



Universidad de Valladolid

Facultad de Enfermería de Valladolid

Grado en Enfermería

Curso 2018/19

**NIVELES DE ESTRÉS CRÓNICO EN
PACIENTES CON RETINITIS
PIGMENTOSA**

Alumna: Isabel Tartilán Buey

Tutora: Eva M Sobas Abad

Cotutor: Salvador Pastor Idoate

RESUMEN

Introducción: La Retinitis Pigmentosa (RP) es una distrofia retiniana que deteriora la función visual y progresa hasta ceguera. Es por ello que provoca estados psicológicos negativos, como ansiedad y depresión.

Objetivo: Estudiar la correlación entre el grado de RP con el grado de estrés crónico y el nivel de cortisol en saliva y pelo.

Material y métodos: Estudio observacional y transversal. Se tomaron muestras de saliva y cabello de 78 pacientes con RP para analizar el nivel de cortisol. Para las comparaciones se utilizó un grupo control sano. Se realizó un examen oftalmológico, los pacientes fueron evaluados con el cuestionario de ansiedad STAI y se clasificó la gravedad de la enfermedad.

Resultados: Un total de 78 pacientes con RP fueron evaluados. Hubo correlación significativa entre la gravedad de la enfermedad y Agudeza visual ($r=-0.54$, $p<0.05$), Campo visual ($r=-0.63$, $p<0.05$) y Tomografía de coherencia óptica ($r=-0.70$, $p<0.05$).

Hubo diferencias significativas en los niveles de cortisol salival en comparación con los controles. Sin embargo, no entre los grupos de RP. Se encontraron puntuaciones altas en el cuestionario STAI. La edad y el rasgo-leve fueron un factor de riesgo en la gravedad de RP (odds ratio (OR): 1.04; intervalo de confianza (IC) del 95%: 1.00- 1.08; OR: 22.48; IC 95%: 2.41-209.28 respectivamente)

Conclusión: Los pacientes con RP tienen niveles altos de cortisol salival y puntajes altos en el cuestionario STAI, lo que podría estar relacionado con su estrés crónico y la progresión de la enfermedad.

Palabras clave: retinitis pigmentosa, estrés crónico, cortisol salivar, STAI.

ABSTRACT

Introduction: Retinitis Pigmentosa (RP) is a retinal disorder characterized by progressive deterioration in visual capacity and to legal blindness. In addition, due to its disabling progression, creates negative psychological states such as anxiety and depression.

Objective: To evaluate the association between the grade of severity of RP, and levels of salivary and hair cortisol.

Material and methods: Observational and cross-sectional study. Salivary and hair samples were taken from 78 RP patients to analyse cortisol levels. A healthy control group was used for the comparisons.

Patients underwent a complete ophthalmic examination. In addition, all patients were assessed with the STAI Anxiety Questionnaire. To develop a grading system, disease severity was assessed.

Preliminary Results: A total of 78 RP patients were evaluated. There was a significant correlation between the severity of the disease and Best Corrected Visual Acuity ($r=-0.54$, $p<0.05$), Mean Deviation ($r=-0.63$, $p<0.05$), and Optical Tomography Coherence ($r=-0.70$, $p<0.05$).

Significant differences were seen in Salivary cortisol levels when compared to controls. However, there was no difference between RP groups. High scores were found in STAI questionnaire. The age and trait-low were a risk factor in the severity of RP (odds ratio (OR): 1.04; 95% confidence interval (CI): 1.00- 1.08; OR: 22.48; 95% CI: 2.41-209.28 respectively).

Conclusion: RP patients have high salivary cortisol levels and high scores in the STAI questionnaire. Both findings could be related to their chronic stress and the progression of the disease.

Key words: retinitis pigmentosa, chronic stress, salivary cortisol, STAI.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------|----|
| ABREVIATURAS..... | IV |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| JUSTIFICACIÓN | 3 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 5 |
| ESQUEMA PICOT | 5 |
| HIPÓTESIS | 6 |
| OBJETIVOS | 6 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 7 |
| RESULTADOS..... | 17 |
| DISCUSIÓN | 22 |
| CONCLUSIONES..... | 26 |
| BIBLIOGRAFÍA | 27 |
| ANEXOS | 30 |

ABREVIATURAS

- ACLARP: Asociación Castellano Leonesa de Afectados por Retinosis Pigmentaria.
- AV: Agudeza Visual.
- BCVA: Best Corrected Visual Acuity.
- CI: Consentimiento Informado.
- CMV: Central Macular Volume.
- CV: Campo Visual.
- DB: Decibelios.
- DM: Desviación Media.
- DT: Desviación Típica.
- ELISA: Enzyme-Linked Inmuno-Sorbent Assay.
- HPA: Hipotálamo Pituitaria Adrenal.
- HFA: Humphrey Visual Field Analyser.
- IC 95%: Intervalo de Confianza para el 95%.
- IOBA: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada.
- MD: Mean Deviation.
- OCT: Tomografía de Coherencia Óptica.
- RP: Retinitis Pigmentosa.
- SITA: Swedish Tnteractive Threshold Algorithm.
- STAI: State-Trait Anxiety Inventory.
- VFt: Visual Field test.

INTRODUCCIÓN

La Retinosis Pigmentosa (RP) engloba un conjunto de distrofias de la retina, que se caracterizan por la disminución gradual de la visión, principalmente de la visión nocturna y periférica debido a la muerte de los conos y bastones, entre otras células implicadas en la visión¹. Este grupo de enfermedades presenta un componente hereditario y se caracteriza por una elevada heterogeneidad genética, lo que ha ocasionado dificultades en cuanto a su conocimiento². Existen algunos casos no asociados a componentes genéticos ni antecedentes familiares y sin una etiología concisa³. En la actualidad la mayor parte de los estudios de investigación referentes a las distrofias retinianas se enfocan en la determinación de su etiología y el desarrollo de tratamientos, principalmente en la terapia génica⁴.

En oftalmología se considera una enfermedad rara, aunque es relativamente frecuente ya que afecta a 1 de cada 5000 en todo el mundo y aumenta su prevalencia en Estados Unidos³. En España se calcula que son 20.000 personas las afectadas por esta distrofia⁵.

Respecto a su sintomatología, es característica la disminución progresiva de la visión nocturna y periférica. Además, a medida que se afectan los fotorreceptores de los conos, se produce una pérdida de la discriminación del color, de la agudeza visual y de la visión central³. Es extremadamente variable su progresión y avance, lo que añade complejidad al estudio de esta enfermedad.

En este momento existe gran interés en la investigación de una terapia curativa y aunque existen ensayos clínicos aún no se ha hallado un tratamiento curativo. Únicamente se emplean métodos que mejoran la visión o retrasan el avance de la enfermedad, como es la terapia génica con células madre pluripotentes^{6,7}, vitaminas (principalmente vitamina A)⁸, soportes y prótesis como los ojos biónicos⁹.

Algunos estudios recientes han asociado la disminución progresiva de visión con problemas psicológicos y depresión^{10,11,12,13}. Específicamente en RP, se ha encontrado relación significativa entre la presencia de ansiedad y depresión

con disminución de la función visual¹⁴. Otro estudio de RP considera el aumento de estrés percibido un factor de riesgo para el aumento de la sintomatología¹⁵. Sin embargo, otro trabajo previo a los citados anteriormente, realizado con 37 sujetos diagnosticados de RP no encontró evidencia entre fluctuaciones en factores psicosociales y reducción de la función visual¹⁶. Esto indica que la discapacidad visual progresiva da lugar a la pérdida de independencia, lo que ocasiona ansiedad y estrés a aquellos que la padecen.

El propósito del presente estudio consiste en medir el nivel de estrés crónico de estos pacientes, de manera subjetiva a través de la escala State-Trait Anxiety Inventory (STAI) y de manera objetiva a través de los niveles de cortisol en saliva y en pelo con el fin de comprobar la presencia de estos estados psicológicos en sujetos con RP.

JUSTIFICACIÓN

La mayor parte de los estudios que relacionan la RP con ansiedad emplean métodos de evaluación subjetiva, como escalas validadas (Epworth Sleepiness Scale, Stanford Sleepiness Scale, Perceived Stress Scale). Aunque estas han demostrado eficacia, suponen un problema ya que los resultados se obtienen de la percepción personal de cada sujeto¹⁷. Por el mismo motivo, los resultados son poco reproducibles, ya que dependen de diversos factores personales, sociales y culturales.

