



Universidad de Valladolid

Facultad de Enfermería de Valladolid

Grado en Enfermería

Trabajo de Fin de Grado

Curso 2017/2018

**Diferencias inter-individuales y
variabilidad inter-sesión de potenciales
biomarcadores de dolor en sujetos sanos
bajo condiciones de ambiente controlado**

Alumna: Patricia Ruano Pequeño

Tutora: Eva María Sobas Abad

Cotutora: Amanda Vázquez Hernández

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los biomarcadores más importantes ya descritos en la saliva relacionados con el dolor son el cortisol, la AAs, la IgAs, la testosterona y el sTNF α RII. La saliva es el método de elección para determinar los biomarcadores de dolor ya que se considera una prueba de diagnóstico rápida y poco invasiva. Los factores ambientales afectan a los biomarcadores que encontramos en las lágrimas, por lo que, en cierta medida, pueden afectar a los que encontramos en la saliva.

JUSTIFICACIÓN: En la actualidad solo están validados métodos subjetivos para la medición del dolor. Estos métodos son escalas que precisan unos niveles adecuado de agudeza visual, función motora y habilidad cognitiva para trasladar la sensación de dolor a la escala; por lo que es evidente que se necesitan nuevos métodos objetivos para valorar el dolor.

OBJETIVOS: Analizar las diferencias inter-individuales y la variabilidad inter-sesión de los biomarcadores de dolor en saliva de sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio clínico, prospectivo y observacional desarrollado en las dependencias del IOBA, donde se recogen dos muestras de saliva a voluntarios sanos que cumplen los criterios de inclusión sometidos durante media hora a condiciones de ambiente controlado, ambas muestras deben estar separadas por un tiempo mínimo de 24 horas.

RESULTADOS: Se analizaron muestras salivares a 34 sujetos sanos bajo condiciones ambientales controladas. Los biomarcadores analizados fueron el cortisol, la testosterona, la AAs y el sTNF α RII, que mostraron un CCI de 0,169; 0,603; 0,42 y 0,987 respectivamente. Encontramos diferencias significativas en el cortisol y en AAs.

CONCLUSIONES: Se ha demostrado que los factores ambientales afectan a las concentraciones de los biomarcadores en la saliva. El sTNF α RII ha mostrado niveles aceptables de repetibilidad, por el contrario, el cortisol y la AAs tiene un nivel de repetibilidad bajo. Son necesarios más estudios sobre la testosterona para establecer conclusiones fiables.

PALABRAS CLAVE: Biomarcadores; saliva; dolor; valoración del dolor.

ÍNDICE

RESUMEN	I
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 El dolor	6
1.2 Métodos actuales subjetivos para la medición del dolor	6
1.3 Métodos objetivos para la medición del dolor	7
1.3.1 Saliva	8
1.4 Biomarcadores del dolor en saliva	8
1.4.1 Cortisol	8
1.4.2 Alfa amilasa salival (AAs)	8
1.4.3 Inmunoglobulina A secretora (IgAs)	9
1.4.4. Testosterona	9
1.4.5 Factor de necrosis tumoral soluble – receptor α II (sTNRF α RII)	9
1.5 Influencia del ambiente en la saliva	9
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3.1 Hipótesis	11
3.2 Objetivos	11
3.2.1 General	11
3.2.2 Específicos	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1 Diseño del estudio	12
4.2 Tamaño muestral	12
4.3 Sujetos seleccionados	12
4.4 Criterios de inclusión y exclusión.	13
4.4.1 Criterios de inclusión	13
4.4.2 Criterios de exclusión	13
4.5 Procedimiento	13

4.5.1 Recogida de saliva y manipulación de las muestras.....	14
4.6 Material utilizado.....	14
4.7 Variables a recoger y analizar	15
4.8 Determinación de los biomarcadores de dolor en la saliva	16
4.9 Análisis estadístico	17
4.10 Consideraciones ético-legales.....	17
5. RESULTADOS	19
5.1 Resultados del tamaño muestral	19
5.2 Condiciones de las visitas.....	21
5.3 Resultados de los biomarcadores	21
5.4 Análisis de Bland-Altman	23
6. DISCUSIÓN.....	25
7. LIMITACIONES Y FORTALEZAS	28
7.1 Limitaciones	28
7.2 Fortalezas.....	28
8. APLICACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	29
9. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	30
10. CONCLUSIONES.....	31
11. BIBLIOGRAFÍA	32
12. ANEXOS	35
Anexo I – Consentimiento informado	35
Anexo II - Recomendaciones para la recogida de la muestra de saliva	36
Anexo III – Hoja de información al paciente	37
Anexo IV – Evaluación de la paciente – Anamnesis en la historia clínica en salud reproductiva, general y visual.....	40
Anexo V – Informe de aprobación de la Comisión de Investigación Clínica del IOBA	42

Anexo VI – Informe de aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid	43
Anexo VII – Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tamaño muestral.....	19
Figura 2. Distribución de la muestra en función del sexo y la edad.....	20
Figura 3. Distribución de las mujeres según el ciclo menstrual.....	20
Figura 4. Concentración de los biomarcadores analizados de dolor en saliva en ambas muestras	22
Figura 5. Gráfico de Bland-Altman.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias de concentraciones de los biomarcadores de dolor en saliva entre ambas muestras.....	22
Tabla 2. Coeficiente de Correlación Intraclase para cada biomarcador	23
Tabla 3. Comparación de los valores obtenidos en los biomarcadores analizados en el estudio actual con los valores obtenidos en el estudio realizado en el año 2016 (15)....	27
Tabla 4. Comparación de repetibilidad de los biomarcadores en saliva en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado con el estudio publicado en el año 2016 (15).	27

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AAs: Alfa amilasa salival

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

CAC: Cámara de ambiente controlado

CCI: Cociente de Correlación Intraclase

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CERLab: Laboratorio de Investigación del Medio Ambiente Controlado

DT: Desviación Típica

EN: Escala Numérica

EV: Escala Verbal

EVA: Escala Visual Analógica

IASP: International Association for the Study of Pain

IC: Intervalo de Confianza

IgAs: Inmunoglobulina A Secretora

IOBA: Instituto de Oftalmobiología Aplicada

OMS: Organización Mundial de la Salud

RIQ: Rango Intercuartílico

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

sTNF α RII: Factor de Necrosis Tumoral Soluble – Receptor alfa II

TNFs: Factor de Necrosis Tumoral

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El dolor

Según la *International Association for the Study of Pain* (IASP) el dolor se define 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” (1). En ciertas ocasiones el dolor puede suponer una disminución de la calidad de vida de las personas, siendo posible su prevención.

La clasificación del dolor la podemos hacer atendiendo a su duración (agudo y crónico), fisiopatología subyacente (neuropático y nociceptivo), localización (somático, visceral), otros tipos de dolor (oncológico, psicógeno...) e intensidad (leve, moderado y severo) (2). Sin embargo, en la práctica clínica observamos que estas definiciones no son excluyentes, y podemos encontrar una persona con varias de estas características.

La clasificación más importante atiende a su tiempo de duración, por lo que podemos diferenciarlo en dolor agudo y dolor crónico.

El dolor agudo resulta de una lesión o de un proceso inflamatorio de los tejidos por lo que tiene una función protectora o de señal de alarma. La duración del dolor agudo es de segundos, minutos o días, desapareciendo cuando la afección que lo originó cumple su período normal de sanación (3).

El dolor crónico es el dolor que persiste más allá del tiempo esperado de curación (3 meses), puede o no estar asociado con una causa identificable o daño real del tejido y no tiene ninguna función (4). Es una mala experiencia que poco a poco deteriora el estado de salud y después mental de un individuo, deteriora su calidad de vida y es capaz de crear un estado emocional con tendencias hacia la ansiedad o depresión (5).

1.2 Métodos actuales subjetivos para la medición del dolor

Actualmente no existe un método válido y confiable para cuantificar objetivamente la experiencia de dolor de un individuo (6). Los métodos actuales validados para la medición del dolor son escalas subjetivas.

La Escala Visual Analógica (EVA) consiste en una línea recta numerada con números ordinarios con los puntos finales que definen los límites extremos como "sin dolor en absoluto" y "el máximo dolor posible". Se le pide al paciente que marque su nivel de dolor en la línea entre los dos puntos finales (7).

En una Escala Numérica (EN), se les pide a los pacientes que circulen el número entre 0 y 10, 0 y 20 o 0 y 100 que se ajuste mejor a su intensidad de dolor (7). Cero representa "sin dolor", mientras que el límite superior representa "el máximo dolor".

Además existen otras escalas como la Escala Verbal (EV) en la cual se usan adjetivos para describir diferentes niveles de dolor (7). Por último, la Escala facial de Wong Baker es una escala diseñada para medir el nivel de intensidad de dolor percibido en niños (8).

