



Universidad de Valladolid



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Diferencias inter-individuales y variabilidad intersesión de IgA salival como potencial biomarcador del dolor en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado

Máster de Enfermería Oftalmológica 2016-17

Autora: Andrea Giaquinta Aranda

Tutora: Eva M^ª Sobas Abad

Cotutora: Amanda Vázquez

Julio 2017

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Hasta el momento, el dolor solo puede medirse con escalas subjetivas puesto que es lo único que está validado, pero es evidente que se necesitan medidas objetivas de dolor. Los biomarcadores en saliva analizados mediante la recogida de muestras por secreción pasiva es un método sencillo, libre de estrés y rápido, encontrándose entre ellos la IgAs que constituye el 15% de las inmunoglobulinas séricas y encontrándose científicamente demostrada su relación con el dolor. La mejor forma de estudiar el efecto de las condiciones ambientales en humanos es la de someterlos a condiciones controladas, aislándolos del ambiente externo a través de la cámara de ambiente controlado.

OBJETIVO: El objetivo de este estudio es analizar la variabilidad interindividual y la variabilidad intersesión de los valores de IgAs establecidos de dolor en la saliva de sujetos sanos sometidos a unas condiciones de ambiente controlado; 22°C y 50% de humedad.

MATERIAL Y MÉTODOS: Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica e la base de datos científica de PubMed. Posteriormente, se ha realizado un estudio clínico, prospectivo y observacional en el que se recogen dos muestras de saliva de individuos sanos entre 30-40 años, ambas separadas por un tiempo mínimo de 24h y tras haber permanecido durante 30 min en una cámara de ambiente controlado (T^a 22°C y H 50%).

RESULTADOS: Se reclutaron 8 sujetos a los que se recogió muestras salivales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el sexo para las concentraciones de IgAs ($p > 0,05$), CCI: 0,41 y cuyo análisis de Bland- Altman muestra que la diferencia entre las concentraciones es independiente de la media.

CONCLUSIONES: A pesar de los resultados obtenidos en este trabajo, donde las concentraciones de IgAs muestran una fiabilidad aceptable, se continuará con el estudio aumentando la muestra de participantes, así como los biomarcadores a analizar que serán incluidos con la IgAs, la Tsal, el cortisol, la AEA y el sTNF α RII, con el fin de realizar una comparación exacta coincidiendo lo más posible con el estudio de Sobas EM, (2016).

Palabras clave: Medida del dolor, medida objetiva del dolor, biomarcadores salivares.

ABSTRACT

INTRODUCTION: So far, pain can only be measured with subjective scales since it is the only one that is validated, but it is clear that objective measures of pain are needed. The salivary biomarkers analyzed by the collection of samples by passive secretion is a simple, stress-free and fast method, among them the IgAs constituting 15% of the serum immunoglobulins and being scientifically proven to be related to pain. The best way to study the effect of environmental conditions on humans is to subject them to controlled conditions, isolating them from the external environment through the controlled environment chamber.

OBJECTIVE: The objective of this study is to analyze interindividual variability and intersessional variability of established IgA values of pain in the saliva of healthy subjects submitted to controlled environment conditions; 22 ° C and 50% humidity.

MATERIALS AND METHODS: Initially, a bibliographic search was made based on the PubMed scientific database. Subsequently, a clinical, prospective and observational study was carried out in which two saliva samples were collected from healthy individuals between 30-40 years old, both separated by a minimum time of 24h and after having stayed for 30 min in a room chamber (22 ° C and 50% H).

RESULTS: Eight subjects were recruited and salivary samples were collected. There were no statistically significant differences between sex for IgA concentrations ($p > 0.05$), ICC: 0.41 and whose Bland-Altman analysis shows that the difference between the concentrations is independent of the mean.

CONCLUSIONS: In spite of the results obtained in this work, where IgA concentrations show acceptable reliability, the study will be continued by increasing the sample of participants, as well as the biomarkers to be analyzed with IgAs, Tsal, Cortisol, AEA and sTNF α RII, in order to make an exact comparison coinciding as much as possible with the Sobas EM study, (2016).

Key words: pain assessment, objective measure of pain, saliva biomarkers.

ÍNDICE

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia del dolor agudo postoperatorio.....	1
1.2 Métodos objetivos para medir el dolor	2
1.2.1 Medida de parámetros fisiológicos.	3
1.2.2 Determinaciones bioquímicas	4
1.3 La saliva.....	5
1.4 Determinaciones bioquímicas de este estudio: Inmunoglobulina A (IgA) secretora .	6
1.5 Influencia del ambiente en la saliva	6
2. JUSTIFICACIÓN.....	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
3.1 Hipótesis	8
3.2 Objetivos.....	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
4.1 Estrategia de búsqueda	9
4.2 Criterios de selección.....	9
4.3 Diseño del estudio	9
4.4 Muestra.	10
4.5 Procedimiento.....	11
4.5.1 Instrumentos utilizados	12
4.5.2 Variables.....	14
4.5.3 Análisis estadístico.....	15
4.5.4 Análisis de IgAs	15
4.5.5 Consideraciones ético-legales	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Características Sociodemográficas y Clínicas de la muestra.....	17
5.2 Condiciones de cada visita	18
5.3 Resultados de la concentración de IgAs	19

5.4 Cálculo de diferencias en cuanto a sexo.....	20
5.5 Análisis de Bland-Altman	20
5.6 Comparación de datos de IgAs con otros estudios	22
6. DISCUSIÓN.....	23
6.1 Comparación de estudios actuales	23
6.2 Comparación con el estudio de Sobas, EM. (2016). ³¹	24
7. APLICACIÓN A LA PRÁCTICA ENFERMERA	27
8. LIMITACIONES.....	28
8.1 Tiempo.....	28
8.2 Muestra	28
8.3 Biomarcadores	28
9. CONCLUSIONES	30
10. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	31
11. BIBLIOGRAFÍA	32
12. ANEXOS	35
Anexo I: Consentimiento informado	35
Anexo II: Hoja de información al paciente	36
Anexo III: Informe de aprobación del Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.	38
Anexo IV: Técnica y recomendaciones para la recogida de la saliva.	39
Anexo V: Cuestionario; “Evaluación de la paciente – Anamnesis en la historia clínica en salud reproductiva”	40
Anexo VI: Informe de aprobación de la Comisión de Investigación Clínica del IOBA.	41

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Resumen de los criterios de inclusión y exclusión generales.....	10
Tabla 2: Características Sociodemográficas de la muestra	18
Tabla 3: Datos descriptivos de IgAs y pruebas de normalidad	19
Tabla 4: Test de Wilcoxon.....	20
Tabla 5: Datos a comparar con estudios actuales	22
Tabla 6: Comparación de valores obtenidos en el estudio de Sobas, EM. (2016) ³¹ sobre la IgAs sin condiciones de ambiente controlado con este estudio.....	25
Tabla 7: Comparación de la fiabilidad de IgAs en sujetos sanos	26

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Descripción de la respuesta endocrina y metabólica por Kehlet ¹	3
Figura 2: Voluntarios incluidos y excluidos.....	17
Figura 3: Hologramas sexo y edad	17
Figura 4: Hologramas de las últimas comidas en visita 1 y 2	19
Figura 5: Concentraciones de IgAs en visita 1 y 2.....	20
Figura 6: Gráfico de Bland-Altman.....	21

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- **ACTH:** Adrenocorticotropina
- **ADH:** Hormona antidiurética
- **AEA:** Alfa amilasa secretora
- **AMPC:** Adenosinmonofosfato cíclico
- **CAC:** Cámara de ambiente controlado
- **CCI:** Coeficiente de Correlación Intraclase
- **CeLab:** Laboratorio de Investigación del Medio Ambiente Controlado
- **CRD:** Cuaderno de Recogida de Datos
- **DeCs:** Descriptores en Ciencias de la Salud
- **DPO:** Dolor Postoperatorio
- **ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- **EVA:** Escala Visual Analógica
- **GH:** Hormona del crecimiento
- **H:** Humedad
- **HR:** Humedad Relativa
- **IASP:** Association for the Study of Pain
- **IgAs:** Inmunoglobulina A secretora
- **IOBA:** Instituto de Oftalmobiología Aplicada
- **LCR:** Líquido cefalorraquídeo
- **Sg:** segundos
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **sTNF α RII:** Fracción soluble del receptor 2 del TNF α
- **T^a:** Temperatura
- **Tsal:** Testosterona salival

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del dolor agudo postoperatorio

El dolor se define según International Association for the Study of Pain (IASP) como “la experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada a una lesión real o potencial de un tejido que incluye una serie de conductas visibles y/o audibles que pueden ser modificadas por el aprendizaje”. En cuanto al término agudo, se refiere a “un curso corto, severo y de duración limitada”.¹

Uno de los retos más importantes que permanece sin resolver en el ámbito quirúrgico es el control satisfactorio del dolor postoperatorio (DPO), lo que supone un fuerte impacto en los pacientes y también en el sistema sanitario siendo los profesionales de la salud los encargados de prevenirlo y tratarlo. El DPO es un dolor de inicio reciente y duración limitada que aparece como consecuencia de la estimulación nociceptiva resultante de la agresión quirúrgica sobre los distintos órganos y tejidos.² Es evidente que la mayoría de los pacientes que se someten a intervenciones de este tipo padecen dolor no inmediato, sino una vez pasado el efecto de la anestesia. El DPO aparece con mayor frecuencia e intensidad en intervenciones intra-torácicas, intra-abdominales, renales, columna vertebral, grandes articulaciones, cirugía traumatológica de la mano y pie, y, por último cualquier procedimiento de cirugía mayor.^{2,3} Existen evidencias⁴ de que el control adecuado del DPO aumenta el confort y satisfacción de los pacientes contribuyendo a disminuir la morbilidad postoperatoria e incluso la estancia hospitalaria.