Como se ha demostrado, la disminución de la función visual influye en las repercusiones psicológicas que presentan los individuos^{12,13}. Se considera un sesgo de la enfermedad ya que probablemente estos sujetos presenten niveles elevados de ansiedad y estrés crónicos derivados de su enfermedad.

Partiendo de la necesidad de desarrollar métodos objetivos de evaluación de estrés crónico, este estudio ha planteado la medición estrés crónico a través de biomarcadores en saliva y pelo. Se emplea el cortisol como biomarcador de estrés¹⁸. Se obtiene en saliva y pelo ya que son métodos no invasivos y no dolorosos que han demostrado relación con el cortisol basal plasmático^{19,20,21,22}. Se eligieron también estas determinaciones porque dicho biomarcador en cabello refleja la actividad a largo plazo del eje Hipotálamo Pituitario Adrenal (HPA) y en saliva refleja la actividad aguda del eje HPA²³. Se destaca la ausencia de biomarcadores para el estrés crónico, ya que los utilizados aportan información de un determinado periodo de tiempo, breve y cercano en el tiempo.

Tras la búsqueda bibliográfica de artículos en PubMed referentes a distrofias retinianas se observa la escasez de estudios que relacionen estrés crónico con RP, por lo que la realización de este estudio supone avance y originalidad. Este estudio, a través de la escala STAI y la medición de cortisol en saliva y pelo en relación con la disminución de función visual, obtendrá unos resultados más completos en cuanto a la determinación de nivel de estrés crónico en estos pacientes, ya que los estudios publicados no han relacionado ambos métodos conjuntamente. Además, si se observa que aquellos pacientes con más baja

función visual presentan niveles más elevados de estrés, se podrá continuar en el desarrollo de esta línea de investigación, con el diseño y puesta en marcha de programas de prevención de estrés o terapia psicológica. De esta manera los pacientes pueden conocer mejor su enfermedad y así disminuir los factores de estrés.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Podría ser el cortisol en pelo y saliva un buen biomarcador para evaluar estrés crónico en pacientes con RP?

ESQUEMA PICOT

- P: Pacientes con RP pertenecientes a la Asociación Castellano Leonesa de Afectados por Retinosis Pigmentaria (ACLARP). Se incluyeron sujetos a partir de 18 años.
- I: Se midió el estrés crónico mediante una valoración subjetiva (escala STAI) y una valoración objetiva, que emplea concentraciones del biomarcador cortisol en saliva y pelo. El estudio consistió en dos visitas, en la primera se tomó una muestra de saliva y otra de pelo, se realizaron las pruebas de agudeza visual (AV), campimetría (CV) y tomografía de coherencia óptica (OCT) además de pasar la escala STAI completa. En la segunda visita se tomó una muestra de saliva y se pasó únicamente la parte Ansiedad/Estado de la escala STAI.
- C: Grupo control para la saliva procedente de un estudio (Sobas et al., 2016)²⁴ que recogió muestras de saliva en sujetos sanos. El grupo control de pelo procede de otro estudio (García-León et al., 2018)²⁵.
- O: Se tuvieron en cuenta las siguientes variables.
 - o Variables primarias: niveles de cortisol en saliva y pelo, grado de RP y nivel de estrés crónico medido a través de la escala STAI.
 - o Variables secundarias: función visual (AV, campimetría y OCT) y variables sociodemográficas (edad y sexo).

HIPÓTESIS

El cortisol analizado en saliva y pelo es un buen biomarcador para evaluar el estrés crónico en pacientes con RP.

OBJETIVOS

- General: Estudiar la correlación entre el grado de RP en base a la edad y al sexo con el grado de estrés crónico y el nivel de cortisol en saliva y pelo.
- Específicos:
 - Analizar la relación entre el grado de severidad de la enfermedad con la edad y el sexo.
 - Analizar ansiedad a través de la escala STAI en los diferentes grupos de RP.
 - Analizar entre los diferentes grupos de enfermedad.
 - Comparar el cortisol en la saliva y en el pelo en los pacientes con RP con los grupos control.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO

Es un estudio de tipo observacional y transversal.

POBLACIÓN Y MUESTRA

Consistió en 78 pacientes con diagnóstico previo de RP, ≥ 18 años, procedentes de ACLARP.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes afectos de RP que hayan firmado el consentimiento informado.
- Pacientes ≥ 18 años.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o en tratamiento hormonal.
- Personas con enfermedad autoinmune.
- Personas con historial de enfermedad psiquiátrica.
- Personas en tratamiento farmacológico de psicotrópicos, antiinflamatorios no esteroideos y otros analgésicos.
- Cirugía ocular seis meses antes de su inclusión en el estudio.

ESTRATEGIA DE RECLUTAMIENTO

Para obtener la muestra de pacientes, el IOBA contactó con el director de ACLARP, quién envió los datos de aquellos sujetos que estuvieron interesados en participar en la investigación y con disponibilidad para acudir dos días en una semana para realizar las pruebas y obtener las muestras biológicas.

ADHERENCIA

Para favorecer la adherencia de los pacientes, en la segunda visita se les proporcionaron los datos de su exploración oftalmológica y se informó de que conocerán los resultados del proyecto una vez haya finalizado.

TIMELINE

Primera etapa: reclutamiento de los pacientes.

Se reclutaron aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio, procedentes de la asociación ACLARP. El estudio “Validación de biomarcadores de estrés crónico en saliva, lágrima y pelo, en pacientes con distrofias de la retina, fundamentalmente retinitis pigmentosa” (PI 17-732) comenzó el 17/04/2018 y finalizó el 15/02/2019, aunque inicié mi colaboración el 16/10/2018.

Segunda etapa: los sujetos acudieron al IOBA para la firma del consentimiento informado (CI) y la toma de muestras: tabla 1.

- Visita 0: CI por el investigador principal.
- Visita 1: Conociendo que entre las visitas 1 y 2 debe pasar un mínimo de 24 horas y considerando la situación de los participantes se determinó la firma del CI y realización de algunas de las pruebas en el mismo día. Este fallo fue aceptado por el Comité Ético de Investigación que aprobó el desarrollo del proyecto. En la visita 1 tuvo lugar la recogida de muestras y valoración del estrés crónico mediante cuestionarios. Las muestras tomadas el primer día fueron la muestra de saliva y la de pelo. El cuestionario fue la escala STAI, compuesta por dos subescalas, Ansiedad/Estado (A/E) y Ansiedad/Riesgo (A/R). El lugar donde se realizó fueron las consultas del IOBA. En esta visita también se toma la AV, y se realiza el OCT el aparato Cirrus HD-OCT 5000 (Carl Zeiss Meditec, Dublin, EE.UU.) y el CV con el campímetro Humphrey Visual Field Analyser (HFA), Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, EE.UU. y utilizando la estrategia SITA (Swedish Tnteractive Threshold Algorithm) estándar 24-2.

- Visita 2: se realizó tres días después de la primera visita ya que se toma como referencia el grupo control de cortisol salival que establece que entre las tomas de muestra debe existir un intervalo menor a 7 días. Las visitas se ajustaron a las posibilidades de los pacientes y la toma de muestra se realizó aproximadamente a la misma hora. Se tomó la segunda muestra de saliva, se llevó a cabo la escala Ansiedad/Estado y se les realizó la exploración oftalmológica.

Tabla 1. Cronograma de las actividades realizadas en la segunda etapa del estudio.

| | CI | AV | CV | OCT | Cuestionario A/R | Cuestionario A/E | Saliva | Pelo | Exploración Oft. |
|-------------|----|----|----|-----|---------------------|---------------------|--------|------|---------------------|
| Visita 0 | X | | | | | | | | |
| Visita 1 | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Visita 2 | | | | | | X | X | | X |

CI: consentimiento informado; AV: agudeza visual; CV: campo visual; OCT: tomografía de coherencia óptica; A/R: Ansiedad/Rasgo; A/E: Ansiedad/Estado; Oft: oftalmológica

Tercera etapa:

- Análisis del biomarcador cortisol en saliva y pelo en el Laboratorio de Inmunología del IOBA.
- Unificación de los datos de todas las pruebas obtenidas en la base de datos.

Cuarta etapa: análisis estadístico en la Unidad de estadística del IOBA y discusión de los resultados.