1.3 Métodos objetivos para la medición del dolor

La desventaja de utilizar escalas validadas, es que contamos con datos subjetivos basados en opiniones que denotan elevadas diferencias entre individuos. Sólo pueden ser usadas en pacientes conscientes y comunicativos. Lo ideal sería poseer un método objetivo para medir el dolor. Con este propósito se está trabajando en esta línea: medición objetiva de dolor a través de biomarcadores.

Los biomarcadores son alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (9).

Existen diferentes tipos de biomarcadores: los de exposición, que se utilizan en la predicción del riesgo, los de enfermedad o diagnóstico, que se utilizan en la detección y el diagnóstico de una enfermedad y los de pronóstico que informan sobre la progresión de una enfermedad (9).

Un biomarcador se debe poder medir objetivamente, ser reproducible, seguro, fácil, no resultar invasivo a la hora de su obtención, modificarse de acuerdo con el tratamiento y las variaciones de la enfermedad, y transferible a un amplio uso clínico (10).

En todos los fluidos corporales existen biomarcadores, aunque el interés actual en las pruebas de diagnóstico rápidas y menos invasivas ha crecido exponencialmente en la

última década, lo que ha llevado a una extensa investigación sobre la saliva como fluido biológico para el diagnóstico clínico ya que la obtención de la misma mediante la técnica de secreción pasiva es una técnica no invasiva, sencilla, rápida, libre de estrés y de dolor (11).

1.3.1 Saliva

El fluido salival es una secreción exocrina que consiste de aproximadamente un 99% de agua, que contiene una variedad de electrolitos y proteínas (12).

En condiciones de reposo, un individuo segrega aproximadamente de 0.1 a 0.3 mL/min, alcanzando un máximo de 7 mL/min cuando se estimula artificialmente (11). En general, el flujo de saliva aumenta antes, durante y después de cualquier comida, el pico máximo ocurre a medio día y disminuye durante el sueño (13).

Los componentes salivales pueden originarse enteramente de las glándulas salivales o puede derivarse de la sangre por difusión pasiva o transporte activo; por ello algunos biomarcadores que estudiaremos posteriormente se encuentran tanto en la sangre como en la saliva como el cortisol y la testosterona y otros solo se encuentran en saliva como la Inmunoglobulina A secretora (IgAs) y la alfa amilasa salival (AAs) (14).

1.4 Biomarcadores del dolor en saliva

Los biomarcadores más importantes ya descritos en la saliva relacionados con el dolor son el cortisol, la AAs, la IgAs, la testosterona y el factor de necrosis tumoral soluble-receptor α II (sTNF α RII) (15).

1.4.1 Cortisol

Es el principal glucocorticoide producido en la corteza suprarrenal, y circula por la sangre y se difunde en la saliva (16). Hay bastantes estudios que muestran intentos de utilizar el cortisol como indicador de dolor agudo. El cortisol es una hormona esteroidea importante en la regulación del metabolismo y el estrés a través del eje hipotalámico hipofisario adrenal (17).

1.4.2 Alfa amilasa salival (AAs)

La AAs se produce localmente en el epitelio altamente diferenciado de las células de las glándulas salivales, que están controladas por el sistema nervioso simpático (18).

Parece establecido que es un buen marcador puesto que hay una correlación positiva entre la secreción de esta enzima en saliva y los parámetros simpáticos incrementados durante el estrés (19).

1.4.3 Inmunoglobulina A secretora (IgAs)

El dolor puede generar cierto grado de estrés psicológico y el estrés puede disminuir la capacidad funcional del sistema inmunológico reduciendo la producción de IgAs. La conclusión que se obtiene en un estudio realizado en el año 2010 es que la intensidad del dolor muestra una tendencia a una correlación negativa con las concentraciones de IgAs en niños. En los adultos no se observa variación (20).

1.4.4. Testosterona

En el año 2012 se investiga la relación de la testosterona con el alivio del dolor agudo. Además, se investiga si la disminución de la testosterona provocada por el estrés puede afectar a la percepción del dolor. Los resultados sugieren que controlando la relación testosterona-estrés se puede conseguir alivio en el dolor agudo (21).

1.4.5 Factor de necrosis tumoral soluble – receptor α II (sTNF α RII)

Los factores de la necrosis tumoral (TNFs) son citoquinas que están consideradas como modificadores de la inflamación y de las respuestas inmunológicas producidas por una herida o por una infección. Un estudio realizado en el año 2012 encuentra una relación entre el dolor y la respuesta del sTNF α RII encontrada en saliva (22).

1.5 Influencia del ambiente en la saliva

La película lagrimal está constantemente expuesta a múltiples factores ambientales, incluida la temperatura variable, el flujo de aire y la humedad (23).

Los factores ambientales como la temperatura, la hora del día y la humedad afectan a los biomarcadores que encontramos en las lágrimas, por lo que, en cierta medida, pueden afectar a los que encontramos en la saliva (24).

Por ello se analizan los biomarcadores del dolor en saliva bajo condiciones de ambiente controlado, de esta forma sabemos exactamente cuáles son los valores de las variables del ambiente, de esta forma se podría mejorar la repetibilidad de los resultados.

2. JUSTIFICACIÓN

El dolor en general sigue siendo uno de los principales motivos de consulta médica en todo el mundo, ya sea por el propio síntoma o por el mal tratamiento del mismo. Numerosas organizaciones y asociaciones científicas se han esforzado por encontrar soluciones para este problema y facilitar el tratamiento del dolor (25).

En la actualidad sólo existen métodos subjetivos para evaluar el nivel de dolor ya que es lo único que está validado, por lo que es evidente que se necesitan nuevos métodos para medir el dolor agudo postoperatorio y crónico de forma objetiva. Las mediciones objetivas del dolor serían útiles en niños y en sujetos que no pueden verbalizar su nivel de dolor (26).

En el año 2016 se realiza el primer estudio clínico observacional que analiza las variaciones de los biomarcadores del dolor salival en sujetos sanos para establecer la repetibilidad de las mediciones a lo largo del tiempo. Existe una evidencia científica de que los biomarcadores relacionados con el dolor que se pueden medir de forma objetiva son el cortisol, la testosterona, la AAs, la IgAs y el sTNF α RII (15).

En el año 2017 se realizó un estudio clínico observacional prospectivo sobre las variaciones de la IgAs en saliva como biomarcador del dolor en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado (27).

Siguiendo la línea de éste último estudio, y con la ayuda del anterior, se pretende investigar las diferencias inter-individuales y la variabilidad inter-sesión para comprobar si las variaciones de temperatura y humedad pueden actuar como agente estresante de los diferentes biomarcadores en saliva tras la aparición del dolor. De ésta forma se creará una nueva forma de medir el dolor de forma objetiva y dará nuevas oportunidades para tratar adecuadamente el dolor en los pacientes.

Se eligió la saliva ya que los métodos de muestreo de saliva son considerados como no invasivos y pueden realizarse fácilmente sin ningún tipo de molestia o incomodidad. Además, existen protocolos y herramientas de recolección de muestras predefinidos que facilitan el muestreo reproducible.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los biomarcadores del dolor en saliva se ven afectados por factores ambientales por lo que el control de dichos factores bajo una cámara de ambiente controlado puede mejorar la repetibilidad de sus concentraciones.

3.2 Objetivos

3.2.1 General

- Analizar la variabilidad inter-individual y la variabilidad inter-sesión de los biomarcadores de dolor en saliva en sujetos normales (sujetos sanos) bajo condiciones de ambiente controlado.

3.2.2 Específicos

- Justificar la importancia de establecer un método objetivo para la medición del dolor.
- Comparar los datos obtenidos con los existentes hasta el momento en la bibliografía científica tanto en sujetos sometidos a condiciones de ambiente controlado como a los que no lo han sido.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Estudio clínico, prospectivo y observacional, desarrollado en las dependencias del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) entre Mayo de 2017 y Junio de 2018.

Este Trabajo de Fin de Grado supone la continuación de un Trabajo de Fin de Máster publicado en el año 2017 para aumentar el tamaño muestral, ya que se reclutaron 8 voluntarios, y, de ésta forma, poder establecer comparaciones válidas con otros estudios publicados con anterioridad (27).

El estudio consta de dos visitas separadas por un mínimo de 24 horas y un máximo de una semana, a la misma hora de la mañana aproximadamente, entre las 10:00 y las 10:30 horas de la mañana. Se les tomarán dos muestras de saliva a los voluntarios después de haber permanecido durante 30 minutos en una cámara de ambiente controlado (CAC) situada en el IOBA.

4.2 Tamaño muestral

El tamaño muestral se estipuló en 34 sujetos sanos. Se determinó el tamaño muestral necesario para detectar diferencias significativas entre los niveles de cada marcador utilizando el índice d de Cohen para el primer estudio que se realizó en esta línea de investigación, en el cual no se utilizaba la cámara de ambiente controlado (15). Se determina que para poder establecer comparaciones válidas, el tamaño muestral ha de ser al menos el mismo.

