receptor, EGFR, también se encontró expresado en menor medida en pacientes EICH en el trabajo anterior. Esta molécula se ha visto ampliamente expresada en la superficie ocular, jugando un papel crítico en los procesos de reparación de heridas corneales mediando la proliferación, migración y diferenciación,

pero no había sido descrito anteriormente en lágrima o epitelio conjuntival de pacientes con SOS asociado a EICH.

Asimismo, debemos destacar, que genes de moléculas que en el trabajo anterior habían resultado sobre expresadas de manera llamativa, no han podido corroborarse en el presente trabajo. Es el caso del IFN- $\gamma$ , cuya expresión fue 27 veces mayor en pacientes, coincidiendo con su concentración aumentada en lágrima. A pesar de esta discrepancia, esta molécula se halla dentro del conjunto de 5 genes usado para elaborar el modelo, y en este sentido el resultado ha sido muy bueno, por lo que deben valorar estos datos con prudencia y tener siempre en cuenta que el tamaño muestral es pequeño.

Para completar el trabajo, analizamos también la concentración de las citoquinas en lágrima, también con el propósito de verificar los resultados obtenidos anteriormente. De este modo, encontramos que tanto la concentración de EGF como la de IL-17 están disminuidas en pacientes con SOS asociado a EICH respecto a los controles. EGF, como ya se ha dicho, es capaz de inducir proliferación, migración y adhesión de células del epitelio corneal durante la reparación de heridas. Diversos estudios han demostrado la asociación entre los niveles de EGF y el tipo de SOS. Pflugfelder y cols. y Lam y cols. encontraron niveles más bajos de esta molécula en lágrima de pacientes con ojo seco hiposecretor secundario a síndrome de Sjögren, comparados con sujetos normales (12,30), mientras que Rao y cols., a su vez, observaron un aumento de estos niveles en SOS evaporativo y una disminución en SOS hiposecretor (31). Todo ello, además, se encuentra en acuerdo con nuestro anterior trabajo en pacientes EICH, donde los niveles de EGF en lágrima también fueron significativamente menores que en controles.

La IL-17 es una molécula proinflamatoria importante que sirve de conexión entre la inmunidad innata y adaptativa, y que ha sido estudiada en diversas patologías de la superficie ocular (32). Lee y cols. observaron una mayor concentración en lágrima de pacientes con SOS secundario a SS que en pacientes controles sanos (33). Por el contrario, y de acuerdo con nuestros actuales datos, Na y cols. describieron niveles

menores de IL-17 en pacientes con SOS que además disminuyen según aumenta el grado de severidad del cuadro (35).

Los niveles de IL-10, IL-1RA, IL-6 e IL-8 en lágrima fueron significativamente mayores en casos de SOS asociado a EICH que en controles sanos. Los niveles de IL-10 concuerdan con los encontrados en lágrima de pacientes con SOS secundario a SS encontrados por el grupo de Lee y Cols. (33).

IL-1RA es una proteína antagonista del receptor de IL-1, por lo que es capaz de inhibir las funciones proinflamatorias que lleva a cabo esta. Al igual que en el presente trabajo, estudios previos de nuestro grupo también encontraron los niveles de IL-1RA elevados en lágrima de pacientes con SOS evaporativo asociado a disfunción de glándulas de Meibomio (13).

La concentración aumentada de IL-6 en lágrima también se ha comentado anteriormente, ya que esta coincide con un aumento de la expresión génica de la molécula.

IL-8 es una quimioquina, y como tal, sus principales funciones son la atracción de neutrófilos y otros leucocitos al lugar primario de la inflamación, así como promover la angiogénesis. Diversos trabajos han encontrado niveles aumentados de esta molécula en pacientes con SOS (30,35), pero en nuestro conocimiento, hasta hoy no había sido demostrado en lágrima de pacientes con SOS asociado a EICH.

Al igual que en el caso de la expresión génica en conjuntiva, se observan algunas diferencias entre las moléculas que resultaron aumentadas o disminuidas en el presente estudio con respecto al trabajo anterior. IFN- $\gamma$  fue, de nuevo, una de las más llamativas, y su alta concentración en lágrima de pacientes con SOS asociado a EICH no se ha visto confirmada en este estudio. Por el contrario, sí se mantienen uniformes los bajos niveles de EGF encontrados en los pacientes en comparación a los controles en ambos estudios, y que dan fortaleza a este hallazgo.