INTERVENCIONES

Recogida de saliva

La recolección de saliva se hizo por el método de secreción pasiva. Para ello, se explicó al paciente el procedimiento que se iba a realizar resolviendo sus

posibles dudas. Antes de tomar la muestra se reflejó la hora en la que había realizado la última comida, consumido otras sustancias o realizado el lavado de dientes, ya que debería haber transcurrido al menos 1 hora. Previo a la recogida de saliva, los sujetos se enjuagaron durante 5 minutos con agua para evitar la contaminación de la muestra y a continuación tragaron la saliva que quedaba en la cavidad bucal. Se entregó un tubo y una pajita para que depositaran la saliva que fuesen acumulando en un máximo de 5 minutos. La cantidad recogida de saliva se determinó en un mínimo de 1 ml y un máximo de 5 ml. Una vez obtenida y etiquetada la muestra se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

La muestra obtenida no fue válida en casos de sangrado bucal, enfermedad, inflamación o lesión en la boca.

Recogida de pelo

La obtención del cabello se realizó mediante el corte de tres fragmentos de pelo del vértice posterior de la cabeza. Los fragmentos debían ser más largos de 1cm y el corte se realizó en la zona más próxima al cuero cabelludo. Como datos se anotó el color, la longitud y tratamiento si lo hubiese. El cabello no debía estar teñido, decolorado o moldeado, tampoco tratado con espuma, laca o aceites. En dichos casos se reflejó la situación o no se pudo recoger.

La muestra obtenida se guardó en papel de aluminio, quedando identificadas las partes proximal y distal. Se conservaron a -20°C.

Cuestionario STAI

Esta escala mide dos conceptos independientes de ansiedad, Ansiedad/Estado y Ansiedad/Rasgo. Cada parte consta de 20 preguntas con 4 opciones de respuesta. La escala Ansiedad/Estado evalúa un estado emocional transitorio caracterizado por sentimientos subjetivos que pueden cambiar, como la aprensión o preocupación. La escala Ansiedad/Rasgo mide la propensión ansiosa, es decir, la tendencia a percibir las situaciones como amenazadoras, lo sean o no²⁶.

El cuestionario fue leído y completado por el paciente en aquellos casos en los que la enfermedad le permitía leer. En el caso contrario, se leyó el cuestionario

al paciente y se completó, respetando siempre su privacidad y evitando influir en la respuesta.

Las opciones de respuesta son las siguientes, cada una de ellas se asocia a una puntuación: tabla 2.

Tabla 2. Puntuación asignada a cada respuesta del cuestionario STAI.

| Puntuación | 0 | 1 | 2 | 3 |
|------------|------------|---------|----------|--------------|
| A/E | Nada | Algo | Bastante | Mucho |
| A/R | Casi nunca | A veces | A menudo | Casi siempre |

A/E: Ansiedad/Estado; A/R: Ansiedad/Rasgo; 0,1,2,3: puntuación asignada a cada respuesta.

Para el análisis del cuestionario se tuvieron en cuenta las preguntas positivas y las negativas: tabla 3.

Tabla 3. Ítems positivos y negativos del cuestionario STAI.

| | | |
|---|-----|--|
| + | A/E | 3, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 17, 18 |
| - | A/E | 1, 2, 5, 8, 10, 11, 15, 16, 19, 20 |
| + | A/R | 22, 23, 24, 25, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40 |
| - | A/R | 21, 26, 27, 30, 33, 36, 39 |

A/E: Ansiedad/Estado; A/R: Ansiedad/Rasgo; +: preguntas puntuadas en positivo; - preguntas puntuadas en negativo

El resultado se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$A/E = 30 + (\text{suma de ítems positivos}) - (\text{suma de ítems negativos})$$

$$A/R = 21 + (\text{suma de ítems positivos}) - (\text{suma de ítems negativos})$$

Según la puntuación obtenida, los niveles de ansiedad oscilan entre 0 y 60, se dividieron en:

- 0-19: normal.
- 20-28: leve.
- 29-39: alta.
- > 40: severa.

Toma de Agudeza Visual

La AV de los sujetos se tomó en ambos ojos, utilizando la distancia de 4 metros y 1 metro.

En aquellos casos en los que el sujeto no leyó ninguna letra, la AV se valoró anotando si era capaz de contar dedos, de detectar el movimiento de las manos y de percibir o no luz.

Además, se tuvo en cuenta el uso de corrección visual, tanto de gafas como de lentes de contacto.

Campo visual

Se realizó una campimetría de cada ojo para valorar las alteraciones en el campo visual de estos pacientes. Se utilizó un campímetro Humphrey Visual Field Analyser (HFA), Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, EE.UU. y la estrategia SITA estándar 24-2.

OCT

Para la realización de esta prueba se utilizó el aparato Cirrus HD-OCT 5000 (Carl Zeiss Meditec, Dublin, EE.UU.). Los scans realizados fueron el cubo macular 200x200, cubo de disco óptico 200x200, agio-OCT 3x3 y 6x6.

Exploración oftalmológica

Se realizó una exploración del fondo de ojo.

CLASIFICACIÓN DEL GRADO DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD

La clasificación del grado de severidad de RP se evaluó según la escala propuesta por Smith et al., en 2012, que utiliza los siguientes criterios para determinar la gravedad de la enfermedad²⁷:

Las pruebas clínicas se valoraron de 0 a 4:

- AV ($\geq 75=0$; 66-74=1; 56-65=2; 46-55=3; $\leq 45=4$), la desviación media del campo visual ($\leq 15\text{DM}=0$; -15.1 a -20=1; -20.1 a -25=2; -25.1 a -30=3; y $\geq 30=4$).

- Desviación Media (DM) del CV medida en decibelios (db): (≤ 15 DM =0; -15.1 a -20=1; -20.1 a -25=2; -25.1 a -30=3; and ≥ 30 =4).
- Volumen macular medio (mm³) del OCT: ≥ 9.7 =0; 9.0 a 9.6=1; 8.3 a 8.9=2; 7.6 a 8.2=3; and ≤ 7.5 =4).

Además, se utilizaron 4 criterios de la exploración oftalmológica graduados de 0 a 2.

- Grado de catarata siguiendo la escala LOCS-III²⁸.
- Apariencia del nervio óptico.
- Atrofia de la retina.
- Patología macular.

La clasificación global consistió en el conjunto de los valores obtenidos en exploración (AV, CV y OCT) junto con las obtenidas en la exploración oftalmológica. La graduación final presenta tres niveles según gravedad:

- Medio: 0 – 3.
- Moderado: 4 – 7.
- Severo: ≥ 8 .

VARIABLES

- Primarias:
 - Nivel de cortisol en saliva y pelo. Variable cuantitativa continua.
 - Grado de RP. Variable cualitativa ordinal.
 - Nivel de estrés crónico a través del cuestionario. Variable cualitativa ordinal.
- Secundarias:
 - Agudeza visual. Variable cuantitativa discreta.
 - Campo visual. Variable cuantitativa discreta.
 - OCT: Variable cuantitativa discreta.
 - Variables sociodemográficas:
 - Edad. Variable cuantitativa discreta.
 - Sexo: Variable cualitativa nominal.

GRUPO CONTROL

Las concentraciones normales de cortisol en saliva del estudio “Reliability of Potential Pain Biomarkers in the Saliva of Healthy Subjects: Inter-Individual Differences and Intersession Variability” se utilizaron como grupo control para el análisis comparativo de la concentración de cortisol en saliva en el grupo de RP. El grupo control es una muestra de sujetos sanos, libres de dolor, de edad comprendida entre 30 y 40 años. Las concentraciones de cortisol fueron de 1.20ng/ml en la primera recogida y de 1.15ng/ml en la segunda recogida²⁴.

El estudio “Hair cortisol concentrations in a Spanish sample of healthy adult” cuyos resultados se han utilizado como grupo control para la concentración de cortisol en pelo establece que la concentración media de cortisol en cabello para la muestra de individuos sanos de un rango de edad entre 18 y 93 años es de 127.91pg/mg²⁵.

MANEJO DE LOS DATOS

Cada sujeto tiene asignado un número de identificación, el cual ha sido empleado para el etiquetado de las muestras recogidas. De esta forma se cumple en todo momento con lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, del 5 de diciembre de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Tanto los datos de los pacientes como el resultado individual de las pruebas permanecen en el anonimato y únicamente acceden a ellos los componentes del grupo investigador.