En el año 2017 se tomaron y se analizaron muestras de saliva de 8 sujetos sanos. Este proyecto se presentó en un Trabajo de Fin de Máster (27). Estos resultados se han unido a los del estudio actual.

4.3 Sujetos seleccionados

Se seleccionaron los sujetos que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión para participar en el estudio. Todos aquellos que participaron en el estudio, aceptaron colaborar de manera voluntaria después de ser debidamente informados y así lo corroboraron mediante la firma del Consentimiento Informado (*Anexo I*).

Después de informar a todos los voluntarios de qué trata el estudio, ofreciéndoles toda la información pertinente y resolviéndoles todas las dudas planteadas se les administra una encuesta para recoger diversos datos sociodemográficos y clínicos y se realiza una anamnesis de la salud reproductiva a las mujeres.

4.4 Criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión y de exclusión son proporcionados por el protocolo que utilizaron en el IOBA para realizar un estudio sobre diferencias inter-individuales y variabilidad inter-sesión de potenciales biomarcadores de dolor en saliva en sujetos sanos sin estar sometidos a condiciones de ambiente controlado realizado en el año 2016. Se quiere hacer este estudio con los mismos rangos de edad y con los mismos criterios de inclusión pero bajo condiciones ambientales controladas para establecer comparaciones válidas.

4.4.1 Criterios de inclusión

Todos los voluntarios sanos de raza blanca de ambos sexos con edad comprendida entre 30 y 40 años que acepten participar en el estudio tras haber sido informados y hayan firmado el consentimiento informado que se les proporciona (*Anexo I*).

4.4.2 Criterios de exclusión

Quedan excluidos todos aquellos sujetos que presenten cualquier dolor o enfermedad autoinmune; además de esto todos aquellos que consuman de forma habitual fármacos psicotrópicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y analgésicos. Las mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o en tratamiento hormonal anticonceptivo quedarán excluidas igualmente.

4.5 Procedimiento

En primer lugar se les facilita a los voluntarios las recomendaciones para la recogida de saliva (*Anexo II*) y se les explica toda la información relativa al estudio, para ello se les proporciona la Hoja de Información (*Anexo III*). Una vez comprendido y habiendo esclarecido cualquier duda que pudiera surgirles, se explica a los participantes el consentimiento informado (*Anexo I*) para su posterior firma, aclarando que son libres de

interrumpir la participación antes o durante el estudio sin tener que dar ningún tipo de explicación.

Después de esto, los voluntarios cumplimentaron el cuestionario con diversos datos sociodemográficos y clínicos para comprobar que no hay ningún factor que les excluya de su participación en el estudio y las mujeres cumplimentaron un cuestionario relativo a su salud reproductiva (*Anexo IV*).

Por último, los voluntarios permanecen dentro de la cámara de ambiente controlado (CAC) estableciendo un ambiente conocido de 22°C y un 50% de humedad. Deben estar dentro de la CAC durante 30 minutos, empleando los 5 últimos minutos en enjuagarse con agua con el fin de evitar la contaminación salivar con restos de alimentos y la activación del flujo salivar, siguiendo instrucciones que previamente les hemos facilitado y explicado (*Anexo II*).

4.5.1 Recogida de saliva y manipulación de las muestras

La recolección de saliva se realizó usando la forma de secreción pasiva, es decir “por babeo pasivo o escupir” (28). La principal ventaja de esta técnica pasiva por babeo o escupir es que la secreción salivar no se estimula por lo que se produce una saliva que es representación de todas las glándulas. La muestra de saliva la recogeremos durante 5 minutos por la técnica de “babeo pasivo” con guantes no estériles.

Cada sujeto fue identificado con un número ordinal y cada tubo se identificó mediante el número correspondiente al sujeto y letra. Las muestras de saliva se congelaran para su posterior análisis.

4.6 Material utilizado

- Cámara de ambiente controlado (CAC): Las CAC son los dispositivos utilizados en el laboratorio con el fin de simular distintas posibilidades climáticas y poder evaluar el comportamiento del objeto a ensayar en dichas condiciones ambientales.

En la cámara ambiental perteneciente al CERLab (IOBA, Universidad de Valladolid, España) se ha observado que los signos y síntomas de ojo seco se pueden exacerbar de manera controlada y que además, la regulación de los biomarcadores asociados en lágrima es consistente, por lo que, afectarían en cierta medida a los biomarcadores que encontramos en la saliva (24).

- Tubos para la recogida de saliva: Los tubos utilizados para la recogida de saliva se encuentran embolsados y esterilizados junto a la pajita para introducir la saliva en el bote mediante la técnica pasiva “de babeo”.
- Cuaderno de registro: En la carpeta de recogida de datos se archivan todas las actividades que se han desarrollado en el laboratorio y los resultados obtenidos.
- Guantes no estériles y temporizadores: Los guantes no estériles se utilizaron para recoger la saliva manteniendo las condiciones de higiene adecuadas. Los temporizadores fueron usados para cronometrar el tiempo de llenado de los botes y posteriormente calcular la velocidad de flujo con los mililitros de saliva obtenidos.
- Protocolo sobre el Proyecto del Dolor del IOBA: El protocolo ha sido aprobado por la Comisión de Investigación del IOBA y por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.
- Hojas de información, anamnesis de la historia clínica y reproductiva del paciente y consentimiento informado: El modelo de consentimiento informado ha sido aprobado por los Comités de Ética correspondientes.

La hoja de información al paciente se creó para el estudio realizado en el año 2017, al igual que el cuestionario sobre la historia clínica y reproductiva de los pacientes, por lo que no son de elaboración propia.

- Gradillas, pipetas e incubadoras: Estos materiales fueron utilizados en el laboratorio para analizar las muestras de saliva para obtener los datos de los biomarcadores.

4.7 Variables a recoger y analizar

Todas las variables analizadas fueron recogidas en una base de datos para su posterior almacenamiento y uso. Las variables recogidas fueron:

- Sexo y edad de los sujetos.
- Hora del día en el que se realizan la visita 1 y la visita 2. Las visitas se realizaron a la misma hora del día aproximadamente (entre las 10h y las 10:30h de la mañana) debido a que el flujo y la proteína salival aumenta a medio día.

- Hora de la última comida. 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 para evitar la contaminación de la saliva con restos de alimentos.
- Cantidad de muestra de saliva. Se anotará la cantidad de saliva que el sujeto ha depositado en el tubo. Aproximadamente, se necesita 1mL de saliva para la determinación, los tubos de recogida de saliva admiten 5mL como máximo.
- Tiempo de recogida de la muestra. Se recogerá en minutos y segundos el tiempo que el sujeto ha estado depositando la saliva en el tubo, estableciendo un tiempo máximo de 5 minutos. Si el tubo se llena antes de los 5 minutos, se anotará en la base de datos el tiempo que ha tardado.
- Flujo salivar. Se calculará el flujo salivar para cada sujeto (mL/min).
- Tratamientos farmacológicos sistémicos.
- Variables ambientales. Las variables ambientales recogidas fueron la temperatura (22°C) y la humedad (50%) que previamente establecimos dentro de la CAC.
- Fase del ciclo menstrual. A las mujeres se les preguntará por la fase en la que se encuentran del ciclo menstrual para analizar posibles variaciones en los biomarcadores salivares.
- Biomarcadores en la saliva.

4.8 Determinación de los biomarcadores de dolor en la saliva

El análisis de los biomarcadores se realiza mediante la técnica de Elisa tipo Sandwich utilizando los kits específicos para cada biomarcador:

- Cortisol: Kit de inmunoensayo enzimático DRG Salivary Cortisol ELISA.
- AA_s: Kit de ensayo α -amilasa especialmente diseñada y validados para la medición de la actividad α -amilasa salival.
- IgAs en saliva: Técnica de inmunodifusión radial simple.
- Testosterona: Kit de inmunoensayo enzimático DRG testosterone.

- sTNF α RII: Quantikine, Human sTNF RII/TNFRSF1B Immunoassay.

4.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó 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 \pm desviación típica (DT), mediana, desviación estándar, intervalo de confianza del 95%, y el rango. La hipótesis de normalidad se comprobó utilizando el contraste de Shapiro-Wilk.

Las variables que siguen una distribución normal son el flujo de saliva, la cantidad de saliva recogida, el cortisol y la testosterona, mientras que las que no siguen una distribución normal son la edad, el tiempo de la última comida, el tiempo de recogida de la saliva, la AAs y sTNF α RII (*Anexo VII – Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk*).