### **7.1. Limitaciones del estudio**

Este trabajo presenta algunas limitaciones. La primera es el pequeño número de muestras incluido, lo cual podría dificultar el análisis estadístico, y en cualquier caso,

deben hacer valorar los resultados con cierta cautela. Esto se debe a la baja frecuencia de EICH en la población general, además de al delicado estado de salud general que tienen estos pacientes y que limita su participación en estas actividades.

Por otro lado, existieron dificultades en la extracción de material genético de las muestras de citología por impresión conjuntival, de modo que solamente pudieron ser analizadas 8 de las 11 muestras de pacientes con SOS asociado a EICH y 5 de las 12 de controles. En el caso de los pacientes, esto podría explicarse por el gran deterioro que sufre su superficie ocular y reacciones que sufren ante una mínima y cuidadosa manipulación, como el blefaroespasma y el lagrimeo. En el caso de los controles sanos, estas explicaciones parecen menos probables, y su causa no se conoce con certeza, pero podría ser achacable a los nuevos materiales que fueron recibidos en ese momento.

## 8. CONCLUSIONES

Con este trabajo se ha tratado de validar un modelo predictivo previamente desarrollado. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la medida de la expresión de los genes IFN- $\gamma$ , EGFR, CCL18, TNFSF4 e IL-9 en epitelio conjuntival nos permite clasificar con alta precisión y exactitud a los pacientes con SOS asociado en EICH. Este hecho en un futuro cercano puede facilitar que estos pacientes puedan recibir de forma precoz la profilaxis o tratamiento que necesitan.

Además, los resultados obtenidos, en cuanto a la expresión diferencial de genes en epitelio conjuntival y niveles de citoquinas en lágrima en estos pacientes, nos ayuda a identificar y confirmar la expresión de biomarcadores tanto en lágrima como en epitelio conjuntival y pueden conducir y ayudarnos al esclarecimiento de los complejos mecanismos etiopatogénicos que intervienen en esta enfermedad, colaborando así con los esfuerzos que se hacen a nivel mundial por conocer la enfermedad de injerto contra huésped y en concreto la afectación ocular y el síndrome de ojo seco asociado.

Así, moléculas como el eje EGF/EGFR y las citoquinas IL-6, IL-9 e IL-10, parecen piezas importantes y poco conocidas en su patogenia. Con posteriores estudios que definan su papel en la enfermedad, se estará más cerca de diseñar fármacos contra dianas terapéuticas conocidas, así como valorar en ensayos clínicos la eficacia de tratamientos aún pendientes de aprobar.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Hessen M, Akpek E. Ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012;12:540–47
- 2) Memoria actividad ONT. Trasplante de progenitores Hematopoyéticos. 2012. Organización nacional de trasplantes.<http://www.ont.es/infesp/Memorias/MemDonph2011.pdf> (acceso a 20 de julio de 2014)
- 3) Shikari H, Antin JH, Dana R. Ocular Graft-versus-Host Disease: A Review. *Surv Ophthalmol*. 2013;58:233-51.
- 4) Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11:945–956.
- 5) Auletta JJ, Cooke KR. Bone marrow transplantation: new approaches to immunosuppression and management of acute graft-versus-host disease. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21:30-8.
- 6) Riemens A, Boome L, Imhof S, Kuball J, Rothova A. Current insights into ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010;21:485-94.
- 7) Westeneng AC, Hettinga Y, Lokhorst H, et al. Ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Cornea*. 2010; 7:758–63.
- 8) Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83: 1125-30.
- 9) Bron AJ, Smith JA, Calonge M et al. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the diagnostic methodology subcommittee of the international dry eye Workshop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5:108-52.
- 10) Lemp AM, Baudouin C, Baum J, et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75–92.
- 11) De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, et al. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol*. 2009;2:243-53.
- 12) Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2009;147:198-205
- 13) Enríquez de Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis*. 2010;16:862-73.
- 14) Enríquez-de-Salamanca A, Bonini S, Calonge M. Molecular and cellular biomarkers in dry eye disease and ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012;12:523-33.
- 15) Tesón M, González-García MJ, López-Miguel A, et al. Influence of a controlled environment simulating an in-flight airplane cabin on dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:2093-9.
- 16) Tanaka J, Imamura M, Kasai M, Sakurada K, Miyazaki T. Cytokine gene expression after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma*. 1995;16:413-8.