El etiquetado de las muestras recogidas es el siguiente:

- Muestra de saliva de la primera visita: número de historia clínica-S1.
- Muestra de saliva de la segunda visita: número de historia clínica-S2.
- Muestra de pelo: número de historia clínica-P.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para determinar las concentraciones de cortisol en las muestras de saliva y pelo, estas se analizaron en el laboratorio del IOBA mediante la técnica ELISA. Para ello se empleó el kit Human Cortisol ELISA. Las muestras se congelan a -20°C . Para su análisis, se descongelaron, se mezclaron con un conjugado de enzima y tras un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente se centrifugaron entre 5 y 10 minutos a 2000-3000rpm.

Respecto al análisis en pelo, aún queda pendiente determinar el método.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se recogieron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel y se realizó un análisis descriptivo comparativo utilizando el programa estadístico R versión 3.5.3 (R Core Team 2019).

Para determinar la existencia de relación entre las distintas variables comparadas se han tomado valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

Método de estimación de los Límites de Referencia: asumiendo que la distribución de cada uno de estos marcadores es normal, el intervalo de referencia se estimará utilizando el intervalo inter-fractílico, cuya expresión es: $\bar{X} \pm kS_X$ donde \bar{X} representa la media muestral, S_X la desviación estándar y k es el valor de la distribución normal para el nivel de probabilidad fijado, generalmente $\alpha = 0.05$. Los límites así estimados, se corresponden con los fractiles 0.025 y 0.975. Para cada fractil, es necesario calcular un intervalo de confianza (90%). Fijando un nivel del 90%, se calcula este IC utilizando la expresión, $\text{fractil} \pm 2.81 S_X / \sqrt{n}$, donde n es el tamaño de la muestra.

Estimación del tamaño muestral

Los α fractiles y $(1-\alpha)$ fractiles no son estimables al menos que α sea como mínimo del orden de $1/n$. De este modo, la determinación paramétrica de los fractiles 0.025 y 0.975 requiere de al menos 40 individuos.

CONSIDERACIONES ÉTICO LEGALES

El protocolo del estudio “Validación de biomarcadores de estrés crónico en saliva, lágrima y pelo, en pacientes con distrofias de la retina, fundamentalmente retinitis pigmentosa” dentro del cual se encuentra este trabajo, fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Valladolid Este (HCUV).

Los pacientes fueron informados en la visita 0 sobre los objetivos y condiciones de la investigación. También sobre la utilización y el destino de las muestras biológicas recogidas, que cumple con el Real Decreto 1716/2011, del 18 de Noviembre, que establece las normas para la autorización y el funcionamiento de biobancos y tratamiento de muestras biológicas de origen humano. Previamente a su inclusión en el estudio firmaron el Consentimiento Informado y aceptaron participar en la investigación. Además, dio a los pacientes la posibilidad de revocar el consentimiento en cualquier momento.

La confidencialidad de los datos de todos los participantes se ha protegido según la Ley Orgánica 3/2018, del 5 de diciembre de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

RESULTADOS

La muestra fue formada por un total de 78 sujetos, de los cuales 30 fueron mujeres (38.5%) y 48 varones (61.5%). La media de edad fue 51.59, rango (18 – 79), con una desviación típica (DS) ± 13.4 .

El grupo control utilizado para comparar el cortisol salival se compone de 34 pacientes, entre ellos 23 mujeres (67.7%) y 11 varones (32.4%). La media de edad fue de 34.26, rango (30 – 40), con una desviación típica (DS) de ± 2.27 .

Respecto a la severidad de la RP, 2 sujetos presentaron grado ligero (2.6%), 24 moderado (30.8%) y 52 severo (66.7%). Debido a que únicamente 2 sujetos presentan grado ligero, por motivos estadísticos se les ha incluido dentro de severidad moderada, lo que supone que 26 sujetos presentan RP “ligera-moderada” (33.3%) y 52 RP “severa” (66.7%).

Los valores de ansiedad se recogieron con la escala STAI. La A/R solo muestra el nivel de ansiedad en la primera visita. La puntuación de las escalas de ansiedad se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Valores en las escalas de Ansiedad/Estado y Ansiedad/Rasgo en función del grado de RP.

| | N | % | IC 95% |
|--------------|----|------|---------------|
| Grado RP | | | |
| Ligera | 2 | 2.6 | 0.45 – 9.8 |
| Moderada | 24 | 30.8 | 21.08 – 42.38 |
| Severa | 52 | 66.7 | 54.98 – 76.69 |
| A/E visita 1 | | | |
| Normal | 22 | 28.2 | 18.88 – 39.7 |
| Leve | 11 | 14.1 | 7.59 – 24.26 |
| Alta | 14 | 17.9 | 10.5 – 28.62 |
| Severa | 31 | 39.7 | 29.03 – 51.48 |
| A/R visita 1 | | | |
| Normal | 8 | 10.3 | 4.85 – 19.73 |
| Leve | 20 | 25.6 | 16.72 – 37 |
| Alta | 29 | 37.2 | 26.72 – 48.91 |
| Severa | 21 | 26.9 | 17.79 – 38.36 |

| | N | % | IC 95% |
|--------------|----|------|--------------|
| A/E visita 2 | | | |
| Normal | 2 | 2.6 | 0.45 – 9.8 |
| Leve | 0 | 0 | |
| Alta | 18 | 23.1 | 14.6 – 34.25 |
| Severa | 48 | 74.4 | 63 – 83.28 |

N: número de individuos, %: porcentaje de la muestra, IC 95%: intervalo de confianza para el 95%, A/E: Ansiedad/Estado; A/R: Ansiedad/Rasgo.

Resultados de la escala STAI

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre grupos y la escala Ansiedad/Estado ni en V1 ni en V2. (p-valor: 0.6002 para A/E1 y p-valor: 1 para A/E2).

Se han podido considerar factores de riesgo para padecer grado severo de RP el nivel A/R Leve (p-valor: 0,0063; OR: 22.47; IC 95%: 2.41-209.28) y la edad p-valor. 0.0418; OR: 1.04; IC 95%: 1.00-1.08).

Relación entre grado de RP y las variables sociodemográficas edad y sexo

Respecto al sexo, el resultado no ha sido estadísticamente significativo (p-valor 0,3251). Sin embargo, la edad si se ha considerado factor de riesgo para la RP severa (p-valor 0,0418) y calculando la Odds Ratio se determina que el riesgo de padecer RP severa aumenta 1.04 veces por cada año de edad del paciente, IC 95%:1.00 –1.08. Se muestra en las figuras 1 y 2.



Figura 1: Diagrama de barras apiladas. Relación entre grado de RP y sexo.

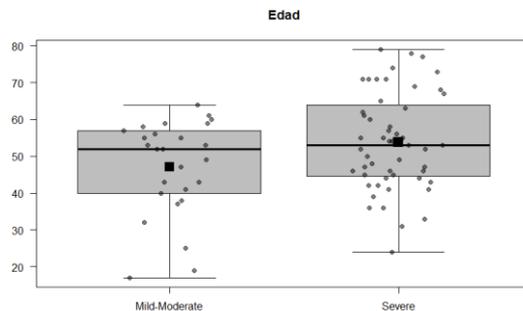


Figura 2: Diagrama de cajas. Relación entre grado de RP y edad.

Relación entre el grado de RP y las variables AV, CV y OCT

Se ha encontrado relación entre la severidad de la enfermedad y AV ($r = -0.54$, p -valor < 0.001), así como con el CV ($r = -0.63$, p -valor 0.001).

Respecto al OCT, se considera significativa la relación con la severidad de la RP, aunque se encuentra en el límite ($r = -0.7$, p -valor 0.048). Los valores de los diferentes grupos de AV, OCT y CV se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Análisis descriptivo de las variables cuantitativas AV, OCT y CV para cada grupo de pacientes

| | | RP total | RP leve-moderada | RP severa |
|-----|--------|-----------------|------------------|-----------------|
| AV | Media | 53.8 | 68.08 | 43.67 |
| | DT | 23.09 | 68.08 | 19.62 |
| | IC 95% | 47.22 – 58.95 | 60.14 – 76.01 | 37.22 – 50.12 |
| OCT | Media | 8.272 | 8.946 | 8.272 |
| | DT | 1.390 | 1.013 | 1.390 |
| | IC 95% | 7.84 – 8.70 | 8.528 – 9.364 | 7.844 – 8.700 |
| CV | Media | -26.51 | -23.64 | -28.22 |
| | DT | 8.782 | 9.026 | 1.143 |
| | IC 95% | -28.56 – -24.46 | -27.28 – -19.99 | -30.51 – -25.92 |

AV: agudeza visual; OCT; tomografía de coherencia óptica; CV: campo visual; DT: desviación típica; IC 95%: intervalo de confianza para el 95%.