Para evaluar la existencia de sesgos y realizar el contraste de hipótesis y ver las diferencias entre dos muestras pareadas se realizó T-Student en las muestras que seguían una distribución normal. En caso contrario, se utilizó su alternativa no paramétrica para muestras relacionadas, el test de Wilcoxon.

Se realiza un análisis ANOVA para evaluar la reproducibilidad de los biomarcadores y el gráfico de Bland-Altman para evaluar la concordancia entre las muestras de saliva.

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

4.10 Consideraciones ético-legales

El protocolo utilizado para realizar este estudio, así como el consentimiento informado han sido aprobados por la Comisión de Investigación del IOBA (*Anexo V*) y por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (*Anexo VI*).

Todos los participantes aceptaron participar de forma voluntaria y firmaron el consentimiento informado (*Anexo I*) previamente a su inclusión en el estudio y serán tratados según los principios de La Declaración de Helsinki.

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. Se tomaron toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información y todos ellos recibieron información pertinente a cerca del estudio. Los sujetos fueron informados de que podían retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias.

5. RESULTADOS

Los resultados mostrados a continuación serán los resultados de todo el proyecto en su totalidad, incluyendo los 8 sujetos del estudio anterior (27) y los 26 sujetos del actual, siendo un total de 34 sujetos.

5.1 Resultados del tamaño muestral

Inicialmente se reclutó una muestra de 42 voluntarios (28 mujeres y 14 hombres), posteriormente se descartaron en la primera visita dos mujeres por estar bajo tratamiento con anticonceptivos hormonales y dos hombres por estar bajo tratamiento con antihistamínicos. Cuatro sujetos fueron descartados en la segunda visita, uno por incompatibilidad horaria, dos por padecer dolor y haber ingerido analgésicos en las 48 horas anteriores a la muestra y el último por padecer úlceras bucales y dolor asociado, por lo que la muestra final se redujo a 34 sujetos (*Fig. 1*).

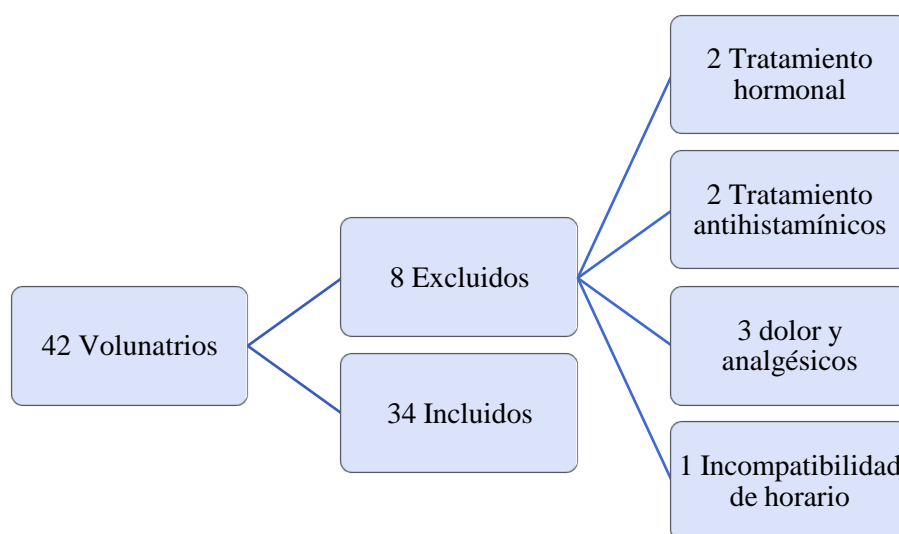


Figura 1. Tamaño muestral

Dos sujetos estaban bajo tratamiento sistémico con levotiroxina (Eutirox®), otro bajo tratamiento con ácido acetil-salicílico (Adiro®), otro con mesalazina (Claversal®) y otro con hierro (Tardyferon®). Después de revisar la bibliografía pertinente sobre estos medicamentos, se consideró que era poco probable que estos medicamentos influyesen en los resultados de los biomarcadores en saliva, por lo que no se excluyeron del estudio las muestras de saliva de estos voluntarios.

La distribución entre ambos sexos (*Fig. 2*) es bastante homogénea, siendo ligeramente mayor el número de mujeres (58,83%) que el de hombres (41,17%). La edad media es de $35,44 \pm 3,57$ años dentro del rango establecido previamente (rango 30-40); una mediana y un RIQ de 36(32-39) (*Fig. 2*).

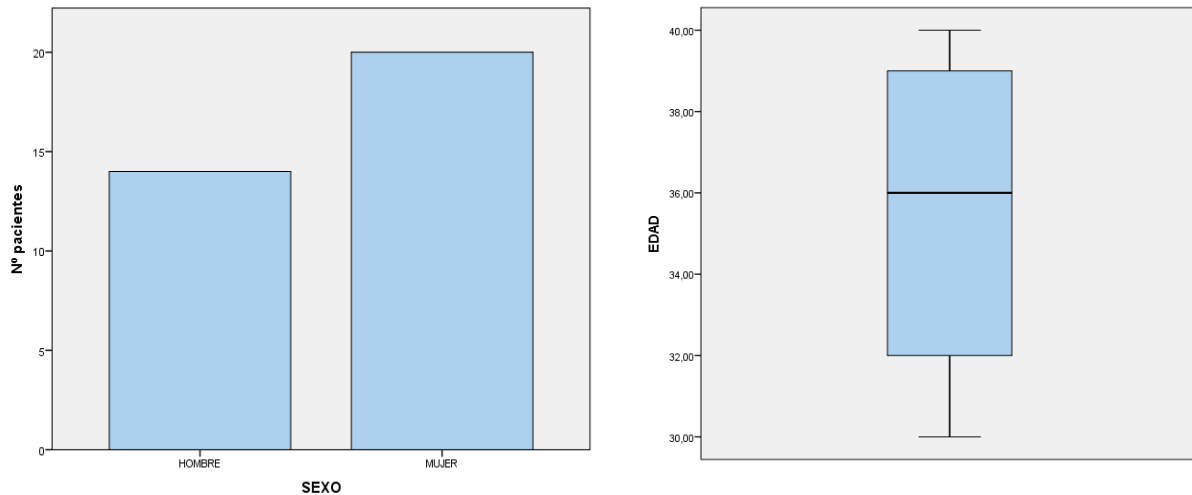


Figura 2. Distribución de la muestra en función del sexo y la edad

Si consideramos tres fases menstruales; fase folicular (día 1-14), fase lútea (día 15-28) y fase hemorrágica, los resultados obtenidos muestran que de las 22 voluntarias del sexo femenino incluidas en el estudio, 9 se encontraban en la fase folicular, 10 en la fase lútea y 1 persona no contestó a la pregunta (*Fig. 3*).

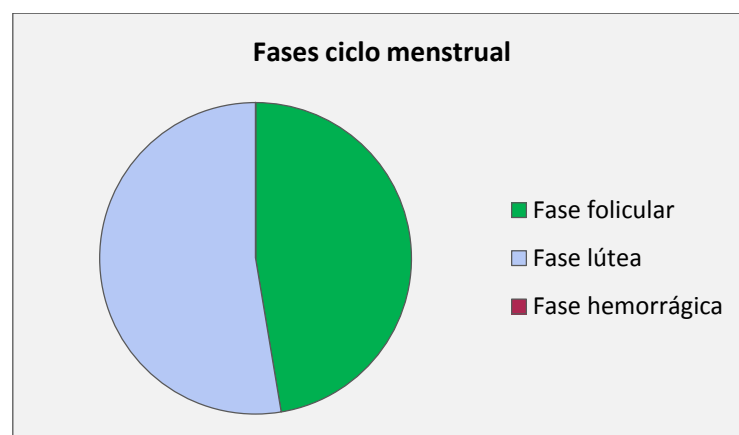


Figura 3. Distribución de las mujeres según el ciclo menstrual

5.2 Condiciones de las visitas

Las muestras fueron recogidas durante los meses de mayo de 2017, enero y febrero de 2018. Ambas visitas se realizaron entre las 10:00 y las 10:30 horas de la mañana y tras haber permanecido durante 30 minutos en una cámara de ambiente controlado en condiciones estándar de temperatura y humedad (temperatura de 22°C y 50% de humedad).

El tiempo transcurrido entre la toma de las dos muestras fue de 24 horas como mínimo y 1 semana como máximo. El tiempo medio transcurrido desde la última comida hasta el momento justo antes de la toma de la muestra fue de 179,58 minutos (rango 60-750) en la primera visita y de 227,23 minutos (rango 92-783) en la segunda visita.

El tiempo medio de recolección de la primera muestra de saliva fue de $280,41 \pm 42,79$ segundos con un rango de 130-300 mientras que el tiempo medio en la segunda visita fue de $288,17 \pm 24,52$ segundos con un rango de 216-300. No existieron diferencias significativas entre el tiempo de recolección de ambas visitas ($p=0,230$).