- 17) Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, et al.. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2003;31:1044-50.
- 18) Skert C, Damiani D, Michelutti A, et al. Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 729–37.
- 19) Westekemper H, Meller S, Citak S, et al. Differential chemokine expression in chronic GVHD of the conjunctiva. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:1340-6.
- 20) Riemens A, Stoyanova E, Rothova A, Kuiper J. Cytokines in tear fluid of patients with ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Mol Vis.* 2012;18:797-802.
- 21) Weissinger EM, Metzger J, Dobbstein C, Wolff D, Schleuning M, Kuzmina Z. Proteomic peptide profiling for preemptive diagnosis of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2014;28:842-52.
- 22) Cuzzola M, Fiasché M, Iacopino P, Messina G, Martino M, Console G. A molecular and computational diagnostic approach identifies FOXP3, ICOS, CD52 and CASP1 as the most informative biomarkers in acute graft-versus-host disease. *Haematologica.* 2012;97:1532-8.
- 23) Kohrt HE, Tian L, Li L, Alizadeh AA, Hsieh S, Tibshirani RJ. Identification of gene microarray expression profiles in patients with chronic graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Immunol.* 2013;148:124-35.
- 24) Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG, Quick R. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2009 ;113:273-8.
- 25) Barak V, Levi-Schaffer F, Nisman B, Nagler A. Cytokine dysregulation in chronic graft versus host disease. *Leuk Lymphoma.* 1995 ;17:169-73.
- 26) DiCarlo J, Agarwal-Hashmi R, Shah A, Kim P, Craveiro L, Killen R. Cytokine and chemokine patterns across 100 days after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:361-9.
- 27) Liem LM, van Houwelingen HC, Goulmy E. Serum cytokine levels after HLA identical bone marrow transplantation. *Transplantation* 1998;66:863–871.
- 28) Nowak EC, Noelle RJ. Interleukin-9 and T cell subsets. *Cell Cycle.* 2009 Dec;8(23):3798-9.
- 29) Li H, Rostami A. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010;5:198-209.
- 30) Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999;19:201-11.
- 31) Rao K, Farley WJ, Pflugfelder SC. Association between high tear epidermal growth factor levels and corneal subepithelial fibrosis in dry eye conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:844-9.
- 32) Kang MH, Kim MK, Lee HJ, Lee HI, Wee WR, Lee JH. Interleukin-17 in various ocular surface inflammatory diseases. *J Korean Med Sci.* 2011;26:938-44
- 33) Lee SY, Han SJ, Nam SM, et al. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjögren syndrome dry eye patients and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2013;156:247-53.

- 34) Na KS, Mok JW, Kim JY, Rho CR, Joo CK. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 ;53:5443-50.
- 35) Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009;28:1023-7.



Universidad de Valladolid



COMISION DE INVESTIGACION

Dña. M<sup>a</sup> Paz García García como **Secretaria de la Comisión de Investigación** del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid,

### CERTIFICA

Que el TFM titulado “**Validación externa de un modelo de predicción de síndrome de ojo seco secundario a enfermedad injerto contra huésped**” con número de registro 05/2014 de Dña. Lidia Cocho, se encuentra en el momento de la última reunión de la Comisión de Investigación de 12 de febrero de 2014

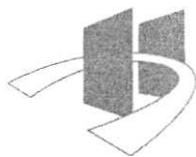
Aprobado

Pendiente de

Y para que así conste expido el presente certificado.