Existen diferencias en AV y CV, siendo los afectados de RP severa los que obtienen una media más baja respecto a la RP leve-moderada (p-valor: <0.0001 para AV y p-valor:0.0273 para CV). En cuanto al OCT, la diferencia se considera significativa, aunque se encuentra en el límite de no serlo (p-valor: 0.0380). Estos resultados se representan en la figura 3.

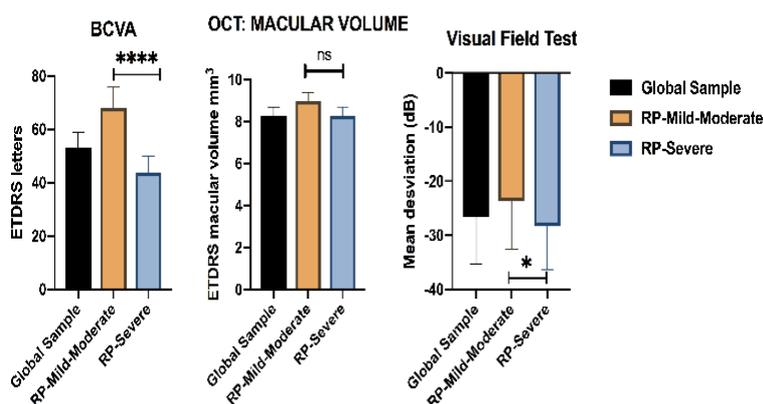


Figura 3: Diagrama de barras. Medias e intervalos de confianza de AV, CV y OCT entre nivel de RP, AV, OCT y CV. **** <0.0001; *** <0.1; * <0.05; ns: no significativo.

RP y cortisol salival

Se tomaron 78 muestras de saliva de los sujetos, una en cada visita. Por cada individuo se tomo el valor medio de las dos visitas. La media de cortisol salival en estos sujetos fue de 4.02ng/ml (DS ±4.26). Los datos del cortisol en la totalidad de la muestra, en el grupo de leve -moderado y en el grupo de severo se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Cortisol en saliva en la totalidad de la muestra, en los grupos de RP y en el grupo control.

| | N | Media | DT | IC 95% | p-valor* |
|------------------------------|----|-------|------|-------------|----------|
| Cortisol saliva RP | 78 | 4.02 | 4.26 | 3.04 - 5 | 0.7276 |
| Cortisol en RP leve-moderado | 26 | 3.45 | 0.83 | 3.12 – 3.79 | |
| Cortisol en RP severo | 52 | 4.33 | 5.23 | 2.82 – 5.83 | |

| | N | Media | DT | IC 95% |
|---------------------------|----|-------|------|-------------|
| Cortisol en grupo control | 34 | 1.20 | 0.91 | 0.89 – 1.52 |

N: número de individuos; DT: desviación típica; IC 95%: intervalo de confianza para el 95%; A/E: Ansiedad/Estado; A/R: Ansiedad/Rasgo. *U de Mann-Whitney p-valor.

El cortisol no se asocia con la severidad de la RP en ningún caso

Comparación del cortisol salival con el grupo control

La media de cortisol analizado en los sujetos sanos del grupo control fue de 1,14ng/ml y mayor en los afectados de RP, 3,45ng/ml en “leve-moderada” y 4,33ng/ml en “severa”, como se muestra en la figura 4. Sí se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con RP con el grupo control (p-valor <0,0001 en ambos) utilizando ANOVA. No se encuentran diferencias entre los grupos de enfermos.

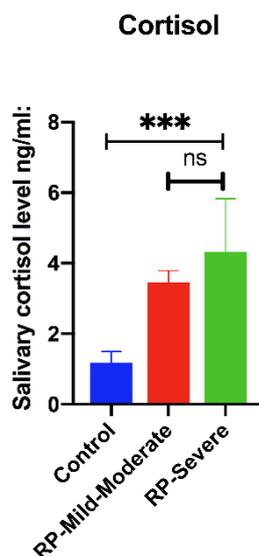


Figura 4. Diagrama de barras. Relación entre cortisol salival en sujetos con RP y grupo control: representación de las medias y el intervalo de confianza al 95% de las concentraciones. *** <0.1; ns: no significativo.

Cortisol en pelo

No hay resultados de concentración de cortisol en pelo, ya que aún se encuentra en proceso de análisis

DISCUSIÓN

Varios estudios indican que existe equivalencia entre concentraciones de cortisol basal plasmático y cortisol salival ^{19,20,21}. En ello basa este estudio el empleo de saliva en lugar de plasma, además así se evita el sesgo de que el estrés previo a la extracción de plasma modifique los niveles de cortisol. El cortisol se ha utilizado como método de valoración de estrés crónico, aunque obtenido en saliva no aporta información de un largo periodo de tiempo^{29,30}. Cabe destacar la variabilidad de este biomarcador ya que su liberación sigue un ritmo circadiano^{22,23}.

Los datos obtenidos en el estudio sugieren que existe una elevación de los niveles de cortisol salival en sujetos afectados de RP. Algunos autores consideran que este biomarcador está implicado en el estrés crónico ^{18, 31}, por lo que se podría determinar que existe relación entre el estrés crónico y la RP. No se ha encontrado ninguna publicación que haya medido el cortisol salival en pacientes con RP para determinar el estrés crónico, pero si se han encontrado en otro tipo de patologías. S.Garg et al., señala concentraciones superiores de este biomarcador en otras patologías de retina³². También hay estudios que encuentran el cortisol salival elevado en otro tipo de patologías que producen dolor. Se resalta este aspecto por la relación existente entre el dolor y el estrés, ambos influidos por la respuesta del eje HPA^{23, 33,34}.

A diferencia de otros autores que han empleado escalas subjetivas para considerar que la ansiedad y el estrés se relacionan con una disminución de la función visual, nuestro estudio no puede establecer la misma relación ya que no relaciona ansiedad y disminución progresiva ^{12,14,15}. No se ha encontrado que niveles elevados de estrés según la escala STAI se relacionen con estadios avanzados de RP, únicamente se pudo relacionar la Ansiedad/Rasgo leve como factor de riesgo para la RP severa. Cabe destacar que los estudios encontrados no han empleado la misma escala, sino otras también validadas ^{12,14,15}.

Puissant et al., identifican un aumento de la concentración de cortisol en sujetos con niveles altos de depresión y ansiedad, según la escala STAI. A

diferencia de este, nuestro estudio no se observa significación entre dicha escala y los valores del cortisol³⁵.

Los resultados obtenidos de la AV muestran una disminución de la misma en RP severa respecto a la forma leve-moderada. Sin embargo, apenas existen diferencias en el OCT, a diferencia de Bataglia Parodi et al. que asocian cambios en el OCT en pacientes con RP con baja AV³⁶. Aunque este estudio no ha realizado un seguimiento de los pacientes, otro que si lo hizo asocia la reducción del CV con la progresión de la enfermedad³⁷, lo que se corresponde con los datos obtenidos en este estudio, ya que se han encontrado valores más disminuidos en RP severa con respecto de RP leve-moderada. Cabe destacar que la mayoría de nuestros pacientes presentaron una reducción concéntrica del campo porque la mayoría pertenecían al grupo moderado y severo, lo que se corresponde con los datos obtenidos en este estudio.

Limitaciones

Una limitación importante sería el grupo control empleado. La media de edad de los sujetos sanos presenta diferencias significativas con la del grupo del estudio, por lo que pueden existir sesgos respecto a la comparación de ambos. También hay que reseñar que el tamaño muestral se puede considerar reducido para las determinaciones de biomarcadores.

Otra limitación de la investigación sería que no se ha analizado la repetibilidad de las determinaciones en saliva, lo cual queda pendiente para un sucesivo estudio. No se han encontrado otras investigaciones con el mismo análisis por lo que quedaría pendiente de validación.

En cuanto a las variables empleadas, hubiese sido interesante añadir tanto la situación laboral de los sujetos como el número de convivientes en la unidad familiar.

Para la fiabilidad en la valoración de los resultados, se considera un sesgo la escasez de pacientes en estadio leve de RP, lo que puede ser la causa de que no se encuentre relación entre los grupos de enfermedad.