El flujo medio de la primera visita fue de $0,55 \pm 0,28$ mL/min con un rango de 0.1-1.14 y en la segunda de $0,58 \pm 0,24$ mL/min con un rango de 0.18-1.16. No existieron diferencias significativas entre el flujo de la primera y segunda muestra ($p=0,347$).

5.3 Resultados de los biomarcadores

La concentración del cortisol fue significativamente mayor en la primera visita ($7,79 \pm 2,06$ µg/dL) respecto a la segunda visita ($7,11 \pm 1,70$ µg/dL) ($p < 0,035$). Lo contrario sucede con la AAS, siendo la concentración de la primera visita menor ($42,74 \pm 32,17$ U/mL) con respecto a la de la segunda visita ($61,15 \pm 42,72$ U/mL) ($p < 0,001$).

Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los valores de testosterona ($p=0,250$) y sTNFαRII ($p=0,638$) entre ambas tomas (*Tabla 1*) (*Fig. 4*).

Debido a un error en el kit de análisis de la IgAs (técnica de inmunodifusión radial simple) no se ha podido analizar su concentración en las muestras de saliva, aunque sí que se realizará en un futuro.

Tabla 1. Diferencias de concentraciones de los biomarcadores de dolor en saliva entre ambas muestras

BIOM.	MUESTRA 1			MUESTRA 2			P
	CONC. $\bar{x} \pm DT$	MEDIANA [RIQ]	IC 95%	CONC. $\bar{x} \pm DT$	MEDIANA [RIQ]	IC 95%	
CORTISOL	7,79±2,06	7,84(6,11-4,41)	7,07-8,51	7,11±1,70	6,68(6,00-8,54)	6,52-7,70	0,035
AAs	42,76±32,17	34,56(24,37-53,73)	31,54-53,99	61,15±42,72	55,57(38,18-67,74)	46,24-76,06	<0,001
TEST.	112,17±55,43	111,85(70,22-143,75)	92,83-131,51	104,62±61,37	91,59(58,13-146,65)	83,21-126,03	0,250
sTNFαRII	106,28±139,35	65,25(16,64-122,18)	57,65-154,90	105,19±136,43	55,30(16,94-131,69)	57,59-152,80	0,638

Biom: Biomarcador; Conc: Concentración; IC: Intervalo de confianza; Test: Testosterona. n = 34 para cada biomarcador. Unidades de medida: cortisol, $\mu\text{g} / \text{dL}$; sAA, α -amilasa, U / ml; testosterona, ng / mL; sTNF α RII, Factor de Necrosis Tumoral Soluble – Receptor alfa II , pg / ml.

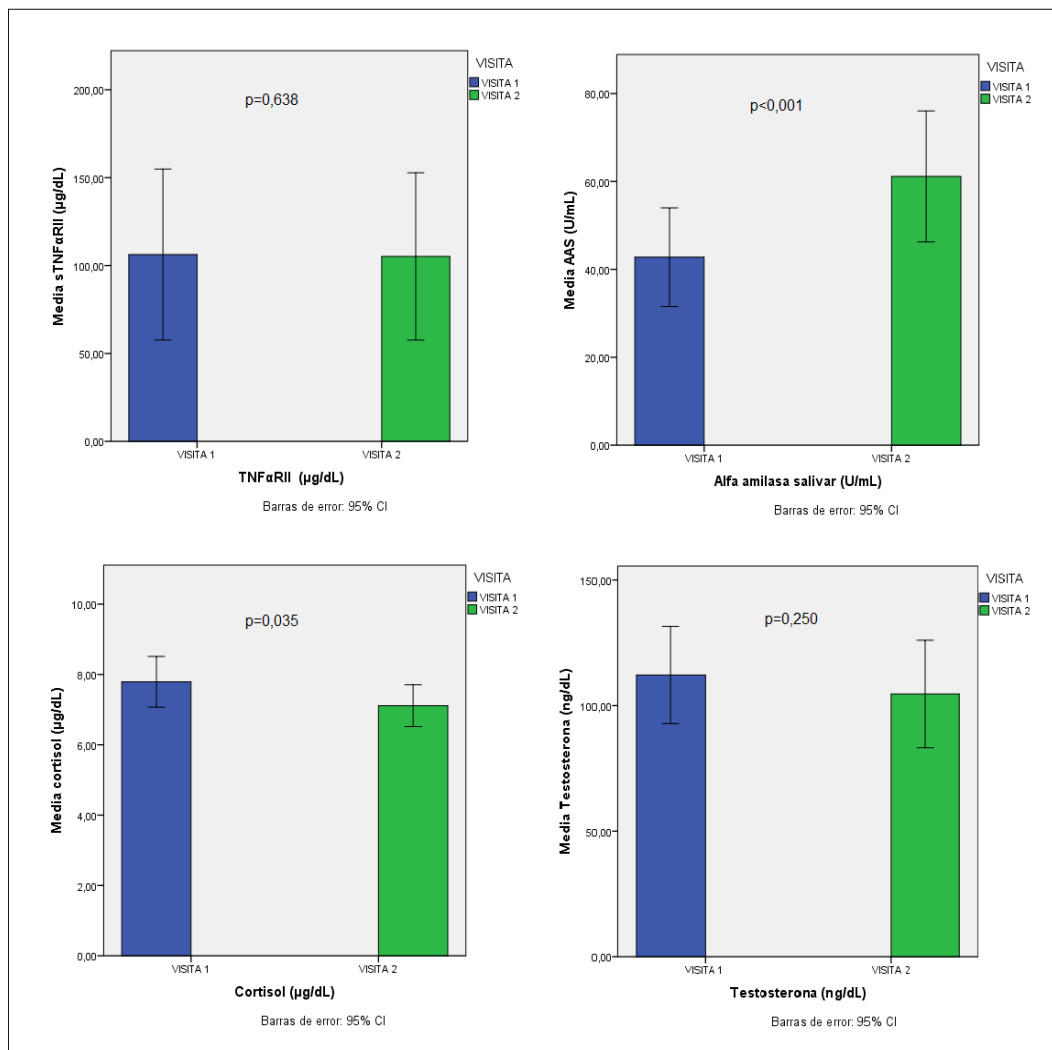


Figura 4. Concentración de los biomarcadores analizados de dolor en saliva en ambas muestras

Se calculó el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) para valorar la fiabilidad a través de la comparación del acuerdo/desacuerdo producido en diferentes mediciones. La repetibilidad es una medida estadística de la consistencia entre medidas repetidas de un mismo carácter en un mismo individuo (*Tabla 2*).

Para el cortisol se obtuvo un CCI ($r=0,169$) testosterona ($r=0,603$) AAs ($r=0,42$) y sTNF α RII ($r=0,987$).

Tabla 2. Coeficiente de Correlación Intraclase para cada biomarcador

BIOMARCADORES	CCI	Grado de repetibilidad
CORTISOL	0,169	Insignificante
AAs	0,420	Débil
TESTOSTERONA	0,603	Moderado
sTNA α RII	0,987	Fuerte

n = 34 para cada biomarcador. Unidades de medida: cortisol, $\mu\text{g} / \text{dL}$; sAA, α -amilasa, U / ml; testosterona, ng / mL; sTNF α RII, Factor de Necrosis Tumoral Soluble – Receptor alfa II, pg / ml.
Grado de repetibilidad: 0-0,1: Insignificante; 0,2-0,4: Débil; 0,5-0,7: Moderado; 0,8-1,0: Fuerte.

5.4 Análisis de Bland-Altman

Se realizaron gráficos de Bland-Altman para estudiar el grado de concordancia o de acuerdo entre las muestras salivares. Muestra la concordancia entre la diferencia de las concentraciones de las dos muestras (concentración de la 2ª muestra menos la concentración de la 1ª muestra) lo que se muestra en el eje de las ordenadas y la media de las dos concentraciones por cada individuo, expresada en el eje de las abscisas.

El diagrama de dispersión (*Fig. 5*) muestra que la media de las dos tomas de cada biomarcador se encuentra próxima a 0 por lo que significa que en ambas recogidas se han encontrado valores similares.

Observamos que en el caso de la testosterona, la AAs y el sTNF α RII, los datos en torno a la línea de la diferencia de la media se dispersan conforme el valor de la media de ambas técnicas aumenta. El diagrama de dispersión del cortisol muestra que la diferencia entre las concentraciones de ambos días es independiente de la media.