A pesar de que se han producido grandes avances en el conocimiento de la fisiopatología del dolor agudo,⁵ el DPO continúa sin resolverse. Sus características son previsibles y lo ideal sería por lo tanto anticiparnos evitando las complicaciones posibles. Este abordaje requiere la participación del equipo multidisciplinar que forma el personal sanitario implicado; anestesiólogos, cirujanos y personal de enfermería.

En los países industrializados del 15 al 20 % de la población sufre dolor agudo y del 25 al 30% presentan dolor crónico,⁶ mientras que en pacientes hospitalizados estudios a nivel mundial han registrado prevalencia de dolor moderado a severo, entre un 30 a 70%.⁷

También se estima que uno de cada cinco europeos (19%) sufre algún tipo de dolor crónico.⁸ En cuanto al DPO, la evidencia a nivel mundial muestra que su prevalencia de intensidad moderada a severa en pacientes hospitalizados es del 26 al 33%, y la del dolor severo se ha estimado entre el 8 y el 13%.⁹

La importancia del dolor se debe a que es un mecanismo de defensa, una señal de alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo pero en algunas ocasiones el dolor se convierte en una fuente de sufrimiento inútil¹⁰ capaz de disminuir la calidad de vida siendo posible su prevención.

1.2 Métodos objetivos para medir el dolor

Con el aumento de la expectativa de vida en la población, son necesarias nuevas investigaciones encaminadas a la evaluación y tratamiento del dolor postoperatorio en adultos para un control más efectivo y seguro del dolor.¹¹ La intensidad es el parámetro más difícil de determinar ya que no se puede medir de manera objetiva hasta el momento. Se estima en función de lo que manifiesta el paciente y en la habilidad del examinador para evaluar su estado físico.

Desde que el dolor fue declarado por la Sociedad Americana de Dolor como “el quinto signo vital”, se pusieron en marcha iniciativas para mejorar el control implementando la escala numérica Escala Visual Analógica (EVA).¹² Ha sido usada para evaluar el dolor somático que equivale al procedente de fascias, tejido muscular, periostio, articulaciones, ligamentos y tendones,² aunque un estudio recomienda que el uso de la escala EVA para un grupo etario mayor sea realizado con cautela y orientación.¹¹ Actualmente hay varias medidas unidimensionales como la EVA como la Escala de Dolor Facial para niños mayores de 3 años y medidas multidimensionales; Cuestionario de McGill, Test de Lattinen... para evaluar la intensidad del dolor pero no hay una específica que sea la mejor o primordial por encima de las demás ya que todas son subjetivas.

Dado que el dolor es una experiencia subjetiva, no es asequible con facilidad a la valoración objetiva mediante exploraciones físicas o técnicas complementarias.¹³ Lo ideal sería poseer un método objetivo para medir el dolor. Con este propósito se está trabajando en varias líneas:

1.2.1 Medida de parámetros fisiológicos.

A partir de los diferentes niveles de dolor; cutáneo o superficial, somático profundo y visceral se originan una serie de impulsos nociceptivos, que al alcanzar el sistema nervioso central (SNC) desencadenan una reacción en “cascada” que afecta a varios órganos y sistemas (endocrinometabólico, digestivo, respiratorio y cardiocirculatorio) frente a la agresión quirúrgica.²

- a) En el sistema endocrinometabólico se produce una activación del sistema simpático y del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, además de la liberación de sustancias humorales asociadas a la inflamación. Aparece un estado diabotogénico así como un aumento de potasio, resistencias periféricas y frecuencia cardíaca.⁵

Alteraciones endocrinas:

Aumento	ACTH, ADH, GH, AMPc, cortisol, catecolaminas, renina, angiotensina II, aldosterona y glucagón.
Disminución	Insulina, testosterona

Alteraciones metabólicas:

Hidratos de carbono	Hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina
Proteínas	Catabolismo proteico muscular
Grasas	Lipólisis del tejido adiposo con aumento de los AGL

ACTH: adrenocorticotropina (hormona corticotropa); ADH: hormona antidiurética; AMPc: adenosinmonofosfato cíclico; GH: hormona del crecimiento.

Figura 1. Descripción de la respuesta endocrina y metabólica por Kehlet.¹

- b) El sistema respiratorio se deteriora tras el acto quirúrgico suponiendo una disminución de los volúmenes pulmonares y alteraciones en la

¹ Kehlet H. Pain relief and modification of the stress response. En: Cousins MJ, Phillips GD, eds. *Acute Pain Management*. New York: Churchill Livingstone, 1986; 3: 49-75

ventilación/perfusión e hipoxemia.¹⁴ De hecho, el DPO es responsable del deterioro al impedir la tos y la respiración profunda.

- c) En el sistema cardiovascular se produce hiperactividad simpática y liberación de catecolaminas produciendo como consecuente la aparición de taquicardia e hipertensión. Debido a la inmovilidad a consecuencia del dolor y la disminución del flujo sanguíneo también hay riesgo de trombosis postoperatoria.⁵
- d) En el sistema gastrointestinal aparecen náuseas y vómitos, intolerancia digestiva y retraso en la recuperación del peristaltismo normal debido al dolor, efecto que se agrava si se administran opioides, en cambio está demostrado que la analgesia epidural lo contrarresta favoreciendo la motilidad gastrointestinal.¹³

Entre las pruebas que pueden solicitarse para medir parámetros fisiológicos se encuentran las respuestas psicofisiológicas del sistema nervioso autónomo, patrones electromiográficos, potenciales evocados, determinación de péptidos opioides endógenos en líquido cefalorraquídeo (LCR); que disminuyen en presencia de dolor, reflejos nociceptivos de dolor, determinación de catecolaminas, cortisol, ADH...¹⁵

1.2.2 Determinaciones bioquímicas

Existe una gran variedad de mediadores químicos relacionados con el dolor. Los podemos agrupar en dos niveles:¹⁶

1. Periférico (estímulo excita a receptores periféricos). Los principales son la serotonina; participa más en la modulación inhibitoria del dolor junto con la noradrenalina, la histamina; interviene en procesos inflamatorios originando vasodilatación y edema, prostaglandinas; junto con los radicales superóxidos liberados, son mediadores comunes en la inflamación y desarrollan hiperalgesia, sustancia P cuya liberación es bloqueada por los opiáceos.¹⁷
2. Medular (asta posterior)
3. Central (percepción cerebral y medular). Aparece el dolor.

Tras una operación quirúrgica y aparición de dolor agudo se pueden detectar niveles elevados de hormonas liberadas por los diferentes órganos y sistemas. Algunos de los mediadores químicos ellos son secretados desde el SNC con finalidad analgésica o de

control descendente del dolor, además de tener un papel de diversa importancia sobre SNS (noradrenalina y acetilcolina) o la respuesta de estrés (cortisol).¹⁷

Métodos bioquímicos:¹⁸

- Medición de endorfinas en LCR.
- Medición de catecolaminas y cortisol.
- Medición de hormona antidiurética.
- Gases sanguíneos.

Actualmente se está investigando orientada en encontrar medidas objetivas a través de biomarcadores relacionado con el grado de dolor agudo postoperatorio.

1.3 La saliva

La saliva es una secreción compleja proveniente de las glándulas salivales mayores en el 93% de su volumen y de las menores en el 7% restante. El 99% es agua mientras que el 1% está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas.¹⁹

La secreción diaria oscila entre 500-700ml, con volumen medio en la boca de 1,1ml controlado por el sistema nervioso autónomo. Mientras que en reposo, la secreción oscila entre 0,25 y 0,35ml/mn y procede sobre todo de las glándulas submandibulares y sublinguales. El mayor volumen salival se produce antes, durante y después de las comidas. Su pico máximo aproximadamente es a las 12 del mediodía y disminuye durante el sueño.²⁰ Algunas moléculas pueden llegar a la saliva desde el suero atravesando barreras capilares, así mismo los componentes del suero también pueden llegar a la saliva. Es por ello la novedosa perspectiva para su aplicación en el diagnóstico de patologías²¹ llegando incluso a su detección.^{22,23,24} Debido a ello, se cabe esperar su relación con el dolor y su posible medición. No hay estudios con evidencia científica que demuestren una relación objetiva entre muestras salivales y dolor, por ello el interés de realizar este estudio.

La saliva tiene una estrecha correlación con el suero, pues ciertos biomarcadores se encuentran presentes en ambas sustancias como el cortisol y la testosterona. Otros en

cambio, son específicos de la saliva y ausentes en suero ya que son de producción local como la IgA secretora (IgAs) y la alfa amilasa secretora (AEA).²⁵

1.4 Determinaciones bioquímicas de este estudio: Inmunoglobulina A (IgA) secretora

La IgA constituye el 15% aproximadamente de las inmunoglobulinas séricas y predomina en su forma secretora (IgAs) en la saliva, lágrimas, sudor, secreciones bronquiales e intestinales, leche humana y calostro.²⁶ La función principal de la IgAs es la defensa contra infecciones así como la de impedir la entrada de antígenos hacia la circulación.²⁷

El intervalo de referencia normal para la IgAs es entre 4 a 30mg/dl, estando relacionado con la tasa de flujo salival, condiciones hormonales, emociones, edad, dieta, actividad física y condiciones genético-ambientales.²⁸

Para la determinación de la IgA en saliva se utilizará la técnica de ELISA, (The Binding Site, Birmingham, UK).

1.5 Influencia del ambiente en la saliva

El concepto de ambiente se considera “al conjunto de aspectos físicos, químicos y biológicos y de los factores sociales y económicos susceptibles de tener un efecto directo o indirecto, inmediato o a largo plazo sobre los seres vivos y las actividades humanas.”²⁹

Los estudios que buscan resultados científicos relacionados con estos temas se ven sometidos a las variaciones climáticas diurnas, pudiendo existir cambios en la humedad relativa (HR) y T^a entre estaciones e incluso entre la mañana y la noche. Los contaminantes ambientales presentes en la atmósfera también pueden influir en los valores específicos.

Por todo ello, la mejor forma de estudiar el efecto de las condiciones ambientales en humanos es la de someterlos a condiciones controladas, aislándolos del ambiente externo a través de la cámara de ambiente controlado.