Se podría considerar como una limitación la fecha de la obtención de la financiación para el análisis de las muestras. Ha sido muy cercana a la presentación del trabajo y esto ha imposibilitado analizar las muestras del pelo y presentar los resultados en este proyecto, aunque están en proceso de análisis.

Fortalezas

La principal fortaleza del estudio es la correlación entre los métodos para medir el estrés crónico, uno de ellos subjetivo con cuestionarios validados y otro objetivo como el análisis de concentraciones de cortisol. Además, se ha incluido la exploración oftalmológica con varias pruebas (AV, CV, OCT) para dividir a los sujetos en los tres grados de enfermedad.

Además, al estar englobado dentro de un estudio más amplio como es “Validación de biomarcadores de estrés crónico en saliva, lágrima y pelo, en pacientes con distrofias de la retina, fundamentalmente retinitis pigmentosa” permite ampliar la línea de investigación y continuar con otros estudios relacionados con ello.

Otra fortaleza a destacar, es haber podido formar parte de un equipo multidisciplinar y desarrollar el TFG dentro un instituto de investigación reconocido como es el IOBA.

Aplicabilidad a la práctica clínica

El nivel de cortisol salival elevado en sujetos afectados por RP en comparación con población sana, se podría emplear como marcador para detectar a los pacientes más necesitados de apoyo psicológico e incluirles en terapias encaminadas a reducir el estrés. Estas terapias tendrían como objetivo que el paciente conozca mejor su enfermedad, de tal manera que pueda gestionar mejor su vida diaria y como consecuencia se reduzca el estrés crónico y la ansiedad. La introducción de ayuda psicosocial en el tratamiento de la RP podría mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Esto ayudaría a introducir otra clasificación a partir de la cual se puedan aplicar tratamientos adecuados y precisos a cada variante.

El objetivo final de este proyecto de investigación sería que esta clasificación que hemos utilizado en los pacientes de RP, combinada con la medida de los biomarcadores, junto con las escalas de sueño y estrés, nos de una medida objetiva de clasificar a los pacientes dentro de un ensayo clínico en el que se probasen nuevas terapias.

Futuras líneas de investigación

Partiendo de los resultados de este trabajo sería de gran interés continuar estudiando la repetibilidad del biomarcador cortisol salival y de otros biomarcadores que también puedan estar relacionados con el estrés crónico, lo que se ampliará en la investigación de la que parte este estudio “Validación de biomarcadores de estrés crónico en saliva, lágrima y pelo, en pacientes con distrofias de retina, fundamentalmente en Retinitis Pigmentosa”.

Al igual que se ha realizado en sujetos con RP, se podría ampliar a otras enfermedades crónicas degenerativas o que ocasionen una pérdida de independencia.

CONCLUSIONES

- Nuestros resultados sugieren que la edad puede ser un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad, sin embargo, no se ha demostrado lo mismo el sexo.
- Aunque no existen diferencias entre los grupos la mayoría de los pacientes presentan niveles elevados de ansiedad medidos a través de las escalas subjetivas. El rasgo leve supone un factor de riesgo respecto a tener un grado normal en la progresión de la enfermedad.
- Los individuos afectados de RP en cualquier grado presentan una concentración media de cortisol superior que los sujetos sanos.
- Se han encontrado concentraciones superiores de cortisol salival en individuos con RP avanzada respecto de los grados más leves pero no existen diferencias estadísticamente significativas.
- Existe relación entre las pruebas oftalmológicas Campo Visual y Agudeza Visual y Tomografía de Coherencia Óptica con los distintos grados de la RP, siendo estos menores en sujetos con RP severa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wood-Gush H. Retinitis pigmentosa research: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1989;82:355-8.
2. Palop Larrea V, Martinez-Mir I. Headaches, pigmentary retinosis, and vitamin A. *Aten Primaria*. 2008;10:532-3.
3. O'Neal T, Luther E. Retinitis Pigmentosa [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 25 November 2018]. Recuperado a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519518/>
4. He Y, Zhang Y, Su G. Recent Advances in Treatment of Retinitis Pigmentosa. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2015;10(3):258-65.
5. Retinosis pigmentaria [Internet]. FARPE - Federación de Asociaciones de Distrofias Hereditarias de Retina de España. 2019 [cited 26 May 2019]. Recuperado a partir de: <http://www.retinosifarpe.org/quienes-somos.html>
6. Barber A, Hippert C, Duran Y, West E, Bainbridge J, Warre-Cornish K et al. Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;110(1):354-9.
7. Santos-Ferreira T, Postel K, Stutzki H, Kurth T, Zeck G, Ader M. Daylight Vision Repair by Cell Transplantation. *STEM CELLS*. 2014;33(1):79-90.
8. Ying Zaho, Kai Feng, Ruibao Liu. Vitamins and Mineral Supplements for Retinitis Pigmentosa. *Journal of Ophthalmology*. 2019;19.
9. Guymer R, Brandli A, Luu C, Ayton L. Progress in the clinical development and utilization of vision prostheses: an update. *Eye and Brain*. 2016;15.
10. Bhuvaneswari M, Immanuel Selvaraj C, Selvaraj B, Srinivasan T. Assessment of Psychological and Psycho-physiological Problems Among Visually Impaired Adolescents. *Iranian Journal of Psychiatry and Behavioral Sciences*. 2016;10(1).
11. Ishtiaq R. Psychosocial Implications of Blindness and Low Vision in students of Blind School Bahawalpur. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2016;32(2).
12. Latham K, Baranian M, Timmis M, Pardhan S. Emotional Health of People with Visual Impairment Caused by Retinitis Pigmentosa. *Plos One*. 2015;10(12).
13. Azoulay L, Chaumet-Riffaud P, Jaron S, Roux C, Sancho S, Berdugo N et al. Threshold Levels of Visual Field and Acuity Loss Related to Significant Decreases in the Quality of Life and Emotional States of Patients with Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmic Research*. 2015;54(2):78-84.

14. Sainohira M, Yamashita T, Terasaki H, Sonoda S, Miyata K, Murakami Y et al. Quantitative analyses of factors related to anxiety and depression in patients with retinitis pigmentosa. *PLOS ONE*. 2018;13(4).
15. Bittner A, Haythornthwaite J, Diener-West M, Dagnelie G. Photopsias are related in part to perceived stress and positive mood in retinitis pigmentosa. *Eye*. 2011;26(1):101-8.
16. Bittner A, Haythornthwaite J, Diener-West M, Dagnelie G. Worse-than-usual visual fields measured in retinitis pigmentosa related to episodically decreased general health. *British Journal of Ophthalmology*. 2012;97(2):145-8.
17. Dougherty B, Cooley S, Davidorf F. Measurement of Perceived Stress in Age-Related Macular Degeneration. *Optometry and Vision Science*. 2017;94(3):290-6.
18. Aguilar-Cordero M, Sánchez-López A, Mur-Villar N. Cortisol salival como indicador de estrés fisiológico en niños y adultos; revisión sistemática. *Nutr Hosp*. 2014;29(5):960-8.
19. Van Faassen M, Bischoff R, Kema I. Relationship between plasma and salivary melatonin and cortisol investigated by LC-MS/MS. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2017;55(9).
20. Sharma P, Sandhu SV, Bhandari R. Estimation oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018; 22(1):27-34.
21. Orozco F, Anders M, Mella J. Adrenal insufficiency in cirrhotic patients. *Medicina B Aires*. 2016;76(4):208-12.
22. Papafotiou C, Christaki E, van den Akker E, Wester V, Apostolakou F, Papassotiriou I et al. Hair cortisol concentrations exhibit a positive association with salivary cortisol profiles and are increased in obese prepubertal girls. *Stress*. 2017;20(2):217-22.
23. Zhang Q, Chen Z, Chen S, Yu T, Wang J, Wang W et al. Correlations of hair level with salivary level in cortisol and cortisone. *Life Sciences*. 2018;193:57-63.
24. Sobas E, Reinoso R, Cuadrado-Asensio R, Fernández I, Maldonado M, Pastor J. Reliability of Potential Pain Biomarkers in the Saliva of Healthy Subjects: Inter-Individual Differences and Intersession Variability. *PLOS ONE*. 2016;11(12).
25. Garcia-Leon M, Peralta-Ramirez M, Arco-Garcia L, Romero-Gonzalez B, Caparros-Gonzalez R, Saez-Sanz N et al. Hair cortisol concentrations in a Spanish sample of healthy adults. *PLOS ONE*. 2018;13(9).

26. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE. STAI Cuestionario Estado-Rasgo. Manual. 5ª ed. Madrid: TEA Publicaciones de Psicología Aplicada, 1999.
27. Smith HB, Chandra A, Zambarajki H. Grading severity in retinitis pigmentosa using clinical assessment, visual acuity, perimetry and optical coherence Tomography. *Int Ophthalmol*. 2012; 33(3):237–44.
28. Chylack L. The Lens Opacities Classification System III. *Archives of Ophthalmology*. 1993;111(6):831.
29. Ceccato F, Selmin E, Sabbadin C, Dalla Costa M, Antonelli G, Plebani M et al. Improved salivary cortisol rhythm with dual-release hydrocortisone. *Endocrine Connections*. 2018;7(9):965-74.
30. Rolfsjord L, Bakkeheim E, Berents T, Alm J, Skjerven H, Carlsen K et al. Morning Salivary Cortisol in Young Children: Reference Values and the Effects of Age, Sex, and Acute Bronchiolitis. *The Journal of Pediatrics*. 2017;184:193-8.
31. Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(5):589-601.
32. Garg S, Dada T, Talwar D, Biswas N. Endogenous cortisol profile in patients with central serous chorioretinopathy. *British Journal of Ophthalmology*. 1997;81(11):962-4.
33. Timmers I, Kaas A, Quaedflieg C, Biggs E, Smeets T, de Jong J. Fear of pain and cortisol reactivity predict the strength of stress-induced hypoalgesia. *European Journal of Pain*. 2018;22(7):1291-303.
34. Hannibal K, Bishop M. Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. *Physical Therapy*. 2014;94(12):1816-25.
35. Puissant S, Van Den Bergh B, Van Calster B. Saliva cortisol profile in 14-15 years old adolescents in relation to depression, anxiety and emotional reactivity. *Rev Mex Psicología*. 2008;25(2):249-58.
36. Battaglia Parodi M, La Spina C, Triolo G, Riccieri F, Pierro L, Gagliardi M et al. Correlation of SD-OCT findings and visual function in patients with retinitis pigmentosa. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2015;254(7):1275-9.
37. Fujiwara K, Ikeda Y, Murakami Y, Tachibana T, Funatsu J, Koyanagi Y et al. Assessment of Central Visual Function in Patients with Retinitis Pigmentosa. *Scientific Reports*. 2018;8(1).

ANEXOS

ANEXO I: APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA.



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

Valladolid a 15 de febrero de 2018

En la reunión del CEIC/CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE del 15 de febrero de 2018, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación.

| | | |
|---------------------------|---|---|
| PI-GR-18-938 PI 17-732 | VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS CRÓNICO EN SALIVA, LÁGRIMA Y PELO, EN PACIENTES CON Distrofias de la retina, FUNDAMENTALMENTE RETINITIS PIGMENTOSA. | I.P.: SALVADOR PASTOR IDOATE EQUIPO: JOSE CARLOS PASTOR, M ^a ISABEL LÓPEZ, ANDRES EDUARDO VALISENA, ANTONIO DUEÑAS, ROSA COCO, EVA M ^a SOBAS, AMANDA VAZQUEZ, ITZIAR PINILLA, ANDRES GALVEZ, |
|---------------------------|---|---|

A continuación les señalo los acuerdos tomados por el CEIC/CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE en relación a dicho Proyecto de Investigación:

Considerando que el Proyecto (y la Hoja de Información al Paciente/consentimiento Informado) 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/CEIm 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

ALVAREZ
GONZALEZ
FRANCISCO
JAVIER -
09721299G

Firmado digitalmente por
ALVAREZ GONZALEZ
FRANCISCO JAVIER - 09721299G
Número de reconocimiento
(EIR) c=ES,
serialNumber=+DC15-09721299
C, givenName=FRANCISCO
JAVIER, o=ALVAREZ GONZALEZ,
cn=ALVAREZ GONZALEZ
FRANCISCO JAVIER - 09721299G
Fecha: 2018.02.15 14:17:22
+0100



ANEXO II: COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD



Universidad de Valladolid

IOBA

Clausula de Confidencialidad



Instituto Universitario de
Oftalmología Aplicada

D. / Dña. Isabel Tortián Buey

en adelante el firmante, se compromete, tanto durante la estancia en el IOBA de la Universidad de Valladolid, como una vez extinguida la relación con el IOBA, al más estricto deber de confidencialidad y secreto respecto de toda la información que reciba como consecuencia de su visita y estancia en el Instituto y toda la información generada en los estudios realizados por el mismo. Igualmente, se compromete, tanto en el desarrollo habitual de su trabajo, como fuera del mismo, a actuar con la debida cautela y lealtad para no dañar los intereses de la Universidad de Valladolid - IOBA.

A tales efectos, se considerará conducta desleal no sólo la divulgación de la información que el firmante hubiera adquirido como consecuencia de esta estancia, y la utilización de la misma en beneficio propio o de tercero, sino toda negociación con miras a una futura divulgación de la citada información.

El firmante no podrá disponer de los documentos, bienes, proyectos, experimentos, pruebas o materiales del IOBA de la Universidad de Valladolid a que tenga acceso, con otro objeto que el desarrollo del proyecto a su cargo, salvo en caso de previa autorización expresa por escrito del Consejo del IOBA. Asimismo, declara su intención de seguir las instrucciones que en el futuro pueda dictar el Instituto en relación con el tratamiento de la información privilegiada de la que pueda disponer.

Todos los documentos, bienes, proyectos, experimentos, pruebas o materiales que se encuentren en posesión del firmante como consecuencia del desarrollo del proyecto, deberán ser devueltos al IOBA, tan pronto como se produzca la finalización de la estancia, o de forma inmediata en cuanto le sean requeridos.

El firmante incumpliera las obligaciones de esta cláusula, el IOBA podrá reclamarle los daños y perjuicios que se le hubieran producido, además de las cantidades que hubiera percibido como compensación económica, desde el momento en que se origine el incumplimiento, no obstante y por este contrato, las partes fijan una indemnización en el caso de divulgación de cualquier información o incumplimiento de la presente cláusula por un importe equivalente a un mes de su salario, cantidad que deberá ser entregada por el firmante en el caso de que la Universidad de Valladolid le requiera por incumplir la presente cláusula, todo ello sin perjuicio de las posibles responsabilidades penales en que se pueda incurrir.

El firmante se compromete a guardar la máxima reserva y secreto sobre los datos de carácter personal de los sujetos en investigaciones clínicas los que acceda con motivo del desempeño de sus tareas, especialmente cuando éstos hagan referencia a datos de salud.

El firmante se compromete a no divulgar dichos datos, así como a no publicarlos ni ponerlos a disposición de terceros, bien directamente, bien a través de terceras personas o empresas.

De igual modo, el firmante se compromete, tras la extinción del presente contrato, a no conservar copia alguna de documentación en la que puedan constar datos de carácter personal de los sujetos en una investigación clínica.

El firmante reconoce que la legislación sobre protección de datos personales establece una serie de obligaciones respecto al acceso a datos de carácter personal. A tal efecto,

El firmante se compromete al acceder a los datos de carácter personal de los sujetos, a cumplir la normativa de protección de datos y a lo especificado en el protocolo de actuación en ensayos clínicos y otras investigaciones clínicas.

Las obligaciones de confidencialidad establecidas en el presente contrato tendrán una duración indefinida, manteniéndose en vigor con posterioridad a la finalización de la relación entre el Centro y el firmante.

Las partes se someten expresamente para cualquier controversia o litigio que se pueda derivar del incumplimiento de las presentes cláusulas a los Juzgados de Valladolid.

En Valladolid, a 16 de Octubre 2018

Fdo.: Isabel Tortián Buey

D. / Dña. _____



IOBA - Camino Miguel Puyol - Pórtico de Balón 17 - 47011 - Valladolid

ANEXO III: INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE LA FACULTAD DE ENFERMERÍA



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
Facultad de Enfermería

Reunida la COMISIÓN DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN de la Facultad de Enfermería de Valladolid el día 28 de febrero de 2019 y vista la solicitud presentada por:

Doña ISABEL TARTILAN BUEY, estudiante de Grado de la Facultad de Enfermería.