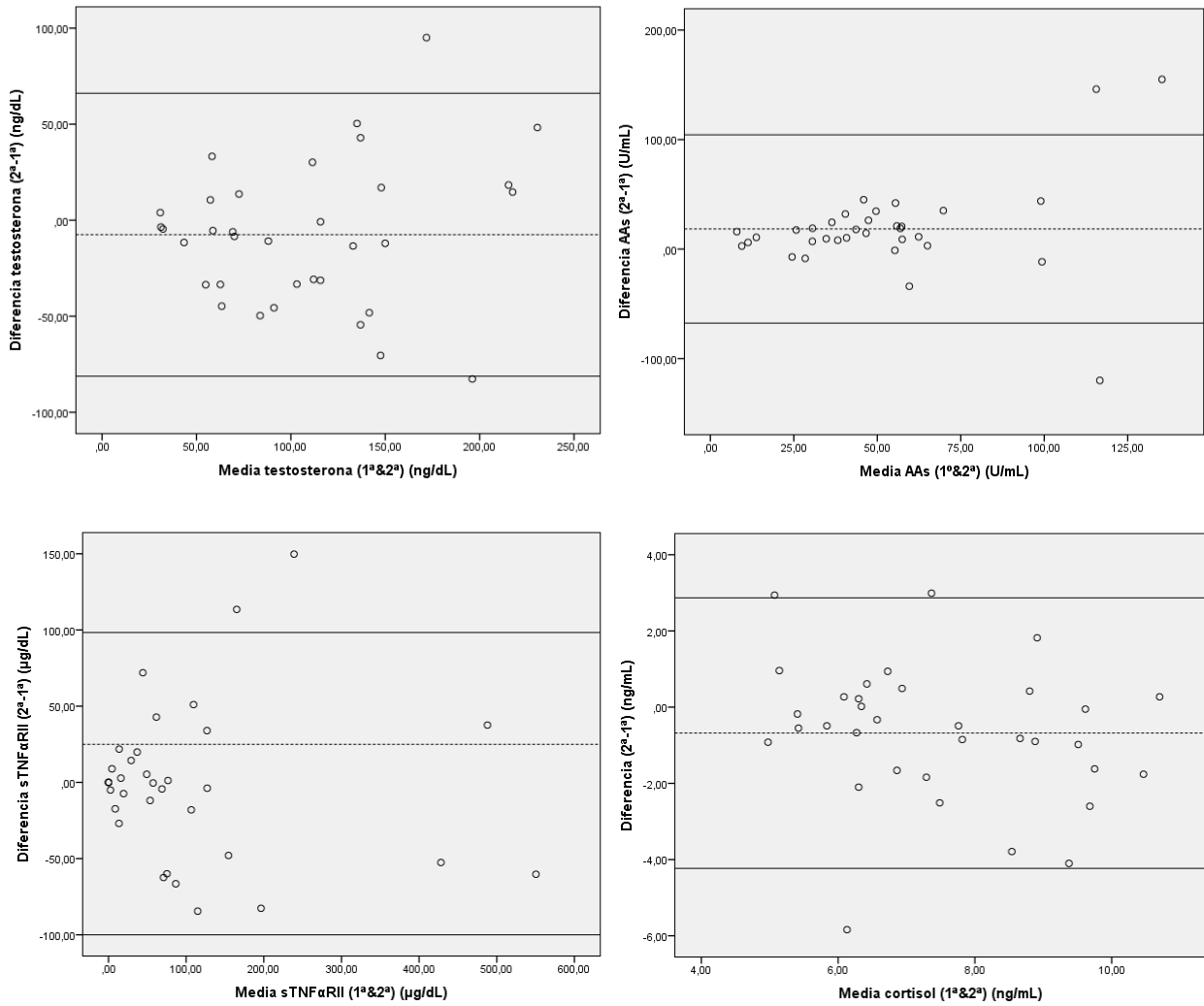


Figura 5. Gráfico de Bland-Altman. Los gráficos de Bland-Altman muestran la reproducibilidad entre sesiones para cada biomarcador. Las líneas continuas representan los límites de confianza superior e inferior (límites de acuerdo). La línea punteada representa la media de la diferencia entre la segunda y la primera medición.

6. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito identificar como los biomarcadores de dolor en la saliva se ven afectados por factores ambientales y como el control de dichos factores bajo una cámara de ambiente controlado puede mejorar la reproductibilidad de sus concentraciones.

Para realizar comparaciones válidas con otros estudios de evidencia científica hemos de tener en cuenta los factores de inclusión y exclusión, que el fluido utilizado para obtener resultados sea la saliva y la forma de analizar los diferentes biomarcadores. Por otro lado, el sueño y el estrés individual son variables que no se han valorado en éste estudio y pueden haber influido en las concentraciones de los biomarcadores. Sin embargo, hemos tratado de minimizar su impacto limitando el rango de edad, eliminando personas con trastornos médicos graves, así como personas con psicoterapia y hemos intentado disminuir la influencia de la respuesta al despertar.

Un estudio reciente en el que analizan el cortisol y la AAs en pacientes sometidos a ejercicio físico de diferente intensidad confirman que estas sustancias en saliva siguen las variaciones circadianas, dato que afianza el que en nuestro estudio se fuese muy cuidadoso en tomar todas las muestras a la misma hora (29). Además, en otro estudio publicado en el año 2011, se analizó el cortisol sérico y salivar de 80 sujetos sanos. Se demostró que el cortisol sérico ($15,8 \pm 5,1$ $\mu\text{g/dL}$) tiene una concordancia con los niveles de cortisol medido en saliva ($5,79 \pm 3,08$ $\mu\text{g/dL}$). El CCI fue de $r=0,7$ (grado de repetibilidad moderado), lo que explica el análisis de cortisol en la saliva como método no invasivo. En éste estudio se recogió la saliva mediante un dispositivo de algodón que la persona mastica durante 45 segundos y posteriormente es centrifugado, obteniendo así una cantidad de saliva de 0,5 mL (30). Además muestra una concentración media de cortisol en saliva similar a la de nuestro estudio ($7,79 \pm 2,06$ $\mu\text{g/dL}$ en la primera muestra y $7,11 \pm 1,70$ $\mu\text{g/dL}$ en la segunda muestra).

El estudio de Nater, M et al. (2006) (31) analiza las concentraciones de AAs y cortisol en 30 sujetos sanos antes y después de ser sometidos a una prueba de estrés psicosocial. Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de AAs y cortisol salivar entre las muestras recogidas antes y después de ser sometidos a estrés. En éste estudio se demuestra que la AAs es sensible al estrés, por lo que parece ser un parámetro útil para su medición. En nuestro estudio, al contrario, la AAs mostró un

nivel de repetibilidad débil ($r=0,420$), por lo que no estaría indicado como un buen biomarcador de dolor.

En el estudio publicado por Gooding, BR et al. (2012) (22), se tomaron muestras de saliva a 46 sujetos sanos bajo tres situaciones estresantes y una situación normal y se analizaron el cortisol y el sTNF α RII. Los criterios de exclusión e inclusión eran similares a los de nuestro estudio, aunque las muestras fueron tomadas entre las 16:00 y las 19:00 horas de la tarde. Los valores basales medios para el cortisol no fueron estadísticamente diferentes en las cuatro modalidades ($F(3,42)=1,64$, $p=0,19$). La ausencia de diferencias estadísticas entre el cortisol basal en las cuatro modalidades sugiere que los participantes tenían niveles equivalentes de cortisol antes del inicio de cada modalidad de estímulo. Por el contrario, los valores basales medios para sTNF α RII fueron estadísticamente diferentes ($F(3,42)=3.15$, $p=0.03$). Como conclusión se obtiene una relación positiva del cortisol con el dolor, ya que muestra como aumenta al someter a los individuos a situaciones dolorosas experimentales y, al cesar estas actividades disminuye y una negativa con el sTNF α RII, ya que hay variaciones menos claras que no siguen un patrón constante, aunque su concentración disminuye desde el inicio en relación con las modalidades dolorosas experimentadas. Muestra diferencias con el p-valor de nuestro estudio, mientras que para el cortisol obtenemos diferencias significativas ($p=0,035$), para sTNF α RII no hay diferencias significativas ($p=0,638$), al contrario que en el estudio nombrado ($p=0,19$) y ($p=0,03$) respectivamente (22).

Los resultados del estudio de Sobas, EM et al. (2016) (15) a 34 sujetos sanos sin estar sometidos a condiciones de ambiente controlado, en el que se analizaron los mismos biomarcadores que en el presente estudio, mostraron que solo la IgAs ($r=0,879$) y la sTNF α RII ($r=0,828$) presentan niveles aceptables de repetibilidad. Además la variabilidad inter-sesión es relativamente uniforme para la IgAs y para la sTNF α RII. Éste estudio fue realizado con los mismos criterios de inclusión y en las mismas horas.