En Valladolid, a 13 de febrero de 2014

Fdo.: M<sup>a</sup> Paz García García  
Secretaria de la Comisión de Investigación



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA  
ÁREA DE SALUD VALLADOLID - ESTE (CEIC-VA-ESTE-HCUV)

Valladolid a 01 de Agosto de 2013

En la reunión del CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID - ESTE del 25 de Julio de 2013, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación

A continuación les señalo los acuerdos tomados por el CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID - ESTE en relación a dicho Proyecto de investigación:

PI-13-93	BIOMARCADORES Y NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN INFLAMACIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR	DRA. : AMALIA ENRIQUEZ DE SALAMANCA ALADRO IOBA RECIBIDO: 04-06-2013
----------	---	---

El Comité Ético de Investigación Clínica del Área Este de Valladolid, en la reunión celebrada el día 25 de julio de 2013, aprueba que el P solicite nuevo consentimiento informado a los pacientes incluidos en este estudio con el objeto de que las muestras recogidas pasen a formar parte de una colección permanente para investigación.

Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe favorable** y la **aceptación** del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Valladolid Este para que sea llevado a efecto dicho Proyecto de investigación.

Un cordial saludo.

*F. Álvarez*

Dr. F. Javier Álvarez.  
CEIC Área de Salud Valladolid Este - Hospital Clínico Universitario de Valladolid  
Farmacología  
Facultad de Medicina,  
Universidad de Valladolid,  
c/ Ramón y Cajal 7,  
47005 Valladolid  
alvarez@med.uva.es  
jalvarezgo@saludcastillayleon.es  
tel: 983 423077



## Hoja de información al paciente

---

Le ofrecemos participar en el estudio **titulado:**

**“BIOMARCADORES Y NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN INFLAMACIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR”.**

**Promotor del Estudio:** Ministerio de Ciencia e Innovación, España. SAF2010-15361

**Duración del estudio:** 01-Enero 2010 hasta 31-Diciembre de 2013.

**Responsables del Estudio:**

- Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro, (Investigador bioquímico; IP del estudio)
- Dr José María Herreras (Médico Oftalmólogo),
- Dra M Calonge (Médico Oftalmólogo)

Tf. 983 18 4750; Fax 983-18 47 62

**Centro:** Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

## Propósito del estudio

---

Está invitado a participar en un estudio de investigación en el que se pretenden analizar los niveles de expresión de moléculas relacionadas con procesos de inflamación (citoquinas/quimioquinas) en lágrima, sangre y células de la superficie ocular de pacientes afectados por síndrome de ojo seco o alergia ocular crónica con el objetivo de definir posibles sustancias biomarcadores de actividad y/o enfermedad, o posibles nuevas dianas terapéuticas para dichas patologías.

## Participación voluntaria

---

Debe saber que su participación en este programa es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

## Condiciones del estudio

---

Si se decide a participar, usted accede a que se le realicen pruebas oftalmológicas, sometido durante una hora y media aproximadamente a unas condiciones ambientales normales de presión (nivel del mar), temperatura (22°C) y humedad (40%), dentro de la cámara de ambiente controlado (habitación aislada donde se puede controlar la humedad, la temperatura, la presión atmosférica, el flujo de aire y la actividad visual) situada en las instalaciones del IOBA.

La realización de las pruebas es indolora, y a veces requiere la instilación de colirios (tinciones vitales). Además accede a que se le tome una muestra de lágrima de cada ojo y se le realice una citología por impresión conjuntival. La toma de muestras la hace un/a oftalmólogo/a o un optometrista; la muestra de lágrima se toma sin anestesia porque no es un procedimiento doloroso ni molesto. La citología, si bien son también mínimamente invasivas se realizarán con anestesia tópica a fin de evitar posibles molestias.

## Pruebas y toma de muestras que se realizarán durante el estudio

Las pruebas serán las siguientes:

- 1) Evaluación de la sintomatología de Ojo Seco:
  - OSDI y SODQ tests.
- 2) Evaluación de la producción y estabilidad de lágrima:
  - Producción lagrimal: Altura del menisco lagrimal, test de Schirmer, y ensayo de nivel de lisozima
  - Estabilidad: TBUT test.
- 3) Evaluación de la integridad de la superficie ocular:
  - Tests de tinción con fluoresceína y test de tinción con verde de Lisamina.
- 4) Evaluación de la calidad de la secreción de las glándulas de meibomio
  - Lámpara de hendidura
- 5) Determinación de la osmolaridad lagrimal
  - Osmómetro TearLabTM (OcuSense Inc, Boston, MA, USA).

Se le recogerán de uno (1) a tres (3) tipos de muestras: lágrima, sangre y células epiteliales conjuntivales:

- 1) Lágrima: El procedimiento de obtención de lágrima es un proceso no invasivo, completamente indoloro e inocuo para Usted. No es necesaria ninguna preparación previa. La toma de lágrima se realizará por capilaridad, utilizando un capilar de vidrio de 4ul apoyado en el canto externo del ojo.
- 2) Sangre: La toma de sangre se realizará por punción venosa por personal especializado. Se le extraerán 6 ml de sangre.
- 3) Células epiteliales conjuntivales: Se obtendrán células epiteliales conjuntivales por citología por impresión conjuntival (CIC) y por citología por cepillado. Las citologías por impresión conjuntival y por cepillado para la obtención de células conjuntivales son pruebas mínimamente invasivas y sin riesgo que se realizarán bajo el efecto de anestésico tópico. En el caso de la citología por impresión conjuntival se procederá a aplicar un pequeño fragmento de filtro en la superficie conjuntival superior del ojo. Dicho filtro se retirará posteriormente y las células adheridas se utilizarán para los estudios de expresión génica. En la citología por cepillado, se utilizará un cepillo especial de pequeño tamaño, desechable y estéril, que se rotará suavemente sobre la superficie conjuntival superior del ojo. Las células adheridas serán utilizadas para los estudios por citometría de flujo.

Todas las muestras serán recogidas bajo un código alfanumérico para asegurar la protección de sus datos personales.

El material recogido estará bajo la custodia del IOBA y del personal investigador del estudio. El material no será comercializado ni manipulado por personal no autorizado. El material recogido para este estudio será utilizado posiblemente en su totalidad, si bien en cumplimiento del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, le informamos que en caso de tener resto sobrante de muestras a la finalización del proyecto, éste será conservado durante seis (6) meses después de finalizado el estudio, con el propósito de ser utilizado solo si hubiese que repetir alguno de los análisis.

Pasados seis (6) meses, se destruirá el material que no haya sido utilizado salvo que Ud. nos autorice a poder guardarlo para su uso posterior en estudios posteriores a este, pero de igual naturaleza, relacionados con la investigación en la línea de investigación de la Inflamación de la Superficie Ocular.

Si así nos autoriza esas muestras pasarán a formar parte de la Colección de muestras número 1417 denominada "Investigación en Ciencias de la Visión" dada de alta por el IOBA en el registro nacional de Biobancos. Esta autorización es totalmente voluntaria, y es independiente a su consentimiento de participación en este proyecto concreto; su negativa al uso posterior de la muestra en otros proyectos no condicionará en absoluto su participación o no en el presente proyecto.

La presencia proteica de citoquinas y quimioquinas serán analizadas en las muestras de lágrima y sangre mediante ensayos comerciales basados en el reconocimiento específico de proteínas mediante anticuerpos. Se utilizarán ensayos multianálisis basados en tecnología XMAP, que se analizarán en un equipo Luminex<sup>®</sup> o bien ensayos tipo ELISA que se analizarán en un espectrofotómetro. La expresión génica de dichas moléculas en las células se llevará a cabo mediante un ensayo en tiempo real de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR), para lo cual primeramente se aislarán las cadenas de ARN mensajero de las células y se retrotranscribirán a ADN complementario, que será utilizado en el ensayo. Se utilizará ensayos comerciales tipo array que se analizarán en un termociclador Real Time.

Las moléculas concretas a analizarse se decidirán más adelante y se le comunicarán si así Ud. lo solicitase. En todo caso se tratará siempre de moléculas relacionadas con el desarrollo de procesos inflamatorios y/ alérgicos.

## Riesgos que entraña el presente estudio

Usted será tratado siempre según las normas de Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki. El estudio no tiene como objetivo evaluar ni comparar la eficacia de ningún fármaco o tratamiento. En ningún momento se le administrará ninguna medicación o se le realizará prueba alguna que no pertenezca a la rutina médica mejor para su caso. No se trata pues, de un ensayo clínico, sino de un estudio de recogida de datos y muestras de manera sistematizada, que permitirá conocer e intentar solucionar mejor sus posibles problemas oculares.

No ha sido reportado ningún daño derivado de los procedimientos diagnósticos que se le van a realizar, sin embargo, todos los productos tienen el potencial de causar efectos secundarios en algunos individuos. Es posible que al día siguiente de la toma de la citología tenga una pequeña sensación de molestia en el ojo.

## Confidencialidad y protección de los datos

La muestra se recogerá empleando un procedimiento de codificación. Sólo el investigador responsable y colaboradores directos podrán relacionar estos datos con Vd. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Según la Ley Orgánica 15/99, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD) y el Real Decreto, 1720/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Desarrollo de la LOPD, le informamos que sus datos van



a formar parte de un fichero automatizado y manual denominado Pacientes cuyo responsable es el IOBA (Fundación General de la Universidad de Valladolid). Sus datos serán tratados para la finalidad de prestarle la asistencia sanitaria necesaria, para realizar la gestión administrativa y también, para fines de investigación y docencia médica. Atendiendo al artículo 14.2 del R.D. 1720/2007, le informamos que si en el plazo de 30 días no manifiesta su oposición, entenderemos que consiente a que podamos notificarle información sobre nuestras actividades y servicios por vía electrónica o postal; usted podrá revocar este consentimiento en cualquier momento. Y podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición dirigiéndonos una solicitud con copia de su DNI a La Fundación General de la Universidad de Valladolid en Plaza de Santa Cruz, 5 bajo del 47002 de Valladolid o al mail [protecciondatos@funge.uva.es](mailto:protecciondatos@funge.uva.es).

## Destino de la muestra

En cumplimiento del Real Decreto 1716/2011 de 18 de noviembre, la muestra será incluida en la colección de muestras biológicas indicada que el IOBA tiene dada de alta en el Registro Nacional de Biobancos:

1417 | Investigación en Ciencias de la Visión

y estará disponible para los investigadores involucrados en la línea de investigación:

Inflamación de la Superficie Ocular.

Podrá solicitar que se destruyan sus muestras dirigiéndonos una solicitud con copia de su DNI a La Fundación General de la Universidad de Valladolid en Plaza de Santa Cruz, 5 bajo del 47002 de Valladolid o al mail [protecciondatos@funge.uva.es](mailto:protecciondatos@funge.uva.es).

## Otra información relevante

A partir de los estudios que se realicen se podría obtener información de importancia para su salud y la de sus familiares. La información que se obtenga del análisis le será comunicada, exclusivamente a Vd., cuando sea relevante para su salud.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis así como la eliminación de sus datos personales. También debe saber que puede ser excluido del programa si los responsables del estudio lo consideran oportuno.



## Consentimiento informado

### “BIOMARCADORES Y NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN INFLAMACIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR”.

**Promotor del Estudio:** Ministerio de Ciencia e Innovación, España. SAF2010-15361

**Duración del estudio:** 01-Enero 2010 hasta 31-Diciembre de 2013.

**Responsables del Estudio:**

- Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro, (Investigador bioquímico; IP del estudio)
- Dr José María Herreras (Médico Oftalmólogo),
- Dra M Calonge (Médico Oftalmólogo)

Tf. 983 18 4750; Fax 983-18 47 62

**Centro:** Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra:

Yo

Nombre y apellidos del paciente:

He hablado con,

Nombre y apellidos del facultativo:

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Además de lo anterior, autorizo a que la muestra sobrante caso de que la haya pueda ser incluida en la Colección de muestras nº 1417 (denominada “Investigación en Ciencias de la Visión” dada de alta por el IOBA en el registro nacional de Biobancos) y que sea utilizada en estudios posteriores de naturaleza similar dentro de la línea de investigación en Inflamación de la Superficie Ocular.

Paciente:	NHC:	Representante Legal del Paciente(1):
Nombre: _____		Nombre: _____
NIF: _____		NIF: _____
		En calidad de: _____
Firma _____		Firma _____
(1) La representación legal deberá ser acreditada.		
<b>Facultativo</b>		
Nombre: _____		
Nº de Colegiado: _____		
Centro recogida: _____		
Firma _____		

### Copia para el Paciente