Acuerda emitir **INFORME FAVORABLE**, en relación con su propuesta de Trabajo de Fin Grado.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente escrito.

Valladolid a 28 febrero de 2018.- La Presidenta de la Comisión, M^a José Cao Torija



Facultad de Enfermería. Edificio de Ciencias de la Salud. Avda. Ramón y Cajal, 7. 47005 Valladolid.
Tfno.: 983 423025. Fax: 983 423284. e-mail: decanato.enf.va@uva.es

| | | | | |
|--------------------------------|---|---------|---------------------|--|
| Código Seguro De Verificación: | DHM8MiQedfnQUanQaWuE1A== | Estado | Fecha y hora | |
| Firmado Por | Maria Jose Cao Torija - Decano/a de la Facultad de Enfermeria de Valladolid | Firmado | 11/06/2019 11:46:58 | |
| Observaciones | | Página | 38/40 | |
| Url De Verificación | https://sede.uva.es/Validacion_Documentos?code=DHM8MiQedfnQUanQaWuE1A== | | | |

ANEXO IV: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: Evaluación de repetitividad de biomarcadores de estrés en pacientes con Distrofias Hereditarias de Retina, principalmente Retinosis Pigmentaria

CÓDIGO DEL PROMOTOR: PI 17-732

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

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Salvador Pastor Idoate

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, de acuerdo a la legislación vigente.

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 de biomarcadores de estrés crónico e inflamación, a través de muestras de saliva, lágrima y cabello.

Para ello, se formarán dos grupos, uno de pacientes de Retinosis Pigmentaria y, en general Distrofias Hereditarias de Retina (DHR), y otro de individuos sanos, en rangos de edad comparables en ambos casos. A cada sujeto se le tomará dos muestras de saliva y lágrima en un intervalo mínimo de un día entre toma y toma, y siempre a primera hora de la mañana. Se tomarán además muestras de cabello en la primera sesión. La obtención de estas muestras no supondrá ningún riesgo para el sujeto. Consiste en recoger la saliva durante cinco minutos en unos tubos específicos mediante la técnica pasiva denominada de babeo. En cada toma de saliva y de acuerdo con esta técnica, el paciente debe depositar en el tubo de forma intermitente toda la saliva que fuese acumulando durante un período de 5 minutos. Al menos una hora antes de la toma, el voluntario no debe comer, beber (excepto agua), fumar o realizar ejercicio físico intenso, ya que esto podría afectar al resultado de los análisis.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Se ha demostrado que el estado anímico es un factor que afecta a la evolución de patologías orgánicas, una categoría que se aplica también a la Retinosis Pigmentaria y a otras distrofias de retina. Desde hace unos años, diversos estudios han intentado determinar la influencia del estrés en enfermos de Retinosis Pigmentaria y han tratado de establecer qué tipo de medidas de estrés pueden ser más apropiadas para este fin. Hay varios métodos que dependen de la propia percepción del sujeto para evaluar su grado de estrés, lo que puede introducir sesgos o inexactitudes. Se han propuesto biomarcadores objetivos de estrés en saliva, cuya medida es sencilla y no invasiva. Las medidas en cabello son complementarias a las de saliva ya que permiten evaluar la acumulación de biomarcadores de estrés, como el cortisol, durante periodos extensos de tiempo, para así poder estudiar el estrés crónico, que puede ser perjudicial para la salud.

Algunos de los biomarcadores de estrés más usados son el cortisol, la Inmunoglobulina A secretora y el factor soluble del Receptor II del TNF α . También se usa la melatonina para analizar el ciclo diurno, denominado ciclo circadiano, que afecta a estas sustancias en la saliva. La melatonina también permite estudiar el ciclo de sueño y la vigilia del paciente y otros ciclos que controlan el funcionamiento de la retina a nivel celular.

Ninguno de estos biomarcadores está completamente libre de limitaciones. Para poder usarlos e interpretar las medidas de forma fiable, existe la necesidad de caracterizarlos en pacientes con distrofias de retina. Al hacerlo se estará más cerca de desarrollar medidas objetivas para investigar la posible

influencia del estrés en las variaciones de la capacidad visual de dichos pacientes.

En resumen, con este estudio se pretende comprobar las diferencias entre individuos y la repetitividad de las medidas en sesiones distintas de los marcadores citados anteriormente. Esto permitiría probar la validez de estos biomarcadores en la evaluación del estrés en los enfermos de distrofias hereditarias de retina.

En cumplimiento del 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, le informamos de que está previsto que al finalizar el estudio se conserven las muestras biológicas en la colección de muestras del IOBA, adscrita al Instituto de Salud Carlos III (isciii.es).

Al conservarse las muestras de saliva en la colección de muestras del IOBA, dada de alta en el Instituto de Salud Carlos III, permitirá continuar la investigación y aplicar nuevas técnicas de medida, más allá del tiempo limitado que dure el presente estudio. Cada nuevo estudio que se realice con esas muestras será remitido para su evaluación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Valladolid-Este (CEIC-VA-ESTE-HCUV).

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:

ANEXO V: CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.

Estudio BIOMARCADORES DE ESTRÉS CRONICO EN SALIVA, LAGRIMA Y PELO, EN PACIENTES CON DISTROFIAS DE LA RETINA, FUNDAMENTALMENTE RETINITIS PIGMENTOSA

Yo,

(nombre y apellidos del paciente ó representante legal)

He leído la información que me ha sido entregada.

He recibido la hoja de información que me ha sido entregada.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado del estudio con

(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1.- Cuando quiera.
- 2.- Sin tener que dar explicaciones.
- 3.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para:

- El fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales según lo recogido en la hoja de información al paciente que me ha sido entregada.

- Accedo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten conmigo en el futuro en caso de que se necesite obtener nuevos datos. ...SINO (marcar con una X lo que proceda)

- Accedo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten conmigo en caso de que los estudios realizados sobre mis muestras / datos aporten información relevante para mi salud o la de mis familiares ...SI NO (marcar con una X lo que proceda)

Una vez firmada, me será entregada una copia del documento de consentimiento.

FIRMA DEL PACIENTE / REPRESENTANTE LEGAL NOMBRE Y
APELLIDOS FECHA
EN CALIDAD DE (Parentesco, tutor legal, etc.)

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este estudio al paciente nombrado anteriormente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en nombre del paciente.

FIRMA DEL INVESTIGADOR NOMBRE Y APELLIDOS
FECHA

**APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO
(CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)**

Yo _____ revoco el
consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado con fecha

Firma:

ANEXO VI: 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 uno 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. (no pone tiempo).
- 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 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 VII: Ansiedad: State-Trait Anxiety Inventory (STAI)

Ansiedad-Estado

A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo. Lea cada frase y señale la opción que indique mejor cómo **se siente usted ahora mismo**, en este momento. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa su situación presente.

Me siento calmado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento seguro: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento tenso: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Estoy contrariado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento a gusto: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento alterado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Estoy preocupado ahora por posibles desgracias futuras: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento descansado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento angustiado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento confortable: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Tengo confianza en mí mismo: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento nervioso: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Estoy desaseado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento muy atado (como oprimido): []nada, []algo, []bastante, []mucho

Estoy relajado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento satisfecho: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Estoy preocupado: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento aturdido: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Me siento alegre: []nada, []algo, []bastante, []mucho

En este momento me siento bien: []nada, []algo, []bastante, []mucho

Ansiedad-Rasgo

A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo. Lea cada frase y señale la opción que indique mejor cómo **se siente usted en general**, en la mayoría de las ocasiones. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y

conteste señalando la respuesta que mejor describa cómo se siente usted generalmente.

Me siento bien: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me canso rápidamente: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Siento ganas de llorar: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me gustaría ser tan feliz como otros: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Pierdo oportunidades por no decidirme rápido: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me siento descansado: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Soy una persona tranquila: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Veo que las dificultades se amontonan: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me preocupo demasiado por cosas sin importancia: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Soy feliz: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Suelo hacer las cosas demasiado seriamente: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me falta confianza en mí mismo: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me siento seguro: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

No suelo afrontar las crisis o las dificultades: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me siento triste: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Estoy satisfecho: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me rondan y molestan pensamientos sin importancia: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Me afectan tanto los desengaños que no puedo olvidarlos: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Soy una persona estable: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre

Cuando pienso en asuntos y preocupaciones actuales me pongo tenso y agitado: []Casi nunca, []A veces, []A menudo, []Casi siempre