Comparando los resultados de las concentraciones de ambos estudios (*Tabla 3*), podemos afirmar que existen grandes diferencias en las concentraciones de cortisol y testosterona, y menores en las de AAs y sTNF α RII. En cuanto al p-valor hay grandes variaciones, ya que en el estudio publicado en el año 2016, los sujetos sin estar sometidos a condiciones de ambiente controlado presentaban valores significativos de testosterona ($p=<0,001$), siendo el resto de los biomarcadores no significativos (15). En

cambio, en el estudio actual obtenemos valores significativos del cortisol ($p=0,035$) y de la AAs ($p<0,001$).

Tabla 3. Comparación de valores obtenidos en el estudio del año 2016 (15) sin estar sometidos a condiciones de ambiente controlado con este estudio

BIOM.	Estudio 1					Estudio 2				
	Muestra 1		Muestra 2		p	Muestra 1		Muestra 2		p
	CONC. $\bar{x}\pm DT$	IC 95%	CONC. $\bar{x}\pm DT$	IC 95%		CONC. $\bar{x}\pm DT$	IC 95%	CONC. $\bar{x}\pm DT$	IC 95%	
CORTISOL	1,20±0,91	0,89 – 1,52	1,15±1,14	0,75– 1,54	0,721	7,79±2,06	7,07-8,51	7,11±1,70	6,52-7,70	0,035
AAs	53,13±19,27	46,41 – 59,86	47,00±20,28	39,92– 54,07	0,109	42,76±32,17	31,54- 53,99	61,15±42,72	46,24- 76,06	<0,001
TEST.	39,91±33,93	28,07 – 51,75	22,38±21,82	14,77– 30,00	<0,001	112,17±55,43	92,83- 131,51	104,62±61,37	83,21- 126,03	0,250
sTNFαRII	79,46±66,24	56,34 – 102,57	75,77±64,10	53,38– 98,16	0,565	106,28±139,35	57,65- 154,90	105,19±136,43	57,59- 152,80	0,638

Estudio 1: Sobas EM; Estudio 2: Ruano P; Biom: Biomarcador; Conc: Concentración; IC: Intervalo de confianza; Test: Testosterona.

n = 34 para cada biomarcador. Unidades de medida: cortisol, $\mu\text{g} / \text{dL}$; sAA, α -amilasa, U / ml; testosterona, ng / mL; sTNF α RII, fracción soluble del receptor II del factor de necrosis tumoral α , pg / ml.

Es interesante comparar el CCI de ambos estudios ya que muestra la repetibilidad de cada uno de los biomarcadores (Tabla 4). En el estudio realizado en el año 2016, AAs tuvo los valores de repetibilidad más bajos entre todos los biomarcadores, por el contrario IgAs y sTNA α RII tuvieron los valores de CCI más altos (15). En éste estudio sTNA α RII es el biomarcador que mas repetibilidad presenta, mientras que el cortisol es el que menos.

Tabla 4. Comparación de repetibilidad de los biomarcadores en saliva en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado con el estudio publicado en el año 2016 (15).

BIOMARCADORES	Estudio 1		Estudio 2	
	CCI (r)	Grado de repetibilidad	CCI (r)	Grado de repetibilidad
CORTISOL	0,526	Moderado	0,169	Insignificante
AAs	0,003	Insignificante	0,420	Débil
TESTOSTERONA	0,412	Débil	0,603	Moderado
sTNFαRII	0,828	Fuerte	0,987	Fuerte

Estudio 1: Sobas, EM; Estudio 2: Ruano, P.

n = 34 para cada biomarcador. Unidades de medida: cortisol, $\mu\text{g} / \text{dL}$; sAA, α -amilasa, U / ml; testosterona, ng / mL; sTNF α RII, Factor de Necrosis Tumoral Soluble – Receptor alfa II , pg / ml.

Grado de repetibilidad: 0-0,1: Insignificante; 0,2-0,4: Débil; 0,5-0,7: Moderado; 0,8-1,0: Fuerte.

7. LIMITACIONES Y FORTALEZAS

7.1 Limitaciones

La primera limitación que encontramos es el tiempo, puesto que es un Trabajo de Fin de Grado, el tiempo del que he dispuesto para realizar el estudio es relativamente corto.

Otra limitación importante que ha complicado el reclutamiento de pacientes ha sido el rango de edad establecido (30-40 años), tratándose de personas jóvenes la mayoría tenían obligaciones que les hacía imposible realizar el estudio, negándose muchas personas a participar.

7.2 Fortalezas

La principal fortaleza de éste estudio de investigación ha sido poder formar parte de un equipo multidisciplinar y especializado que ha facilitado el desarrollo adecuado del proyecto.

Se añade como fortaleza el gran deseo de superación de todo el equipo de investigación que ha participado en el proyecto, la comunicación con el equipo a la hora de planificar y gestionar y la disposición de herramientas necesarias para realizar la investigación y el análisis de los resultados.

Otra fortaleza presente es la disposición y el uso de la CAC, ya que solo hay 5 en el mundo y, gracias a ella, hemos podido realizar éste estudio controlando la temperatura y la humedad, para así evaluar el comportamiento de los biomarcadores bajo condiciones ambientales conocidas.

Por último, he aprendido y consolidado mis conocimientos sobre estadística y técnicas de laboratorio

8. APLICACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA

En la actualidad existen varias escalas subjetivas para evaluar el nivel de dolor pero ninguno de ellos está completamente libre de problemas, por lo que 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.

Los biomarcadores en saliva, además, podrían ser usados para testar nuevos fármacos o dosis diferentes de fármacos ya existentes, ya que el dolor suele ser tratado de forma inadecuada con los analgésicos actuales.

Encontrar biomarcadores del dolor sería un gran avance. Nos permitiría conocer el dolor de personas que no pueden expresarse como pacientes pediátricos, o personas con alteraciones neurológicas (por ejemplo en coma), ya que hasta ahora solo podemos usar las escalas subjetivas, que no son útiles en este tipo de pacientes.

Si se consiguiese, en un futuro podría existir un dispositivo cuya función sea la de medir el dolor a través de la saliva, un método poco invasivo para los pacientes, lo que supondría un cambio, ya que se controlaría mejor el dolor, reduciría la toma de analgesia y además supondría una descarga de trabajo para la enfermera tanto de atención primaria como especializada.

9. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

En el estudio realizado a 34 sujetos sanos sin ser sometido a condiciones de ambiente controlado los biomarcadores relacionados con el dolor con mayor reproducibilidad fueron IgAs y sTNF α RII., en este estudio se analizaron también el cortisol, testosterona y la AAs para corroborar los niveles bajo ambiente controlado y establecer comparaciones.

Sería útil realizar estudios sobre repetibilidad de los biomarcadores del dolor en pacientes que se encuentren en el postquirúrgico de una operación y en pacientes con dolor crónico para estudiar las relaciones existentes entre los datos subjetivos proporcionados por los pacientes a través de las escalas subjetivas y los datos “objetivos” a partir de los biomarcadores de dolor. Estos datos servirían para evaluar la eficacia de las escalas subjetivas existentes.

Además sería interesante comparar los resultados de los sujetos sanos con los biomarcadores de los sujetos con dolor, al igual que realizar un estudio sobre la reproducibilidad de los biomarcadores en sujetos con dolor bajo condiciones de ambiente controlado.

Por último 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 sería de interés diseñar un estudio en el que se sometiera a sujetos sanos y a otros con dolor asociado a diferentes y variadas temperaturas y condiciones de humedad para analizar las variaciones existentes.