2. JUSTIFICACIÓN

La problemática del dolor postoperatorio no se resuelve sólo con la creación de unidades de dolor, sino que hace falta, además de que el personal médico y de enfermería empleen de manera adecuada los medios terapéuticos disponibles, sobre todo los opioides. Hasta el momento, el dolor solo puede medirse con escalas subjetivas puesto que es lo único que está validado, pero es evidente que se necesitan medidas objetivas de dolor.

Entre los diferentes tipos de medidas objetivas de dolor propuestas en la bibliografía, destacan los biomarcadores. Se define como biomarcador a aquella molécula medible en una muestra biológica de forma objetiva, sistemática y precisa, cuyos niveles se constituyen en indicadores de que un proceso es normal o patológico y sirven para monitorizar la respuesta al tratamiento. Un biomarcador ideal debería tener las siguientes características: fácil de medir, técnicamente no complejo, de bajo costo, y que detecte la enfermedad/procesos estudiados con una alta sensibilidad y especificidad.³⁰ Existen en todos los fluidos corporales, sangre, lágrima, etc... Nosotros nos hemos centrado en biomarcadores en saliva puesto que la recogida de saliva por secreción pasiva es un método sencillo, libre de estrés, rápido y con bajo coste. La existencia de una determinación objetiva del dolor en saliva supondría un gran avance para la medicina general.

En 2016 se realizó un estudio clínico observacional con el propósito de analizar por primera vez las variaciones de cortisol, AEA, IgAs, Tsal y sTNF α RII en la saliva de voluntarios sanos con el fin de seleccionar de forma fiable y reproducible los biomarcadores más fiables para evaluar el dolor de manera objetiva.³¹ Se escogieron estos potenciales biomarcadores tras verificar en la evidencia científica una posible relación entre los mismos y dolor. Siguiendo los pasos del estudio anterior, y teniendo en cuenta que la IgAs es uno de los biomarcadores con mejor reproducibilidad, se pretende estudiar las diferencias inter-individuales así como la variabilidad entre las sesiones para comprobar si unas condiciones ambientales adversas pueden modificar o afectan directamente los valores de los biomarcadores para así tenerlo en cuenta en estudios posteriores que evalúen el dolor en el paciente postoperatorio.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis:

La IgAs se ve afectada por factores ambientales tales como la temperatura y la humedad, por lo que el control de dichos factores bajo una cámara de ambiente controlado puede mejorar la repetibilidad de sus concentraciones.

3.2 Objetivos:

General:

- Analizar la variabilidad interindividual y la variabilidad intersesión de la IgAs como potencial biomarcador de dolor en la saliva de sujetos sanos sometidos a unas condiciones de ambiente controlado.

Específicos:

- Realizar una búsqueda bibliográfica actualizada para determinar por qué los cambios de ambiente pueden alterar los biomarcadores establecidos para el estudio.
- Comparar los datos obtenidos con los existentes hasta el momento en la bibliografía científica en sujetos no sometidos a condiciones ambientales controladas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo consta de dos fases, la primera de ellas consiste en una búsqueda bibliográfica para estudiar la bibliografía existente hasta el momento en la evidencia científica relacionada con biomarcadores salivares de dolor, medidas objetivas de dolor, etc.

La segunda fase consiste en el desarrollo del estudio clínico propiamente detallado a continuación.

4.1 Estrategia de búsqueda

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en las principales bases de datos de Ciencias de la Salud con evidencia científica como PubMed/MedLine con los siguientes Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCs); Saliva, Cámara de ambiente controlado, dolor agudo, dolor postoperatorio... La búsqueda se ha comenzado y finalizado en febrero de 2017, por lo que cualquier artículo publicado con posterioridad queda automáticamente excluido.

4.2 Criterios de selección

Inicialmente se incluyeron artículos originales, tanto observacionales como experimentales, y revisiones, escritos en español e inglés y limitando el periodo de publicación desde 2011 a 2017 con el fin de revisar la literatura científica más actual en relación a la pregunta de investigación. A posteriori, ha sido necesario añadir bibliografía más antigua debido a la obtención de escasos resultados en algún apartado de la introducción.

4.3 Diseño del estudio

El estudio que ha dado lugar al trabajo fin de máster se ha diseñado como un estudio clínico, prospectivo y observacional desarrollado en las dependencias del IOBA. El estudio consta de dos visitas separadas por un tiempo mínimo de 24 horas y ambas, aproximadamente a la misma hora de la mañana. El protocolo del estudio así como el

consentimiento informado (Anexo I) y la hoja informativa para los participantes (Anexo II) fueron aprobados por la Comisión de Investigación del IOBA (Anexo VI) y por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Anexo III). El estudio cumple con los principios de la Declaración de Helsinki y de la ley española de protección de datos.

4.4 Muestra.

Se seleccionaron sujetos sanos que cumplieran los criterios de inclusión establecidos (Tabla 1), y que aceptaron colaborar de manera voluntaria.

Tabla 1. Resumen de los criterios de inclusión y exclusión generales

	CRITERIOS INCLUSIÓN	CRITERIOS EXCLUSIÓN
Estado físico	Sujetos sanos, ausentes de patologías autoinmunes.	Sujetos con presencia de cualquier dolor asociado.
Edad	30-40 años.	<30 y >40 años.
Raza y género	Sujetos de raza blanca, ambos sexos.	Sujetos de raza que no sea blanca.
Estado del género femenino.	Mujeres desprovistas del estado de exclusión.	Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia y mujeres con tratamiento hormonal.

Además de estos anteriores, quedaban excluidos los sujetos que consumiesen fármacos psicotrópicos (antipsicóticos, benzodiazepinas, fármacos anticonvulsivos o antidepresivos), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), antihistamínicos y analgésicos de forma habitual.

Se adoptan estos criterios puesto que en este centro IOBA, previamente se realizó un estudio sobre reproducibilidad de potenciales biomarcadores de dolor, en condiciones ambientales no controladas y se quiere hacer este estudio pareado en edad y con los mismos criterios de inclusión pero bajo condiciones ambientales controladas para establecer comparaciones.

4.5 Procedimiento

Inicialmente, se proporciona y explica a los pacientes la información relativa al estudio haciendo entrega de las Hojas de Información (Anexo II). Una vez comprendido y habiendo esclarecido cualquier duda que pudiera surgirles, se explica a los participantes el consentimiento informado (Anexo I) para su firma, aclarando que son libres de interrumpir la participación antes o durante el estudio sin tener que dar ningún tipo de explicación.

Posteriormente, se recogieron diversos datos sociodemográficos y clínicos y las mujeres cumplimentaron un cuestionario relativo al ciclo menstrual (Anexo V).

Permanecen en la CAC con un ambiente establecido de 22°C y 50% de humedad. Durante 30 minutos empleando los 5 últimos minutos en enjuagarse con el fin de evitar la contaminación salivar, siguiendo instrucciones previamente establecidas (Anexo IV). Posteriormente se procede a recoger la muestra con la previa colocación de guantes durante 5 minutos por la técnica de “babeo”.



Una vez recogida la muestra, se mantiene congelada a -20°C hasta su análisis posterior.

Los tubos se identifican mediante número ordinal y letra, por ejemplo: Participante AGA: Visita 1: tubo 1A, Visita 2: tubo 1B.

4.5.1 Instrumentos utilizados

Cámara de ambiente controlado (CAC)

La cámara de ambiente controlado es una habitación aislada del exterior en la que se puede controlar diversas variables ambientales; temperatura, viento, humedad, presencia de flujo de aire, presión atmosférica, exposición a contaminantes entre otras.

Los sujetos del estudio permanecerán en su interior el tiempo mínimo de 30 minutos exponiéndose bajo unas condiciones de ambiente previamente determinadas dentro de una cámara ambiental (Vision I + D, SL; Valladolid, España) en el Laboratorio de Investigación del Medio Ambiente Controlado (CELab), con sede en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA).

A lo largo de la historia el uso de este tipo de habitaciones se han utilizado para evaluar la reacción del organismo humano a diferentes situaciones. La finalidad del uso de la cámara de ambiente controlado en este estudio se basa en definir la forma en que unas condiciones diferentes pueden influir a los biomarcadores en saliva y poder analizar cómo estos se ven afectados después de la exposición comparándolos con valores medidos en diferentes condiciones.

Actualmente las CAC son y han sido utilizadas en diversos estudios con objetivos diferentes tales como la provocación alérgica en los que se provoca al usuario una reacción a un determinado alérgeno para analizar la eficacia de un tratamiento con productos de inmunoterapia.³² En el *Journal of Allergy and Clinical Immunology* se publicó una revisión que demanda ensayos clínicos para la evaluación de la eficacia clínica haciendo también uso de las CAC.³³

Otro propósito del uso de la CAC ha sido el exponer a los sujetos a contaminantes ambientales con el objetivo de estudiar el edificio enfermo (SEE) analizando la respuesta a los sujetos a distintos niveles. Según la definición de Berenguer MJ, del Centro Nacional de Condiciones de Trabajo el SEE “*se da al conjunto de síntomas que presentan los individuos en edificios generalmente equipados con aire acondicionado, mostrando quejas referentes a su salud sin ninguna lesión orgánica o signo físico presente*”.³⁴

En otra ocasión se utilizó una CAC para crear dos condiciones ambientales diferentes con el fin de investigar el efecto de las exposiciones en la fisiología de la película lagrimal llegando a la conclusión de que las condiciones ambientales con baja humedad afectan negativamente a la estabilidad lagrimal y su producción llegando a parámetros semejantes a los del ojo seco.³⁵

Diversos estudios se han encontrado relacionados también con el Síndrome del Ojo Seco, una enfermedad prevalente caracterizada por la disfunción de las glándulas lagrimales secretoras que resultan inestables provocando daños en la superficie ocular. Otros estudios^{36,37} evidencian que ciertos factores ambientales como la humedad baja y las corrientes de aire contribuyen a la aparición de los síntomas del ojo seco en sujetos normales, y demuestran el empeoramiento de la enfermedad en los individuos que la padecen. También se ha evaluado la eficacia de las lágrimas artificiales y corticoesteroides (Dexametasona al 0,1%) en pacientes con Síndrome del Ojo Seco bajo condiciones de ambiente controladas, encontrando un empeoramiento cuando los sujetos estaban sin tratar y también cuando fueron tratados durante dos semanas con lágrimas artificiales.³⁸ En cambio, después de dos semanas de tratamiento con corticoesteroides, disminuyeron los síntomas de irritación ocular en comparación con su evaluación inicial. Esto indica que el tratamiento con corticoesteroides puede suprimir la inflamación de la superficie ocular aun en condiciones adversas.

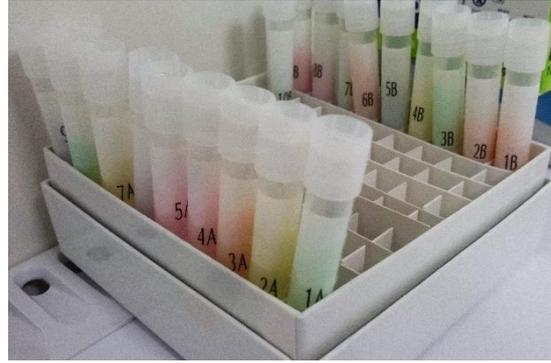
No se han encontrado por el momento estudios que hagan uso de la CAC enfocados en la saliva, motivo por el cual y viendo los resultados de los estudios anteriores, queremos comprobar si las condiciones de ambiente controladas pueden influir en los parámetros de ésta, pudiendo evidenciarlo científicamente.

- *Cuestionario de elaboración propia nombrado como “Evaluación de la paciente – Anamnesis en la historia clínica en salud reproductiva” (Anexo V).*

Este cuestionario se ha cumplimentado por las participantes del estudio durante la estancia en la CAC. En el estudio de Sobas E.M et al, 2013 se le dio importancia al periodo fértil de la mujer así como el día del ciclo en el que se encontraban, por lo que se justifica la razón de recoger la información.

- *Tubos de saliva y otros materiales.*

Los tubos de saliva se han procedido a embolsar y esterilizar cumpliendo con las normas de higiene correspondiente, así como la pajita para introducir por la técnica pasiva “de babeo” más fácilmente en el tubo. También se ha hecho uso de guantes y temporizadores.



- Cuaderno de recogida de datos (CRD).

Todas las variables pendientes de estudiar, han sido documentadas en las hojas del CRD del estudio. Los sujetos han sido identificados tanto con iniciales como con número único para cada uno sin aparecer datos personales.

4.5.2 Variables

Las variables del estudio se han recogido mediante la anamnesis individual. Dichas variables son las siguientes:

- Variables de identificación: sexo y edad.
- Otras:
 - Tiempo transcurrido desde la última comida (entrada a la cámara de ambiente): se refiere comida a cualquier alimento o bebida tomado por última vez.
 - Fase del ciclo menstrual en el que se encuentra el sexo femenino para analizar el efecto en los niveles de los biomarcadores tras la estancia en la cámara de ambiente y la fase del ciclo menstrual correspondiendo a la fase folicular; de 1 a 14 días, la fase lútea; de 15 a 28 días, y la fase hemorrágica.
 - Tratamientos sistémicos /observaciones importantes a destacar en el estudio si las hubiera.
 - Valores ambientales de la CAC siendo en todos los sujetos la T^a ambiente de 22°C y la humedad ambiente del 50%.
 - Fecha y hora de las tomas (visita 1 y 2).

- Tiempo de recogida de la saliva (en minutos y segundos), siendo el establecido para todos los sujetos un periodo de 5 minutos. Si el tubo de recogida de 5 ml se llenase antes de 5 minutos, se registraría la cantidad de tiempo transcurrido.
- Cantidad (ml) de saliva recogida, así como el flujo (ml/min) calculado.
- Concentración de Ig A salivar.

4.5.3 Análisis estadístico

Los datos de este estudio se almacenaron previa codificación y fueron analizados con el software: “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS v.23 para Windows).

Se describen las variables cualitativas mediante frecuencias absolutas y relativas (n,%) y para las variables cuantitativas se utiliza la media, mediana, desviación estándar, intervalo de confianza del 95%, y el rango.

Se realizó el test de Shapiro Wilk para estudiar la normalidad de cada una de las variables utilizadas.

Por consecuente, para hacer el contraste de hipótesis y ver si hay diferencias significativas entre las dos muestras (Visita 1 y visita 2), se realizó T- Student en variables que siguieron una distribución normal y en las que no lo siguieron, su alternativa no paramétrica para muestras relacionadas que es el Contraste de Wilcoxon.

Las diferencias entre grupos (hombre/mujer) se han analizado mediante el test de U de Mann-Whitney para variables continuas.

También se realiza un análisis de Bland-Altman con límites de acuerdo para estudiar el grado de acuerdo entre las muestras salivares.

Para todos los análisis efectuados, se estableció el nivel de significación estadística de $p < 0,05$.

4.5.4 Análisis de IgAs

Las determinaciones de IgA en saliva se han realizado mediante la prueba de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) por técnica de Sandwich. ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática.³⁹

4.5.5 Consideraciones ético-legales

Este Proyecto, está aprobado por la Comisión de Investigación Clínica del IOBA (Anexo VI) y por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (anexo III). Aquí puedes poner lo que ponías en el resumen de la D. Helsinki...

5. RESULTADOS

5.1 Características Sociodemográficas y Clínicas de la muestra

Se incluyen un total de 8 sujetos. Inicialmente se reclutaron 11 sujetos de los cuales 3 fueron excluidos (Fig.2); dos en la primera visita por utilizar tratamientos farmacológicos (antihistamínicos) que podrían interferir en la concentración de IgAs sin haber sido previamente especificados en los criterios de exclusión y un tercero en la segunda visita por presentar dolor de origen localizado acompañado de un cuadro de malestar general junto con la toma de un fármaco AINE; ibuprofeno.

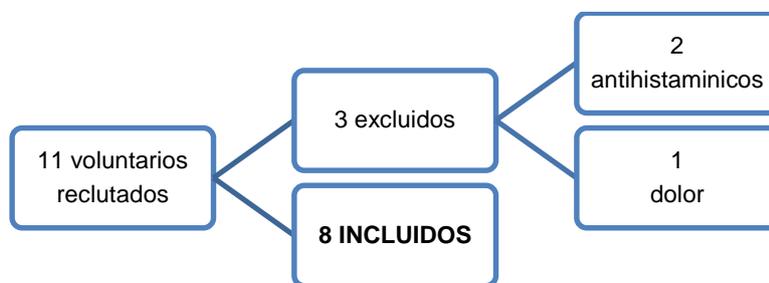


Figura 2: Voluntarios incluidos y excluidos.

La distribución entre ambos sexos es homogénea (50%) (Fig.3). La edad media es de $36,87 \pm 3,04$ dentro del rango establecido previamente (rango 30-40) (Fig.3).

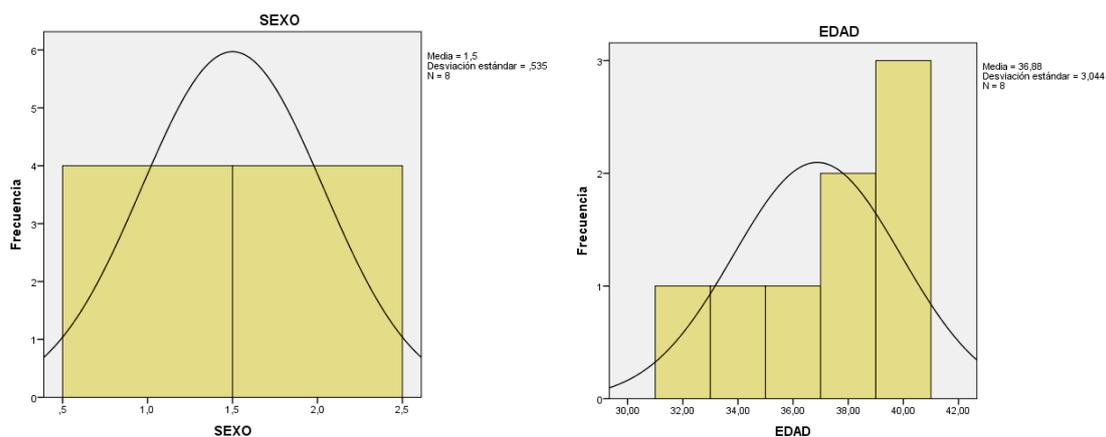


Figura 3. Hologramas sexo y edad.

Uno de los sujetos incluidos en este estudio se encontraba bajo tratamiento sistémico con tardyferon. Tras haber revisado la evidencia científica referente a dicha medicación, no se contempló una posible influencia del mismo sobre el parámetro a estudiar (IgA) y por tanto no se excluyó al paciente del estudio.

Si consideramos tres fases menstruales; fase folicular (día 1-14), fase lútea (día 15-28) y fase hemorrágica, podemos decir que tres de las cuatro mujeres incluidas en el estudio se encontraban en las dos visitas en el periodo de fase lútea.

Tabla 2. Características Sociodemográficas de la muestra.

	Muestra Inicial (n=8) n (%)
Edad (años): media \pm DE	36,87 \pm 3,04 (30-40)
Sexo:	
• Hombre	4 (50)
• Mujer	4 (50)
Ciclo ovárico:	
• Fase Folicular	0
• Fase lútea	3 (75)
• Fase hemorrágica	0
Tratamientos sistémico	1 (12,5)
• Tardyferon	

5.2 Condiciones de cada visita

Ambas muestras se recogieron aproximadamente a la misma hora de la mañana (entre 10:00 y 11:00 am) y tras haber permanecido durante 30 minutos en una cámara de ambiente controlado en condiciones estándar de temperatura y humedad (T^a 22°C y 50% H) por este motivo no hay diferencias en este aspecto entre las dos tomas. El tiempo transcurrido entre la toma de las dos muestras para la mayoría de los sujetos fue de 24 horas, siendo la mayor diferencia entre ambas tomas de 28 minutos. El tiempo medio transcurrido desde la última comida fue de 231,25 min (rango 60-690) en la primera visita y de 258 min (rango 92-685) en la segunda visita (Fig.4).

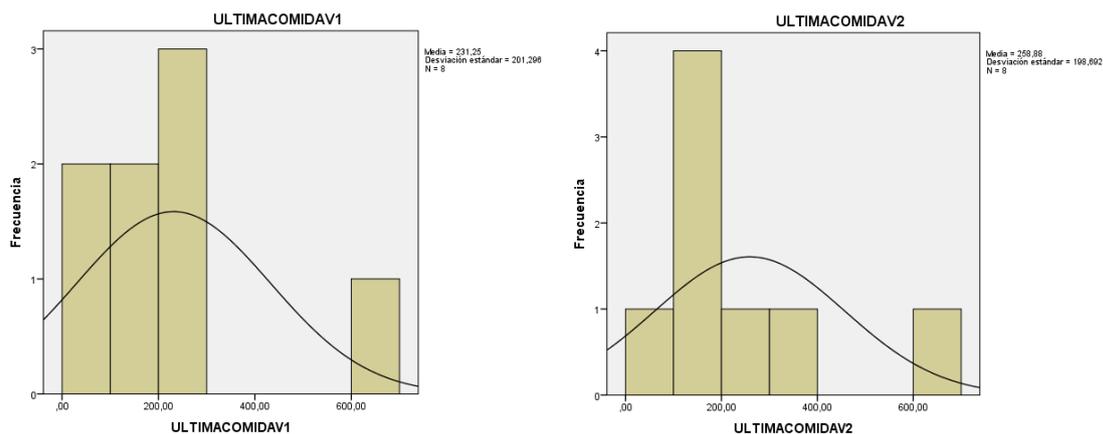


Figura 4. Hogramas de las últimas comidas en visita 1 y 2.

El tiempo mediano de recolección de la primera muestra de saliva fue de 300 sg con un rango de (260-300) mientras que la mediana y el rango de la segunda muestra de saliva fue exactamente la misma. No existen diferencias significativas entre ambas tomas ($p=0,674$).

El flujo medio de la primera visita fue de 0.39 ± 0.24 con un rango de 0.1-0.8 y en la segunda de (0.43 ± 0.25) con un rango de 0.18-0.9.

5.3 Resultados de la concentración de IgAs

La concentración de IgAs, en la primera visita tiene un valor mediano de 34,38 y en la segunda de 51,85 (Tab.3). La comparación de las concentraciones correspondientes a las dos visitas mediante el Contraste de Wilcoxon arroja un p valor de 0,161 ($p > 0,05$) (Tab.4) por lo que se acepta la hipótesis de igualdad y no hay diferencias significativas entre ambas tomas (Fig. 5).

Tabla 3. Datos descriptivos de IgAs y pruebas de normalidad.

	N	Media	DT	IC 95% para la media		Med.	Mín.	Max.	H ₀ : normalidad	
				Inf.	Sup.				SW	p-valor
Toma 1	8	62,07	67,43	5,695	118,444	34,38	5,27	198,59	0,822	0,049
Toma 2	8	75,52	75,15	12,687	138,357	51,85	13,12	203,17	0,801	0,030

DT=Desviación Típica; Med. = Mediana; Mín.=Mínimo; Máx. = Máximo; SW = Shapiro-Wilk test

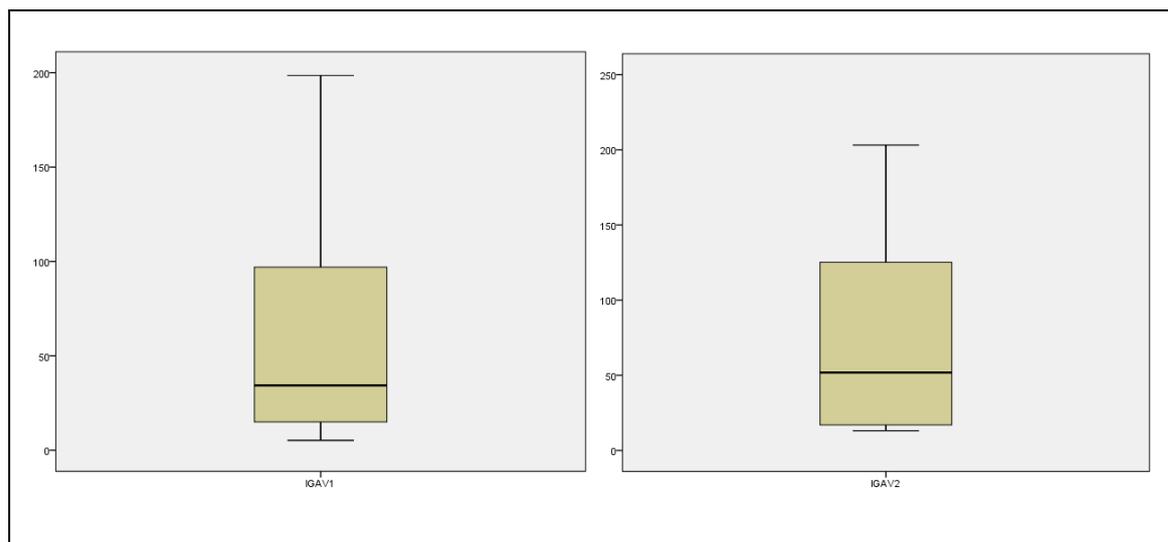


Figura 5. Concentraciones de IgAs en visita 1 y 2.

Tabla 4: Test de Wilcoxon.

Estadísticos de prueba ^a	
	IGAV2 - IGAV1
Z	-1,400 ^b
Sig. asintótica (bilateral)	,161

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos negativos.

5.4 Cálculo de diferencias en cuanto a sexo

Se comprobó a través del test U de Man Whitney si existían diferencias en cuanto a la concentración de IgAs referentes al sexo. El p-valor en la primera y segunda toma fue de 0,386 y 0,773 por lo que las diferencias no serían significativas.

5.5 Análisis de Bland-Altman

Se hace un análisis de Bland-Altman con límites de acuerdo para estudiar el grado de acuerdo entre las muestras salivares. Muestra la concordancia entre la diferencia de las concentraciones de las dos muestras y la diferencia de las dos medias de las

concentraciones por cada individuo. El diagrama de dispersión muestra que la diferencia entre las concentraciones es independiente de la media.

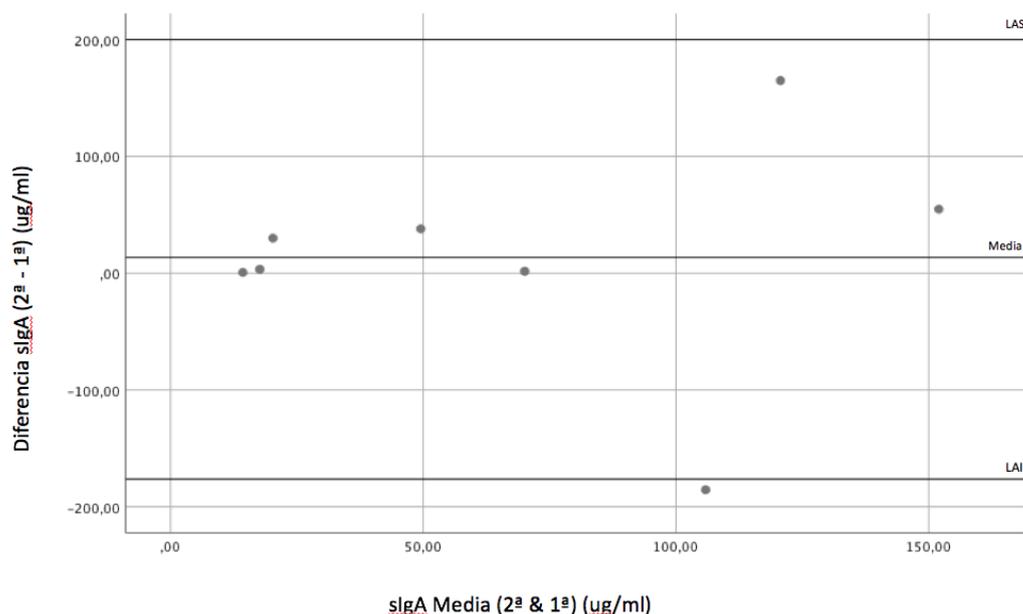


Figura 6: Gráfico de Bland-Altman

Con el fin de cuantificar la fiabilidad de las mediciones asociadas a las variables cuantitativas continuas, se ha utilizado el coeficiente de correlación intraclass (CCI). Los valores obtenidos obtienen un valor de 0,417 significando una relación suficiente (41%) según los valores convencionales para CCI por lo que las medidas cuantitativas del estudio concuerdan suficientemente.

Para terminar el análisis se ha creado una variable de diferencia entre las dos tomas. Se ha analizado el coeficiente de asimetría y curtosis que informan sobre la forma de distribución de una variable.

En el coeficiente de asimetría se obtiene un resultado de 0,906, valor >0 representando un sesgo positivo (a la derecha) tendiendo a ser una curva simétrica por ser un valor cercano a 0. La curtosis mide cuán escarpada o achatada está una curva o distribución, indica la cantidad de datos que hay cercanos a la media obteniéndose un valor >0 (3,30), por lo que la curva según el signo de curtosis será leptocúrtica significando que los datos están muy concentrados en la media, siendo una curva muy apuntada.

5.6 Comparación de datos de IgAs con otros estudios

Tabla 5: Datos a comparar con estudios actuales.

AUTOR	n	EDAD	SEXO	RECOGIDA	EST	T/C	HORA	ANALISIS	CONCENTR
Zhang, S. (2016)	20	27-70	H Y M	Secreción pasiva	no	3 ml	SD	ELISA	97.47±5.10 µg/l
Sabah, A. (2017)	20	35-60	10H y 10M	Secreción pasiva	no	SD	7:00 - 8:00	ELISA	122.4±37,9 µg/mL
Saito, Y. (2017)	27	20-64	H y M	Salisoft ^R	no	2 min	Mañana	SD	30,51±24,40 mg/dL
Sobas EM. (2016) (1ª visita)	34	30-40	11H y 23M	Secreción pasiva	no	5 min	10:00 - 11:00	ELISA	169,70±44,55 µg/mL
Sobas EM. (2016) (2ª visita)	34	30-40	11H y 23M	Secreción pasiva	no	5 min	10:00 - 11:00	ELISA	168,74±42,32 µg/mL
Rangbulla, V. (2017)	20	18-45	SD	Secreción pasiva	no	5 ml	SD	ELISA	81,23±24,61 µg/mL

EST: Estimulación salivar previa si/no; T/C: Tiempo/cantidad estimado; SD: Sin determinar

6. DISCUSIÓN

En primer lugar, se ha de destacar que aunque, como limitación principal, la muestra es muy pequeña y no se podrían sacar conclusiones evidentes, a través de este Trabajo Fin de Máster se hace una aproximación inicial a los resultados obtenidos, aunque como se comenta más adelante, este proyecto se continuará hasta tener un tamaño muestral óptimo (n=34).

Al observar la comparación de las medianas de las concentraciones de IgAs por visita en separado y en conjunto, por sexo, para cada uno de los valores, no se encuentran diferencias significativas así como tampoco en el flujo salivar, cantidad de flujo recogido y tiempo transcurrido desde la última comida, recogiendo significaciones mayores a 0,05.

6.1 Comparación de estudios actuales

Para comparar los datos obtenidos con la evidencia científica existente hasta el momento, hay que tener en cuenta varios factores imprescindibles; que los sujetos sean de raza humana, que los estudios obtengan muestras a través de la recolección de la saliva independientemente de la forma que establezcan, que sean estudios actuales mayoritariamente y a ser posible, que hayan utilizado la técnica ELISA para la obtención de valores, para poder hacer una comparación más exhaustiva.

Se han encontrado estudios con objetivos variados, pero todos lo responden a través de la recolección de la saliva. En el estudio de Sabah, A. (2017)⁴⁰, se llevó a cabo para determinar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 (DMII) en la saliva y valorar su posible uso como método no invasivo para supervisar el control glucémico en estos pacientes obteniéndose la aceptación de la hipótesis. En el estudio de Zhang, S. (2016)⁴¹ determinó los cambios de concentración de la IgAs de los pacientes con cáncer oral, disminuyendo notablemente (un 45%) en la saliva de dichos pacientes. El estudio de Saito, Y. (2017)⁴² sugiere que las bacterias del ácido láctico aumentan y mejoran la liberación secretora de IgAs. Por último, en el estudio de Rangbulla, V. (2017)⁴³ se

compararon los niveles de IgAs y otros parámetros en pacientes con periodontitis crónica e individuos con encía sana.

El número de muestra en cuanto a sujetos participantes en los grupos control (sujetos sanos) de los estudios son mayores que el presente (n= 20, 20, 20, 27) con n=8 sujetos.

En cuanto a los criterios establecidos de inclusión, el más semejante al presente trabajo es el estudio de Saito, Y. (2017),⁴² ya que incluye sujetos desprovistos de cualquier enfermedad que requiera tratamiento y enfermedades graves, es decir, incluye tanto para grupo control como para grupo intervención sujetos sanos. En cambio posee una diferencia significativa tanto con el resto de estudios mencionados anteriormente como con el presente en cuanto a la recogida de la muestra; los sujetos fueron sometidos al uso de Salisoft[®] (Assist Co., Ltd., Tokio, Japón) que consta de masticar una esponja de plástico durante 2 minutos insertándose posteriormente en el tubo de ensayo. El uso de tubos para la recogida está presente en el resto de estudios, aunque hay que señalar que en el estudio de Sabah, A. (2017)⁴⁰ se pidió a los sujetos que doblasen la cabeza hacia adelante, posición que no se asemeja al resto. En cambio el almacenamiento de la muestra coincide con el presente siendo a una T^a de -20°C cuando los estudios de Zhang, S. (2016)⁴¹ y Rangbulla, V. (2017)⁴³ se conservaron a -80°C.

Todos los restantes utilizan la secreción pasiva no estimulada variando en la cantidad de muestra recogida (Zhang, S. (2016)⁴¹; 3 ml, Rangbulla, V. (2017)⁴³; 5ml) así como en el tiempo de recogida (Saito, Y. (2017)⁴²; 2 min). En el presente trabajo, la cantidad mínima que se recogió fue de 0,5ml en un tiempo determinado de 5 minutos. Teniendo en cuenta el tiempo establecido de Saito, Y. (2017),⁴² cabe suponer que las muestras salivares serían de escaso flujo.

6.2 Comparación con el estudio de Sobas, EM. (2016).³¹

La hipótesis del presente estudio, se basa en los hallazgos de Sobas, EM, que analizó por primera vez las variaciones de biomarcadores; entre ellos la sIgA en la saliva de voluntarios sanos, libres de dolor con el fin de seleccionar los más adecuados, en términos de reproducibilidad y fiabilidad.

Para el presente trabajo y como ya se ha comentado anteriormente, se estableció un protocolo con criterios y variables semejantes a estudiar. Debido a las limitaciones nombradas, la muestra que se ha obtenido finalmente (n=8) no ha sido la deseada, ya que para poder hacer una comparación lo más semejante posible hubiera sido necesario una muestra de 34 sujetos.

Al igual que Sobas EM., la recogida de la muestra se realizó por la mañana; 09 a.m – 12 p.m siendo en este estudio de 10 a.m – 11 a.m con un intervalo de tiempo de 24 horas en ambos estudios. La única diferencia existente y significativa es el modo en el que se recogieron las muestras siendo en un ambiente variable de temperatura; de 17,2 la más baja a 26,1 la más alta y humedad de 23,2-58,1% entre las dos visitas, aunque en la misma habitación en el estudio de Sobas EM., mientras que en el presente también se recogieron en la misma habitación pero con T° definida de 22°C y H de 50% sin haber variado en ningún momento durante las visitas.

También se ha querido analizar el potencial del ciclo femenino en los niveles de IgAs como hizo Sobas EM., pero la escasa información que se ha obtenido de la muestra (n=4 mujeres) donde solo 2 supieron comunicar el día aproximado del ciclo menstrual ha impedido el análisis, por lo que se retomará cuando se amplíe dicha muestra.

Entre todos los biomarcadores que se analizaron en el estudio a comparar, la IgAs fue la que mayor reproducibilidad entre ambas colecciones de un mismo individuo tuvo por lo que se procede a comparar nuestros datos estadísticos con los datos de su estudio.

Tabla 6. Comparación de valores obtenidos en el estudio de Sobas, EM. (2016)³¹ de IgAs sin condiciones de ambiente controlado con este estudio.

	1º muestra		2º muestra		Dif.	IC de 95%	p-valor
	Concentra.	95% CI	Concentra.	95% CI			
1	169,70±44,55	154,15-185,24	168,74±42,32	153,97-183,50	-0,96	-6,47,+8,38	0,794
2	62,07±67,43	5,695-118,44	75,52±75,159	12,687-138,35	-13,45	-94,32,+67,42	0,161

1: Estudio de Sobas, EM; 2: Estudio de Giaquinta, A; Concentra.: Concentración; Dif.: Diferencia; IC: Intervalo de confianza.

En la concentración de IgAs de los sujetos con CAC se observa una menor concentración que los sujetos sin CAC tanto en la primera (169,70 ± 44,55 vs. 62,07 ± 67,43), como en la segunda visita (168,74 ± 42,32 vs. 75,52 ± 75,15).

En cuanto a la p-valor, en ninguno de los estudios sería estadísticamente significativo por lo que no se permite discutir sobre cuál podría ser más reproducible. Claramente, se debería de aumentar la muestra del presente estudio para poder discutir con p-valor más evidente.

Tabla 7. Comparación de la fiabilidad de IgAs en sujetos sanos

Biomarcador (IgAs)	CCI	95% IC CCI	Clasif. reproducibilidad
1. Sobas, EM.	0,879	0,805-0,942	Muy buena
2. Giaquinta, A.	0,417	(-)0,618-0,710	Buena

n=34 (1) vs n=8 (2) para el biomarcador IgAs; CCI: Coeficiente de correlación intraclase; IC: Intervalo de confianza; Clasif.: Clasificación.

Al evaluar la fiabilidad de las mediciones asociadas a las variables cuantitativas continuas de IgAs y comparar con los datos de Sobas, EM se observan relaciones positivas en ambos estudios, ya que valores entre 0,4-0,75 representan una fiabilidad regular-buena y valores por encima de 0,75 representan una fiabilidad excelente. Hay que tener en cuenta que la muestra es mayor en 1, aunque la medición se ha realizado con el mismo material e instrumento??? pero en diferentes condiciones (sin condiciones de ambiente controlado vs bajo condiciones de ambiente controlado).

7. APLICACIÓN A LA PRÁCTICA ENFERMERA

Esta línea de investigación debe continuarse puesto que si se encontraran biomarcadores asociados a dolor, sería un gran avance para enfermería. Además, se podría llegar al desarrollo de un kit salivar cuya función sea la de medir el dolor de forma objetiva in situ que supondría un cambio para la enfermera tanto de atención primaria como especializada. Novedoso y además muy útil en pacientes pediátricos o pacientes con alteraciones físicas/psíquicas que les incapaciten el poder expresar tanto verbalmente como físicamente el grado de dolor que presentan.

8. LIMITACIONES

8.1 Tiempo

Al tratarse de un trabajo fin de máster, se ha contado con un tiempo limitado de realización del estudio clínico. A ello se le une la respuesta del Comité Ético de Investigación que se ha demorado en aprobar el trabajo con un tiempo superior a dos meses.

8.2 Muestra

El tamaño muestral es limitado, debido a que los participantes mostraban criterios de exclusión variados debido al rango de edad establecido, tales como la toma de anticoncepción en mujeres. Por otro lado, al tener que acudir dos días consecutivos, a una hora determinada y permanecer un tiempo determinado, muchos sujetos invitados a participar no han dispuesto del tiempo otorgado por lo que también se considera una limitación importante a tener en cuenta.

8.3 Biomarcadores

Este estudio se completará con el resto de biomarcadores que están en proceso de análisis siendo los siguientes:

- Cortisol (hidrocortisona)

Hormona esteroidea, o glucocorticoide producida por la glándula suprarrenal en respuesta a la hormona corticotropina (ACTH) de la hipófisis. Esta hormona se ha medido a través de la sangre y a través de la orina, sin embargo en esta última se encuentran sesgos inherentes. Por consiguiente se trata de buscar alternativas como las lágrimas, sudor y saliva siendo esta última una muestra simple, no invasiva y, además, disminuye

el riesgo de falsos positivos.⁴⁴ Un estudio entre otros, confirma que la medición de cortisol en saliva tiene concordancia positiva con los niveles de cortisol sérico.⁴⁵

- Enzima alfa amilasa salivar (AEA)

Es la enzima más abundante en la saliva⁴⁶ y pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas. Se ha demostrado que los niveles de alfa-amilasa aumentan en respuesta al estrés tanto físico como psíquico⁴⁷ y su activación está correlacionada con el incremento de catecolaminas en plasma,⁴⁸ por lo que la AEA refleja principalmente la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA) simpático.⁴⁹ Un estudio demuestra que no sólo la AEA supervisa el factor del estrés junto con el cortisol, si no que también supervisa el nivel de estrés causado por el dolor aumentando su concentración.⁵⁰

- Testosterona en saliva (Tsal)

Refleja la fracción libre de la hormona circulante. También se ha establecido que la elevación de la razón cortisol/testosterona es un indicador de estrés crónico⁵¹ y viendo las relaciones con la aparición del dolor parece razonable estudiarla.

- Fracción soluble del receptor 2 del TNF α (sTNF α RII)

Los factores de necrosis tumoral se refieren a dos tipos de polipéptidos similares (caquectina y linfotoxina), que comparten algunos efectos biológicos como sus propiedades antitumorales. Son miembros de la clase de las citosinas y desempeñan un papel mediador de la inflamación y la respuesta inmune⁵² por lo que también es objeto de estudio en relación con el dolor.

9. CONCLUSIONES

1. Los valores de concentración de IgAs han mostrado una buena reproducibilidad, lo que le sitúa como un posible biomarcador de dolor.
2. Factores ambientales como la temperatura y humedad (en condiciones variables), afectan a las concentraciones de los biomarcadores en la saliva.
3. No existen diferencias significativas según el sexo de los sujetos de este trabajo, por lo que se podría decir que el sexo no influye en los valores de IgAs.
4. Estos resultados pueden ser el principio de una línea de investigación que podría permitir la medición objetiva de dolor por parte de los profesionales de enfermería.

10. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

A pesar de saber que los marcadores de mayor reproducibilidad fueron IgAs y sTNF α RII en el estudio de Sobas EM., se analizarán también próximamente el cortisol, Tsal y AEA para corroborar los niveles bajo ambiente controlado.

Sería útil realizar estudios de los biomarcadores más reproducibles en el postoperatorio de procedimientos quirúrgicos de cualquier campo de la medicina donde el aumento de dolor sea evidente para estudiar las relaciones existentes entre los datos subjetivos proporcionados por los pacientes a través de las escalas subjetivas (validadas) y los datos “objetivos” a partir de los potenciales biomarcadores del dolor.

Por otro lado, si finalmente la IgAs fuera un biomarcador de dolor, se podría investigar si las modificaciones de temperatura y humedad pudieran actuar como agente estresante de los biomarcadores tras la aparición del dolor. Para ello se diseñaría un estudio en el que se sometiera a voluntarios sanos a diferentes y variadas temperaturas y condiciones de humedad para analizar las variaciones existentes.

11. BIBLIOGRAFÍA

¹Restrepo GCE, Marriquer VH, Botero PLF. Gabapentina y pregabalina: ¿cuál es su papel en el perioperatorio? *Rev Soc Esp Dolor*. 2007;6:432-436.

²Catalá E. Manual del Tratamiento del Dolor; Dolor postoperatorio. 2ªEd. Pag 203.

³Bonica JJ. Postoperative Pain. En: Bonica JJ, ed. *The Management of Pain*. (2ª ed.). Filadelfia: Lea & Febiger, 1990: 1.

⁴Vidal M.A, Torres L.M, De Andrés J.A, Moreno-Azcoitia M. Estudio Observacional sobre el dolor postoperatorio leve o moderado desde el punto de vista del anestesiólogo en España. *PATHOS. Rev Soc Esp Dolor*. 2007, 8:550-567.

⁵Martínez-Vázquez J, Torres L.M. Prevalencia del dolor postoperatorio: Alteraciones fisiopatológicas y sus repercusiones. *Rev Soc Esp Dolor*. 2000, 7: 465-476.

⁶Erazo M.A, Pérez L, Colmenares C.C, Álvarez H, Suárez I, Mendivelso F. Prevalencia y caracterización del dolor en pacientes hospitalizados. *Rev Soc Esp Dolor* 2015; 22(6):241-248.

⁷Sawyer J, Haslam L, Daines P, Stilos K. Pain prevalence study in a large Canadian teaching hospital. Round 2: lessons learned? *Pain Management Nursing*. 2010;11(1):45-55.

⁸Breivik H, Collett B, Ventafridda V, et al. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 2006;10:287-333.

⁹Machado J. et al. Are we controlling postoperative pain?. *Rev Colom Anestesiología* 2013; 41(2):132-138.

¹⁰Bataille E, Chausset R. Bases Neurofisiologiques. *Soins* 1997: 6-8

¹¹Labrocini PJ et al. Evaluación del dolor en el adulto mayor. *Acta Ortopédica Mexicana* 2016; 30(2):73-80.

¹²A. Gkotsi, D. Petsas, V. Sakalis, A. Fotas, A. Triantafyllidis, I. Vouros, et al. Pain point system scale (PPSS): A method for postoperative pain estimation in retrospective studies *J Pain Res*, 5 (2012), pp. 503–510

¹³Catalá E. Manual del Tratamiento del Dolor; Historia clínica del paciente con dolor. 2ª Ed. Pag 22

¹⁴Reyes A, de la Gala F, Garutti I. Postoperative pain: multimodal analgesia. *Patología del aparato locomotor* 2004; 2 (3): 176-188

¹⁵M. Ferrándiz, E. Català. Las clínicas del dolor. E. Català, M. Ferrándiz, M. Genové (Eds.), *Manual de Tratamiento del Dolor* (2nd), Publicaciones Permanyer, Barcelona 2008

¹⁶Burgess PR, Perl ER. Cutaneous mechanoreceptors and nociceptors. En: Iggo A (ed.) *Handbook of sensory Physiology*. Springer-Verlag. Berlin 1973; 2: 29-78

¹⁷Romera E, Perena M.J, Perena M.F, Rodrigo M.D. Neurofisiología del dolor. *Rev Soc Esp Dolor* 2000; 7(2):11-17.

¹⁸Fugarolas W, Carballar A, Prado F, Cano F, Odor A. Control del dolor postoperatorio. 1990; 13:79-100.

-
- ¹⁹ Llana-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:449-55
- ²⁰ Nauntofte B, Tenevuo JO, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E, eds. *Dental Caries. The disease and its clinical management*. Oxford. Blackwell Munksgard; 2003. p. 7-29.
- ²¹ Haeckel R, Hanecke P. Application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. *Ann Biol Clin* 1993; 51:903-10.
- ²² Matsukazi T et al. Function of the Membrane Water Channel Aquaporin-5 in the Salivary Gland. *Acta Histochem Cytochem* 2012; 45(5):251-259.
- ²³ Pollak L et al. Varicella-zoster DNA in saliva of patients with meningoencephalitis: a preliminary study. *Acta Neurol Scand* 2015; 131(6):417-21.
- ²⁴ Adornetto G et al. An electrochemical immunoassay for the screening of celiac disease in saliva samples. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(23):7189-96.
- ²⁵ Líder mundial en ensayos de la saliva. Salimetrics Europe Ltd.
- ²⁶ Zaldívar Ochoa M. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2002;18(5):352-354.
- ²⁷ Chacón de Petrola MR, Flores ME, Rodríguez S, Valles L, Petrola C, Torres A, et al. Niveles de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en saliva en una población sana del Estado Carabobo. *Salus online* 2008;8(1):8-16.
- ²⁸ Martínez E, Juárez P, Vila G, Hormaechea M. Relationship between bucal health and salivary immunoglobulin. A concentration in adolescents. *Odontoestomatología* 2013;15(21).
- ²⁹ Arana A. Construction of the Institutional knowledge around the Environment concept. *Revista de Investigación* N°63. 2008.
- ³⁰ Gil F. The role of biomarkers in human toxicology. Departamento de Medicina Legal y Toxicología. Granada
- ³¹ Sobas E.M et all. Reliability of Potential Pain Biomarkers in the Saliva of Healthy Subjects: Inter-Individual Differences and Intersession Variability. *PLoS ONE* 11(12): e0166976. doi:10.1371/journal.pone.0166976
- ³² Ellis AK, Soliman M, Steacy LM, Adams DE, Hobsbawn B, Walker TJ. Clinical validation of controlled exposure to birch pollen in the Environmental Exposure Unit (EEU). *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2016; 19:12:53.
- ³³ Karen R, Susanne K, Stefan V, Oliver P. Environmental exposure chambers in allergen immunotherapy trials: Current status and clinical validation needs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2015; 135(3):636-643.
- ³⁴ Ministerio de trabajo y asuntos sociales. NTP 289: Síndrome del Edificio Enfermo. Berenguer MJ.
- ³⁵ Abusharha A, Pearce E, Ian D, Fagehi R. Effect of ambient temperatura on the human tear film. *Eye & Contact Lens.* 2016; 42(5):308-312.

-
- ³⁶ Lopez-Miguel A, Teson M, Martin-Montanez V, et al. Dry eye exacerbation in patients exposed to desiccating stress under controlled environmental conditions. *Am J Ophthalmol*. 2014; 157(4):788–798.
- ³⁷ Alex A, Edwards A, Hays JD, et al. Factors predicting the ocular surface response to desiccating environmental stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54(5):3325–3332.
- ³⁸ León C, Loza A. Biomarkers in sepsis: Simplifying the complexity?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(3):137–139.
- ³⁹ Cultek. Fundamentos y tipos de ELISAs, protocolo y técnicas:2006.
- ⁴⁰ Sabah A et al. Salivary changes in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr*. 2017; (17) 30097-8.
- ⁴¹ Zhang S et al. Variation and significance of secretory immunoglobulin A, interleukin 6 and dendritic cells in oral cancer. *Oncol Lett*. 2017; 13(4):2297-2303.
- ⁴² Saito Y et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study of the effect of *Lactobacillus paracasei* K71 intake on salivary release of secretory immunoglobulin A. *Biosci Microbiota Health Food*. 2017; 36(2):55-63.
- ⁴³ Rangbulla V et al. Salivary IgA, Interleukin-1 β and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients. *Chin J Dent Res*. 2017; 20(1):43-51.
- ⁴⁴ Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A, Yagmur E. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clin Chim Acta* 2007; 382: 15-19
- ⁴⁵ Lavalley F et all. Validación de la medición de cortisol en saliva de una población de adultos jóvenes. 2011; 19(4):146-148.
- ⁴⁶ Zakowski JJ, Bruns DE. 1985. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 21: 283–322.
- ⁴⁷ Granger DA, Kivlighan KT, El-Sheikh M, Gordis EB, Stroud LR. 2007. Salivary α -Amylase in Biobehavioral Research. Recent Developments and Applications, New York Academy of Sciences, 1098: 122–144.
- ⁴⁸ Nater, U. M., La Marca, R., Florin, L., Moses, A., Langhans, W., Koller, M. M., Ehlert, U. 2006. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity-associations with adrenergic activity, *Psychoneuroendocrinology*, 31:49-58.
- ⁴⁹ Aguilar M.J et all. Influence of a program of physical activity in children and adolescents obese: evaluation of physiological stress by compounds in saliva; study protocol. *Nutr Hosp* 2013; 28(3):705-708.
- ⁵⁰ Uesato M, Nabeya Y, Akai T, et al. Salivary amylase activity is useful for assessing perioperative stress in response to pain in patients undergoing endoscopic submucosal dissection of gastric tumors under deep sedation. *Gastric Cancer* 2010;13:84-89.
- ⁵¹ Álvarez A, González R, Marrero M. Role of testosterone and cortisol in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Rev Cubana Endocrinol* 2010; 21(1)
- ⁵² Martins e Silva J. Biochemical characterization and metabolic effects of tumor necrosis factor. *Acta Med Port* 1991; 1(20).

12. ANEXOS

Anexo I: Consentimiento informado

Consentimiento informado para el estudio que tiene de título “Diferencias inter-individuales y variabilidad intersesión de potenciales biomarcadores de dolor en saliva de sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado”

El paciente firmará dos copias del consentimiento de las cuales, una copia será para el participante y otra copia será para el investigador.

Código del Estudio: PI 13-55

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....
(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.
Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

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

- Para cumplir con lo establecido en el Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de muestras biológicas de origen humano, las muestras se destruyan a los tres meses de finalizar el proyecto.

SI NO

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

Anexo II: Hoja de información al paciente

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Diferencias inter-individuales y variabilidad intersesión de potenciales biomarcadores de dolor en saliva de sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado”

CÓDIGO DEL PROMOTOR:

PROMOTOR: Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Eva M^a Sobas Abad

CENTRO: Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Este-Hospital Clínico Universitario y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente.

Para cumplir con lo establecido en el Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de muestras biológicas de origen humano, está previsto que las muestras se destruyan a los tres meses de finalizar el proyecto.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la lectura. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

El objetivo de este estudio es analizar la repetitividad interindividual del cortisol, la alfa amilasa secretora, la inmunoglobulina A, la testosterona y el factor soluble del receptor 2 del TNF α a través de la saliva.

Para ello, a 34 sujetos sanos entre 30 y 40 años, después de haber permanecido durante 30 minutos en una cámara de ambiente controlado, situada en el IOBA, se les tomarán tres muestras de saliva en un intervalo mínimo de un día entre toma y toma. La obtención de esta muestra no supondrá ningún riesgo para el sujeto puesto que no se trata de una técnica

invasiva. Consiste en recoger la saliva durante cinco minutos en unos tubos específicos mediante la técnica pasiva denominada “de babeo”.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

En la actualidad hay un especial interés por la forma de medir el dolor y por establecer qué tipo de escalas pueden ser más eficaces.

Hay varias escalas y métodos subjetivos para evaluar el dolor pero ninguno de ellos está completamente libre de problemas. Entre las más utilizadas se encuentran las Escalas Analógicas Visuales (EVA) y las Escalas de Calificación Numéricas del Dolor (NRS). No obstante, existe la necesidad de desarrollar nuevos modelos clínicos objetivos para investigar de forma más eficaz el manejo del dolor después de la cirugía y el efecto de los tratamientos preventivos o de protocolos analgésicos que se van desarrollando.

Con este estudio se pretende comprobar la repetitividad interindividual del análisis de los marcadores citados anteriormente en la saliva para luego poder probar la validez de estos biomarcadores como un modelo clínico de dolor en la cirugía refractiva corneal, que es la que se usa para corregir la miopía, la hipermetropía, el astigmatismo y la presbicia.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna.

El paciente firmará dos copias del consentimiento de las cuales, una copia será para el participante y otra copia será para el investigador.

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

Anexo III: Informe de aprobación del Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.



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

Valladolid a 23 de marzo de 2017

En la reunión del CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE del 23 de marzo de 2017, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación.

17-607 TFM NO HCUV	DIFERENCIAS ÍTER-INDIVIDUALES Y VARIABILIDAD INTERSESIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES DE DOLOR EN SALIVA DE SUJETOS SANOS BAJO CONDICIONES DE AMBIENTE CONTROLADO	IP: ROBERTO REINOSO OTROS INVESTIGADORES EN IOBA: ANDREA GIAQUINTANA, EDUARDO TAMAYO, EVA MARÍA SOBAS ABAD. IOBA RECIBIDO: 08-03-2017
------------------------------------	---	--

A continuación les señalo los acuerdos tomados por el CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE en relación a dicho Proyecto de 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. Javier 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



Anexo IV: Técnica y recomendaciones para la recogida de la saliva.

Técnica y recomendaciones para la recogida de saliva

Se debe seguir las siguientes recomendaciones para realizar correctamente la recolección de la saliva:

- El paciente no debe comer, beber, (todo menos agua), tomar chicles o lavarse los dientes al menos una hora antes de la recogida de la muestra.
- El consumo de cafeína aguda se debe evitar una hora antes de la extracción.
- El ejercicio se debe evitar antes de la participación en el estudio.
- Justo antes de la toma de saliva se realizará un enjuague con agua limpia durante 5 minutos para evitar la contaminación de la saliva con restos de alimentos y la activación del flujo salivar.
- El paciente tiene que tragar toda la saliva de la boca antes de empezar la recogida de la muestra.
- El paciente debe depositar en el tubo de forma intermitente toda la saliva que fuese acumulando durante un período de 5 minutos. Aproximadamente, se necesita 1 ml de saliva para la determinación. Se recogerán 4-5 ml de saliva en cada tubo.
- Es importante aclarar que en este método de recolección no puede existir estimulación intencionada de la saliva, como pueden ser estímulos gustativos como el ácido cítrico o estímulos mecánicos utilizando la masticación de parafina.
- No se recogerán muestras cuando hay enfermedades bucales, inflamación o lesiones de la boca. Si existiera una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta deberá ser descartada, se esperará 10 minutos y se recogerá una nueva muestra.

Anexo V: Cuestionario; “Evaluación de la paciente – Anamnesis en la historia clínica en salud reproductiva”

Evaluación de la paciente – Anamnesis en la historia clínica en salud reproductiva

Nombre:

Fecha de nacimiento:

Fecha actual:

Preguntas sobre periodo fértil:

*Si no está en periodo de gestación pase a la pregunta N° 3.

1. ¿Está embarazada?
2. ¿Está en periodo de lactancia?
3. ¿Cuánto tiempo aproximado le duran sus ciclos menstruales?
4. ¿Sus ciclos son regulares?
5. ¿Se encuentra en este momento con el periodo?

Si es así, ¿A qué día del periodo pertenece?

Si no es así, ¿Sabría decirme en qué día del ciclo se encuentra?

- Antes del periodo de ovulación (día 14)
- Después del periodo de ovulación

6. ¿Siente dolores en su periodo?
7. ¿Está bajo tratamiento hormonal?

Si es así, ¿Cuál de los siguientes es?

- Pastillas anticonceptivas
- Parche
- Anillo
- Inyección de progestina trimestral
- Dispositivo intrauterino (DIU)

Anexo VI: Informe de aprobación de la Comisión de Investigación Clínica del IOBA.



Universidad de Valladolid



COMISION DE INVESTIGACION

Dña. M^a 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 proyecto de TFM “**Valorar las diferencias íter-individuales y la variabilidad intersección de potenciales biomarcadores de dolor en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado**” de la alumna **Andrea Giaquintana Aranda** con número de registro: 003/2017, ha sido revisado en la última reunión de la Comisión de Investigación de 9 de marzo de 2017.

Y para que así conste expido el presente certificado.

En Valladolid, a 14 de marzo de 2017

Fdo.: M^a Paz García García

Secretaria de la Comisión de Investigación