10. CONCLUSIONES

1. El sTNF α RII y la testosterona muestran una buena reproducibilidad.
2. Los factores ambientales como la temperatura y la humedad afectan a la reproducibilidad de los diferentes biomarcadores analizados, ya que se observan variaciones respecto al estudio previo sin condiciones ambientales controladas.
 - La reproducibilidad de los biomarcadores: sTNF α RII, AAS y testosterona ha mejorado bajo condiciones ambientales controladas (22°C y 50% H).
 - Sin embargo, la reproducibilidad del cortisol se ha visto disminuida.
3. El sTNF α RII muestra una variación inter-sesión mínima, con un grado de repetibilidad fuerte, por lo que puede ser considerada un buen biomarcador. La testosterona muestra un grado de reproducibilidad moderado y por el contrario, el cortisol y la AAs muestran un grado insignificante y débil respectivamente.
4. Existen estudios que han demostrado (sin controlar las condiciones ambientales) una gran variabilidad inter-sesión de la testosterona. Es necesario realizar mayores investigaciones sobre este biomarcador para poder establecer conclusiones firmes.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Manchado Alba J, Manchado Duque M, Calderón Flórez V, González Montoya A, Cardona Escobar F, Ruiz Garcia R, et al. Are we controlling postoperative pain? Rev Colomb de Anestesiología. 2013 Junio; 41(2): p. 132-138.
2. Puebla Díaz F. Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S Dolor iatrogénico. 2005..
3. Rivera Ordoñez A. Dolor agudo postoperatorio. Rev Mexic de Anestesiología. 2016 Marzo; 39(1): p. 174-177.
4. Carrington Reid M, Eccleston C, Pillemer K. Management of chronic pain in older adults. The BMJ. 2015 Febrero.
5. Paz Domingo M, Ruiz Sánchez de León J, Paz Solís J, Gandía González M, Mateos González A, Pedro Pérez E. Dolor crónico: relación con sintomatología prefrontal estrés percibido. Rev. Soc. Esp. del Dolor. 2017 Agosto; 24(4).
6. Younger J, McCue R, Mackey S. Pain Outcomes: A brief review of instruments and techniques. Curr Pain Headache Rep. 2009 Febrero; 13(1): p. 39.43.
7. Haefeli M, Elfering A. Pain assessment. Europea Spine Journal. 2006 Enero; 15(1).
8. Miró J, Huguet A, Nieto R, Paredes S, Baos J. Valoración de la escala de dolor de caras-revisada (faces pain scale-revised) para evaluar la intensidad del dolor pediátrico en niños castellano parlantes. Rev Soc Esp Dolor. 2005 Octubre; 12(7).
9. Mayerux R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. NeuroRx. 2004 Abril; 1(12).
10. Strimbul K, Tavel J. What are biomarkers? Curr Opin HIV AIDS. 2010 Noviembre; 5(6): p. 463-466.
11. Soares Nunes LA, Mussavira S, Sukumaran Bindhu O. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. Biochem Med. 2015 Junio; 25(2): p. 177-192.
12. Del Vigna de Almeida P, Trinidad Gégio AM, Naval Machado AÁ, Adilson Soares de Lima A, Reis Azevedo L. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. The Journal of Contemporary Dental Practise. 2008 Marzo; 9(3).
13. Ekstrom J, Khosravani N, Castagnola M, Messana I. Saliva and the Control of Its Secretion. In Ekberg O, editor. Dysphagia, Diagnosis and Treatment. Berlin: Springer; 2012. p. 19-47.
14. Munro C, Williamson S, Pickler R, Elswick R. Comparison of Biomarkers in Blood and Saliva in Healthy Adults. Nursing research and practice. 2012 Abril.

15. Sobas EM, Reinoso R, Cuadrado-Asensio R, Fernández I, Maldonado MJ, Pastor JC. Reliability of Potential Pain Biomarkers in the Saliva of Healthy Subjects: Inter-Individual Differences and Intersession Variability. *PLoS ONE*. 2016 Diciembre; 11(12): p. 1-12.
16. Carrasco G, Van de Kar L. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*. 2003 Febrero; 463(1-3): p. 235-272.
17. Maruyama Y, Kawano A, Okamoto S, Ando T, Ishitobi Y, Tanaka Y, et al. Differences in salivary alpha-amylase and cortisol responsiveness following exposure to electrical stimulation versus the Trier Social Stress Tests. *PLoS One*. 2012 Julio; 7(7).
18. Baum B. Principles of saliva secretion. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Septiembre; 694: p. 17-23.
19. Hirose N, Kato J. [Device for measuring salivary alpha-amylase--application for pain]. *Masui*. 2009 Noviembre; 58(11): p. 1360-1366.
20. da Silva Campos M, Souza Alves C, Barbosa Raposo N, Ferreira A, Farinazzo Vitral R. Influence of salivary secretory immunoglobulin A level on the pain experienced by orthodontic patients. *Med Sci Monit*. 2010 Septiembre; 16(9): p. 405-409.
21. Choi J, Chung M, Lee Y. Modulation of pain sensation by stress-related testosterone and cortisol. *Anaesthesia*. 2012 Octubre; 67(10): p. 1146-1151.
22. Goodin B, Quinn N, King C, Page G, Haythornthwaite J, Edwards R, et al. Salivary cortisol and soluble tumor necrosis factor-alpha receptor II responses to multiple experimental modalities of acute pain. *Psychophysiology*. 2012 Enero; 49(1): p. 118-127.
23. Barabino S, Shen L, Chen L, Rashid S, Rolando M, Dana MR. The Controlled-Environment Chamber: A New Mouse Model of Dry Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2005 Agosto; 46(8).
24. Tesón M, González-García M, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Mateo M, et al. Influence of a controlled environment simulating an in-flight airplane cabin on dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Marzo; 54(3): p. 2093-9.
25. Vargas-Schaffer G. Ins the WHO analgesic ladder still valid? Twenty-four years of experience. *Can Fam Physician*. 2010 Junio; 56(6): p. 514-517.
26. Shibata M, Kawai M, Matsukura T, Heike T, Okanoya K, Myowa-Yamakoshi M. Salivary biomarkers are not suitable for pain assessment in newborns. *Early Hum Dev*. 2013 Abril; 89(7): p. 503-506.
27. Giaquinta Aranda A. Diferencias interindividuales y variabilidad intersesión de IgA salival como potencial biomarcador del dolor en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado. Trabajo de fin de máster. Valladolid: Universidad de Valladolid, Departamento de oftalmología; 2017.

28. Beltzer E, Fortunato C, Guaderrama M, Peckins M, Garramone B, Granger D. Salivary flow and alpha-amylase: collection technique, duration, and oral fluid type. *Physiol Behav.* 2010 Septiembre; 101(2): p. 289-296.
29. Leicht C, Goosey-Tolfrey V, Bishop N. Exercise intensity and its impact on relationships between salivary immunoglobulin A, saliva flow rate and plasma cortisol concentration. *Eur J Appl Physiol.* 2018 Abril.
30. Lavalle-González FJ, Villareal-Pérez JZ, González-González G, Montes-Villareal J, Mancillas-Adame L, Támez-Pérez HE, et al. Validación de la medición de cortisol en saliva de una población de adultos jóvenes. *Rev. de Endocrinología y nutrición.* 2011 Diciembre; 19(4): p. 146-148.
31. Nater M, La-Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, M-Koller M, et al. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity—associations with adrenergic activity. *PlumX Metrics.* 2006 Enero; 31(1): p. 49-58.

12. ANEXOS

Anexo I – Consentimiento informado

Consentimiento informado para el estudio de repetitividad de determinaciones bioquímicas en saliva en voluntarios sanos relacionadas con el dolor agudo, neuropático y postquirúrgico.

Código del Estudio:

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 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, está previsto que 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 - Recomendaciones para la recogida de la muestra de saliva

Recomendaciones para la recogida de la muestra de 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 tienen 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.
- 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 III – 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 María 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 correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos.

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 explicación. 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 dos 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 IV – Evaluación de la paciente – Anamnesis en la historia clínica en salud reproductiva, general y visual

Evaluación de la paciente – Anamnesis en la historia clínica en salud reproductiva, general y visual

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)

Preguntas sobre salud general:

8. ¿Tiene alguna enfermedad de carácter autoinmune?
 - Uveítis
 - Enfermedad de Sjögren
 - Psoriasis

- Anemia autoinmune
- Artritis reumatoide
- Asma
- Celiacía
- Diabetes Tipo 1
- Enfermedad de Crohn

9. ¿Está tomando alguna medicación actualmente?

10. ¿Tiene algún dolor asociado a patologías?

Preguntas sobre salud visual:

11. ¿Ha sido intervenida de cirugía ocular en menos de 12 meses?

12. ¿Está tomando algún tipo de tratamiento o medicación ocular?

Anexo V – Informe de aprobación de la Comisión de Investigación Clínica del IOBA



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 inter-individuales y la variabilidad intersesión 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

A handwritten signature in blue ink that reads 'M. Paz García García'.

Fdo.: M^a Paz García García

Secretaria de la Comisión de Investigación

Anexo VI – Informe de aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica 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 ÍNTER-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 VII – Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
EDAD	,150	34	,049	,890	34	,003
TIEMPOULTIMACOMIDA_V1	,296	34	,000	,570	34	,000
TIEMPO_V1	,471	34	,000	,529	34	,000
CANTIDAD_V1	,107	34	,200 [*]	,966	34	,369
FLUJO_V1	,111	34	,200 [*]	,961	34	,264
CORTISOL_V1	,136	34	,113	,963	34	,293
TESTOST_V1	,076	34	,200 [*]	,961	34	,257
ALFAAMILAS_V1	,173	34	,011	,797	34	,000
TNF_V1	,229	34	,000	,708	34	,000
TIEMPOULTIMACOMIDA_V2	,333	34	,000	,585	34	,000
TIEMPO_V2	,479	34	,000	,532	34	,000
CANTIDAD_V2	,144	34	,072	,951	34	,130
FLUJO_V2	,087	34	,200 [*]	,973	34	,537
CORTISOL_V2	,120	34	,200 [*]	,976	34	,659
TESTOST_V2	,116	34	,200 [*]	,914	34	,011
ALFAAMILAS_V2	,256	34	,000	,779	34	,000
TNF_V2	,241	34	,000	,717	34	,000

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors