



Universidad de Valladolid



Escuela de Doctorado Universidad de Valladolid



Instituto Universitario de  
Oftalmobiología Aplicada

## PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

TESIS DOCTORAL:

# BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN EL SÍNDROME DE OJO SECO ASOCIADO A ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)

Presentada por Lidia Cocho Archiles para optar al grado  
de doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Prof. Margarita Calonge Cano

Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro

2017





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/A DE TESIS

(Art. 7.2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D<sup>a</sup> **Margarita Calonge Cano**, con D.N.I. nº **09255952Q**, Catedrática del departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, Facultad de Medicina, calonge@ioba.med.uva.es, con dirección a efecto de notificaciones en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada, Paseo de Belén 17, 47011 Valladolid,

D<sup>a</sup> **Amalia Enríquez de Salamanca Aladro**, con D.N.I. nº **05408578J**, Investigadora Principal del Instituto de Oftalmobiología Aplicada, amalia@ioba.med.uva.es, con dirección a efecto de notificaciones en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada, Paseo de Belén 17, 47011 Valladolid,

como Directoras de la Tesis Doctoral titulada:

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN EL SÍNDROME DE OJO SECO ASOCIADO A ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)**

Realizada por D. **Lidia Cocho Archiles**, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión autorizan su presentación, considerando que es **APTA** para su defensa.

Valladolid, 19 de abril de 2017

Las Directoras de la Tesis,

Fdo.: Dra. Margarita Calonge Cano

Fdo.: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro

**SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO**



## ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO CON EL APOYO ECONÓMICO DE LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES

- Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, España. Expediente: SAF-2010 15631. **“Biomarcadores moleculares y dianas terapéuticas en inflamación de la superficie ocular”**. Investigadora principal: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro. 01/01/2011-31/12/2013.
- Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, España. Expediente: GRS 946/A/14: **“Biomarcadores moleculares en el síndrome de ojo seco secundario a la enfermedad de injerto contra huésped”**. Investigador principal: José M. Herreras Cantalapiedra. 01/01/2013-31/12/2013.
- Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, España. Expediente: GRS 946/A/14: **“Validación externa de un modelo de predicción de síndrome de ojo seco secundario a enfermedad injerto contra huésped”**. Investigador principal: José M. Herreras Cantalapiedra. 01/01/2014-31/12/2014.
- Centro de Investigación Biomédica en Red en Biomateriales, Bioingeniería y Nanomedicina (CIBER-BBN), Instituto de Salud Carlos III. Investigadora principal: Margarita Calonge Cano.

**ESTE TRABAJO HA DADO LUGAR A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES Y  
COMUNICACIONES EN CONGRESOS**

**PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS INDEXADAS**

- Cocho L, Fernández I, Calonge M, Martínez V, González-García MJ, Caballero D, López-Corral L, García-Vázquez C, Vázquez L, Stern ME, Enríquez-de-Salamanca A. Gene Expression-Based Predictive Models of Graft Versus Host Disease-Associated Dry Eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56:4570-81. doi: 10.1167/iovs.15-16736. Posición 6/56, Q1 en Categoría Ophthalmology JCR, Índice Impacto JCR 2015: 3,427.
- Cocho L, Fernández I, Calonge M, Martínez V, González-García MJ, Caballero D, López-Corral L, García-Vázquez C, Vázquez L, Stern ME, Enríquez-de-Salamanca A. Biomarkers in Ocular Chronic Graft versus Host Disease: Tear Cytokine- and Chemokine-Based Predictive Model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57:746-58. doi: 10.1167/iovs.15-18615. Posición 6/56, Q1 en Categoría Ophthalmology JCR, Índice Impacto JCR 2015: 3,427.

**COMUNICACIONES EN CONGRESOS**

- Calonge M, Martínez V, Cocho L, González-García MJ, Enríquez de Salamanca A. Clinical Studies and Biomarker Search on Graft Versus Host Disease (GvHD). 111 Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft Kongress (Sociedad Alemana de Oftalmología). Berlín, Alemania. 2013.
- Enríquez-de-Salamanca A, Cocho L, Martínez V, González-García MJ, Fernández I, García-Vázquez C, Stern ME, Calonge M. Graft vs Host Disease (GvHD)-Associated Dry Eye: Searching for Molecular Biomarkers. 17th International Ocular Surface Society (IOSS) Annual Meeting. Orlando, EEUU. 2014.
- Calonge M, González-García MJ, Martínez V, Cocho L, Herreras JM, Enríquez-de-Salamanca A. Potential Biomarkers of Disease Activity in Ocular Surface Inflammation. The International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics (ISOPT). París, Francia. 2013.

- García Vázquez C, Cocho L, Martínez V, González-García MJ, Calonge M, Enríquez de Salamanca A. Biomarcadores Diagnósticos en Pacientes con Síndrome de Ojo Seco (SOS) asociado a Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH). 27º Congreso Nacional de Inmunodiagnóstico AETEL. Córdoba. 2014.

#### **ABSTRACTS DE COMUNICACIONES EN CONGRESOS PUBLICADOS**

- Lidia Cocho; Verónica Martínez; María-Jesús González-García; Itziar Fernández; Carmen García-Vázquez; Michael E Stern; Margarita Calonge; Amalia Enriquez-De-Salamanca. Molecular Biomarkers in Ocular Graft vs Host Disease (GVHD)-Associated Dry Eye (DE). 85Th Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Orlando, EEUU. 2014.
  - Publicación: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(13):2020.
- Lidia Cocho; Itziar Fernández; Margarita Calonge; Dolores Caballero; Lucia López-Corral; Verónica Martínez; María-Jesús González-García; Carmen García-Vázquez; Michael E Stern; Amalia Enriquez-De-Salamanca. Gene expression-based predictive models of Graft versus Host Disease-associated Dry Eye. 86Th Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Denver, EEUU. 2015.
  - Publicación: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(7):354.
- Amalia Enriquez-De-Salamanca; Lidia Cocho; Itziar Fernández; Dolores Caballero; Lucia López-Corral; Verónica Martínez; María-Jesús González-García; Carmen García-Vázquez; Michael E Stern; Margarita Calonge. The utility of tear cytokine profiles in the diagnosis of Graft vs Host Disease- Associated Dry Eye. 86Th Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Denver, EEUU. 2015.
  - Publicación: *Invest Ophthalmol. Vis Sci* 2015; 56(7):4452.
- Lidia Cocho; Itziar Fernández; Margarita Calonge; Dolores Caballero; Lucia López-Corral; Verónica Martínez; María-Jesús González-García; Carmen García-Vázquez; Michael E Stern; Amalia Enriquez-De-Salamanca. Tear molecular biomarkers can predict the development of ocular chronic graft versus host disease before hematopoietic stem cell transplantation. 88Th Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Baltimore, EEUU. 2017. Aceptado.





## Breve Curriculum Vitae

### DATOS PERSONALES

**Nombre y apellidos:** Lidia Cocho Archiles

**Lugar y fecha de nacimiento:** Valladolid, 21 de septiembre de 1984.

**Idiomas:** **INGLÉS:** nivel alto hablado y escrito. *First Certificate in English*. Nivel B2 del Marco de Referencia Europeo. **ALEMÁN:** nivel medio hablado y escrito.

### FORMACIÓN ACADÉMICA

- Licenciada en Medicina por la Universidad de Valladolid. 2002-2008.
- Beca de Colaboración en Tareas de Investigación en Departamentos e Institutos L.O.U. de la Universidad de Valladolid. Área de Microbiología. 2005.
- Beca de Colaboración en Tareas de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia, en el Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia. Universidad de Valladolid 2007.
- Premio de Licenciatura de la Fundación de San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina al expediente académico en 2008.
- Especialista en Oftalmología, por el sistema MIR, en el Departamento de Oftalmología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid. 2013.
- Máster Oficial en Investigación en Ciencias de la Visión. IOBA, Universidad de Valladolid. Curso 2009-2010.
- Máster Oficial en Subespecialidades Oftalmológicas: Inmunología y Superficie Ocular. IOBA, Universidad de Valladolid. Curso 2013-2014.
- Research Fellow en Massachusetts Eye Research and Surgery Institution (MERSI). Mentor. Dr. C. Stephen Foster. Ocular Immunology. Cambridge, MA, EE.UU. (9 meses, entre 2012-2015)
- Beca de Investigación en Universidades o Centros en el Extranjero. Fundación Alfonso Martín Escudero para estancia en MERSI, Cambridge, EEUU. 2015.
- Colaborador Honorífico del IOBA, Universidad de Valladolid. Curso 2016-2017.

## COMUNICACIONES EN CONGRESOS

- Enriquez-De-Salamanca A, García-Vázquez C, Benito MJ, Maldonado MJ, Cocho L, Dotor J, Stern ME, Calonge M. In vitro P144 and P17 Anti-TGF- $\beta$  Peptides Effect in TGF $\beta$ -Stimulated Corneal Epithelial Cells. Invest Ophthalmol. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, EEUU. 2009.
- Enriquez-De-Salamanca A, Trías E, Martínez V, Cocho L, García-Vázquez C, González-García MJ, Calonge M. Tear Molecule Levels and Conjunctival Inflammatory Gene Expression in Atopic Keratoconjunctivitis (AKC). Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Seattle, EEUU. 2013.
- Cocho L, Martínez V, González-García MJ, Fernández I, García-Vázquez C, Stern ME, Calonge M, Enriquez-De-Salamanca A. Molecular Biomarkers in Ocular Graft vs Host Disease (GVHD)-Associated Dry Eye (DE). Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Orlando, EEUU. 2014.
- Cocho L, Fernández I, Calonge M, Caballero D, López-Corral L, Martínez V, González-García MJ, García-Vázquez C, Stern ME, Enriquez-De-Salamanca A. Gene expression-based predictive models of Graft versus Host Disease-associated Dry Eye. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Denver, EEUU. 2015.
- Enriquez-De-Salamanca A, Cocho L, Fernández I, Caballero D, López-Corral L, Martínez V, González-García MJ, García-Vázquez C, Stern ME, Calonge M. The utility of tear cytokine profiles in the diagnosis of Graft vs Host Disease- Associated Dry Eye. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Denver, EEUU. 2015.
- Allende M, Ibares-Frias L, Labrador SC, Wong C, Cocho L, Herreras JM. Efficacy and safety of infliximab and adalimumab in treating ocular autoimmune diseases. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Denver, EEUU. 2015.
- Cocho L, Herreras JM. Vasculitis retiniana y uveítis de las enfermedades sistémicas: sarcoidosis y Behçet. Curso avanzado de patología ocular inflamatoria, Santander. 2015.
- Cocho L, Herreras JM. Glaucoma y uveítis. XXXV Curso de Glaucoma, Valladolid. 2015.

- Cocho L. Uveítis posteriores en la infancia: retinitis y neurorretinitis. Congreso de la Sociedad Española de Estrabología y Oftalmología Pediátrica, Córdoba. 2016.
- Co-Director del curso Terapia regenerativa de la superficie ocular y queratoplastias. ¿Dónde estamos?, Valladolid. 2017.
- Cocho L, Herreras JM. Colirios de derivados biológicos. Curso Terapia regenerativa de la superficie ocular y queratoplastias. ¿Dónde estamos?, Valladolid, 2017.
- Co-Director del curso Terapias biológicas inmunomoduladoras en enfermedad inflamatoria ocular, Valladolid. 2017.

#### **PUBLICACIONES EN REVISTAS INDEXADAS**

- Cocho L, Fernández I, Calonge M, Martínez V, González-García MJ, Caballero D, López-Corral L, García-Vázquez C, Vázquez L, Stern ME, Enríquez-de-Salamanca A. Gene Expression-Based Predictive Models of Graft Versus Host Disease-Associated Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:4570-81.
- Cocho L, Gonzalez-Gonzalez LA, Molina-Prat N, Doctor P, Sainz-de-la-Maza M, Foster CS. Scleritis in patients with granulomatosis with polyangiitis (Wegener). *Br J Ophthalmol.* 2016;100(8):1062-5.
- Cao JH, Oray M, Cocho L, Stephen Foster CS. Rituximab in the Treatment of Refractory Non-Infectious Scleritis. *Am J Ophthalmol.* 2016;164:22-8.
- Cocho L, Fernández I, Calonge M, Martínez V, González-García MJ, Caballero D, López-Corral L, García-Vázquez C, Vázquez L, Stern ME, Enríquez-de-Salamanca A. Biomarkers in Ocular Chronic Graft versus Host Disease: Tear Cytokine- and Chemokine-Based Predictive Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:746-58.



## AGRADECIMIENTOS

A las primeras a las que quiero mostrar mi agradecimiento es a mis directoras, Amalia Enríquez de Salamanca y Margarita Calonge. Sin ellas es seguro que presentar esta tesis no habría sido posible. Todo es gracias a su ayuda, sus consejos y su paciencia. He tenido la fortuna de estar unida a ellas desde hace muchos años, cuando aún era estudiante de Medicina y empezaba mi andadura en la investigación bajo su dirección y tutela. Desde entonces, he aprendido un poco, pero siempre estaré profundamente agradecida a ellas por estar siempre ahí, apoyándome y enseñándome, y tirando siempre hacia delante.

A Itziar Fernández le debo tanto que no sé ni por dónde empezar. Ha sido su gran creatividad y conocimientos lo que ha dado lugar a buena parte de esta tesis, y no puedo agradecer lo suficiente su ayuda y su paciencia a la hora de resolver mis dudas estadísticas.

A Carmen García, porque sin su trabajo bien hecho en el laboratorio, su compañía y su amistad nada de esto sería posible. Ha sido un verdadero placer contar con alguien tan amable y sonriente para llevar a cabo esta tesis.

A Chema Herreras, porque trabajar todos estos años a su lado ha sido un verdadero lujo, por enseñarme tanto, compartir sus éxitos conmigo y por supuesto, tirar en los momentos difíciles.

A Maite Sáinz de la Maza, Montserrat Rovira, Dolores Caballero, Lucía López y Lourdes Vázquez. Su colaboración ha sido valiosísima, y siempre han hecho lo posible para allanar el camino y resolver los problemas que iban surgiendo ¡Gracias!

Al Profesor Pastor, gracias por la gran confianza que ha depositado en mí y que espero no defraudar.

A Alberto López-Miguel, siempre pendiente para ayudarme con la cámara ambiental.  
Hace ya unos pocos años, ¡pero no se olvida!

Y a toda la familia del IOBA, M<sup>a</sup> Paz García, Ana Rodríguez, M<sup>a</sup> Jesús González y todos los amigos del “control”. Ellos le hacen sentir a uno sentir como en casa desde el primer día.

No me olvido de mis compañeros, adjuntos y residentes del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, con los que siempre se puede contar y con los que es un placer compartir a diario el trabajo para que sea más llevadero. A su amistad y buenos momentos debo haber podido superar esta etapa. En especial a Yrbani Lantigua por su ayuda a la hora de coger las muestras. Con mucho cariño también a Erma Trías y Verónica Martínez, las “fellows” con las que inicié este proyecto.

A todos los pacientes con Enfermedad Injerto contra Huésped, que gracias a esta tesis he podido conocer, personas increíblemente luchadoras, amables y agradecidas. Algunos han fallecido y otros siguen en la pelea, pero a todos los recuerdo con cariño y les estoy profundamente agradecida por haberse puesto a nuestra disposición, confiando, dejándose hacer y siempre con buena cara. Este trabajo está hecho con vosotros siempre en mente, que podáis llevar una vida más fácil es el fin de todo esto.

Por supuesto, a todas aquellas personas que participaron como voluntarios sanos, porque me dieron un poquito de su tiempo sin pedir nada a cambio, y con los que pasé unos ratos estupendos en la cámara ambiental mientras se dejaban coger todo tipo de muestras.

Y, por último, a mi familia y amigas. Ellos han participado en la tesis, aunque no lo sepan.

¡Gracias por vuestra paciencia!

**A todos,**

**¡¡Gracias!!**

# ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS.....</b>	<b>17</b>
<b>2. RESUMEN DEL PROYECTO.....</b>	<b>21</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>4. INTRODUCCION: ESTADO ACTUAL DEL TEMA</b>	
4. A. TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (TAPH).....	31
4. B. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH).....	33
4. C. SÍNDROME DE OJO SECO Y OTRAS COMPLICACIONES OCULARES DE EICH.....	35
4. D. BIOMARCADORES MOLECULARES EN SÍNDROME DE OJO SECO Y EICH OCULAR.....	38
4. E. MODELOS DE PREDICCIÓN.....	41
4. F. FACTORES DE RIESGO Y PREDICCIÓN DEL DESARROLLO DE EICH OCULAR. MODELOS MULTIESTADO.....	43
<b>5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b>	
6. A. DISEÑO.....	54
6. B. ASPECTOS ÉTICOS.....	54
6. C. PACIENTES Y CONTROLES.....	55
6. D. TESTS CLÍNICOS.....	57
6. E. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	60
6. F. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	62
6. G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
<b>7. RESULTADOS</b>	
7. A. EXPRESIÓN GÉNICA EN EPITELIO CONJUNTIVAL.....	77
7. B. NIVELES DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÁGRIMA.....	83
7. C. BIOMARCADORES EN PACIENTES ANTES DEL TAPH.....	94
<b>8. DISCUSIÓN</b>	
8. A. EXPRESIÓN GÉNICA EN EPITELIO CONJUNTIVAL.....	107
8. B. NIVELES DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÁGRIMA.....	114
8. C. BIOMARCADORES EN PACIENTES ANTES DEL TAPH.....	122
8. D. LIMITACIONES.....	130
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>151</b>





# **1. ABREVIATURAS**



**ADNc:** ADN complementario

**ARNm:** ARN mensajero

**AUC:** *Area under the curve* (Área bajo la curva)

**APC:** *Antigen-presenting cell* (Células presentadoras de antígeno)

**CIC:** Citología por impresión conjuntival

**CL:** *Calibration in the large*

**CS:** *Calibration slope*

**DEM:** Desviación estándar de la media

**EICH:** Enfermedad injerto contra huésped

**EGF:** *Epidermal growth factor* (Factor de crecimiento epidérmico)

**HGF:** *Hepatocyte growth factor* (Factor de crecimiento de hepatocitos)

**GVL:** *Graft versus leukemia* (Injerto frente a leucemia)

**HLA:** *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitario humano)

**IFN:** *Interferon* (Interferón)

**IL:** *Interleukin* (Interleuquina)

**IQR:** *Interquartile range* (Rango intercuartílico)

**kNN:** *k-Nearest neighbour Classification*

**LOOCV:** *Leave one out cross validation* (Validación cruzada dejando uno fuera)

**LFU:** *Lacrimal functional unit* (Unidad funcional lagrimal)

**mRMR:** *Minimum redundancy maximum relevance* (Mínima redundancia máxima relevancia)

**MSM:** *Multistate model* (Modelo multiestado)

**NAMPT:** *Nicotinamide phosphoribosyltransferase* (Nicotinamida fosforibosiltransferasa)

**NIH:** *National institutes of health* (Instituto Nacional de Salud)

**NK:** *Natural killer* (asesinas naturales)

**OSDI:** *Ocular surface disease index*

**OR:** *Odds Ratio*

**PCA:** *Principal components analysis* (Análisis de componentes principales)

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

**ROC:** *Receiver operating characteristic*

**SOS:** Síndrome de ojo seco

**SS:** Síndrome de Sjögren

**SVA:** *Surrogate variable analysis*

**SVM:** *Support vector machines*

**T-BUT:** *Tear break-up time* (Tiempo de ruptura lagrimal)

**TAPH:** Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

**TNF:** *Tumor necrosis factor* (Factor de Necrosis Tumoral)

**TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos

**VEGF:** *Vascular endothelial growth factor* (Factor de crecimiento vascular endotelial)

**VIF:** *Variance inflation factor* (Coeficiente de inflación de la varianza)

## 2. RESUMEN DEL PROYECTO



**OBJETIVOS:** En esta tesis doctoral se trató de determinar la existencia de biomarcadores en células del epitelio conjuntival y lágrima de pacientes con síndrome de ojo seco (SOS) debido a enfermedad de injerto contra huésped (EICH) ocular que iban a ser sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH), así como de encontrar correlaciones significativas entre estos biomarcadores y signos clínicos de la enfermedad. Con ello se pretendía desarrollar modelos predictivos basados en estos parámetros con capacidad diagnóstica y predictiva de la enfermedad.

**METODOLOGÍA:** Se realizaron para ello tres trabajos, dos con carácter retrospectivo y uno prospectivo. En los dos primeros se reclutaron pacientes con EICH ocular y controles sanos, se les evaluó clínicamente y se recogieron muestras de células de epitelio conjuntival y de lágrima. En el tercero, se reclutó una cohorte de pacientes que iba a ser sometido a TAPH y se les siguió longitudinalmente. Se estudió la expresión diferencial de 84 genes de moléculas inflamatorias mediante qRT2-PCR (trabajo 1) y niveles en lágrima de 15 y 19 moléculas (trabajos 2 y 3), respectivamente) con un ensayo multianálisis con tecnología Luminex. Se establecieron correlaciones entre estos biomarcadores y los parámetros clínicos y se desarrollaron modelos diagnósticos basados en la expresión de los genes en epitelio conjuntival y los niveles de citoquinas en lagrima; también se puso a punto un modelo multiestado en el estudio prospectivo, basado en cuatro estados y la transición entre ellos por medio de los varios métodos, entre ellos la regresión logística y el análisis supervisado de componentes principales. Todos los modelos fueron validados considerando su precisión, calibración y capacidad de discriminación.

**RESULTADOS:** De los 84 genes analizados en el epitelio conjuntival de pacientes con EICH, 34 mostraron diferencias significativas en la expresión. El modelo diagnóstico basado en los niveles de los genes EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT obtuvo buenos resultados en su validación. Los niveles de EGF e IP-10 en lágrima se vieron disminuidos en pacientes con EICH ocular, mientras que IL-1Ra, IL-8 e IL-10 aumentaron. El modelo diagnóstico basado en niveles de IL-8 e IP-10 en lágrima junto con edad y género, obtuvo la mejor capacidad discriminatoria y demostró tener una buena sensibilidad y especificidad a la hora de clasificar a pacientes con SOS por EICH ocular frente a pacientes con SOS sin EICH. El modelo multiestado basado en una variable construida sobre la combinación de los niveles de las moléculas fractalquina, IL-1Ra e IL-6 en lagrima en sujetos que iban a ser sometidos a TAPH, obtuvo una buena capacidad para predecir el desarrollo de EICH ocular.

**CONCLUSIONES:** En este trabajo se logró la identificación de biomarcadores con capacidad diagnóstica y predictiva para el SOS asociado a EICH ocular. Además, este trabajo arroja más información acerca de sus mecanismos etiopatogénicos, identificando biomarcadores que pueden representar nuevos objetivos terapéuticos.



## 3. JUSTIFICACIÓN



El Síndrome de Ojo Seco (SOS) asociado a enfermedad de injerto contra huésped (EICH) es una de las manifestaciones más frecuentes e incapacitantes de esta enfermedad en su variante crónica. Esta patología puede dar lugar a alteraciones graves de la superficie ocular, afectar mucho a la calidad de vida de estos pacientes y, además, es potencialmente invalidante, ya que puede resultar en una pérdida total de la visión del paciente. Sin embargo, aún hoy en día, no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de esta afectación a nivel ocular. Un obstáculo importante para la investigación y el tratamiento del EICH ocular recae en que el diagnóstico y el pronóstico de esta enfermedad dependen casi totalmente de la presencia de síntomas y pruebas poco fiables, como el test de Schirmer. No se dispone actualmente de pruebas de laboratorio capaces de predecir el riesgo de desarrollar la enfermedad, la respuesta al tratamiento o la supervivencia de estos pacientes, por lo que encontrar biomarcadores en esta patología es de una importancia enorme. A este respecto, una buena prueba diagnóstica de EICH ocular debería ser capaz de distinguir aquellos pacientes con SOS asociado a EICH de otras patologías de la superficie ocular con similares características. Además, cualquier biomarcador debe reflejar de forma sensible y específica el estado de la enfermedad, siendo no invasivo y, además, económicamente asumible.

Por todo ello, existe un creciente interés en la identificación de biomarcadores a nivel de la superficie ocular y en la creación de modelos predictivos de esta enfermedad que, trasladados a la clínica, deriven en un diagnóstico más precoz y en un tratamiento más eficaz. El avance en la identificación de biomarcadores también es vital para el diseño de ensayos clínicos, varios de los cuales se encuentran ya en curso con el fin de evaluar la eficacia de diferentes terapias antiinflamatorias, y que se ven en la necesidad de incorporar dichos marcadores. En este contexto, el uso de modelos predictivos como los utilizados en

este trabajo, podría ayudar a la comprensión de la importancia, no sólo de la expresión de genes individuales, sino también de la expresión coordinada de grupos de genes implicados en los procesos patogénicos del EICH ocular y, por ende, en nuestra comprensión y abordaje de la enfermedad.

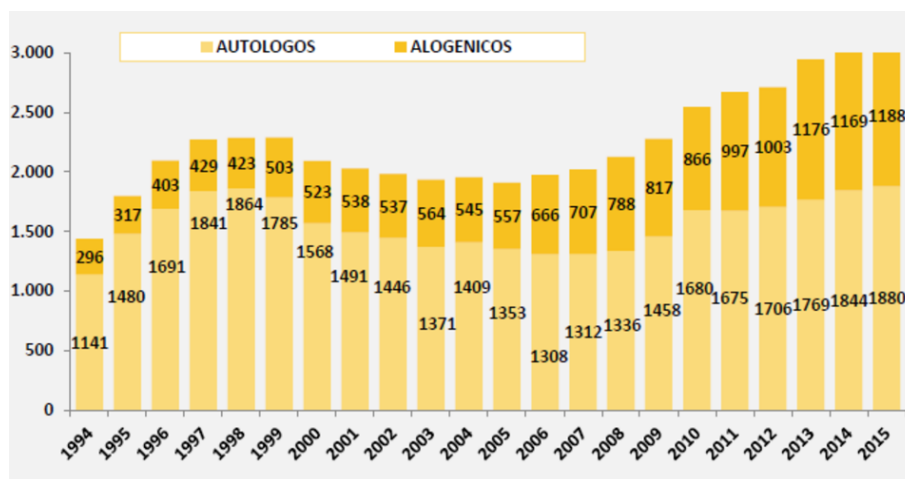
La presente tesis doctoral es, por tanto, pertinente en cuanto que mediante su realización se aborda la búsqueda de biomarcadores para el SOS asociado a EICH ocular, con el fin de mejorar el diagnóstico de la enfermedad en pacientes con unos signos y síntomas determinados de una manera fiable, reproducible, objetiva y sencilla. Asimismo, se aborda la construcción de un modelo capaz de predecir el desarrollo de la enfermedad de manera previa a que el paciente sea sometido al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH), con el fin de tomar decisiones terapéuticas y preventivas, adecuándolas así a las necesidades concretas del paciente.

## **4. INTRODUCCION: ESTADO ACTUAL DEL TEMA**



#### 4. A. TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (TAPH)

El TAPH consiste en la infusión de precursores hematopoyéticos, procedente de otro individuo, a un receptor que ha sido previamente acondicionado para recibir el injerto.<sup>1,2</sup> En 1959, se publicó por primera vez el éxito temporal logrado por un trasplante de este tipo en un paciente con leucemia por Donnall Thomas y, desde entonces, esta técnica ha evolucionado rápidamente, convirtiéndose hoy en día en la piedra angular del tratamiento de enfermedades hematológicas, tanto malignas como no malignas.<sup>3</sup> En el mundo, se realizan actualmente más de 30.000 trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH) al año, mientras que en nuestro país fueron 3.068 los trasplantes realizados durante el año 2015,<sup>4</sup> siendo la cifra más alta alcanzada desde el momento en que se implementó esta medida. De estos 3.068 trasplantes, 1.880 (61%) fueron autólogos (procedentes del mismo individuo) y 1.188 (39%) fueron trasplantes alogénicos (procedente de otro individuo) (TAPH) (Figura 1).



**Figura 1.** Evolución del número de trasplantes de progenitores hematopoyéticos autólogos y alogénicos realizados en España desde 1994 hasta 2015 (Fuente: Memoria ONT 2015).

Existen **3 fuentes** diferentes para la obtención de dichas células que, posteriormente, serán infundidas en el receptor de forma intravenosa.<sup>5,6</sup>

- **Médula ósea:** este tipo de trasplante se realiza con células extraídas directamente de la médula ósea del donante, generalmente aspiradas de la cresta ilíaca.
- **Sangre periférica:** las células hematopoyéticas se obtienen de la sangre del donante por medio de aféresis, donde se estimula su producción y movilización mediante la inyección previa de factor estimulante de colonias de granulocitos o factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
- **Sangre de cordón umbilical:** la sangre del cordón tiene una mayor concentración de progenitores hematopoyéticos que la de una persona adulta. Sin embargo, la pequeña cantidad de sangre procedente de un cordón umbilical (normalmente de 50 ml) hace que usar un solo donante para realizar un trasplante en un adulto o joven sea difícil.

El **efecto del injerto contra la leucemia** (GVL de sus siglas en inglés) es un componente central de la capacidad del aloinjerto para curar la enfermedad hematológica, mediado por células T y NK del donante, que tienen distintos mecanismos de reconocimiento y direccionamiento de las células malignas del receptor. Pero tras el trasplante, la necesidad de prevenir el EICH, limita el potencial curativo de este proceso. Y así para lograr la supervivencia del paciente, es necesario mantener un equilibrio entre ambos efectos.<sup>7</sup>

En la última década, se han introducido innovaciones esenciales con objeto de disminuir la mortalidad asociada al trasplante y ampliar las indicaciones del TAPH. Entre ellas, se encuentra la introducción de regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida, la mejora del arsenal terapéutico para combatir tanto infecciones como reacciones autoinmunes o la diversificación de las fuentes de las células madre.



Sin embargo, los pacientes sometidos a TAPH pueden desarrollar diversas complicaciones, como infecciones, enfermedad vaso-oclusiva y, sobre todo, **EICH, que constituye hoy en día la primera causa de morbilidad y mortalidad en los sujetos trasplantados.**<sup>8</sup>

#### 4. B. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)

El EICH está causado por la **respuesta inmunitaria orquestada por las células inmunocompetentes precedentes del injerto y dirigida frente a los tejidos del donante.**<sup>9</sup>

Según Billingham, para que el paciente desarrolle EICH, el injerto debe incluir células inmunológicamente competentes, el huésped debe tener antígenos que las células donantes reconocerían como extraños llevando a su activación y, finalmente, el huésped debe ser incapaz de montar una respuesta contra células de injerto que les permita atacar los tejidos del huésped.<sup>10</sup>

En función de las manifestaciones clínicas que se observen, el EICH se puede clasificar como agudo o crónico. El **EICH agudo** comprende: a) aquel que ocurre en los 100 primeros días después del trasplante sin signos de formas crónicas (agudo clásico); b) el tipo persistente; c) el tipo recurrente; d) el agudo tardío, que se manifiesta a partir de los 100 días con signos agudos. Por el contrario, el **EICH crónico** comprende a) el tipo crónico clásico, cuando ocurre pasados 1000 días del trasplante y sin características del tipo agudo, y b) el síndrome de solapamiento, cuando aparecen juntos signos de ambos tipos, agudo y crónico.<sup>11</sup>

La forma aguda de EICH aparece en aproximadamente un 40% de los pacientes trasplantados con antígeno leucocitario humano (HLA) compatible, afectando

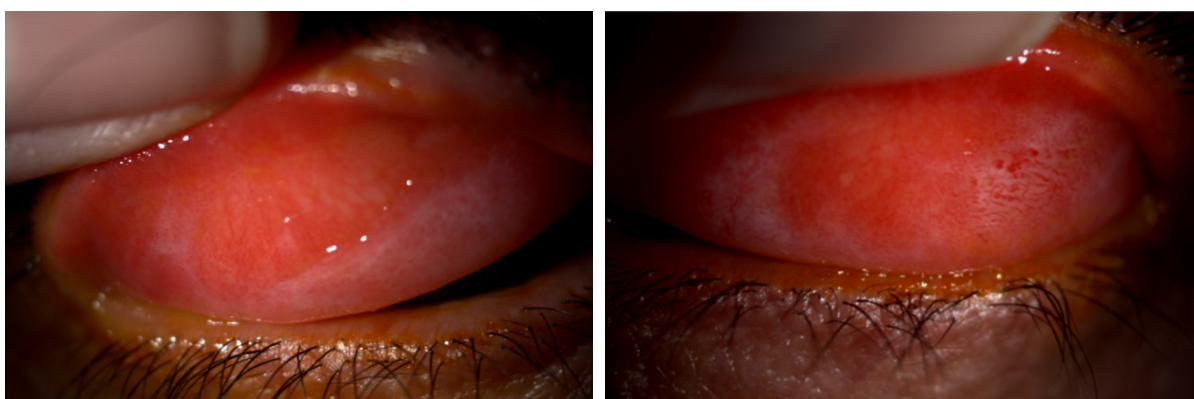
principalmente a la piel, al tracto gastrointestinal y al hígado. Sobre la base de modelos experimentales, se ha descrito su patogénesis en 3 etapas.<sup>12</sup>

- a) El paso inicial es la **activación de las células presentadoras de antígeno (APC)** que conduce a la activación, proliferación, diferenciación y migración de los linfocitos T donantes. La activación de las APC está mediada por el proceso de la enfermedad subyacente y el régimen de acondicionamiento, ya que ambas producen un daño tisular, que conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias.
- b) En el segundo paso, **las células T donantes son activadas por APCs** en los tejidos linfoides, para luego diferenciarse y producirse su expansión.
- c) El tercer paso es la **fase efectora**, proceso complejo mediado por agentes celulares y humorales, en el que los efectores celulares son principalmente las células Th 1 citotóxicas.

Por otro lado, entre un 30 y un 70% de los pacientes llegan a desarrollar formas crónicas de EICH.<sup>8</sup> Las manifestaciones clínicas de este tipo de EICH se asemejan a las colagenopatías sistémicas, pudiéndose presentar en forma de dermatitis, queratoconjuntivitis, alteraciones hepáticas y bronquiales y síndrome de malabsorción, entre otros. La fisiopatología del EICH crónico es más compleja que la del EICH agudo. Todos los mecanismos mencionados anteriormente son relevantes, pero en este caso las **células T reguladoras** juegan un papel primordial en su patogénesis.<sup>13</sup> También se ha descrito la presencia de autoanticuerpos, aunque se duda de su participación en el daño tisular siendo, más probablemente, una manifestación de la llamativa desregulación inmune que desencadena esta enfermedad.<sup>14</sup>

#### 4. C. SÍNDROME DE OJO SECO (SOS) Y OTRAS COMPLICACIONES OCULARES DE EICH

Tanto en la forma aguda como en la crónica de EICH es posible la afectación ocular. Las complicaciones oftalmológicas más frecuentes en pacientes que sufren **EICH agudo** son la **conjuntivitis pseudomembranosa** y la **conjuntivitis aguda hemorrágica**, que se evidencian en un 12-17% de los pacientes (Figura 2).<sup>15</sup>



A)

B)

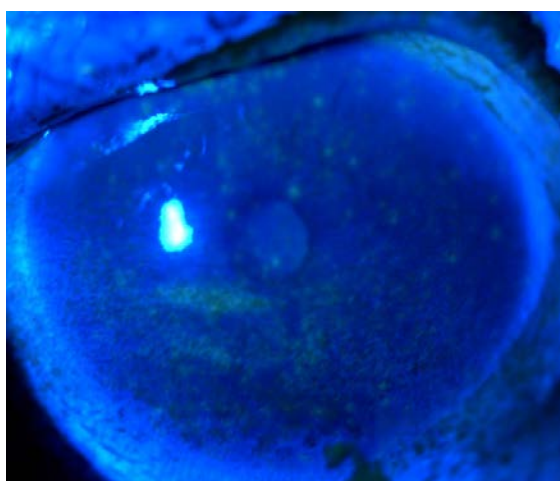
**Figura 2.** A) Conjuntivitis pseudomembranosa. B) conjuntivitis hemorrágica, en pacientes con enfermedad injerto contra huésped ocular. Imágenes cedidas por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA).

Sin embargo, la afectación oftalmológica es mucho más frecuente en el **EICH crónico**, ya que se ha visto que afecta a entre un 13 y un 80%.<sup>11</sup> **Hasta un 60-90% de los pacientes con EICH crónico desarrollan SOS** que, de forma general, suele denominarse **EICH crónico ocular**.<sup>16,17</sup> El SOS asociado a EICH es principalmente de tipo acuodeficiente, similar al del síndrome de Sjögren (SS). A nivel histológico, se aprecia destrucción inmune de los acinos y conductos de las glándulas lagrimales, tanto de la principal como de las conjuntivales, con intensa fibrosis, lo que resulta en una producción lagrimal deficiente que, con mucha frecuencia, asocia una profunda alteración de las glándulas de Meibomio productoras de la capa lipídica de la película lagrimal (Figura 3) y, por tanto, suele asociarse un componente de SOS evaporativo.<sup>18</sup>



**Figura 3.** Disfunción de las glándulas de Meibomio en paciente con enfermedad injerto contra huésped ocular. Imágenes cedidas por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA).

Los síntomas de la afectación oftalmológica en pacientes con EICH ocular se pueden parecer a los de un SOS típico, incluyendo sequedad, sensación de cuerpo extraño, enrojecimiento, ardor, irritación y fotofobia.<sup>17</sup> Los signos en este caso son potencialmente muy severos y difíciles de controlar, y producen alteraciones importantes de la superficie ocular que afectan seriamente a la calidad de vida del paciente e, incluso, pueden amenazar la visión y la integridad del globo ocular (Figura 4).<sup>19</sup>



A)



B)

**Figura 4.** Afectación severa de la superficie ocular en 2 pacientes con enfermedad injerto contra huésped ocular. **A)** Queratitis punteada superficial difusa en la tinción de fluoresceína. **B)** Opacidad corneal con neovascularización sobre un trasplante de córnea fracasado. Imágenes cedidas por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada.

El Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH de sus siglas en inglés), en su proyecto sobre “*Criterios para Ensayos Clínicos en EICH Crónico*” de 2005, propuso considerar los valores bajos del test de Schirmer como criterio suficiente para su diagnóstico, siempre que estuviera acompañado de manifestaciones distintivas en, al menos, otro órgano.<sup>20</sup> Numerosas publicaciones han demostrado la falta de sensibilidad y especificidad del test de Schirmer en el diagnóstico del SOS, además de otras desventajas, incluyendo su baja reproducibilidad o la falta de control sobre el lagrimeo reflejo.<sup>21</sup> La falta de concordancia entre los síntomas y las pruebas diagnósticas de SOS, entre ellas el test de Schirmer, ha sido demostrada, además, entre nuestros propios pacientes.<sup>22</sup>

En el año 2007, el subcomité para el diagnóstico del *International Dry Eye Workshop*,<sup>23</sup> **reconoció la ausencia de pruebas objetivas y validadas para el diagnóstico del SOS** y, más recientemente, el NIH, en su nuevo documento de consenso, reconoce que el test de Schirmer no es muy eficiente de forma aislada para establecer un diagnóstico de EICH ocular, y así, proponen una nueva forma de establecer el diagnóstico, basada en el cuadro clínico.<sup>11</sup> Específicamente, el artículo de consenso explica que “Las manifestaciones distintivas de EICH ocular crónico incluyen la nueva aparición de SOS, sensación de cuerpo extraño o dolor, conjuntivitis cicatrizante y áreas confluentes de queratopatía punteada superficial. Otras características incluyen fotofobia, hiperpigmentación periorbitaria y blefaritis”. “Un SOS de nueva aparición documentado por una baja puntuación del test de Schirmer, con un valor medio de 5 mm a los 5 minutos o un examen con lámpara de hendidura asociado a valores del test de Schirmer de 6 a 10 mm no debido a otras causas es suficiente para el diagnóstico de EICH crónico ocular con fines de tratamiento y para ensayos clínicos diseñados específicamente para EICH ocular, pero es necesario que haya

un rasgo distintivo adicional para establecer elegibilidad en ensayos clínicos sobre EICH crónico”.

Actualmente, continúa la controversia acerca de si el diagnóstico del SOS en general, y en el EICH ocular en particular, debería recaer sobre las pruebas clínicas o sobre test más objetivos apoyados en nuevas tecnologías, como los biomarcadores moleculares.

#### 4. D. BIOMARCADORES MOLECULARES EN SOS Y EICH OCULAR

El SOS ha sido definido hace años como una patología inflamatoria<sup>24</sup> que afecta a la Unidad Funcional Lagrimal (*lacrimal functional unit*, LFU) y, como tal, se han descrito multitud de mediadores inflamatorios como piezas clave en su patogenia y, además, como posibles biomarcadores de la enfermedad. La respuesta inmune está mediada por un complejo entramado de células y moléculas de comunicación intercelular, jugando las citoquinas, quimioquinas y otras moléculas similares un papel fundamental en la regulación de las respuestas inflamatorias.

El término “biomarcador” fue establecido formalmente en el año de 1987 por el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (*National Research Council*) a través del “Comité de Marcadores Biológicos”.<sup>25</sup> Esta definición considera como biomarcador a un **evento de estado conocido que puede usarse como guía para la evaluación de sistemas biológicos, es decir, como característica de señalización en muestras o sistemas biológicos que pueda ser medida y evaluada objetivamente** como un indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o evolución de respuesta terapéutica.

Se han definido varias categorías de biomarcadores, atendiendo a su función:<sup>26</sup>

- Biomarcadores de **riesgo**: predicen si un individuo está predispuesto a desarrollar cualquier trastorno.
- Biomarcadores de **diagnóstico o rasgo**: son características medibles que reflejan la presencia de un estado de enfermedad.
- Biomarcadores de **estado**: una característica medible que refleja la gravedad de un proceso de enfermedad.
- Biomarcadores de **etapa**: reflejan las clasificaciones de estratificación existentes que permiten la categorización de la etapa actual de la enfermedad de un individuo.
- Biomarcadores de **respuesta**: indexan la probabilidad de respuesta a un tratamiento dado.
- Biomarcadores **pronósticos**: predicen el resultado probable y el curso de una enfermedad.

Los biomarcadores moleculares desempeñan un papel cada vez más importante en el descubrimiento de nuevos fármacos y dianas terapéuticas, así como para el desarrollo de **dispositivos point of care** (pruebas de diagnóstico en el punto de atención). Esto se entiende como la práctica de realizar ensayos a partir de especímenes clínicos al lado del paciente, bajo la premisa que los resultados estarán disponibles de inmediato, o en un período de tiempo muy breve, para proveer de información útil al personal sanitario en la toma de decisiones, referentes tanto al diagnóstico como al tratamiento.<sup>27</sup>

En concreto, en el campo del SOS, la mala concordancia entre signos y síntomas clínicos de la enfermedad y la necesidad de encontrar nuevos métodos diagnósticos, han impulsado la investigación en biomarcadores. Y así, numerosos grupos en los últimos años han publicado varios trabajos que, utilizando la lágrima como fuente de biomarcadores, pretenden ampliar nuestros conocimientos acerca del SOS.<sup>28-33</sup>

Los abordajes más adecuados para obtener biomarcadores en este caso son la **lágrima y las células del epitelio conjuntival** a través de la citología por impresión conjuntival (CIC).<sup>34,35</sup> Ambos tipos de muestra son accesibles y cercanos al origen físico de la inflamación, por supuesto más que el suero, y en el caso de la lágrima, se puede obtener sin necesidad de anestesia, lo que la haría más fácil de aplicar en la práctica clínica diaria.

Los estudios comprenden la investigación de las diferentes formas de SOS,<sup>30,36-38</sup> incluyendo casos de SOS evaporativo, debido sobre todo a disfunción de las glándulas de Meibomio,<sup>39,40</sup> hiposecretor, que causa las formas más severas de la enfermedad, incluido eISS.<sup>28,41,42</sup> **Muchos de estos estudios han demostrado diferencias en niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima de pacientes con SOS en comparación con sujetos sanos, o entre los diferentes tipos de SOS** pero, además, la medición se ha realizado también en pacientes con SOS expuestos a diferentes condiciones ambientales controladas dentro de una cámara ambiental.<sup>43-45</sup>

Se ha demostrado que, aunque la secreción de estas moléculas se incrementa normalmente en condiciones de estimulación celular, ocurre también en ausencia de ésta, manteniéndose unos niveles basales<sup>46,47</sup> que pueden medirse de forma reproducible a lo largo del tiempo y, la mayoría de las moléculas, no tiene una variabilidad significativa entre diferentes días. Sin embargo, sí que han podido evidenciar variaciones en los niveles de algunas de estas moléculas dependiendo del momento de recolección de la muestra, lo que debe tenerse en cuenta cuando al hacer e interpretar estas comparaciones.<sup>48</sup>

El desarrollo de tecnologías de ensayos múltiples, tales como *cytometric bead array* (CBA), o la **tecnología XMAP**, desarrollada por *Luminex Corporation*, **ha permitido medir simultáneamente múltiples moléculas en volúmenes diminutos de muestras**, lo que es de gran utilidad al estudiar citoquinas en muestras de lágrima. Antes de este desarrollo



tecnológico, el análisis de proteínas lagrimales estaba limitado por la cantidad de muestra requerida por otras técnicas de análisis.

En el campo del EICH, existe un interés creciente en la identificación de moléculas que pudieran estar específicamente involucradas en la patogénesis del EICH crónico que, a día de hoy, sigue siendo fundamentalmente ignorada. Así lo demuestran los numerosos estudios realizados en suero, en los que moléculas relacionadas con la inflamación han demostrado actuar como buenos biomarcadores de la enfermedad.<sup>49-53</sup> También existen estudios a nivel ocular, donde ya se han encontrado diferencias en niveles de algunas citoquinas en lágrima de pacientes con EICH ocular con respecto a pacientes sanos<sup>54,55</sup> Recientemente, un estudio publicado por Jung et al, viene a confirmar que las citoquinas en lágrima son excelentes biomarcadores para el diagnóstico de EICH ocular.<sup>56</sup>

#### 4. E. MODELOS DE PREDICCIÓN

Los modelos de predicción son ampliamente utilizados en la investigación en ciencias de la salud actualmente. Con frecuencia, el objetivo del uso de estos modelos obedece al afán de explicar las relaciones que existen entre ciertas variables, o bien a determinar los factores que afectan a la presencia o ausencia de un estado de salud.<sup>57</sup> Estos modelos se han convertido, por ello, en un instrumento de gran utilidad, al suministrar una explicación matemática simplificada de dicha relación. Un modelo debe ser una buena aproximación al sistema real, debe incorporar los aspectos importantes del sistema y debe resultar fácil de comprender y manejar. El objetivo final será obtener un modelo simplificado que tenga sentido desde una perspectiva biológica, se atenga estrechamente a los datos disponibles y aporte predicciones válidas al aplicarlo a datos independientes.

Este tipo de modelos han sido desarrollados para dar apoyo al personal médico a la hora de estimar de forma objetiva el riesgo de padecer una enfermedad en particular y,

con ello, facilitar el proceso de toma de decisiones.<sup>58</sup> En el caso que nos ocupa, **los modelos predictivos tratan de predecir una variable de clasificación, por ejemplo, la susceptibilidad a padecer EICH ocular, sobre la base de las respuestas conocidas como la expresión génica o los niveles de citoquinas.** Además, la validación de modelos, que evalúa la cercanía del modelo con la realidad que analiza, es imprescindible, y proporciona información importante acerca de su fiabilidad.<sup>58</sup>

Sin embargo, es evidente que cualquier biomarcador único carece de la sensibilidad y especificidad necesarias para la mayoría de las aplicaciones clínicas.<sup>49</sup> Así, las técnicas de modelos predictivos multivariable han surgido como una herramienta útil para gestionar fácilmente no sólo un único biomarcador, sino un conjunto de ellos, lo que aumenta su poder diagnóstico y pronóstico. El uso de modelos de predicción múltiples puede, además, ayudar en la comprensión de la importancia de la expresión coordinada de grupos de genes o moléculas, de modo que tales modelos se sustentan en la identificación de **firmas de genes (“signatures”) que actúan de forma conjunta en un estado biológico de interés.**<sup>59</sup> Estas firmas de genes vienen siendo utilizadas ampliamente en especialidades como la oncología,<sup>60</sup> la hematología, así como en estudios sobre EICH crónico.<sup>61</sup>

Recientemente, se han utilizado una gran variedad de modelos predictivos en un intento de mejorar el diagnóstico de EICH crónico ocular, incluyendo modelos basados en parámetros clínicos, como el descrito en el *NIH Score*,<sup>62</sup> y en biomarcadores. Es el caso de los modelos descritos por el grupo de Paczesny et al, centrados en la predicción y el diagnóstico de EICH crónico sistémico<sup>49,63</sup> y otros grupos de investigación.<sup>64,65</sup>

#### 4. F. FACTORES DE RIESGO Y PREDICCIÓN DEL DESARROLLO DE EICH OCULAR. MODELOS MULTIESTADO

Diversos estudios han tratado de encontrar factores de riesgo de EICH ocular con el fin de realizar un diagnóstico precoz e implementar estrategias preventivas en la población de alto riesgo, y así evitar las devastadoras complicaciones en la función visual y calidad de vida de estos pacientes.

La única manera de extraer datos referentes a la incidencia de la enfermedad y los factores de riesgo asociados, es mediante estudios prospectivos, ya que los estudios retrospectivos tipo casos-controles poseen limitaciones al estudiar individuos que ya han sido diagnosticados de EICH crónico ocular.

Los **factores de riesgo clínicos** sugeridos hasta el momento incluyen el haber sufrido un **episodio de EICH agudo previo**,<sup>16,66</sup> que el donante de los progenitores hematopoyéticos sea positivo para el **virus de Epstein-Barr**,<sup>67</sup> así como que se relacione un **donante femenino con receptor masculino** de los progenitores hematopoyéticos.<sup>66,68</sup> Pero la forma más eficaz de establecer el riesgo de desarrollar esta enfermedad incluye el uso de biomarcadores moleculares que, al utilizarse junto a los criterios clínicos, pueden mejorar la clasificación de los pacientes en grupos de riesgo y orientar las decisiones acerca de la necesidad y la intensidad del tratamiento de forma individualizada.<sup>69</sup>

El **análisis de supervivencia** es una técnica inferencial que tiene como objetivo esencial modelizar el tiempo que se tarda en que ocurra un determinado suceso.<sup>70</sup> Estos estudios consisten en el seguimiento de una serie de individuos desde el inicio del estudio hasta su final, siendo frecuente que se produzca la desaparición de alguno de esos individuos por algún motivo que no sea el estudiado, lo que se denomina censura. Por lo tanto, en el proceso de enfermedad, a menudo hay más de un tipo de evento jugando un

papel. Uno de ellos puede ser señalado como el evento de interés y los otros eventos pueden impedir que este se produzca, o cambiar sustancialmente el riesgo de que ocurra.<sup>71</sup> Por ello, es necesario ser precavidos a la hora de estimar la probabilidad de que ocurra el evento de interés en presencia de estos llamados riesgos competidores y evitar los sesgos en la estimación de riesgos. Para ello, surgen los **modelos multiestado (MSM)**, que **permiten tener en cuenta los eventos denominados intermedios**, que pueden ser vistos como **transiciones de un estado a otro**, de modo que los pacientes se pueden clasificar en una serie de estados de salud en cualquier momento del seguimiento, representando la transición entre los estados un cambio en el proceso de la enfermedad.<sup>71</sup> Típicamente, un modelo multiestado contiene un estado inicial, un estado final, que representa un punto final, y varios estados intermedios o transitorios. Esta aproximación ha resultado idónea para representar el estado de salud de pacientes sometidos a TAPH y ha sido utilizados para la estimación de la probabilidad de recaída o muerte en remisión en estos pacientes.<sup>72,73</sup>

En resumen:

- **El TAPH es una terapia potencialmente curativa de enfermedades hematológicas graves** con una presencia cada vez más frecuente en nuestro medio.
- **El EICH es una enfermedad inmune orquestada por los Linfocitos T del donante**, siendo la primera causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes sometidos a TAPH.
- **Las complicaciones oculares**, y sobre todo el **SOS**, son muy frecuentes tanto en las formas agudas como crónicas de EICH, y son generalmente **graves y potencialmente invalidantes**, afectando a la función visual y a la integridad anatómica del ojo.

- **El diagnóstico de EICH ocular basado en pruebas clínicas o sistemas como el test de Schirmer, es poco objetivo y repetible**, por ello es necesario el desarrollo de nuevos sistemas precisos como los biomarcadores moleculares.
- **La lágrima y las células del epitelio conjuntival** representan una **fuentes importante de biomarcadores moleculares** por su cercanía al lugar donde se desarrolla el proceso, y por su fácil obtención de forma no invasiva.
- **Los modelos predictivos clásicos y multiestado son herramientas muy útiles para determinar el diagnóstico y pronóstico** de las enfermedades en general y pueden ser aplicadas al caso concreto de EICH ocular.



## **5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## HIPÓTESIS

Es posible identificar genes y moléculas en el epitelio conjuntival y la lágrima, respectivamente, de pacientes con síndrome de ojo seco (SOS) asociado a enfermedad injerto contra huésped (EICH) crónica, cuyos valores puedan ser usados como posibles biomarcadores de enfermedad.

Dichos marcadores no sólo serían diagnósticos del SOS en el contexto de EICH ocular, sino que también serían biomarcadores pronósticos de su desarrollo antes de que, de hecho, se lleve a cabo el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH).

## OBJETIVO PRINCIPAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El **objetivo principal** del trabajo es encontrar biomarcadores en la lágrima y en el epitelio conjuntival capaces de convertirse en una herramienta útil para el diagnóstico y predicción del desarrollo de EICH ocular en la práctica clínica, así como aumentar el conocimiento existente sobre los mecanismos moleculares subyacentes de la etiopatogenia del EICH ocular.

Para demostrar la hipótesis planteada, así como para desarrollar el objetivo principal, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar la expresión diferencial de 84 genes de moléculas relacionadas con la inflamación en el epitelio conjuntival de pacientes con EICH ocular y controles sanos, y establecer a partir de ella un modelo diagnóstico de EICH ocular.
2. Establecer correlaciones entre los parámetros clínicos y la expresión génica de las moléculas inflamatorias en pacientes con EICH ocular.

3. Determinar la presencia y los niveles de 15 citoquinas y quimioquinas en la lágrima de pacientes con EICH ocular, comparada con la de controles sanos, y desarrollar un modelo diagnóstico de EICH ocular.
4. Establecer correlaciones entre los parámetros clínicos y los niveles de citoquinas y quimioquinas en la lágrima de pacientes con EICH ocular.
5. Identificar biomarcadores en la lágrima con valor pronóstico de EICH ocular en pacientes antes de ser sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH).

## 6. METODOLOGÍA



Para desarrollar esta tesis doctoral, se ha dividido el proyecto en TRES trabajos:

### **Trabajo 1 (Anexo 1)**

*“Gene Expression-Based Predictive Models of Graft Versus Host Disease-Associated Dry Eye”. Cocho L, Fernández I, Calonge M, Martínez V, González-García MJ, Caballero D, López-Corral L, García-Vázquez C, Vázquez L, Stern ME, Enríquez-de-Salamanca A. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56(8):4570-81.*

En este primer trabajo, se analizó la **expresión génica diferencial de un panel de mediadores inflamatorios en las células epiteliales de la conjuntiva** de pacientes con EICH ocular, y se establecieron correlaciones significativas entre dicha expresión génica y los parámetros clínicos de la enfermedad. Todo ello se hizo con el fin de desarrollar y validar diferentes modelos de predicción basados en la expresión de estos genes.

### **Trabajo 2 (Anexo 2)**

*“Biomarkers in Ocular Chronic Graft Versus Host Disease: Tear Cytokine- and Chemokine-Based Predictive Model.” Cocho L, Fernández I, Calonge M, Martínez V, González-García MJ, Caballero D, López-Corral L, García-Vázquez C, Vázquez L, Stern ME, Enríquez-de-Salamanca A. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57(2):746-58.*

En el segundo trabajo de esta tesis se desarrolló y validó un **modelo de predicción** para el diagnóstico de EICH ocular basado, esta vez, **en los niveles de un panel de mediadores inflamatorios en lágrima**, y al igual que en el artículo anterior, se determinó su correlación con las características de la exploración oftalmológica de estos pacientes.

### **Trabajo 3**

En el tercer trabajo, cuyo manuscrito se encuentra en preparación, se buscó **identificar biomarcadores en lágrima** recogida previamente al TAPH, cuyos niveles fueran capaces de

**predecir el riesgo individual de cada paciente de desarrollar de forma posterior EICH ocular.** Para ello, se reclutó una cohorte de pacientes que fueran a ser sometidos a TAPH, se analizaron los niveles de un panel de citoquinas y quimioquinas en lágrima en el momento previo al trasplante y se construyó un modelo multiestado basado en dichos niveles. Para construir dicho modelo se analizaron cada posible combinación de biomarcadores, así como las características clínicas y demográficas relevantes.

## 6. A. DISEÑO

Los trabajos 1 y 2 son estudios analíticos, observacionales, tipo casos-controles. El trabajo 3, en cambio, se trata de un estudio observacional con carácter prospectivo.

## 6. B. ASPECTOS ÉTICOS

Los trabajos fueron aprobados tanto por la comisión de investigación del IOBA como por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid (trabajos 1 y 2, Anexo 3) y del Hospital Clínic de Barcelona (trabajo 3). Todos se llevaron a cabo siguiendo las normas de Buena Práctica Clínica, la Declaración de Helsinki sobre estudios clínicos, y lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm. 298, de 14-12-1999, pp. 43088-43099). Además, se cumplió la normativa que regula el almacenamiento de muestras humanas recogida en la Ley 14/2007, RD 223/2004 sobre investigación con muestras humanas en investigación biomédica, así como en el Real Decreto 1716/2011 de 18 de noviembre.

Todos los sujetos que formaron parte de los estudios firmaron un consentimiento informado (anexos 4 y 5) y fueron libres de interrumpir su participación en el estudio en cualquier momento.

## 6. C. PACIENTES Y CONTROLES

### a) Trabajos 1 y 2

Se incluyó un grupo de pacientes con diagnóstico de EICH ocular de entre los que acudieron a la unidad de Inmunología Ocular del IOBA, Universidad de Valladolid, y los referidos desde el Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Con el fin de que los resultados no se vieran influenciados por la medicación tópica en la medida de lo posible, los criterios de inclusión y exclusión intentaron asegurar la estabilidad de los pacientes, lo que llevó a la exclusión de las formas más graves de SOS, en los que retirar dicha medicación para la obtención de las muestras se consideró poco ético. En ambos trabajos, se incluyó además un grupo de sujetos sanos (controlados en edad y sexo según grupo de pacientes) como grupo control.

Los criterios de inclusión y exclusión de ambos grupos para los dos estudios fueron:

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

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

**Criterios de exclusión del grupo de pacientes**

- Pacientes que no hayan suspendido su tratamiento tópico con inmunomoduladores, corticoides, otros antiinflamatorios u otra medicación tópica diferente de lágrimas artificiales, una semana previamente a la toma de muestra.
- Sujetos con cualquier patología ocular activa, excepto SOS y patologías asociadas a esta enfermedad.
- Sujetos con cualquier cirugía ocular en los 6 meses previos estudio.
- Uso de lentes de contacto en los 3 meses anteriores a este estudio.

**Criterios de inclusión del grupo control**

- Hombres o mujeres en el mismo rango de edad y con la misma distribución en género que el grupo de pacientes reclutado, de modo que ambos grupos sean comparables en ambas variables demográficas.
- Personas sin patología oftalmológica activa, sin síntomas ni signos de enfermedad inflamatoria de la superficie ocular.
- Valores normales en, al menos, tres de las siguientes pruebas diagnósticas de patología de superficie ocular, SOS en particular:
  - Test de OSDI con una puntuación <12.
  - T-BUT  $\geq$  10 segundos.
  - Tinción con fluoresceína corneal  $\leq$  1 (escala Oxford).
  - Tinción con verde de Lisamina en conjuntiva  $\leq$  1(escala Oxford).
  - Test de Schirmer sin anestesia  $\geq$  5mm en 5 minutos.

**Criterios de exclusión del grupo control**

- Sujetos con cualquier patología ocular activa.
- Sujetos que estén bajo tratamiento oftalmológico tópico.
- Sujetos con cualquier cirugía ocular en los 6 meses previos al estudio.
- Uso de lentes de contacto en los 3 meses anteriores a este estudio.



### **b) Trabajo 3**

Los pacientes que participaron en este estudio fueron reclutados de forma consecutiva de entre aquellos que iban a ser sometidos a TAPH como tratamiento a diferentes enfermedades hematológicas por el Servicio de Hematología del Hospital Clínic de Barcelona, entre septiembre de 2008 y febrero de 2010. El seguimiento total planeado incluyó 10 visitas programadas (V0-V9), comenzando por V0 o basal, realizada entre 7 y 30 días antes del TAPH, y antes de que se administrara cualquier tratamiento preparatorio. Las visitas de seguimiento V1-V9 se llevaron a cabo a los siguientes intervalos mensuales después del TAPH: 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses. En la primera visita (basal o V0) antes de la TAPH, se evaluó el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión.

#### **Criterios de inclusión**

- Hombres o mujeres de edad comprendida entre 18 y 75 años.
- Pacientes seleccionados para someterse a TAPH a criterio de su hematólogo.
- Ausencia de patología oftalmológica activa, sin síntomas ni signos de enfermedad inflamatoria de la superficie ocular y sin SOS previo (definido más adelante).
- Pacientes en los que fuera posible la recolección de lágrima.

#### **Criterios de exclusión**

- Pacientes que hubieran sido sometidos a un TAPH previo.
- Pacientes con cualquier patología ocular activa o que estén usando medicación tópica.
- Pacientes con cualquier cirugía ocular en los 6 meses previos al estudio.
- Uso de lentes de contacto en los 3 meses anteriores a este estudio.

## **6. D. TESTS CLÍNICOS**

En los trabajos 1 y 2, tanto la toma de muestras como la valoración de parámetros clínicos de los pacientes y controles se llevó a cabo en una cámara de ambiente controlado

(IOBA-CERLab, Visión I+D, SL, Valladolid) bajo condiciones estándares de humedad relativa (45%), presión atmosférica (930-940 mbar), y temperatura (23°C). Ambos, pacientes y controles, permanecieron en dicha cámara durante 20 minutos antes de la evaluación clínica y la toma de las muestras. En el caso del trabajo 3, la valoración clínica de los pacientes y la toma de muestras se realizó en ambiente no controlado.

La secuencia de realización de las diferentes pruebas y evaluaciones siguió el mismo orden en los 3 trabajos, y se relata a continuación.

#### **6. D. I. Sintomatología de ojo seco**

La sintomatología de ojo seco fue evaluada utilizando la versión española homologada del test OSDI (Ocular Surface Disease Index), que incluye 12 preguntas, cada una con valoración de 0 a 4; para hallar el resultado se aplica la siguiente ecuación ( $OSDI = \frac{(Suma\ de\ puntuación) \times 25}{n^\circ\ de\ respuestas}$ ), siendo el máximo valor de este test de 100 puntos (anexo 6).<sup>74</sup>

#### **6. D. II. Medida de hiperemia conjuntival**

Para su gradación se utilizó la escala de Nathan Efron (escala subjetiva de 0 a 4), a través del examen de la superficie ocular con lámpara de hendidura (Anexo 7).<sup>75</sup>

#### **6. D. III. Medida de estabilidad lagrimal**

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

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

#### **6. D. IV. Tinciones corneal y conjuntival**

Tras dos minutos de haber instilado la fluoresceína, se evaluó la integridad corneal examinando la superficie ocular mediante lámpara de hendidura con un objetivo de 16x y a través del filtro azul cobalto y del filtro amarillo Wratten #12 y, utilizando para su evaluación la escala de Oxford, con gradación de 0 a 5 (Anexo 8).<sup>76</sup>

A su vez, la integridad de la conjuntiva bulbar se valoró mediante la tinción con verde de Lisamina (trabajos 1 y 2) o rosa de Bengala (trabajo 3). Se instilaron 25 µl de suero fisiológico mediante una pipeta sobre una tira de verde de Lisamina (GreenGlo; HUB Pharmaceuticals, LLC, Rancho Cucamonga, CA, EEUU) o rosa de Bengala (Rose bengal-GloStrips®, Nomax Inc. St. Louis, MO, EEUU), humedeciéndola y a continuación se aplicó una gota en el fondo de saco conjuntival inferior. A los dos minutos, se evaluó en lámpara de hendidura la conjuntiva, usando para ello la escala de Oxford, con gradación de 0 a 5 (Anexo 8).

#### **6. D. V. Medida de la producción lagrimal**

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



**Figura 5.** Test de Schirmer. Imagen cedida por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA).

## 6. E. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

### 6. E. I. Citología de impresión conjuntival

Se recogió una muestra de células epiteliales conjuntivales mediante citología de impresión conjuntival (CIC) de uno de los ojos (Figura 6). Previamente a la toma de la muestra, se realizó un lavado de la superficie ocular con suero fisiológico al 0,9% y se dejó el ojo en reposo durante 10 minutos, con el fin de tratar de eliminar todos los restos de colorantes de la superficie ocular.

A continuación, se instilaron 2 gotas del anestésico proparacaína al 5% (Anestésico Doble 5%. Alcón Cusí, S.A. Barcelona, España). Tras esperar dos minutos, se aplicaron sucesivamente sobre la conjuntiva bulbar superior y temporal superior, 2 mitades de filtro de polietersulfona (Supor 200, tamaño del poro 0.20  $\mu\text{m}$ , 13 mm de diámetro; Gelman Laboratory, MI, EEUU) a 4 mm del área límbica y se mantuvo en su lugar 10 segundos antes de retirarlo con cuidado (Figura 6). El filtro fue guardado en 1 ml de solución tampón de lisis RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para el aislamiento del ARN total.

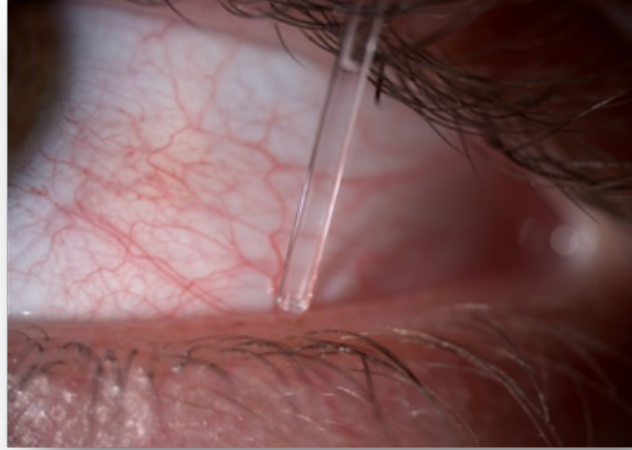


**Figura 6.** Citología por impresión conjuntival (CIC). Imagen cedida por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA).

#### **6. E. II. Muestra de lágrima**

La recogida de la muestra de lágrima se hizo antes de la instilación de cualquier colorante, con el fin de evitar posibles interferencias posteriores con estos en su análisis. En el trabajo 2, las muestras fueron tomadas del ojo con mayor sintomatología en el grupo de pacientes, mientras que en el grupo control, así como en casos en que la sintomatología era similar en ambos ojos y en el estudio 3, la elección del ojo se realizó al azar, siguiendo para ello una tabla de aleatorización.

Se recogió 1  $\mu$ l de lágrima basal tanto en el grupo de pacientes del trabajo 2 como en la totalidad de los pacientes del trabajo 3, mientras que fueron 4  $\mu$ l en el grupo control del trabajo 2. Todas las muestras se recogieron mediante capilaridad del canto externo del ojo, de forma no traumática, a fin de producir la menor secreción refleja posible. Se empleó un capilar de vidrio de 1 ó 4  $\mu$ l (Drumond Scientific Co, VW International, EEUU) (Figura 7).



**Figura 7.** Método de recogida de lágrima mediante capilar de vidrio. Imagen cedida por el Instituto de Oftalmobiología Aplicada.

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

## 6. F. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

### 6. F. I. Análisis de expresión génica en epitelio conjuntival

#### a) Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc

Para el análisis de la expresión génica en las células de epitelio conjuntival, obtenido mediante CIC, se procedió primeramente a la extracción del ARN total de las citologías utilizando un Kit comercial (RNeasy Micro Kit, Qiagen, EEUU) bajo condiciones estándares, con tratamiento con ADNasa libre de ARNasas siguiendo las instrucciones de fabricante. El análisis de las muestras fue individual. Posteriormente se procedió a la transcripción

inversa del ARN extraído a ADNc, usando el kit comercial RT2 HT First Strand (Qiagen, EEUU). Se sintetizaron 100 ng de cada muestra.

#### **b) Análisis por PCR- “real time”**

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

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

Las muestras fueron analizadas individualmente. Sin embargo, en algunos pacientes, la cantidad de ARN obtenida no fue suficiente para el análisis individual (<100 ng). Por ello, tres de estas muestras consistieron en grupos de muestras de pacientes combinados. La primera muestra agrupada fue de los pacientes 2, 3 y 4; la segunda fue de los pacientes 5 y 6; la tercera muestra agrupada fue de los pacientes 17, 18, 19 y 20.

Tabla 1. Relación de los 84 genes analizados en el trabajo 1.

GEN	Descripción	GEN	Descripción
<b>AIMP1</b>	Aminoacyl Trna synthetase complex-interacting multifunctional protein 1	<b>IL13</b>	Interleukin 13
<b>BMP2</b>	Bone morphogenetic protein 2	<b>IL15</b>	Interleukin 15
<b>CCL1</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 1	<b>IL16</b>	Interleukin 16
<b>CCL11</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 11	<b>IL17A</b>	Interleukin 17 <sup>a</sup>
<b>CCL17</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 17	<b>IL17B</b>	Interleukin 17B
<b>CCL18</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 18	<b>IL17C</b>	Interleukin 17C
<b>CCL2</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	<b>IL17E</b>	Interleukin 17E
<b>CCL24</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 24	<b>IL17F</b>	Interleukin 17F
<b>CCL26</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 26	<b>IL17RA</b>	Interleukin 17 receptor A
<b>CCL3</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	<b>IL17RC</b>	Interleukin 17 receptor C
<b>CCL4</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 4	<b>IL18</b>	Interleukin 18
<b>CCL5</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	<b>IL1A</b>	Interleukin 1, 64lpha
<b>CCL7</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 7	<b>IL1B</b>	Interleukin 1, beta
<b>CCR1</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 1	<b>IL1RN</b>	Interleukin 1 receptor antagonist
<b>CCR2</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 2	<b>IL2</b>	Interleukin 2
<b>CCR3</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 3	<b>IL22R</b>	Interleukin 22 receptor
<b>CCR4</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 4	<b>IL27</b>	Interleukin 27
<b>CCR5</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 5	<b>IL4</b>	Interleukin 4
<b>CCR6</b>	Chemokine (C-C motif) receptor 6	<b>IL5</b>	Interleukin 5
<b>CD40LG</b>	CD40 ligand	<b>IL5RA</b>	Interleukin 5 receptor, 64lpha
<b>CSF2</b>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	<b>IL6</b>	Interleukin 6
<b>CSF3</b>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	<b>IL8</b>	Interleukin 8
<b>CX3CL1</b>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	<b>IL9</b>	Interleukin 9
<b>CX3CR1</b>	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	<b>IL9R</b>	Interleukin 9 receptor
<b>CXCL1</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	<b>LTA</b>	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
<b>CXCL10</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	<b>LTB</b>	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
<b>CXCL11</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	<b>MIF</b>	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
<b>CXCL12</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	<b>NAMPT</b>	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
<b>CXCL13</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>CXCL2</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	<b>TNFRSF11B</b>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
<b>CXCL3</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	<b>TNFSF10</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
<b>CXCL9</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	<b>TNFSF11</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
<b>XCL1</b>	XCL1 chemokine (C motif) ligand 1	<b>TNFSF4</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
<b>CXCR1</b>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1	<b>VEGFA</b>	Vascular endothelial growth factor A
<b>CXCR2</b>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2	<b>EFG</b>	Epidermal growth factor
<b>CXCR3</b>	CXCR3 chemokine (C-X-C motif) receptor 3	<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>FASLG</b>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	<b>MMP9</b>	matrix metalloproteinase 9
<b>IFNA2</b>	Interferon, 64lpha 2	<b>TGFB1</b>	transforming growth factor, beta 1
<b>IFNG</b>	Interferon, gamma	<b>TGFB2</b>	transforming growth factor, beta 2
<b>IL10</b>	Interleukin 10	<b>TGFB3</b>	transforming growth factor, beta 3
<b>IL12A</b>	Interleukin 12	<b>TLR2</b>	toll-like receptor 2
<b>IL12B</b>	Interleukin 12B	<b>TLR4</b>	toll-like receptor 4



### c) Análisis de la expresión diferencial de RNAm

Para el análisis de la expresión génica diferencial de moléculas inflamatorias en las células de epitelio conjuntival de pacientes con EICH con respecto a controles, se utilizó el método comparativo de Ct. El Ct es un ciclo umbral y su valor está determinado por el número de ciclos necesarios para amplificar cada gen sobre un valor umbral (determinado por el operador). Se calculó el valor del incremento en Ct ( $\Delta\text{Ct}$ ) para cada gen en controles y pacientes, usando como factor de normalización el promedio de los valores de Ct de los genes housekeeping incluidos en la placa del array y se calculó el valor *fold change* (número de veces en que se incrementa la expresión) de cada gen con respecto al grupo control mediante el cociente del valor  $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$  entre las muestras de los pacientes y controles. Los resultados fueron reportados como *fold up-regulation* o *fold down-regulation* (expresión aumentada o disminuida). Para la normalización de los valores se usó el programa NormqPCR, mientras que para el análisis de la expresión diferencial se usó el programa HTqPCR (Bioconductor, EEUU) en R (R Core Team).

La estabilidad de la expresión de 2 genes de referencia se estimó mediante el algoritmo geNorm<sup>77</sup> con los paquetes ReadqPCR y NormqPCR *packages*.<sup>78</sup> El análisis de los genes seleccionados se realizó utilizando la prueba t moderada<sup>79</sup> implementadas en el HTqPCR *package*.<sup>80</sup>

### d) Análisis de citoquinas y quimioquinas en lágrima

En los trabajos 2 y 3, los niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima se determinaron mediante la tecnología XMAP utilizando un ensayo multianálisis comercial (Milliplex 15x-MPXHCYTO-60 Human Cytokine/chemokine panel, Millipore, Watford, UK) en un Luminex IS-100 (Luminex Corporation, Austin, TX, EEUU).

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

## 6. G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de todos los trabajos fue realizado por la Dra. Itziar Fernández, Unidad de Estadística del IOBA, utilizando *The R software* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

En los tres trabajos, los datos cuantitativos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar de la media (DEM) y las variables cualitativas se describieron en porcentajes. Se utilizó la mediana y el rango intercuartílico (IQR) para resumir las distribuciones de variables ordinales. Se realizaron pruebas univariadas para verificar las diferencias en la distribución de cada variable entre los grupos estudiados. Los supuestos de normalidad fueron verificados por la prueba de *Shapiro-Wilk*. Para comparar las características cuantitativas, se utilizó la prueba *t de Student* para muestras independientes, o la

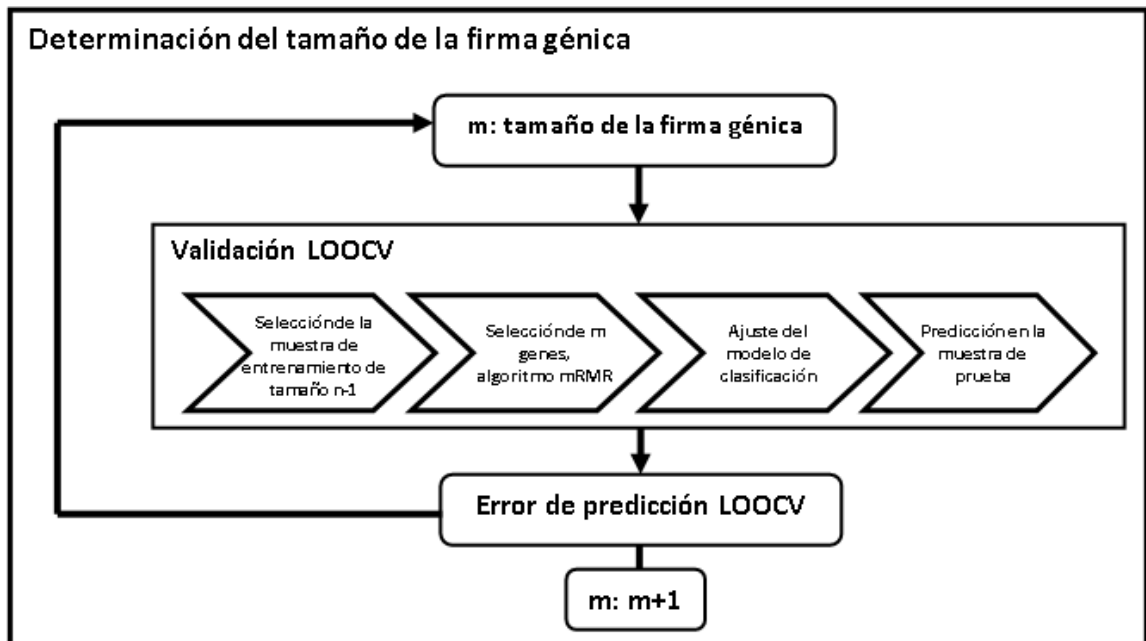
alternativa no paramétrica, prueba *U de Mann-Whitney*, cuando la hipótesis de normalidad no resultó válida. Para verificar la homogeneidad de las varianzas, se utilizó la prueba de *Brown-Forsythe*, y en casos de heterogeneidad significativa de la varianza, se utilizó la prueba *t de Welch*.

Para cuantificar las correlaciones entre los niveles de expresión génica o niveles de citoquinas y los parámetros clínicos de los dos primeros trabajos, se utilizó el coeficiente de correlación clasificado de *Spearman* ( $\rho$ ), junto con un valor de  $p$  que contrastara la hipótesis nula  $\rho = 0$ . Por otra parte, un intervalo de confianza de arranque para este coeficiente fue construido usando 5.000 muestras de arranque o bootstrap.

Para evaluar la asociación entre las variables cualitativas y los grupos del tercer trabajo, se utilizó la prueba de *chi cuadrado* o la prueba exacta de *Fisher* con pequeñas frecuencias esperadas. Las curvas de *Kaplan-Meier* y las estimaciones de supervivencia se generaron para evaluar la aparición de EICH agudo, EICH crónico sistémico y EICH ocular.

### 6.G.I. Construcción de los modelos predictivos basados en la expresión génica

La identificación de la firma de genes se llevó a cabo utilizando **TRES modelos de clasificación diferentes**. La selección de genes relevantes se ha basado en el algoritmo de **mínima relevancia máxima redundancia (mRMR)**<sup>81</sup>, a través de repeticiones del proceso LOOCV (*Leave one out cross validation*) (Figura 8). El proceso LOOCV se repitió 84 veces, el número total de genes candidatos. Se estimó la tasa de error basada en LOOCV para cada firma de genes  $m$ , donde la firma genes  $m$  es un grupo de  $m$  genes dentro de los cuales la expresión combinada podría usarse para identificar pacientes con EICH ocular. El tamaño óptimo de la firma se definió como el tamaño del conjunto con la mejor precisión de la predicción y el número de genes más pequeño.



**Figura 8. Determinación del tamaño de la firma génica (m).** El proceso de identificación del tamaño de la firma génica (m) se realizó utilizando tres modelos de clasificación diferentes: SDA (*Shrinkage Discriminant Analysis*), SVM (*Support Vector Machines*) y kNN (*k-Nearest Neighbour*). La selección de los genes pertinentes se basó en el algoritmo mRMR (Mínima relevancia máxima redundancia), a través del proceso LOOCV (*Leave one out cross validation*).

Los modelos se construyeron usando 3 métodos:

- 1) ***Shrinkage Discriminant Analysis (SDA)***: el análisis discriminante clásico implica la determinación de una combinación lineal de los predictores de la expresión del gen, o función discriminante, que maximiza las diferencias entre clases. En general, este método tiene menor rendimiento cuando el tamaño de la muestra es pequeño y el número de predictores (en este caso, de genes) es grande, reduciéndose la precisión de la clasificación. Una solución consiste en hacer uso de estimadores de varianza basado en contracción. En este estudio, se han utilizado estimadores de contracción tipo James Stein.
- 2) ***Support Vector Machines (SVM)***: este método tiene como objetivo la búsqueda de un hiperplano que separa las dos clases con el margen más grande o la

distancia entre el hiperplano y el punto más cercano.<sup>82</sup> Un factor clave en estos casos es utilizar los núcleos lineales para construir los límites de decisión. Por ello, para desarrollar este modelo han sido utilizados núcleos lineales a través del package `e1071`.<sup>83</sup>

- 3) ***k-Nearest Neighbour (k-NN)***: este método utiliza para la clasificación un enfoque basado en distancia.<sup>84</sup> Para clasificar una nueva observación con el algoritmo *kNN*, El ajuste *k*, como parámetro predefinido, encuentra las observaciones *k* más cercanas y clasifica la nueva observación por mayoría de votos. Por lo tanto, se elige la clase que es más común entre los *k* vecinos. En este trabajo se utilizó la distancia euclídea, y la *k* óptima se decidió en base a la clasificación de error estimado por un procedimiento LOOCV. Para desarrollar este modelo se utilizó el *Classs package*.<sup>85</sup>

## 6. G. II. Validación de los modelos predictivos

Con el fin de establecer las semejanzas de los modelos con la realidad que pretenden analizar determinamos su **precisión, calibración y grado de discriminación** de los modelos.<sup>86</sup> Como **medida global de la precisión** de un modelo se utilizó el *Brier Score*, que se refiere a las diferencias, a nivel individual, entre los riesgos predichos en términos de probabilidad y los resultados finalmente observados, siendo 0 cuando el grado de acuerdo sea perfecto y 1 en caso contrario.

La **calibración**, entendida como el grado de acuerdo entre los valores predichos y los observados, se evaluó mediante dos medidas, *calibration-in-the-Large* (CL) que en un modelo perfectamente calibrado será 0 y *calibration Slope* (CS) que en este tipo de modelos

será 1. También usamos la prueba de *Hosmer-Lemeshow*, que resulta significativa para los modelos mal calibrados.

La **capacidad de discriminación** del modelo hace referencia a su capacidad de clasificar los nuevos individuos correctamente, en sanos y enfermos. Para ello se usa el área bajo la curva (AUC) ROC, estableciendo un umbral óptimo utilizando el paquete *pROC*,<sup>87</sup> y a partir de ella se extrajeron medidas fundamentales, como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y la exactitud global del modelo.

### 6. G.III. Desarrollo del modelo predictivo basado en los niveles en lágrima de citoquinas y quimioquinas

En el segundo trabajo de esta tesis (Anexo 2), el tamaño de la muestra se determinó estadísticamente de forma previa. El análisis de poder estadístico para la regresión logística con un predictor continuo, y un diseño equilibrado determinó que una muestra de 19 sujetos por grupo daría un poder estadístico del 80% para detectar odds ratio de 2.5 con un nivel de significación de 0.05.

Los niveles de citoquinas y quimioquinas fueron analizadas como variables transformadas logarítmicamente. Los niveles por debajo del límite de detección fueron imputados utilizando el programa *robust ROS*,<sup>88</sup> incluido en el paquete *R* de *NADA*.<sup>89</sup> Sin embargo, las moléculas que se detectaron en menos del 50% de las muestras no se analizaron.

La regresión logística, ajustando las variables de edad y género, fue el método de análisis utilizado para cuantificar la asociación entre el grupo de pacientes con EICH ocular y cada una de las citoquinas por separado. Las moléculas que arrojaron un resultado con

un nivel de significación de al menos un 10% fueron identificados como biomarcadores candidatos y fueron evaluados para ajustar un modelo multivariante.

El primer paso fue identificar los biomarcadores candidatos más útiles en la predicción de EICH ocular y, tras ello, la construcción de modelos de regresión logística con todas y cada una de las combinaciones posibles de las moléculas candidatas.

#### 6. G. IV. Validación del modelo predictivo

El modelo considerado óptimo fue aquel que obtuvo el mínimo valor de criterio de información Akaike. La medida del factor de inflación de la varianza (VIF) se utilizó para verificar la multicolinealidad, considerándose un  $VIF > 5$  como evidencia de multicolinealidad. Para estimar la precisión de predicción del modelo se utilizó el procedimiento LOOCV, mientras que, para evaluar su capacidad de discriminación, se utilizó el análisis de curva de ROC y el AUC. Además, la sensibilidad y la especificidad se obtuvieron estableciendo un umbral óptimo utilizando de nuevo el paquete *pROC* (presentación y análisis de curvas ROC).<sup>87</sup>

Al igual que en el primer trabajo, el *Brier Score* se utilizó como medida global de precisión, mientras que las medidas *calibration-in-the-Largey calibration Slope* se usaron como determinantes de su calibración, junto con el test de *Hosmer-Lemeshow*.

En este segundo trabajo, además, con el fin de **evaluar la capacidad del modelo para clasificar adecuadamente a los individuos con SOS de diferentes etiologías**, se analizaron un conjunto de datos independiente de 48 pacientes (14 SOS asociado a SS y 34 SOS no asociados al SS) y 32 controles sanos procedentes de estudios previamente publicados por nuestro grupo.<sup>43-45</sup>

## 6. G.V. Definición del modelo multiestado

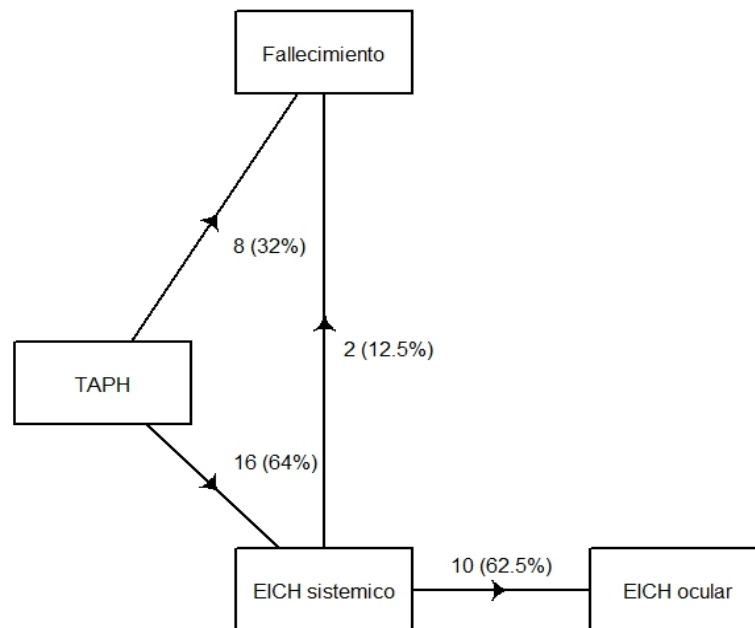
Con el objetivo de evaluar la aparición de EICH ocular como una complicación importante asociada a EICH sistémico tras un TAPH, e identificar los niveles en lágrima de citoquinas que podrían predecir el riesgo del paciente de desarrollarlo, se utilizaron **los modelos multiestado**, utilizando el paquete *R mstate*.<sup>90</sup>

Con estos modelos, los pacientes pueden clasificarse en varios estados de salud en cualquier momento del período de seguimiento, representando las transiciones entre estados un cambio en el proceso de la enfermedad.<sup>71</sup>

Típicamente, los MSM contienen un estado inicial, uno o varios estados finales, y diferentes estados intermedios o transitorios entre ellos.<sup>71</sup> En este estudio, se definió un modelo de cuatro estados (Figura 9). El estado inicial fue el TAPH, mientras que el fallecimiento, y el desarrollo de EICH ocular se consideraron estados finales. Desde el estado inicial, el EICH sistémico podría ser alcanzado como estado transitorio al desarrollo de EICH ocular, incluyéndose también una transición desde EICH sistémico a fallecimiento. Se ha considerado, que después del TAPH los pacientes pueden o no adquirir EICH sistémico, pero también pueden morir debido a complicaciones de trasplante o recidiva de enfermedad hematológica inicial. También se consideró que la aparición de EICH ocular estaba siempre precedida por EICH sistémico, aunque podría haber excepciones.<sup>91</sup> Por último, algunos pacientes podrían haber muerto después de sufrir EICH sistémico, pero sin haber desarrollado afectación ocular.

Se utilizó el estimador de Aalen-Johansen<sup>92</sup> con el fin de determinar las probabilidades de cada transición, proporcionando así la distribución de los estados de enfermedad de los pacientes durante el seguimiento.





**Figura 9.** Modelo multiestado diseñado para estudiar el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped (EICH) crónica sistémica y EICH ocular en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TAPH). Cada uno de los 4 estados del modelo está representado por una caja. Las transiciones entre estados se indican mediante flechas de un estado a otro. Se muestran el número de transiciones y el porcentaje observados entre paréntesis.

#### 6. G.VI. Efecto de las características individuales en el proceso de enfermedad

Los niveles en lágrima de citoquinas y quimioquinas en el momento previo al trasplante, así como diferentes características demográficas y clínicas de los pacientes, fueron elegidas como covariables para los MSM, con el fin de explicar las diferencias entre los individuos, y también para predecir el riesgo de cada paciente para sufrir la enfermedad en estudio, EICH ocular. Las asociaciones entre estas características basales (recogidas en la visita previa al trasplante o V0) y las transiciones entre los estados descritos, se basaron en el modelo de riesgos proporcionales de Cox<sup>93</sup> para cada uno de los riesgos de transición por separado. Se realizaron modelos univariantes para detectar potenciales predictores,

identificándose estos como aquellas variables relacionadas con el proceso que alcanzaron un nivel de significación de 0,05.

#### **6. G.VII. Efecto simultáneo de predictores potenciales**

El conjunto de características que se incluirían en el modelo final se redujo mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA) supervisado,<sup>94</sup> en el que los componentes principales (PCs) se calculan a partir de un subconjunto preseleccionado de variables, entre aquellas más significativas. Los PC más informativos o más representativos de la variabilidad de los datos, se incluyeron en el modelo multivariable. Como nuestra muestra fue descrita por una mezcla de covariables cualitativas y cuantitativas, se utilizó una PCA de datos mixtos por medio del paquete *PCA mixdata*.<sup>95</sup>

#### **6. G. VIII. Validación interna del modelo final**

Para la validación interna del modelo final, se utilizó el re-muestreo bootstrap. Para ello, se generaron 1000 muestras bootstrap por muestreo aleatorio preservando el tamaño de la muestra original. El proceso general de ajuste del modelo se repitió con las diferentes muestras de arranque.

La capacidad discriminativa del modelo se determinó de acuerdo con las curvas ROC dependientes de tiempo, y se calculó el AUC correspondiente para evaluar la precisión predictiva del modelo, por medio del paquete de R *timeROC*.<sup>96</sup>

## 7. RESULTADOS



## 7. A. RESULTADOS DEL TRABAJO 1

### 7. A. I. Evaluación clínica

Se reclutaron un total de 20 pacientes con EICH ocular (13 varones, 7 mujeres;  $56,8 \pm 1,6$  años de edad, rango 34-72 años) y 14 voluntarios sanos (8 varones, 6 mujeres;  $51,9 \pm 14,7$  años de edad, rango 30-75 años), entre los que no hubo diferencias estadísticas en cuanto al género ( $P = 0,916$ ) ni en la edad ( $P = 0,3533$ ). Los datos de la historia clínica de los 20 pacientes, incluyendo el diagnóstico previo al trasplante, tiempo hasta el diagnóstico de EICH ocular y tratamiento sistémico o tópico, se muestra en la Tabla 2.

Los pacientes con EICH ocular obtuvieron puntuaciones más altas en el cuestionario OSDI (Tabla 3). La exploración de la superficie ocular y test de Schirmer revelaron en estos pacientes resultados alterados en relación a los controles. Sin embargo, los valores no fueron muy patológicos, lo que refleja el hecho de que los pacientes fueron seleccionados de entre los que podían suspender los medicamentos tópicos durante una semana y, por lo tanto, tenían un nivel moderado de inflamación.

Los resultados del análisis de la expresión génica diferencial de moléculas inflamatorias en las células de epitelio conjuntival de pacientes con EICH con respecto a controles, fueron reportados como *fold up-regulation* o *fold down-regulation* (expresión aumentada o disminuida) y se muestran en la tabla 4.

Tabla 2. Datos clínicos de los 20 pacientes con EICH ocular incluidos en el trabajo 1.

Paciente	Diagnóstico	Fecha de TAPH	Tiempo desde TAPH hasta diagnóstico de EICH ocular (meses)	Tratamiento sistémico	Tratamiento tópico (interrumpido 7 días antes del estudio)
1	Enfermedad de Hodgkin	2003	36	Tacrólimus	Suero autólogo Medroxiprogesterona 0,4%
2	Linfoma no Hodgkin	2006	9	Ninguno	Suero autólogo Ciclosporina A 0,05%
3	Leucemia linfoblástica aguda	2000	24	Ninguno	Ninguno
4	Leucemia mieloide aguda	2005	12	Ninguno	Suero autólogo Fluorometolona 0,1%
5	Leucemia mieloide aguda	2008	3	Ciclosporina A	Ninguno
6	Enfermedad de Hodgkin	2006	18	Ninguno	Ciclosporina A 0,05%
7	Leucemia linfoblástica aguda	2004	12	Ninguno	Ninguno
8	Síndrome mielodisplásico	2010	3	Tacrólimus	Suero autólogo
9	Leucemia mieloide aguda	2007	36	Tacrólimus Prednisona	Ninguno
10	Leucemia mieloide crónica	1997	12	ninguno	Fluorometolona 0,1% Suero autólogo
11	Leucemia mieloide crónica	2011	2	Ninguno	Suero autólogo
12	Síndrome mielodisplásico	2012	1	Rapamicina	Suero autólogo
13	Leucemia linfocítica crónica	2012	15	Rapamicina Tacrólimus Metilprednisolona	Fluorometolona 0,1%
14	Síndrome mielodisplásico	2012	6	Prednisona	Suero autólogo
15	Leucemia mieloide crónica	2011	27	Rapamicina	Suero autólogo
16	Mieloma múltiple	2012	6	Rapamicina Talidomida Ciclofosfamida	Suero autólogo
17	Síndrome mielodisplásico	2007	2	Tacrólimus	Fluorometolona 0,1% Suero autólogo Ciclosporina A 0,05%
18	Síndrome mielodisplásico	2012	6	Tacrólimus	Suero autólogo Hidrocortisona pomada 1,5%
19	Leucemia mieloide crónica	2010	3	Prednisona	Tacrólimus pomada 0,03% Suero autólogo
20	Leucemia mieloide aguda	2012	10	Metilprednisolona	Suero autólogo 0,1% Dexametasona

EICH: enfermedad injerto contra huésped; TAPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

**Tabla 3. Resultados de la exploración oftalmológica en los pacientes con EICH ocular y controles sanos.**

	Controles sanos (n=14)	Pacientes EICH ocular (n=20)	P-valor
Cuestionario OSDI	3 ± 3,7	45,3 ± 22,7	<0,0001
Hiperemia conjuntival	0 ± 0	1 ± 1	<0,0001
T-BUT (segundos)	6,8 ± 2,8	2,5 ± 2,4	<b>0,0001</b>
Tinción corneal con fluoresceína	0 ± 0	2 ± 2	<0,0001
Tinción conjuntival con verde de Lisamina	0 ± 0	2 ± 1	<b>0,0006</b>
Test de Schirmer sin anestesia (mm)	10,9 ± 7,5	3,8 ± 3	<b>0,001</b>

Los datos se presentan como media ± desviación estándar en OSDI, T-BUT, y test de Schirmer. Los datos se presentan como mediana ± rango intercuartílico en hiperemia, tinción corneal con fluoresceína y tinción conjuntival con verde de Lisamina. Los cambios significativos (P <0,05) se indican en negrita. EICH: enfermedad injerto contra huésped; OSDI: *Ocular Surface Disease Index*; T-BUT: *Tear Break-up Time*.

**Tabla 4. Expresión aumentada o disminuida (*fold up-down regulation*) de genes en epitelio conjuntival en el grupo de EICH ocular respecto al grupo control.**

Gen	<i>Fold Change</i>	P-valor	Gen	<i>Fold Change</i>	P-valor
AIMP1	-1,0526	0,9456	IL4	4,6064	<b>0,0300</b>
BMP2	5,1207	<b>0,0028</b>	IL5	3,8667	<b>0,0488</b>
CCL1	-1,0124	0,9884	IL6	17,5002	<b>0,0002</b>
CCL2	6,2658	<b>0,0028</b>	IL8	4,7912	<b>0,0134</b>
CCL11	4,6814	<b>0,0316</b>	IL9	9,7630	<b>0,0004</b>
CCL17	2,6773	0,0856	IL10	7,7101	<b>0,0020</b>
CCL18	8,4752	<b>0,0080</b>	IL12A	5,5056	<b>0,0156</b>
CCL24	8,8615	<0,0001	IL12B	3,9194	<b>0,0304</b>
CCL26	-1,5463	0,6100	IL13	2,9178	0,0878
CCL3	5,0640	<b>0,0030</b>	IL15	2,3694	<b>0,0170</b>
CCL4	3,0156	0,0770	IL16	1,1224	0,8694
CCL5	1,6693	0,2822	IL17A	2,5200	0,1148
CCL7	2,3739	0,1652	IL17B	4,7314	<b>0,0108</b>
CCR1	1,5794	0,5286	IL17C	-2,1992	0,3248
CCR2	1,3312	0,6224	IL17E	5,9851	<b>0,0218</b>
CCR3	2,4451	0,2550	IL17F	1,2965	0,7560

CCR4	2,4328	0,1768	IL18	1,2295	0,4744
CCR5	-1,4112	0,4908	IL27	3,0838	0,1082
CCR6	2,6908	0,1572	IL1RN	1,5494	0,1816
CD40LG	1,5925	0,5306	IL5RA	3,7640	0,0796
CSF2	4,9735	<b>0,0294</b>	IL9R	4,0484	<b>0,0484</b>
CSF3	4,2827	<b>0,0072</b>	IL17RA	-1,3229	0,4312
CX3CL1	-1,5436	0,6382	IL17RC	1,0978	0,8658
CX3CR1	1,3032	0,6588	IL22R	3,1344	<b>0,0184</b>
CXCL1	2,9250	0,0754	LTA	2,8006	0,1692
CXCL2	1,7630	0,2720	LTB	2,4248	0,1952
CXCL3	3,9719	<b>0,0418</b>	MIF	1,2832	0,2566
CXCL9	3,0113	0,0960	NAMPT	2,2890	<b>0,0002</b>
CXCL10	2,7774	0,2396	TNF	5,3940	<b>0,0036</b>
CXCL11	1,8866	0,4146	TNFRSF11B	1,0220	0,9686
CXCL12	5,0477	<b>0,0076</b>	TNFSF10	1,4051	0,0792
CXCL13	2,9757	<b>0,0208</b>	TNFSF11	3,2002	<b>0,0490</b>
XCL1	2,1767	0,2232	TNFSF4	-1,9841	0,1702
CXCR1	2,2647	0,2136	VEGFA	2,9702	<b>0,0014</b>
CXCR2	1,0780	0,9268	EGF	1,2352	0,6720
CXCR3	1,0825	0,9180	EGFR	-2,5926	<b>&lt;0,0001</b>
FASLG	1,4435	0,5344	MMP9	2,5997	0,1080
IFNA2	5,6058	<b>0,0458</b>	TGFB1	1,3618	0,4410
IFNG	6,9790	<b>0,0050</b>	TGFB2	3,3314	<b>0,0254</b>
IL1A	2,2711	0,2490	TGFB3	3,9609	<b>0,0474</b>
IL1B	3,8988	<b>0,0174</b>	TLR2	-1,1571	0,7290
IL2	3,1437	0,0658	TLR4	1,2942	0,6900

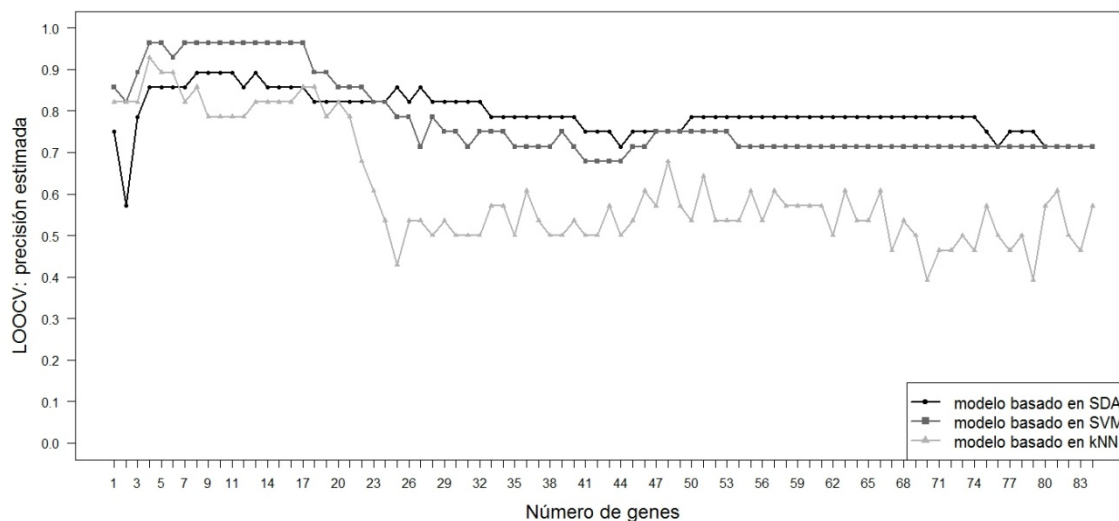
Los cambios significativos ( $P < 0,05$ ) se indican en negrita. Los valores de P al límite de la significación ( $0,05 < P < 0,08$ ) se indican en cursiva. *Fold change*: número de veces que la expresión aumenta o disminuye.

## 7.A. II. Desarrollo del modelo predictivo

Se utilizaron tres métodos diferentes de clasificación, SDA, SVM y kNN, para analizar un panel de moléculas expresadas en células del epitelio conjuntival, de manera que ayuden a diagnosticar y monitorizar la enfermedad mejor que un solo gen. Se estimó el rendimiento basado en LOOCV para cada uno de los modelos de genes. Su exactitud alcanzó el valor máximo cuando se incluyeron cuatro genes: EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT en el modelo basado en SVM (Figura 10). Para los modelos basados en kNN y SDA, un panel de



5 y 8 genes, respectivamente, fueron los óptimos. Para el modelo kNN, IFN- $\gamma$  se incluyó junto con los cuatro genes utilizados en el modelo SVM. Para el modelo de SDA, IFN- $\gamma$ , TGFB2, CCL3, y VEGFA fueron incluidos con los cuatro genes del modelo SVM.



**Figura 10. LOOCV para estimar la exactitud de los modelos predictivos SDA, SVM y kNN.** El número de genes utilizados para la clasificación se representa en el eje X; el eje Y corresponde a las exactitudes estimadas evaluadas por el método LOOCV de cada uno de los tres modelos ajustados. Se estimó la tasa de error basada en LOOCV para cada firma genética  $m$ . El tamaño óptimo de la firma se definió como el tamaño del conjunto con la mejor precisión de predicción y el menor número de genes. LOOCV: leave-one-out cross-validation; SDA: linear discriminant analysis, SVM: support vector machine; kNN: k-nearest neighbor classifier.

### 7. A. III. Validación interna del modelo

Se ha utilizado el procedimiento LOOCV para validar nuestros resultados (Tabla 5). Se evaluaron 3 aspectos en cada caso: precisión, calibración y capacidad de discriminación. Todos los modelos resultaron precisos, con puntuaciones de Brier Score cercanas a 0, y ninguno de ellos presentaba problemas serios de calibración. Con respecto al rendimiento discriminativo, el modelo basado en SVM fue algo mejor que los otros, con un AUC de 0,995, una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92,9%. Teniendo en cuenta todos estos resultados, se determinó que el modelo obtenido por el método SVM, basado en la expresión de EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT, produjo el mejor modelo predictivo de la aparición

de EICH ocular, ya que este panel compuesto por cuatro biomarcadores discriminaba adecuadamente entre los pacientes con y sin EICH ocular.

**Tabla 5. Resultados de la validación interna del modelo SVM basado en la expresión de EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT.**

Modelo	Precisión	Calibración			Discriminación		
	Brier Score (IC 95%)	Calibration in the large (IC 95%)	Calibration Slope (IC 95%)	Hosmer-Lemeshow p-valor	AUC (IC 95%)	Sensibilidad (%) (IC 95%)	Especificidad (%) (IC 95%)
SDA	0,089 (0,087-0,006)	1,460 (-0,485-3,406)	0,708 (0,151-1,265)	0,3925	0,959 (0,891-1)	92,9 (79,4-100)	92,9 (79,4-100)
SVM	0,054 (0,053-0,025)	-1,178 (-4,025-1,67)	3,712 (-0,341-7,765)	0,9344	0,995 (0,981-1)	100 (100-100)	92,9 (79,4-100)
kNN	0,071 (0,069-0)	0,14 (-1,183-1,463)	0,929 (0,377-1,48)	0,465	0,929 (0,83-1)	92,9 (79,4-100)	92,9 (79,4-100)

SDA, *linear discriminant analysis-based model*, SVM, *support vector machine-based model*; kNN, *k-nearest neighbor classifier-based model*; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; AUC: *area under the curve* (area bajo la curva).

#### 7. A. IV. Correlación entre la expresión génica diferencial y parámetros clínicos

Se encontraron correlaciones significativas entre la expresión de EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT y las pruebas clínicas utilizadas para el diagnóstico del SOS (Figura 11). Considerando la muestra completa de pacientes y controles, la expresión de EGFR se correlacionó negativamente con la puntuación del cuestionario OSDI, hiperemia conjuntival, tinción con fluoresceína y con verde de Lisamina. En cambio, la expresión de EGFR se correlacionó positivamente con los T-BUT y Schirmer. La expresión de IL-6 y la IL-9 se correlacionó positivamente con la hiperemia y tinción con fluoresceína, y negativamente T-BUT y Schirmer. Además, la IL-6 se correlacionó positivamente con la puntuación del cuestionario OSDI. Por último, la expresión génica de NAMPT se correlacionó

positivamente con el cuestionario OSDI, la hiperemia y la tinción corneal, mientras que se correlacionó negativamente con T-BUT y verde de Lisamina.

## **7. B. RESULTADOS DEL TRABAJO 2**

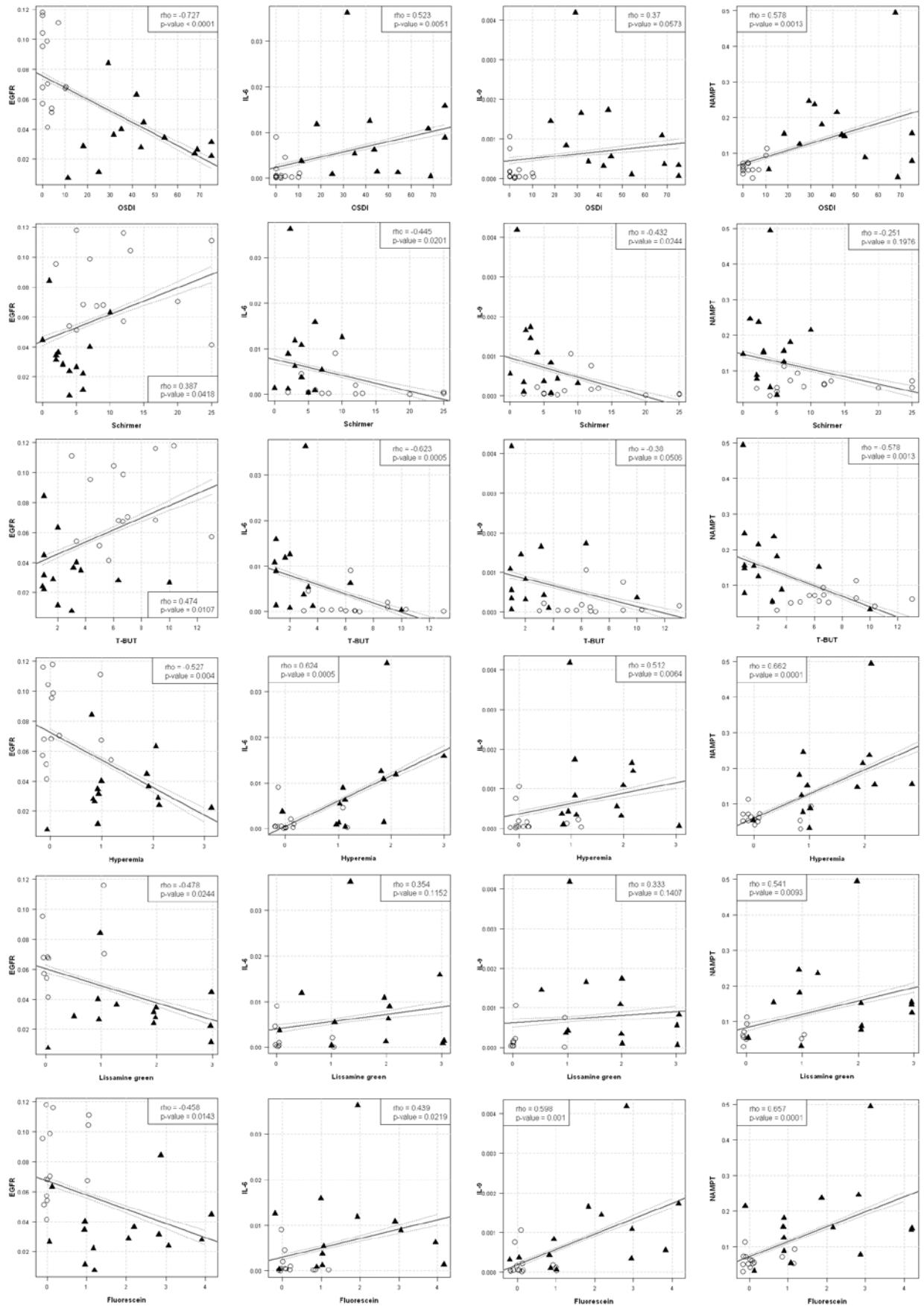
### **7. B. I. Evaluación clínica**

Se reclutó un total de 22 pacientes con EICH ocular (15 varones, 7 mujeres;  $55,6 \pm 11,6$  años, rango 34-72 años) y 21 voluntarios sanos (12 varones, 9 mujeres;  $53,1 \pm 12,6$  años, rango 30-75 años). No hubo diferencias significativas en cuanto al género ( $P = 0,665$ ) ni la edad ( $P = 0,4873$ ) entre estos dos grupos. La historia clínica de los pacientes con EICH ocular, incluyendo el diagnóstico previo al trasplante, el tiempo transcurrido hasta el diagnóstico de EICH ocular, tanto desde el trasplante como del diagnóstico de EICH sistémico, y las terapias sistémicas y tópicos que recibían se encuentran en la Tabla 6.

Los pacientes con EICH ocular presentaron síntomas más frecuentes e intensos que los controles según el cuestionario OSDI (Tabla 7). La exploración de la superficie ocular reveló que los pacientes tenían una hiperemia conjuntival significativamente mayor en comparación con el grupo control, así como menor estabilidad y producción lagrimal. Por último, las tinciones con fluoresceína y verde de Lisamina demostraron una superficie ocular alterada en estos pacientes respecto a los sujetos sanos.

### **7. B. II. Detección de citoquinas y quimioquinas en lágrima, concentración y correlación con datos clínicos**

Para cada una de las 15 moléculas estudiadas, se analizó el porcentaje de detección en cada grupo y la concentración en cada muestra (Tabla 8).



**Figura 11. Correlaciones entre la expresión génica de EGFR, IL-6, IL-9, NAMPT y test clínicos para el diagnóstico de síndrome de ojo seco (SOS).** Las correlaciones fueron determinadas para la población total del estudio. ▲: pacientes EICH; ○: controles sanos. Los valores de hiperemia conjuntival, tinción corneal con fluoresceína y tinción conjuntival con verde de Lisamina han sido desplazadas para evitar su coincidencia o “overplotting”. Las líneas a trazos representan el intervalo de confianza del 95%; P-value: p-valor; *Hyperemia*: hiperemia; *Lissamine Green*: verde de Lisamina; *Fluorescein*: fluoresceína; Rho: coeficiente de correlación Spearman.

**Tabla 6. Datos clínicos de los 22 pacientes con EICH ocular del trabajo 2.**

Paciente n	Diagnóstico previo	Tiempo desde TAPH hasta EICH ocular (meses)	Tiempo desde EICH crónico sistémico hasta EICH ocular (meses)	Tratamiento sistémico	Tratamiento tópico interrumpido 7 días antes del estudio
1	Enfermedad de Hodgkin	36	99	Tacrólimus	Suero autólogo Medroxiprogesterona 0,4%
2	Linfoma no Hodgkin	9	45	Ninguno	Suero autólogo Ciclosporina A 0,05%
3	Leucemia linfoblástica aguda	24	63	Ninguno	Ninguno
4	Leucemia mieloide aguda	12	60	Ninguno	Suero autólogo Fluorometolona 0,1%
5	Leucemia mieloide aguda	3	126	Ciclosporina A	Ninguno
6	Enfermedad de Hodgkin	18	67	Ninguno	Ciclosporina A 0,05%
7	Leucemia linfoblástica aguda	12	Desconocido	Ninguno	Ninguno
8	Linfoma no Hodgkin	38	49	Tacrólimus	Suero autólogo Fluorometolona 0,1%
9	Síndrome mielodisplásico	3	81	Tacrólimus	Suero autólogo
10	Leucemia mieloide aguda	36	Desconocido	Ninguno	Ninguno
11	Leucemia mieloide crónica	12	Desconocido	Ninguno	Fluorometolona 0,1%
12	Leucemia mieloide crónica	2	Desconocido	ninguno	Suero autólogo
13	Leucemia mieloide aguda	18	21	Rapamicina Prednisona Imatinib	Fluorometolona 0,1%
14	Síndrome mielodisplásico	1	Desconocido	Rapamicina	Suero autólogo
15	Leucemia linfoblástica crónica	15	Desconocido	Rapamicina Tacrólimus Metilprednisolona	Dexametasona 0,1%
16	Síndrome mielodisplásico	6	26	Prednisona	Suero autólogo
17	Leucemia mieloide crónica	27	10	Rapamicina	Suero autólogo
18	Mieloma múltiple	6	Desconocido	Rapamicina	Suero autólogo

				Talidomida Ciclofosfamida	
19	Síndrome mielodisplásico	2	20	Tacrólimus	Fluorometolona 0,1% Suero autólogo Ciclosporina A 0,05%
20	Síndrome mielodisplásico	6	Desconocido	Tacrólimus	Suero autólogo Hidrocortisona pomada 1,5%
21	Leucemia mieloide crónica	3	Desconocido	Prednisona	Tacrólimus pomada 0,03% Suero autólogo
22	Leucemia mieloide aguda	10	7	Metilprednisolona	Suero autólogo Dexametasona 0,1%

EICH: enfermedad injerto contra huésped; TAPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Tabla 7. Resultados de la exploración oftalmológica en los 22 pacientes con EICH ocular.

	Controles sanos (n=21)	Pacientes con EICH ocular (n=22)	P-valor
Cuestionario OSDI	4,29 ± 5,11	44,58 ± 21,76	<b>&lt;0,0001</b>
Hiperemia conjuntival	0 ± 0	1,5 ± 0,5	<b>&lt;0,0001</b>
T-BUT (segundos)	6,79 ± 2,87	2,39 ± 2,30	<b>&lt;0,0001</b>
Tinción corneal con fluoresceína	0 ± 0	2 ± 1	<b>&lt;0,0001</b>
Tinción conjuntival con verde de Lisamina	0 ± 0	2 ± 1	<b>&lt;0,0001</b>
Test de Schirmer sin anestesia (mm)	13,60 ± 10,25	3,68 ± 2,90	<b>&lt;0,0001</b>

Los datos se presentan como media ± desviación estándar en OSDI, T-BUT, y test de Schirmer. Los datos se presentan como mediana ± rango intercuartílico en hiperemia, tinción corneal con fluoresceína y tinción conjuntival con verde de Lisamina. Los cambios significativos (P <0,05) se indican en negrita. EICH: enfermedad injerto contra huésped. OSDI: Ocular Surface Disease Index; T-BUT: Tear Break-up time.

EGF e IL-17 se detectaron en menos pacientes con EICH ocular que en controles.

Para las otras 13 moléculas, no hubo diferencias significativas en cuanto a su detección entre ambos grupos.

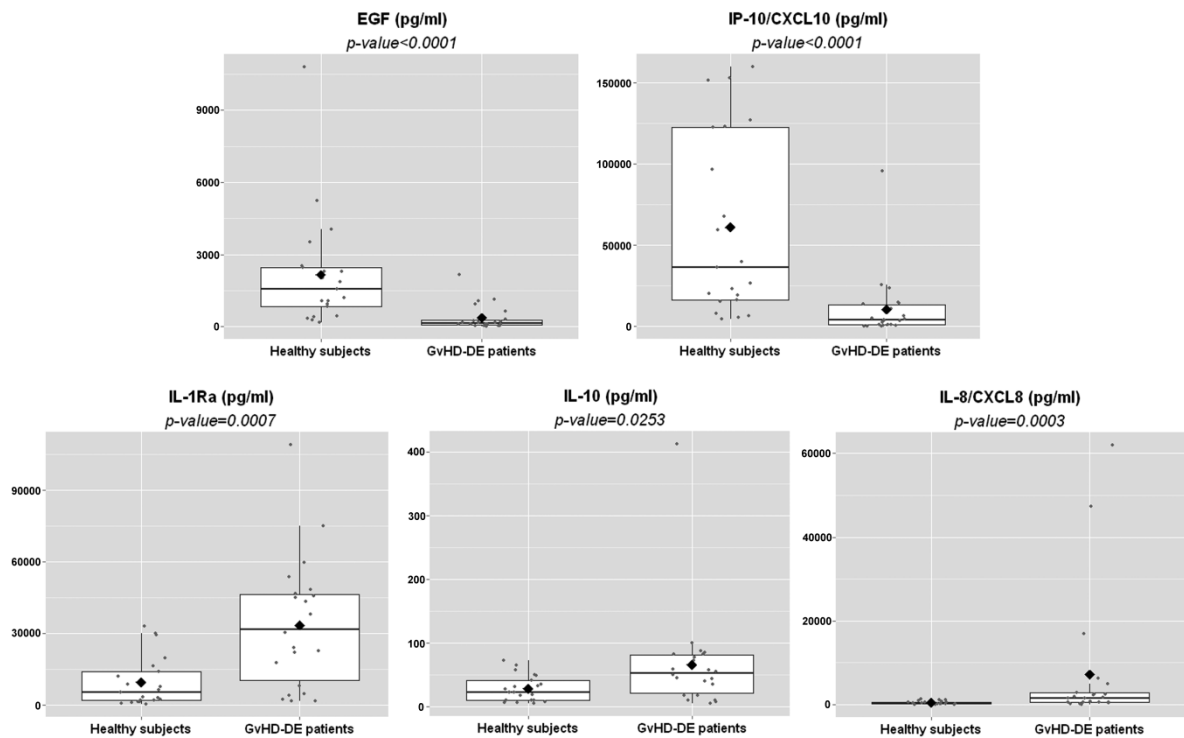
En lo relativo a su concentración, los niveles de EGF e IP-10 se vieron significativamente disminuidos, mientras que IL-1RA, IL-8 e IL-10 por el contrario, estaban incrementados en pacientes EICH comparados con sujetos sanos (Tabla 8, Figura 12).

**Tabla 8. Porcentaje de detección y concentración de las 15 moléculas analizadas en lágrimas de pacientes con EICH ocular y controles sanos**

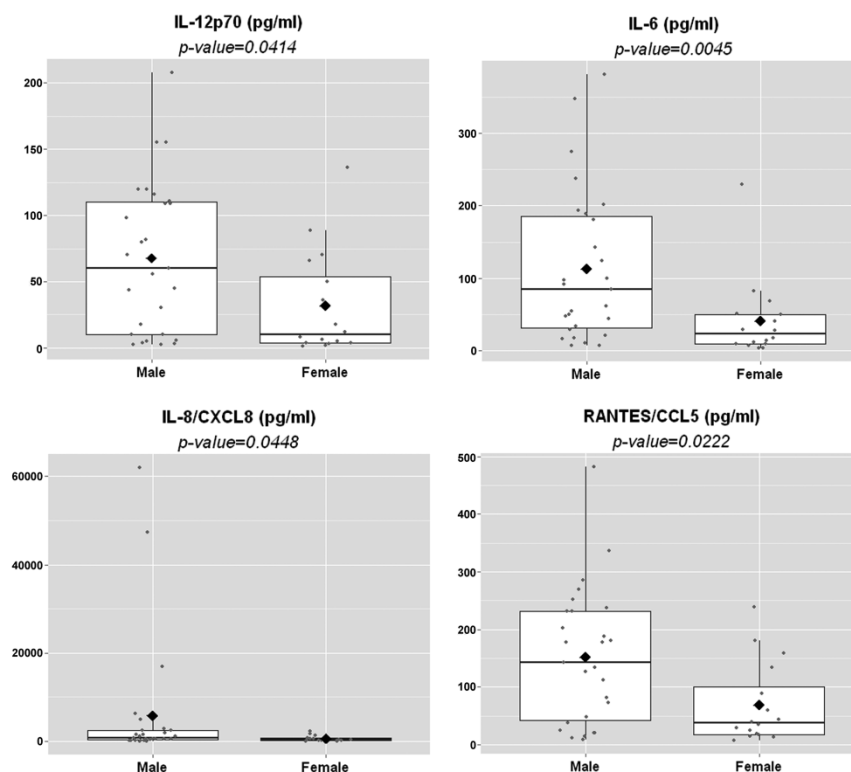
Molécula	Detección %		P-valor	Concentración (pg/ml)		P-valor
	Controles	EICH ocular		Controles	EICH ocular	
EGF	100	77,27	<b>0,0485</b>	2154,71 ± 2385,56	357,83 ± 527,95	<b>&lt;0,0001</b>
Eotaxina	47,62	72,73	0,1703	69,95 ± 61,34	83,75 ± 60,95	0,1936
IFN- $\gamma$	47,62	77,27	0,09	28,24 ± 26,56	36,86 ± 24,31	0,1203
IL-1 $\beta$	57,14	63,64	0,9018	15,71 ± 14,51	84,65 ± 299,02	0,3259
IL-1 Ra	100	90,91	0,4884	9384,52 ± 10474,92	33330,96 ± 26982,06	<b>0,0007</b>
IL-2	71,43	45,45	0,1566	21,84 ± 17,79	20,16 ± 17,44	0,8093
IL-6	80,95	86,36	0,6981	51,44 ± 48,49	119,5 ± 117,4	0,1169
IL-8/ CXCL8	95,24	100	0,4884	385,18 ± 401,72	7131,18 ± 15956,77	<b>0,0003</b>
IL-10	76,19	8,36	0,4566	28,16 ± 20,74	65,7 ± 82,99	<b>0,0253</b>
IL-12 p70	66,67	86,36	0,1623	49,12 ± 55,4	59,32 ± 53,44	0,1331
IL-17 $\alpha$	61,9	22,73	<b>0,0218</b>	20,89 ± 17,74	12,16 ± 12,42	0,1913
IP-10/ CXCL10	100	90,91	0,4884	60999,05 ± 56159,34	10511,33 ± 20431,76	<b>&lt;0,0001</b>
RANTES	80,95	86,36	0,6981	121,74 ± 108,6	120,55 ± 112,58	0,8126
TNF- $\alpha$	66,67	72,73	0,92	20,2 ± 17,19	36,43 ± 74,89	0,3203
VEGF	61,9	81,82	0,2648	415,78 ± 347,08	578,01 ± 528,14	0,4575

Los resultados significativos (P <0,05) se indican en negrita. EICH: enfermedad injerto contra huésped.

Al correlacionar los niveles de citoquinas con parámetros demográficos y clínicos, se encontró que IL-12, IL-6, IL-8 y RANTES tenían niveles más altos en varones que en mujeres tanto de pacientes con EICH ocular como de sujetos control (Figura 13).



**Figura 12. Moléculas con diferencias significativas en sus niveles en lágrima entre los pacientes con Enfermedad Injerto contra Huésped y sujetos sanos.** Los diamantes representan los valores medios. P-value: P-valor; *GVHD-DE*: enfermedad injerto contra huésped ocular; *healthy subjects*: sujetos sanos. Pg/ml: picogramo/mililitro.



**Figura 13. Asociación entre el género y los niveles en lágrima de IL-12p70, IL-6, IL-8 y RANTES.** Los diamantes representan los valores medios. IL; *male*: varones, *female*: mujeres; P-value: P-valor; Pg/ml: picogramo/mililitro.

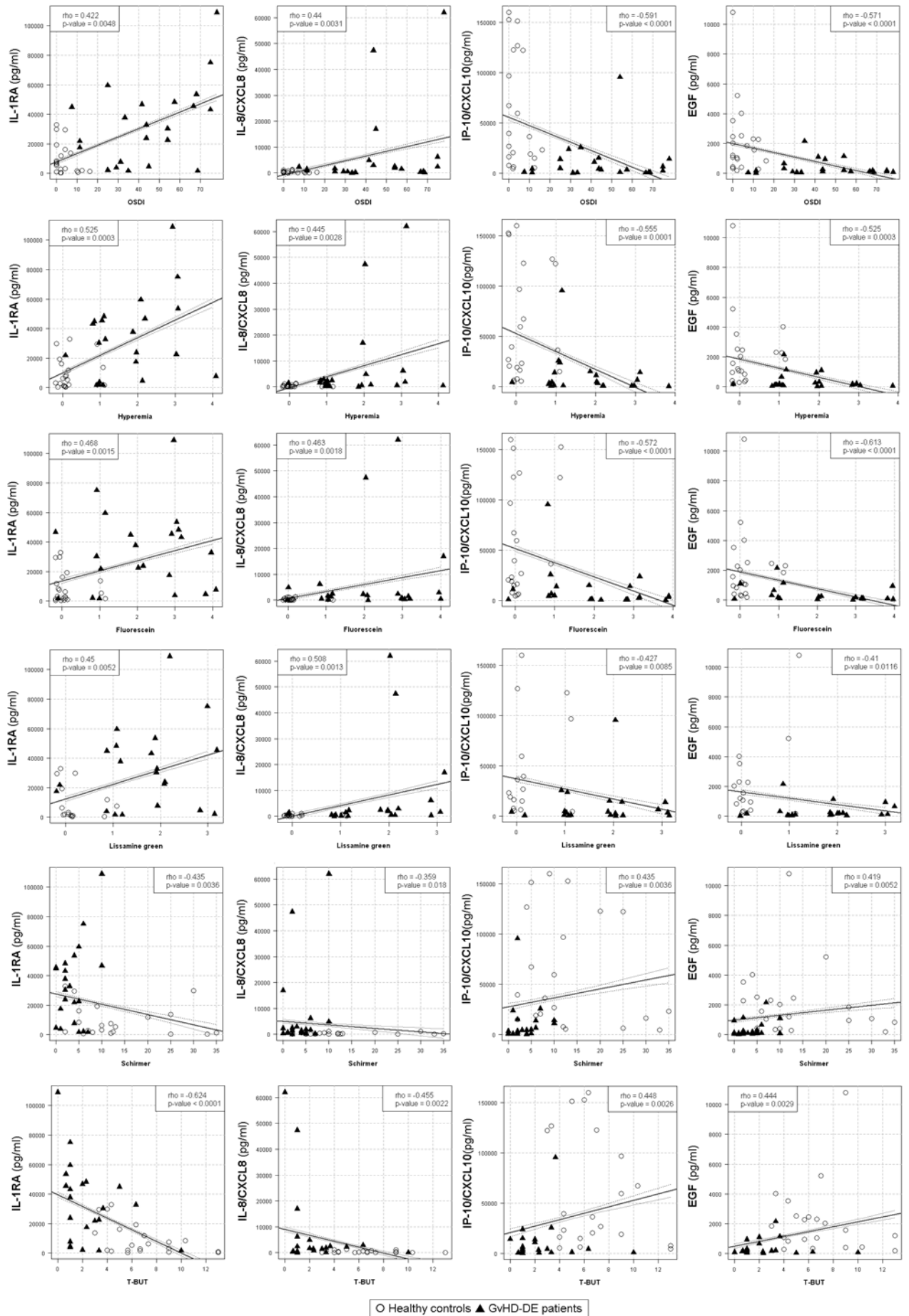


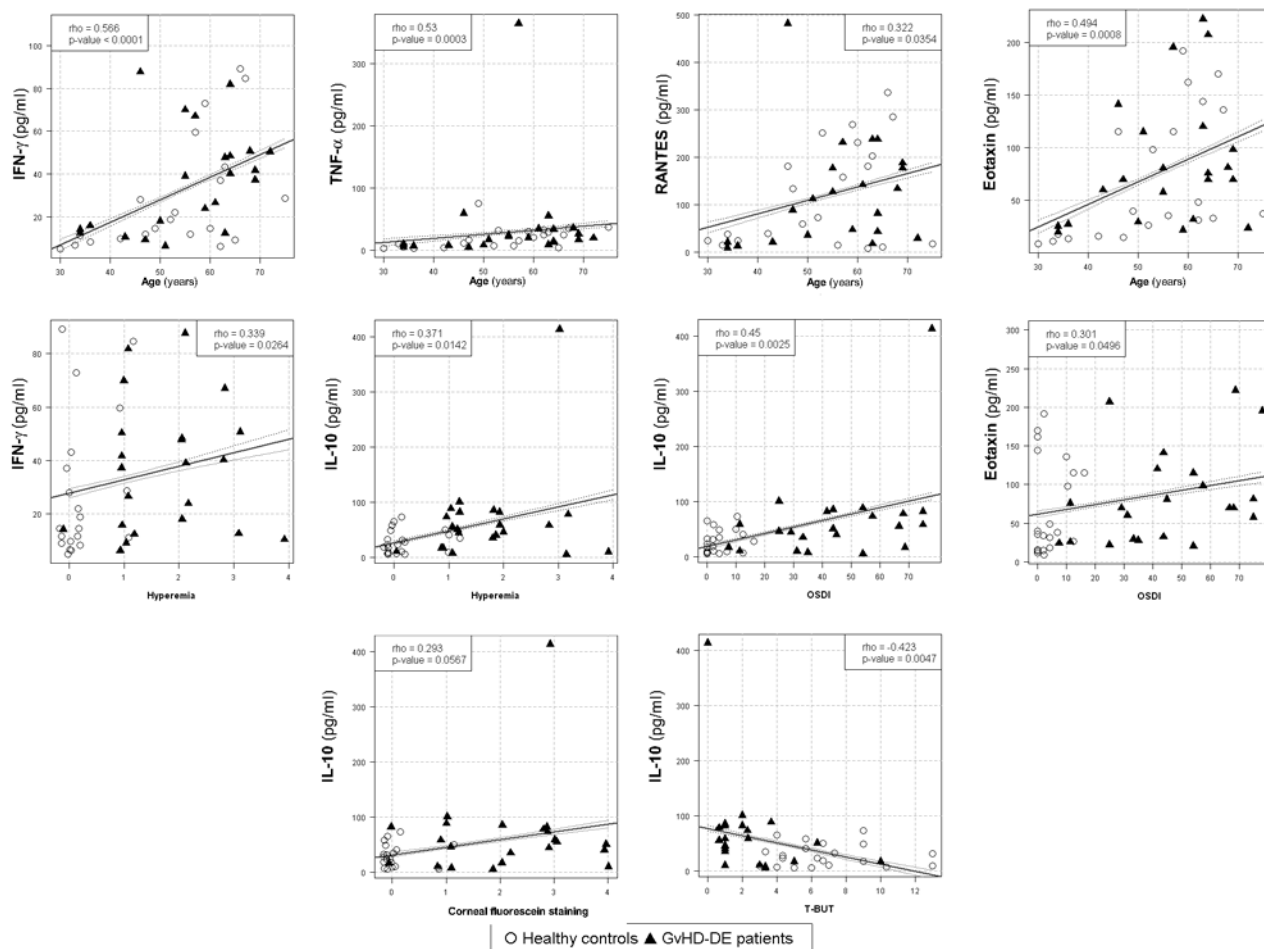
Los niveles en lágrima de IL-1RA e IL-8 se correlacionaron positivamente con la puntuación OSDI, hiperemia conjuntival, tinción con fluoresceína y con verde de Lisamina, mientras que se correlacionaron negativamente con T-BUT y Schirmer (Figura 14). Los niveles de EGF e IP-10 se correlacionaron positivamente con T-BUT y Schirmer, y negativamente con OSDI, hiperemia, fluoresceína y verde de Lisamina. Además, se encontró una correlación positiva entre los niveles de RANTES y TNF- $\alpha$  y la edad de los sujetos, la eotoxina con la edad y la puntuación del cuestionario OSDI, el IFN- $\gamma$  con la edad y la hiperemia, y la IL-10 y OSDI, hiperemia y tinción de fluoresceína corneal. Esta correlación fue negativa entre IL-10 y T-BUT.

### **7. B. III. Modelo predictivo multivariable y validación interna**

Por medio de un análisis de regresión logística para cada una de las citoquinas, ajustada por edad y género, se demostró que niveles elevados en lágrima de EGF e IP-10 se comportaron como factores protectores, mientras que niveles altos de IL-8 e IL-1Ra como como factores de riesgo para el desarrollo de EICH ocular (Tabla 9).

Las moléculas EGF, IL1-Ra, IL2, IL-8, IP-10, RANTES, TNF $\alpha$  y VEGF mostraron una buena capacidad de clasificación, siendo estadísticamente significativa, mostrando valores de AUC diferentes de 0,5, lo que correspondería a la acción del azar. Se realizó una búsqueda exhaustiva para seleccionar el mejor subconjunto de citoquinas y quimioquinas para el modelo final. Los mejores modelos, basados en el valor más bajo del criterio Akaike se muestran en la Tabla 10.





**Figura 14. Correlaciones entre los niveles en lágrima de IL-1Ra, IL-8, IP-10, EGF y test clínicos para el diagnóstico de SOS.** Las correlaciones fueron determinadas para la población total del estudio.  $\blacktriangle$ : pacientes EICH;  $\circ$ : controles sanos. Los valores de hiperemia, tinción con fluoresceína y tinción con verde de Lisamina han sido desplazados para evitar su coincidencia u “overplotting”. Las líneas a trazos representan el intervalo de confianza del 95%; P-value: p-valor; GVHD-DE: enfermedad injerto contra huésped ocular; *hyperemia*: hiperemia; *Lissamine Green*: verde de Lisamina; *Fluorescein*: fluoresceína; Rho, coeficiente de correlación Spearman.

Las variables incluidas en el modelo multivariado son aquellas que mostraron un P valor menor de 0,1 individualmente, es decir, EGF, IP-10, IL-17, IL-8 e IL-1 IL-1Ra y las variables de confusión edad y género. Los modelos M0, M1, M2, M3, M4, M5 y M6, están basados en variables 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. El mejor modelo por tamaño es aquel con un menor criterio Akaike por lo tanto, el modelo M2, basado en dos citoquinas, IL-8 e IP-10, junto con la edad y el género, fue identificado como el modelo óptimo, con

una *odds ratio* de 3,37 y 0,23 respectivamente. Para determinar la validez del modelo construido, se procedió a su validación interna mediante el procedimiento LOOCV.

**Tabla 9. Estimación de *odds ratio* (OR) para cada una de las moléculas en lágrima, ajustadas por edad y género.**

Molécula	OR	IC 95% de OR		P-valor	AUC	IC 95% de AUC	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
EGF	<b>0,3881</b>	<b>0,2302</b>	<b>0,6545</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,8333</b>	<b>0,7073</b>	<b>0,9594</b>
Eotaxina	1,3538	0,7494	2,4453	0,3154	0,3961	0,2196	0,5726
IFN- $\gamma$	1,5635	0,7963	3,0697	0,1942	0,5455	0,3673	0,7236
IL-1 $\beta$	1,1648	0,8254	1,6439	0,3854	0,6472	0,4792	0,8152
IL-1 Ra	<b>1,7720</b>	<b>1,2091</b>	<b>2,5971</b>	<b>0,0034</b>	<b>0,7078</b>	<b>0,5476</b>	<b>0,868</b>
IL-2	0,8687	0,5246	1,4383	0,5842	<b>0,6861</b>	<b>0,5233</b>	<b>0,849</b>
IL-6	1,3057	0,8859	1,9243	0,1777	0,539	0,3596	0,7184
IL-8/CXCL8	<b>1,7878</b>	<b>1,2060</b>	<b>2,6501</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,7446</b>	<b>0,5936</b>	<b>0,8956</b>
IL-10	1,6817	0,9967	2,8373	<i>0,0515</i>	0,5649	0,3847	0,7452
IL-12 p70	1,2188	0,8908	1,6676	0,2160	0,4156	0,2313	0,5999
IL-17A	0,6397	0,3834	1,0674	0,0872	0,4892	0,3083	0,6701
IP-10 /CXCL10	<b>0,4501</b>	<b>0,2766</b>	<b>0,7323</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,8182</b>	<b>0,69</b>	<b>0,9464</b>
RANTES	0,9491	0,6275	1,4355	0,8044	<b>0,7424</b>	<b>0,5919</b>	<b>0,893</b>
TNF- $\alpha$	1,1965	0,6958	2,0574	0,5166	<b>0,6905</b>	<b>0,5287</b>	<b>0,8523</b>
VEGF	1,1107	0,7542	1,6358	0,5951	<b>0,71</b>	<b>0,5538</b>	<b>0,8661</b>

Los resultados significativos se indican en negrita. Los valores P límite ( $0,05 < P < 0,08$ ) se indican en cursiva. Se muestra el área bajo la curva (AUC) para cada uno de los modelos de una única molécula. OR: Odds Ratio. IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

El Brier Score obtenido se correspondió con el de un modelo preciso (Tabla 11).

Además, las medidas CL y CS, junto con el test de *Hosmer-Lemeshow*, indicaron la ausencia de problemas de calibración. El modelo obtuvo un AUC de 0,9004, con una sensibilidad de 86,36% y una especificidad de 95,24%.

**Tabla 10. Clasificación de modelos de regresión logística multivariante de EICH ocular por tamaño (número de variables).**

	Edad	Género	EGF	IL-10	IL-17	IL-1Ra	IL-8	IP-10	AIC
M0	✓	✓							64,64
M1	✓	✓	✓						49,90
M2	✓	✓					✓	✓	26,32
M3	✓	✓	✓				✓	✓	26,72
M4	✓	✓			✓	✓	✓	✓	26,50
M5	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	28,27
M6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*

Las variables incluidas en el modelo multivariado son aquellas que mostraron un valor de  $P < 0,1$  individualmente. M: modelo. AIC: criterio Akaike. \* El modelo completo no es un modelo válido. EICH: enfermedad injerto contra huésped. M0-M6: modelos 0-6.

**Tabla 11. Validación interna del modelo predictivo de EICH ocular basado en niveles de IL-8 e IP-10.**

Precisión	Calibración			Discriminación		
Brier Score (IC 95%)	Calibration in the large (IC 95%)	Calibration Slope (IC 95%)	Hosmer-Lemeshow p-valor	AUC (IC 95%)	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)
0,1018 (0,035-0,1853)	-0,2918 (-1,2163-0,6326)	0,7463 (0,4194-1,0731)	0,3866	0,9004 (0,7936-1)	86,36 (72,02-100)	95,24 (86,13-100)

EICH: Enfermedad Injerto contra Huésped. IC 95%: Intervalo de confianza del 95%. AUC: Área bajo la curva ROC.

#### 7. B. IV. Clasificación de una cohorte externa de pacientes con SOS no asociado a EICH

Con el fin de evaluar la capacidad del modelo ajustado para clasificar adecuadamente individuos con otro tipo de SOS distinto de EICH ocular, éste fue probado en una nueva cohorte de pacientes para observar el modo en que el modelo construido clasificaba a estos pacientes según los niveles en lágrima de IL-8 e IP-10. Este nuevo grupo estaba formado

por 48 pacientes, 14 con SOS severo asociado a SS y 34 con SOS leve-moderado no asociado a SS, y 32 controles sanos de estudios previamente publicados de nuestro grupo.<sup>43-45</sup> Los resultados mostraron que el modelo predictivo basado en IL-8 e IP-10 tenía un 100% de especificidad al clasificar los controles y pacientes con SOS leve-moderado; Los pacientes con SOS severo fueron correctamente clasificados como negativos para EICH ocular en el 78,57% de los casos, lo que le convierte en una herramienta útil en la práctica y específica (Tabla 12).

**Tabla 12. Rendimiento del modelo predictivo para la clasificación de un grupo de pacientes con SOS leve-moderado no asociado a SS, SOS severo asociado a SS, y controles sanos.**

	Bien clasificados (n)	Mal clasificados (n)	Porcentaje de individuos bien clasificados	
			%	IC 95%
Controles sanos	32	0	100	86,66-100
SOS leve-moderado no asociado a SS	34	0	100	87,36-100
SOS severo asociado a SS	11	3	78,57	48,82-94,29
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>3</b>	<b>96,25</b>	<b>88,68-99,03</b>

SOS: síndrome de ojo seco; SS: síndrome de Sjögren; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

## 7. C. RESULTADOS DEL TRABAJO 3

### 7. C. I. Evaluación clínica

La muestra final analizada consistió en 25 pacientes. De los 36 participantes inicialmente reclutados, tres tuvieron una evolución rápida de su enfermedad subyacente y no pudieron someterse al trasplante. Cinco pacientes fueron excluidos debido a que sufrían SOS antes del TAPH, lo cual constituía un criterio de exclusión del estudio. Además, tres pacientes no pudieron dar muestras de lágrima, y por lo tanto no se pudieron incluir en el análisis.

De estos 25 pacientes (15 varones, 10 mujeres; media  $44,1 \pm 15,4$  años, rango 18-63 años) finalmente considerados, en 12 de ellos no pudo completarse el seguimiento, debido a que 6 fallecieron por complicaciones del proceso de trasplante, cuatro a causa de progresión de la enfermedad hematológica subyacente, uno fue seguido en otro centro, y uno se perdió debido a causas desconocidas. Los datos clínicos de estos pacientes están recogidos en la tabla 13.

El tiempo medio de seguimiento fue de  $19 \pm 16,4$  meses (rango, 1-43 meses). El número de pacientes atendidos en cada visita fue V0: 25, V1: 16, V2: 11, V3: 9, V4: 6, V5: 4, V6: 3, V7: 3, V8: 4 y V9: 12. Además, cuatro pacientes fueron vistos en visita no programada.

En total, 12 (48%) pacientes desarrollaron EICH agudo en un tiempo de 2,2 meses estimado por el método de Kaplan Meier, y 16 (64%) desarrollaron EICH crónico sistémico en 15 meses. Entre los pacientes que fueron diagnosticados con EICH crónico sistémico, 10 (62,5%) desarrollaron EICH ocular 33 meses después del TAPH.

### **7. C. II. Detección y concentración de moléculas en lágrima**

Para cada una de las 19 moléculas estudiadas, se analizó el porcentaje de detección y concentración en lágrima (Tabla 14). Las moléculas detectadas en más del 50% de las muestras se trataron como variables cuantitativas y se muestran los datos de concentración, utilizándose la imputación para determinar los valores *LOW*.

Las moléculas detectadas en el 20-50% de las muestras fueron tratadas como variables cualitativas, mostrándose los datos de detección. Por último, las moléculas que se detectaron en menos de un 20% de los individuos no fueron analizadas.

**Tabla 13. Datos clínicos de los pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.**

<b>Total pacientes (n)</b>	<b>25</b>
<b>Edad (media ± DEM, rango en años)</b>	44,1 ± 15,42 (18-63)
<b>Mujeres/varones</b>	10/15
<b>Enfermedad de base (n, %)</b>	
Enfermedades mieloproliferativas crónicas	0 (0)
Enfermedades mielodisplásicas / mieloproliferativas	0 (0)
Síndromes mielodisplásicos	2 (8)
Leucemias mieloides agudas	6 (24)
Enfermedades de las células B	6 (24)
Enfermedades de las células T y NK	8 (32)
Enfermedad de Hodgkin	2 (8)
Enfermedades de las células plasmáticas	0 (0)
Neoplasias de histiocitos y células dendríticas	0 (0)
Otros diagnósticos	1 (4)
<b>Fuente de células madre hematológicas (n, %)</b>	
Médula ósea	4 (16)
Sangre periférica	20 (80)
Sangre de cordón umbilical	1 (4)
<b>Relación donante-receptor (n, %)</b>	
Relacionados	12 (48)
No relacionados	13 (52)
<b>Tipo de régimen de acondicionamiento (n, %)</b>	
No ablativo	15 (60)
Mieloablativo	10 (40)

DEM: desviación estándar de la media



**Tabla 14. Porcentaje de detección y concentración en lágrima de las 19 moléculas analizadas al inicio del estudio (Visita V0), 30-7 días antes del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.**

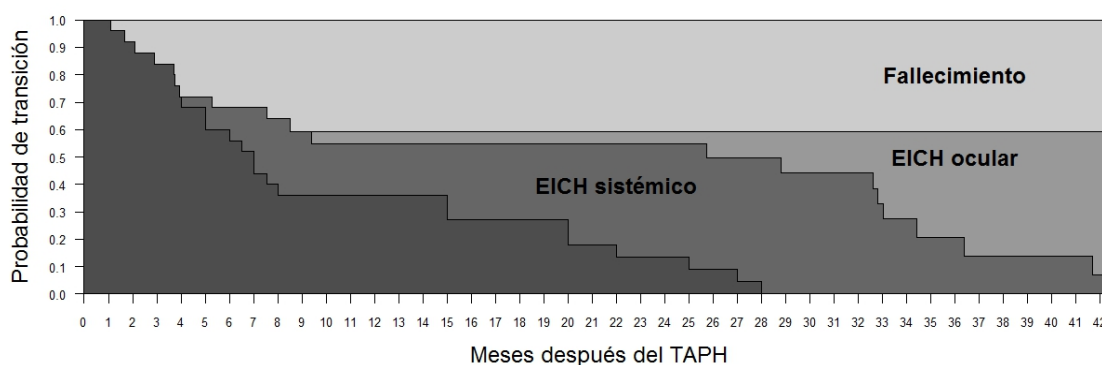
Molécula	Porcentaje de detección (n)	Molécula descartada	Molécula detectada	Concentración (pg/ml)
EGF	72,0 (18)			522,18 ± 668,48
Eotaxina	8,0 (2)	✓		
Fractalquina	64,0 (16)			529,29 ± 634,64
IFN-γ	20,0 (5)		✓	
IL-1β	56,0 (14)			30,59 ± 32,58
IL-1Ra	96,0 (24)			1708,85 ± 2031,69
IL-2	4,0 (1)	✓		
IL-4	4,0 (1)	✓		
IL-5	4,0 (1)	✓		
IL-6	20,0 (5)		✓	
IL-8	92,0 (23)			363,88 ± 410,61
IL-10	24,0 (6)		✓	
IL-12 p70	20,0 (5)		✓	
IL-13	36,0 (9)		✓	
IL-17 <sup>a</sup>	4,0 (1)	✓		
IP-10	100 (25)			16628 ± 21893,37
RANTES	28,0 (7)		✓	
TNF-α	4,0 (1)	✓		
VEGF	8,0 (2)	✓		

Pg/ml: picogramos/mililitro.

### 7. C. III. Estimación del proceso multiestado

Se desarrolló un MSM de cuatro estados, representando los tres estados posibles (EICH crónico sistémico, EICH ocular y muerte) de un paciente dado después de ser trasplantado, considerando el TAPH como el estado inicial en todos los casos, así como las probabilidades

de transición entre los cuatro estados (Figura 9), de manera que después de someterse al trasplante, el paciente puede fallecer o desarrollar EICH sistémico y, tras este, el paciente puede fallecer o desarrollar EICH ocular. La muerte de los pacientes ocurrió entre 1 y 8 meses después del TAPH; el EICH sistémico apareció a partir de los 4 meses de seguimiento, mientras que el EICH ocular se observó a partir de los 9 meses. Al final del período de seguimiento, 43,3 meses después del trasplante, el 40% de los pacientes habían fallecido, el 10% había desarrollado EICH sistémico sin complicaciones oculares y el 50% restante había desarrollado EICH ocular (Figura 15).



**Figura 15. Estimación de probabilidades de transición utilizando el estimador de Aalen Johansen.** Cada transición del TAPH se representa mediante una curva. Las probabilidades tienden a unirse y la distancia entre dos curvas adyacentes indica la probabilidad de transición del estado correspondiente. TAPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; EICH: enfermedad injerto contra huésped.

Los resultados de la exploración oftalmológica de los pacientes en cada uno de los estados se muestran en la Tabla 15.

#### 7. C. IV. Efecto de las características basales individuales

Se analizó el efecto de cada una de las características individuales recogidas en la visita previa al trasplante o V0: edad en el trasplante, género del receptor y del donante,

régimen de acondicionamiento, relación entre donante y receptor, y origen de las células madre. No se vio influencia de estas características sobre ninguno de los estados y transiciones considerados en el modelo.

**Tabla 15. Resultados de la exploración ocular en cada uno de los estados considerados en el modelo multiestado.**

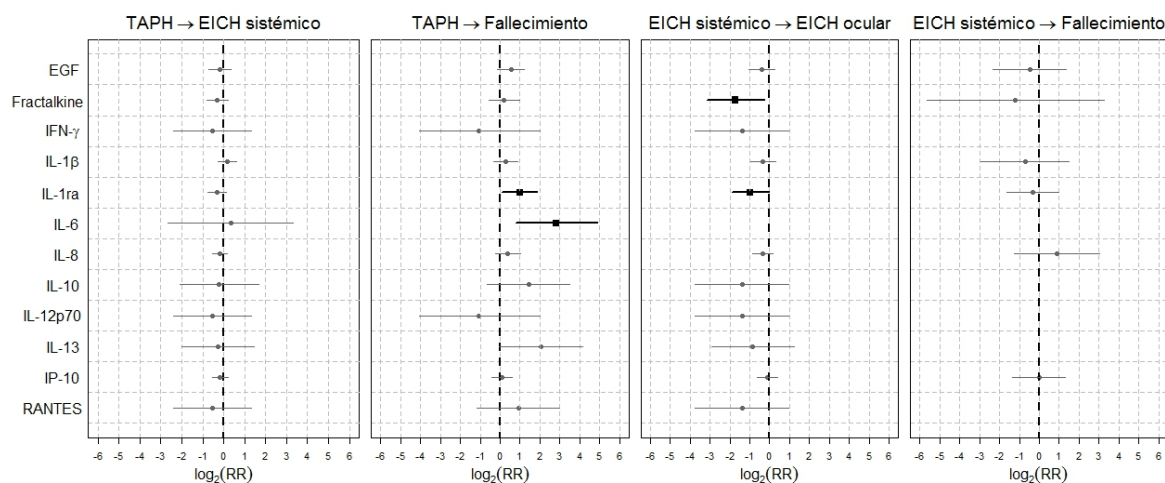
Test	Visita previa VO (n=25)	EICH crónico sistémico (n=16)	EICH ocular (n=10)	Muerte (n=10)
Cuestionario OSDI	0,52 ± 1,13	12,28 ± 23,82	33,33 ± 28,93	0 ± 0
T-BUT (seg)	9,64 ± 3,72	8 ± 4,18	4,9 ± 4,33	8,6 ± 2,88
Tinción corneal con fluoresceína	1 ± 1	2 ± 2	3 ± 1,5	0 ± 1
Tinción conjuntival con rosa de Bengala	1 ± 1	2 ± 2	3 ± 1,5	0 ± 0,75
Test de Schirmer sin anestesia (mm)	9,64 ± 3,72	12,56 ± 7,92	5,9 ± 5,69	13,2 ± 8,2

Los datos se presentan como media ± desviación estándar en OSDI, T-BUT, y test de Schirmer. Los datos se presentan como mediana ± rango intercuartílico en tinción corneal con fluoresceína y tinción conjuntival con rosa de Bengala. EICH: enfermedad injerto contra huésped; OSDI: Ocular Surface Disease Index; T-BUT: *Tear Break-up Time*.

Entre las moléculas estudiadas, sólo fractalquina, IL-1Ra e IL-6 demostraron una influencia significativa en las diferentes transiciones estudiadas (Figura 16). Los altos niveles de fractalquina antes del trasplante disminuyeron significativamente el riesgo de desarrollar EICH ocular, de modo que, para cada aumento en una unidad de esta, el riesgo de desarrollar EICH ocular se redujo 3,3 veces.

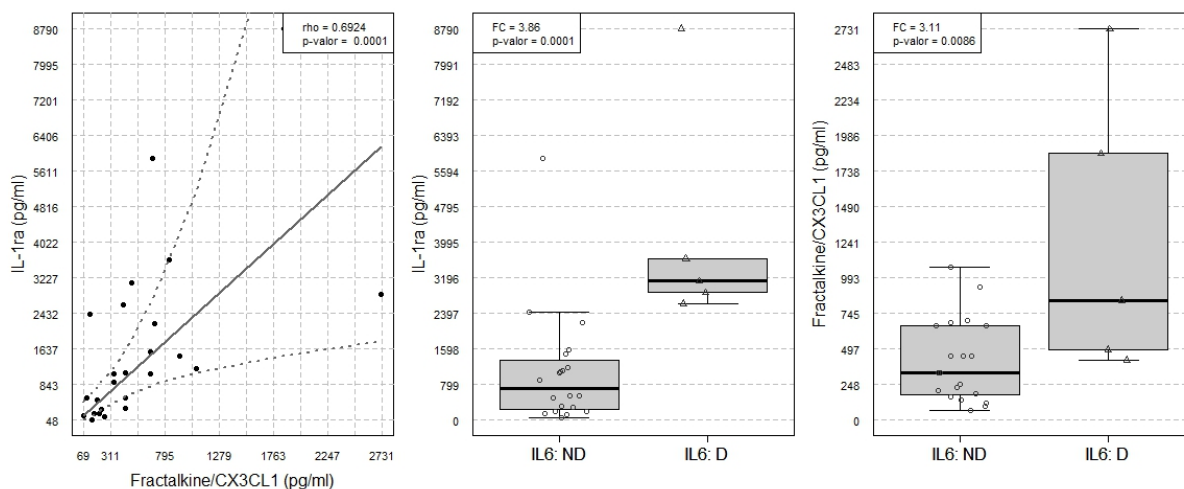
La IL-1Ra tuvo dos efectos sobre las transiciones del modelo. Un aumento de una unidad antes del trasplante aumentó en 2 veces el riesgo de muerte antes del desarrollo de la EICH sistémico. Por otro lado, el mismo aumento disminuyó en 2 veces el riesgo de desarrollar EICH ocular.

Por último, la presencia de IL-6 antes del trasplante aumentó significativamente el riesgo de muerte del paciente. La IL-6 se detectó en la lágrima de sólo un 20% de los pacientes y, debido a este bajo porcentaje de detección, se incluyó en el modelo como una variable cualitativa y se estudió su detección/no detección. La detección de IL-6 antes del trasplante aumentó el riesgo de muerte del paciente 7 veces.



**Figura 16. Estimación del riesgo relativo (RR) de cada molécula en las 4 transiciones consideradas en el modelo.** Los puntos indican el logaritmo en base 2 del riesgo relativo estimado  $\text{Log}_2(\text{RR})$ , y las líneas horizontales representan el intervalo de confianza (IC) del 95% para cada molécula en cada transición. Hay un riesgo mayor o menor si la línea horizontal se sitúa a la derecha o a la izquierda, respectivamente, de la línea sin efecto (línea vertical) y no la cruza. El riesgo no es significativo si la línea horizontal cruza la línea vertical. Los espacios en blanco corresponden a efectos no estimables; EICH: enfermedad injerto contra huésped.

Además, estas 3 variables se encontraron positivamente relacionados entre sí, lo que significa que los mayores niveles de fractalquina e IL-1Ra se encontraron en pacientes donde se detectó IL-6 (Figura 17).



**Figura 17. Relaciones entre fractalquina, IL-1Ra e IL-6.** ND: no detectada; D: detectada; FC: factor de correlación; Rho: coeficiente de correlación Spearman; Pg/ml: picogramos/mililitro.

### 7. C. V. Construcción del modelo multiestado

Usando el sistema de PCA supervisado, se construyó una nueva variable, formada por la combinación de las 3 moléculas significativas del modelo: IL-6, IL-1Ra y fractalquina. Esta nueva variable representa el 73% de toda la variabilidad de la muestra, y fue denominada PC1. Las tres moléculas originales que la integran se correlacionaron positivamente con ella, por lo que un valor más alto de esta variable se corresponde a niveles mayores de fractalquina e IL-1Ra, y a una mayor detección de IL-6. Esta nueva variable demostró un efecto estadísticamente significativo en dos transiciones: de TAPH a muerte y de EICH sistémico a EICH ocular. En el primer caso, un aumento de una unidad en PC1 (es decir, los niveles más altos de estas 3 moléculas) aumentaría el riesgo de muerte antes de desarrollar EICH sistémico 1,6 veces. En el segundo caso, un aumento de una unidad en PC1 reduciría el riesgo de desarrollar EICH ocular 3,3 veces (Tabla 16).

**Tabla 16. Efecto de la nueva variable construida con los niveles en lágrima de fractalquina, IL-1Ra e IL-6 en las transiciones entre los estados considerados en el modelo multiestado.**

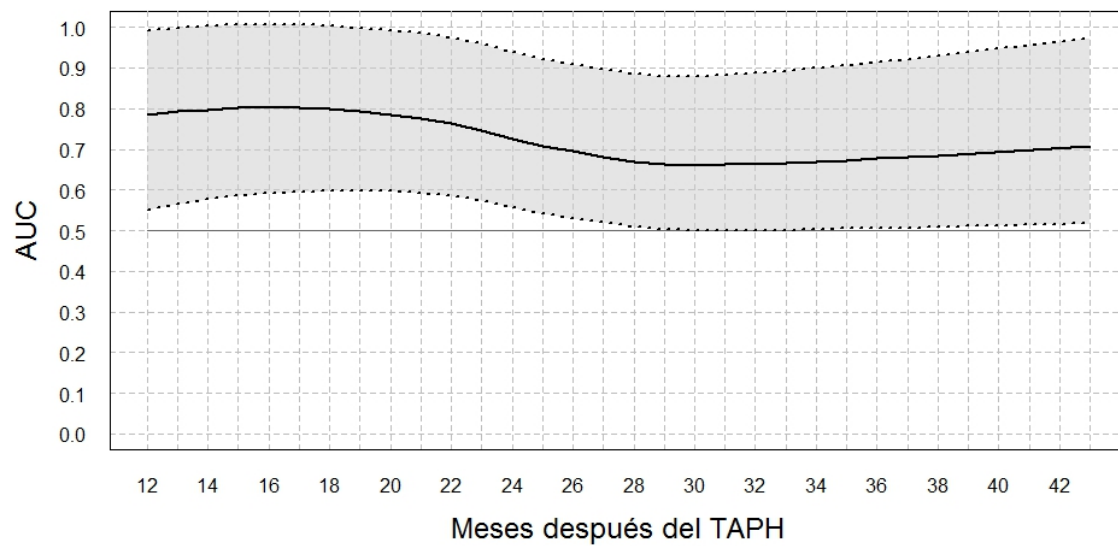
Transición	P-valor	RR	IC 95% del RR		Log fold change
			Inferior	Superior	
Trasplante a EICH sistémico	0,2804	0,787	0,51	1,216	-1,27
Trasplante a muerte	<b>0,0336</b>	<b>1,631</b>	<b>1,039</b>	<b>2,562</b>	<b>1,63</b>
EICH sistémico a EICH ocular	<b>0,034</b>	<b>0,299</b>	<b>0,098</b>	<b>0,913</b>	<b>-3,34</b>
EICH sistémico a muerte	0,5847	0,55	0,064	4,695	-1,82

EICH: enfermedad injerto contra huésped; RR: riesgo relativo. *Log fold change*: cambio en el RR. IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

#### 7. C. VI. Validación interna del modelo multivariable

El proceso general de modelado se repitió con 1000 muestras bootstrap. Las tres moléculas finalmente seleccionadas: IL-6, IL-1Ra y fractalquina aparecieron en más del 69% de las muestras de bootstrap. Específicamente, la frecuencia de selección en muestras de bootstrap fue de 87,9%, 82,6% y 69,4% para IL-1Ra, IL-6 y fractalquina, respectivamente.

La capacidad discriminatoria del modelo, calculada de acuerdo con el AUC de la curva ROC, y considerando el desarrollo de EICH ocular el principal evento de interés, mostró un valor entre 67% y 80% durante todo el seguimiento (Figura 18). Por lo tanto, el modelo resultó ser preciso en la predicción de la aparición de EICH ocular en este estudio.



**Figura 18. Área bajo la curva (AUC) correspondiente a la transición de EICH sistémico a EICH ocular para el en modelo multivariable basado en los niveles de fractalquina, IL-1Ra e IL-6 durante todo el seguimiento. TAPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; EICH: enfermedad injerto contra huésped.**





## 8. DISCUSIÓN



En la presente tesis doctoral se trató, mediante la realización de los 3 trabajos expuestos, de ahondar en el conocimiento de la patogénesis del EICH ocular. Como se ha comentado, se trata de una enfermedad cada día más frecuente en nuestro medio, que afecta de forma muy importante a la visión y a la calidad de vida de los pacientes que la sufren, y de la que existe, aún hoy en día, un relativo desconocimiento. Este desconocimiento es la mayor limitación que encuentran los profesionales sanitarios que atienden a los pacientes con EICH ocular, ya que impide el desarrollo y limita la aparición de nuevas pruebas diagnósticas, más objetivas y fiables. En este estudio, se ha pretendido identificar moléculas que estén específicamente involucradas en los mecanismos patogénicos de esta enfermedad, utilizarlas como biomarcadores con fines diagnósticos e, incluso, a través de ellas, predecir el desarrollo de EICH ocular antes de realizar el TAPH.

De acuerdo con los resultados de este estudio, los pacientes con EICH ocular presentan alteraciones en la expresión de ARN de numerosos genes de moléculas relacionadas con la inflamación en células del epitelio conjuntival, así como en los niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima al compararse con sujetos sanos. Además, los modelos basados en biomarcadores que se han desarrollado podrían convertirse en buenas herramientas diagnósticas y predictoras de esta enfermedad.

Los hallazgos de cada uno de los 3 trabajos que constituyen esta tesis será discutido en profundidad a continuación.

#### **8. A. EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS DEL EPITELIO CONJUNTIVAL (TRABAJO 1)**

En el presente estudio se analizó la expresión de un panel de mediadores inflamatorios en células epiteliales conjuntivales de pacientes con EICH ocular. Se eligieron genes que codifican moléculas relacionadas con la inflamación, debido a que las

dos patologías objeto del estudio, el **EICH y el SOS, han demostrado tener una etiología inflamatoria**. Está bien establecido que tanto citoquinas como quimioquinas juegan un papel fundamental en la coordinación y mantenimiento del proceso inflamatorio, y numerosos estudios ya han demostrado el aumento de determinadas citoquinas y quimioquinas en lágrima y suero de pacientes con procesos inflamatorios crónicos de la superficie ocular, como SOS, alergia ocular y otros.<sup>30,39,97-100</sup> Las proteínas codificadas por los 84 genes estudiados han demostrado, además, que juegan un papel importante en la movilización y reclutamiento de células inmunes en los tejidos afectados.<sup>50</sup>

#### **8. A. I. Exploración oftalmológica**

La evaluación clínica de los pacientes reclutados reveló que todos ellos padecían un SOS moderado-severo, como se demuestran los resultados de la exploración clínica. Los pacientes con EICH ocular mostraron significativamente más síntomas de SOS evaluados a través del cuestionario OSDI, un Schirmer más bajo y valores de T-BUT considerablemente disminuidos en comparación con controles sanos. La integridad de la superficie ocular, según el resultado de la tinción con fluoresceína y verde de Lisamina, se vio significativamente alterada en estos pacientes en comparación con los controles. Sin embargo, los resultados de la exploración no fueron tan llamativos como cabría esperar, debido a que se excluyó del estudio a los pacientes que no pudieran interrumpir el uso de tratamiento tópicos (incluido el colirio de suero autólogo) durante una semana, como lo exigían los criterios de inclusión. El motivo de esta restricción radica en que los datos del estudio serían mucho menos fiables si los pacientes estuvieran usando fármacos antiinflamatorios tópicos, mientras que, en los pacientes con afectación más severa, no nos pareció ética esta retirada del tratamiento, por lo que estos pacientes no fueron elegibles.

### 8. A. II. Expresión diferencial de genes y modelo basado en la expresión génica

De los 84 genes estudiados en células del epitelio conjuntival, 34 tuvieron una expresión diferente en los pacientes con EICH ocular al compararlos con los controles de forma estadísticamente significativa. Los que demostraron las diferencias más marcadas fueron IL-6, IL-9, CCL24, CCL18, IL-10, IFN- $\gamma$ , CCL2 y EGFR. Algunas de las proteínas codificadas por estos genes ya se han relacionado con EICH o con SOS.<sup>30,101,102</sup> Al observar los cambios en la expresión del ARNm, estos resultados nos dan información sobre qué vías inflamatorias pueden estar activas en la enfermedad.

Los modelos predictivos basados en múltiples biomarcadores pueden aumentar la sensibilidad, la especificidad y el rendimiento predictivo o diagnóstico en comparación con el uso de modelos basados en una única molécula. Estos modelos han sido ya utilizados en el pasado para el estudio de EICH sistémico, como el descrito por Paczesny et al, que determinaron que un panel de cuatro biomarcadores detectados en suero: IL-2R $\alpha$ , TNFR1, IL-8 y HGF, era capaz de diferenciar correctamente a los pacientes con EICH agudo de controles.<sup>49</sup> Más recientemente, el mismo grupo estableció un nuevo panel de tres biomarcadores en suero, compuesto por IL-2Ra, TNFR1 y elafina.<sup>63</sup> Este pudo probarse de forma prospectiva en diferentes momentos de la historia natural de la enfermedad, mostrando una buena especificidad (75%), aunque su sensibilidad no resultó muy alta (57%), para el desarrollo de EICH agudo. Además, otros grupos de investigación han establecido diferentes modelos basados en biomarcadores de EICH.<sup>64,65</sup>

En este trabajo, quisimos aplicar esta tecnología para obtener un diagnóstico preciso y la predicción de las complicaciones oculares del EICH. Los tres modelos predictivos que utilizamos, basados en los análisis SDA, SVM y kNN, resultaron apropiados para el tamaño pequeño de la muestra y un gran número de conjuntos de datos, como el

del presente estudio.<sup>103</sup> **De acuerdo con los resultados obtenidos por estos métodos, un panel de cuatro genes, EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT, produjo el mejor modelo para determinar la existencia de EICH ocular.**

**a) EGFR**

EGFR, que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico, fue el único gen que se encontró regulado negativamente en los pacientes con EICH ocular. EGFR es uno de los receptores más específicos en el campo de la oncología, donde sus inhibidores han demostrado ser eficaces a la hora de tratar algunos tipos de neoplasias.<sup>104</sup> Además, EGFR se expresa en células del epitelio corneal, donde se sabe que desempeña un papel fundamental en la regeneración celular necesaria para la cicatrización de heridas corneales.<sup>105</sup> La activación de este gen se ha visto que puede ser eficaz en la reducción del tiempo de reepitalización corneal, y por ello, puede tener un papel esencial en el tratamiento del SOS severo.<sup>106</sup> De hecho, la forma soluble de EGFR se ha encontrado significativamente incrementada en lágrima de pacientes con SOS, en comparación con controles sanos.<sup>107</sup> Hasta donde sabemos, no se ha descrito en muestras oculares de pacientes con EICH ocular ni en pacientes con EICH sistémico.

**b) IL-6**

En contraste con EGFR, IL-6 es una molécula bien conocida en EICH. Se trata de una citoquina multifuncional, implicada en la regulación de la respuesta inmune, la hematopoyesis y los fenómenos de inflamación, y hay evidencias que sugieren que desempeña un papel fundamental en la conexión de la inmunidad innata y adquirida.<sup>108</sup> Además, bajo estímulos proinflamatorios, las células del epitelio conjuntival, son una fuente importante de IL-6.<sup>109</sup> Muchos estudios han demostrado un aumento de los niveles de IL-6 en pacientes con EICH severa.<sup>110,111</sup> La IL-6 producida por células dendríticas activadas es

capaz de inhibir la función de las células Treg,<sup>112</sup> y la administración de un anticuerpo anti-receptor de IL-6, en un modelo murino de EICH agudo inducido por linfocitos T reguladores, disminuyó la mortalidad relacionada con EICH.<sup>113,114</sup> Por todo ello se puede deducir que la IL-6 podría desempeñar un papel crítico en la fisiopatología del EICH.<sup>115</sup>

En un trabajo llevado a cabo por el grupo de Riemens,<sup>55</sup> el nivel de IL-6 en lágrima de pacientes con EICH ocular resultó ser significativamente superior al encontrado en sujetos sanos. Además, su expresión génica se ha visto incrementada en muestras de CIC de pacientes con SOS<sup>116,117</sup>. En base a estos datos, IL-6 podría considerarse un buen biomarcador de la enfermedad debido a su buena sensibilidad, aunque su baja especificidad podría suponer una limitación, ya que se puede incrementar en varias complicaciones de EICH, como infecciones, mucositis y enfermedad venosa oclusiva.<sup>118</sup>

### **c) IL-9**

La IL-9 es una citoquina que históricamente se ha asociado a inflamación de etiología alérgica y a inmunidad frente a parásitos extracelulares. Adicionalmente, desempeña un papel en la inflamación mediada por Th1/Th17, y en la respuesta reguladora T.<sup>119</sup> IL-9 fue reconocida inicialmente vez como una citocina Th2, pero ahora se ha visto que es producida por varios subconjuntos de células T CD4, incluyendo las células Th9 definidas recientemente.<sup>120</sup> En el presente estudio, la IL-9 parece desempeñar un papel importante en la patogénesis de EICH ocular, aunque hasta donde nosotros conocemos, sus niveles aún no se han estudiado en suero o en lágrima. Tawara et al, en un trabajo publicado en 2008, estudiaron las cuatro citoquinas Th2 clásicas: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 en un modelo murino de EICH, llegando a la conclusión de que su deficiencia podría aumentar la respuesta proliferativa de las células T y agravar, por tanto, el EICH.<sup>121</sup> La importancia de este hallazgo aún ha de ser confirmada, pero de ser así, esta molécula podría desempeñar

un papel importante en la patogénesis del EICH ocular, ya que la enfermedad alérgica fue excluida de forma definitiva en todos nuestros pacientes y controles. La IL-9 podría ser un buen biomarcador para esta enfermedad, ya que su especificidad es mayor que la de otras moléculas estudiadas.

#### **d) NAMPT**

El cuarto gen del modelo predictivo, NAMPT (nicotinamida fosfo-rribosil-transferasa, también llamada visfatina), codifica una enzima que cataliza la síntesis de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido). NAMPT es también una citoquina proinflamatoria que promueve la maduración de las células B e inhibe la apoptosis de neutrófilos.<sup>122</sup> Se ha implicado, además, en la patogénesis de una serie de enfermedades, incluyendo neoplasias, obesidad y diabetes.<sup>123</sup> Curiosamente, NAMPT ha sido considerado recientemente como biomarcador de inflamación crónica, y su ARN se ha visto sobre-expresado en células mononucleares de pacientes con enfermedades como psoriasis, artritis reumatoide, o enfermedad inflamatoria intestinal, en las que el alto nivel de expresión de este ARN ha podido utilizarse para discriminar a estos pacientes de controles sanos.<sup>124</sup> Estudios previos han determinado que la inhibición de NAMPT tiene consecuencias catastróficas en las células T activadas, conduciendo a un deterioro funcional y muerte celular.<sup>125</sup> Este enfoque podría ser una estrategia novedosa para eliminar selectivamente estas células T activadas y bloquear así las reacciones inmunes que se observan en el EICH. Hasta donde sabemos, los niveles de NAMPT no se han descrito en pacientes con EICH sistémico ni en patología relacionada con la superficie ocular. Sin embargo, a la luz de los presentes resultados, esta citoquina aún en parte desconocida, podría ser un biomarcador prometedor en EICH ocular, por lo que se deben hacer más estudios en esta dirección.



### 8. A. III. Correlaciones entre expresión génica y parámetros clínicos

En este estudio, se correlacionó la expresión génica diferencial de los cuatro genes seleccionados con la exploración clínica realizada en la muestra de pacientes con EICH ocular y controles sanos, encontrándose correlaciones significativas entre EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT, y múltiples pruebas. Por ejemplo, una menor expresión de EGFR se asoció con valores más bajos T-BUT y Schirmer, manifestaciones de una menor estabilidad y producción lagrimal, respectivamente. Por el contrario, la expresión de EGFR también se asoció con mayores puntuaciones en el cuestionario OSDI, hiperemia conjuntival y tinciones de la superficie ocular, lo que indica un empeoramiento de los síntomas de SOS y un mayor daño en la superficie ocular.

De forma similar, la expresión aumentada de los genes de moléculas de proinflamatorias IL-6, IL-9 y NAMPT se correlacionó, en general, con cuadros más sintomáticos, mayor daño de la superficie ocular y menor producción y estabilidad lagrimal. Estas correlaciones fortalecen el potencial papel de estos cuatro genes como biomarcadores de la enfermedad.

Al desarrollar un modelo de predicción de la enfermedad, no sólo debe tenerse en cuenta la expresión génica diferencial, sino que es fundamental la importancia biológica de los resultados. Por ello, para encontrar el mejor modelo, se seleccionaron los genes para los que la actividad o expresión no fuera redundante, es decir, un reflejo del aumento o la activación de otro gen. Las firmas de genes, es decir, los grupos de genes expresados en un patrón característico de un fenotipo biológico o condición médica, en asociación con un conjunto de datos funcionales, pueden ayudar a revelar otros genes que están relacionados con el proceso de la enfermedad. La firma génica que encontramos para EICH ocular es un

intento de aplicar esta tecnología a la oftalmología en general y en particular a las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.

El modelo predictivo que hemos desarrollado va más allá de las pruebas disponibles actualmente en la práctica clínica, principalmente el test de Schirmer, que carece de la sensibilidad y especificidad necesarias para hacer un diagnóstico correcto. Si dicho modelo predictivo funciona correctamente en una configuración de validación externa, proporcionará un diagnóstico más preciso y precoz, que permitirá a los médicos abordar rápidamente las manifestaciones oculares de estos pacientes, evitando complicaciones que amenacen su visión.

## 8. B. NIVELES DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÁGRIMA (TRABAJO 2)

**En el segundo trabajo de esta tesis se desarrolló y validó un modelo de predicción para el diagnóstico de EICH ocular basado, esta vez, en los niveles de un panel de mediadores inflamatorios en lágrima, y al igual que en el artículo anterior, se determinó su correlación con las características de la exploración oftalmológica de estos pacientes.**

El panel final de las moléculas incluidas se definió tras el análisis de los biomarcadores candidatos más importantes, y se construyeron modelos de regresión logística con todas las posibles combinaciones de estos candidatos, así como la edad y el género como variables de confusión.

En el primer trabajo se lograron identificar biomarcadores en células del epitelio conjuntival de un modo accesible a través de CIC. Sin embargo, la detección de biomarcadores en lágrima es aún más deseable, ya que ésta puede obtenerse más fácilmente de una manera no invasiva y, además, su estrecha relación anatómica con el sitio de la enfermedad, hace que sea una muestra específica para el diagnóstico de

enfermedades de la superficie ocular. Con la descripción de los cambios en los niveles de citoquinas en lágrima, se pretende realizar un progreso hacia la caracterización de los mecanismos inflamatorios subyacentes en la superficie ocular en estos pacientes. Así, algunos estudios ya han encontrado diferencias en niveles de ciertas moléculas, en particular el grupo de Riemens,<sup>55</sup> y más recientemente el de Jung et al,<sup>56</sup> que se describirán en detalle a continuación, sugiriendo que las citoquinas pueden ser buenos biomarcadores para el diagnóstico de EICH ocular.

### 8. B. I. Exploración oftalmológica

La evaluación de los pacientes que participaron en el estudio reveló que todos ellos padecían un SOS moderado, según los resultados de la exploración oftalmológica. El grupo de pacientes con EICH ocular mostró significativamente más síntomas de SOS, puntuaciones más bajas en el test de Schirmer y un T-BUT considerablemente disminuido al comparar sus valores con los controles sanos. La integridad de la superficie ocular de los pacientes, evaluada por la tinción con fluoresceína y verde de Lisamina, se vio a su vez significativamente alterada en comparación con los controles. Sin embargo, y de forma análoga a lo que ocurría en el trabajo anterior, el daño encontrado no fue tan severo como el que cabría esperar, ya que se seleccionaron aquellos pacientes en los que se podía interrumpir de forma temporal el uso de sus terapias antiinflamatorias tópicas, como requerían los criterios de inclusión.

### 8. B. II. Niveles de citoquinas y quimioquinas

Al realizar el análisis de citoquinas de lágrimas se observó que **los niveles de EGF y de IP-10 fueron significativamente menores** en pacientes con EICH ocular. Por otra parte, se encontraron **niveles más altos de IL-1Ra, IL-8 e IL-10** en estos pacientes.

**a) EGF**

EGF es una molécula secretada principalmente por la glándula lagrimal, constituyendo uno de los factores de crecimiento más importantes presentes en la lágrima humana. En los estudios efectuados por los grupos de Pflugfelder et al y Lam et al,<sup>30,41</sup> se encontraron niveles disminuidos de esta molécula en pacientes con SOS hiposecretor asociado a SSen comparación con controles sanos. Los resultados encontrados en el presente grupo de pacientes con EICH ocular coinciden con esos estudios, ya que el EICH causa un SOS hiposecretor con muchas similitudes con el SS. Además, existe también una concordancia con los resultados del análisis de expresión génica, en la que se observaba que el gen del EGFR estaba infra-expresado en estos pacientes con EICH ocular, lo que confirma la importancia de este hallazgo.

**b) IP-10**

La IP-10, molécula cuya función es la quimiotaxis de linfocitos T, NK y monocitos,<sup>126</sup> también se encontró disminuida en lágrima de pacientes con EICH ocular. Las células T activadas conducen a la liberación de las quimioquinas CXCL9, IP-10 (también llamada CXCL10) y CXCL11 en los tejidos, siendo éstas capaces de reclutar células T con receptores CXCR3, mediando el daño tisular característico del EICH.<sup>127</sup> La importancia del papel de IP-10 en pacientes con EICH ha sido establecida por diferentes autores. Utilizando un modelo murino, Duffner et al concluyeron que la migración de las células T del donante a los órganos diana del EICH depende de la expresión de CXCR3, y este contribuye significativamente al daño en los tejidos y a la mortalidad global causada por esta enfermedad.<sup>128</sup>

Por otra parte, Piper et al encontraron niveles séricos significativamente elevados de IP-10 en pacientes con EICH agudo cutáneo, lo que sugiere que la interacción específica de

esta molécula con su receptor fue crítica para el reclutamiento de células T en la piel en pacientes con EICH agudo.<sup>129</sup> Por último, el grupo de Westekemper et al ha podido demostrar por medio de la técnica de PCR, que IP-10 fue marcadamente sobre-expresada en biopsias conjuntivales de pacientes con EICH ocular en comparación con controles sanos.<sup>54</sup> El hecho de que esta quimioquina se haya encontrado menos concentrada en la lágrima de nuestros pacientes podría ser debido a los criterios de inclusión aplicados, que sólo permitió la entrada en el estudio a aquellos pacientes cuya enfermedad estuviera relativamente bajo control como se ha explicado anteriormente.

#### **c) IL-1Ra**

Los niveles de IL-1Ra, IL-8 e IL-10 se vieron incrementados en el grupo de EICH ocular respecto a los sujetos sanos. Esto es consistente con los niveles en lágrima descritos en estudios previos en pacientes con SOS.<sup>30,36,39,41,42</sup>

IL-1Ra es un antagonista natural del receptor de IL-1, que actúa como un modulador de la respuesta inmune, regulando los efectos proinflamatorios de IL-1 en enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis<sup>130</sup>. Además, los polimorfismos en los genes de la familia de la IL-1 se han asociado con la gran variabilidad encontrada en la producción de las distintas citoquinas de esta familia, y han sido implicados en la susceptibilidad del paciente a desarrollar EICH.<sup>131</sup>

#### **d) IL-8**

La IL-8 (quimioquina también llamada CXCL8) es uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria,<sup>132</sup> capaz de contribuir significativamente en los procesos de lesión tisular, fibrosis, angiogénesis y tumorigénesis. Un estudio realizado por Schots et al ha evidenciado que los pacientes que sufren EICH agudo en los 30 primeros días tras el

TAPH mostraron niveles más altos de esta molécula en los momentos en que los signos clínicos de la enfermedad fueron más marcados.<sup>118</sup>

La importancia de la IL-8 en el proceso patogénico del EICH se vio reafirmada al incluirse ésta en dos paneles de biomarcadores definidos con el propósito de ayudar a la predicción del fallecimiento, el fracaso del tratamiento y el riesgo de desarrollar EICH en pacientes trasplantados.<sup>49,133</sup> Además, los resultados del trabajo anterior, basados en la expresión génica, coinciden con los presentes hallazgos, ya que la expresión del gen de la IL-8 en epitelio conjuntival de pacientes con EICH ocular fue casi 5 veces mayor que en controles sanos. Por todo esto, esta molécula estaría claramente involucrada en la patogénesis del EICH, siendo necesarios más estudios que determinen su papel exacto en las complicaciones oculares de la enfermedad.

#### **e) IL-10**

La IL-10 es una citoquina con una función fundamentalmente antiinflamatoria capaz de reducir la activación de las células T. Se ha observado que un déficit o ausencia de esta citoquina da lugar a un aumento de las respuestas de células T alogénicas en pacientes con EICH, agravando fuertemente el curso de la enfermedad.<sup>134</sup> Varios grupos de investigación han estudiado la asociación entre el aumento de los niveles de IL-10 y el desarrollo de EICH y, a pesar de su función antiinflamatoria, esta relación directa ha sido confirmada.<sup>111,135</sup> Para explicarla, se ha sugerido que debido a que esta molécula es un fuerte supresor de la inmunidad mediada por células T, unos niveles altos podrían conducir a una inmunodeficiencia funcional, contribuyendo a un mal pronóstico de la enfermedad.<sup>115</sup>

Los presentes resultados se ven reforzados por el aumento observado en la expresión de este gen en el primer trabajo, 7,7 veces respecto a los controles, siendo también coherentes con los altos niveles encontrados en lágrima de pacientes con SOS asociado a

SS.<sup>42</sup> Nuestros resultados están, sin embargo, en desacuerdo con los descritos por Riemens et al,<sup>55</sup> que no detectaron IL-10 en lágrima de pacientes con EICH ocular. De forma interesante, en el mismo estudio, sí se encontró un aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-6, los cuales fueron propuestos como moléculas clave en esta enfermedad, mientras que, en nuestro trabajo, los niveles de estas moléculas no fueron significativamente diferentes de los de los controles. Los diferentes criterios utilizados para realizar el diagnóstico de EICH ocular en cada estudio, así como los distintos métodos de recolección de las muestras de lágrimas (obtenido directamente de las tiras de Schirmer en el estudio de Riemens, en lugar de por la colección con capilar de vidrio en nuestro trabajo), así como una posible influencia de los medicamentos tópicos utilizados por los pacientes en el estudio de Riemens, podrían ser la clave a la hora de explicar las diferencias encontradas entre estos dos estudios.

El aumento de IL-10 en lágrima de los pacientes con EICH también ha sido descrito más recientemente por Jung et al.<sup>56</sup> En este estudio, investigaron los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en lágrima de pacientes después de someterse a TAPH, tratando de elucidar si se encontraba asociación con la presencia de EICH sistémico, independientemente del estado ocular. Estos autores encontraron que IL-2, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  estaban elevados en pacientes con EICH en comparación con los pacientes trasplantados sin EICH. Aunque nuestros resultados confirman el aumento de IL-10, no encontramos un aumento significativo de IL-2, IL-17a, IFN- $\gamma$ , IL-6 o TNF- $\alpha$ . Una explicación plausible de estas discrepancias entre los resultados del estudio de Jung y el nuestro podría ser la diferente muestra de pacientes y controles analizados, ya que el grupo de Jung comparó una cohorte de pacientes trasplantados con y sin EICH independientemente del estado de su superficie ocular, mientras que en nuestro estudio se incluyeron pacientes con un diagnóstico cierto de EICH ocular, e individuos sanos.

También los métodos de recolección de muestras fueron diferentes, ya que ellos tomaron lágrima después del lavado con *buffer*, mientras que nosotros obtuvimos lágrima basal por capilaridad. Por último, el análisis de moléculas y los *kits* de citoquinas empleados no fueron los mismos, ya que Jung et al utilizan un *array citométrico BD* (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences), mientras que nuestro grupo utilizó un *array Milliplex* con tecnología *X-MAP de Luminex*. En nuestra opinión, todas estas diferencias metodológicas podrían ser responsables de las diferencias encontradas entre ambos estudios.

### **8. B. III. Correlaciones entre los niveles de citoquinas y quimioquinas y parámetros clínicos**

Se buscaron correlaciones entre los niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima y los resultados de las pruebas de exploración clínica. La mayoría de las correlaciones que se encontramos resultaron intuitivas, como la de los niveles de IL-8 (proinflamatoria) con todos los marcadores clínicos de gravedad de la enfermedad. Además, EGF mostró una correlación negativa con pruebas que demuestran la alteración de la superficie ocular como son las tinciones vitales. IP-10 e IL-1Ra, ambas con función antiinflamatoria, se correlacionaron negativamente con estas pruebas, y positivamente con la producción lagrimal, a través del test de Schirmer o la estabilidad de la película lagrimal por medio del T-BUT.

Estos resultados sugieren que los tejidos pueden estar elaborando una respuesta que contrarreste el daño a la superficie ocular. Estos coinciden con los descritos hasta ahora en la literatura, ya que varias citoquinas proinflamatorias se han correlacionado con parámetros clínicos del SOS.<sup>28,41,42</sup> Además, nuestros resultados también muestran coincidencia con los encontrados por Jung et al, respecto a la correlación entre los niveles de IL-10 y la puntuación OSDI, hiperemia conjuntival, tinción con fluoresceína y T-BUT. Sin



embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre IL-2, IL-6, IL-17a, IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$  y los parámetros clínicos descritos por este autor,<sup>56</sup> lo que podría deberse al hecho de que nuestro trabajo incluye un grupo de individuos sanos no trasplantados, mientras que en el de Jung se estudiaron pacientes trasplantados.

#### 8. B. IV. Modelo de predicción

El objetivo de este segundo trabajo, al igual que el anterior, fue desarrollar un modelo de EICH ocular, basado esta vez en los niveles de citoquinas en lágrima. Los modelos predictivos se han utilizado recientemente en un intento de facilitar y estandarizar el diagnóstico de EICH ocular. Estos se han basado en parámetros clínicos, como el *Eye Score* propuesto por el NIH y el test de Schirmer.<sup>62</sup> Algunos investigadores han intentado abordar estos problemas mediante el uso de técnicas de proteómica, con el fin de identificar proteínas candidatas capaces de funcionar como buenos biomarcadores en EICH, con resultados muy prometedores.<sup>49,64</sup>

En lo referente a EICH ocular, autores como Jung et al han propuesto utilizar el comportamiento individual de los niveles de citoquinas en lágrima como posibles biomarcadores,<sup>56</sup> a diferencia del presente estudio, que está basado en un conjunto de biomarcadores. El modelo predictivo resultante, basado en los niveles de IL-8 e IP-10, mostró una buena sensibilidad (86,36%) y una especificidad muy cercana al 100% (95,24%). De forma lógica, la capacidad discriminante de este modelo de biomarcadores múltiples fue mayor que la obtenida con cualquier citoquina de forma aislada.

Los recursos técnicos utilizados para la recolección y el análisis de las muestras, en comparación con el método anterior donde se utilizó la CIC, hacen que estos resultados sean quizá más valiosos. El modelo basado en muestras lagrimales tiene la ventaja de que

estas son más accesibles y fáciles de manejar que la CIC y pueden obtenerse sin necesidad de anestesia, lo que facilitaría la implementación de esta técnica en la práctica clínica diaria. Sin embargo, la limitación en la cantidad de muestra de lágrima que se puede obtener de estos pacientes (a veces incluso 1  $\mu$ l es difícil de obtener), podría ser un inconveniente de este modelo predictivo en comparación con el modelo basado en los genes.

Aunque se ha realizado una validación interna del modelo predictivo, con resultados excelentes, para determinar la validez de un modelo es absolutamente necesario comprobar su capacidad de predicción en un nuevo subconjunto de individuo, diferente de la muestra inicial con la que este se elaboró.<sup>58</sup> Para ello, decidimos utilizar un grupo de pacientes procedentes de estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo diagnosticados de SOS no asociado a SS, asociado a SS, y controles sanos.<sup>43-45</sup> Los resultados de clasificación obtenidos por el modelo resultaron prometedores, ya que identificó a la mayoría de estos pacientes como negativos para EICH ocular. Sin embargo, la validación externa todavía no puede considerarse completa, ya que es necesario comprobar su capacidad clasificadora usando una nueva muestra de paciente con EICH, con y sin afectación ocular.

### 8. C. BIOMARCADORES EN LÁGRIMA CON VALOR PRONÓSTICO EN PACIENTES ANTES DE SER SOMETIDOS A TAPH (TRABAJO 3)

Una de las mayores barreras a la hora de lograr un adecuado manejo de los pacientes con EICH ocular es la incapacidad para determinar **el riesgo individual** de cada paciente **antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad**, lo que puede limitar el diseño de un plan de tratamiento adecuado. Por ello, el presente estudio tuvo como **objetivo la identificación de citoquinas y quimioquinas en lágrima con capacidad de predecir el riesgo de desarrollar EICH ocular antes de someterse al TAPH**. Para ello, se

reclutó una cohorte de pacientes que fueran a ser sometidos a TAPH y se analizaron sus niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima antes del trasplante, siguiendo a este grupo de pacientes un máximo de 43 meses para determinar quién de ellos desarrollaba EICH ocular. Además, se desarrolló un MSM con la intención de que fuera capaz de predecir la probabilidad de desarrollo de EICH ocular.

Una de las mayores limitaciones de los estudios anteriores es el análisis retrospectivo de los datos, siendo esta la diferencia crucial del presente trabajo, ya que los pacientes son seguidos en el tiempo, lo que proporciona una información muy valiosa sobre el curso de la enfermedad. La incapacidad de evaluar a los pacientes en puntos de tiempo específicos después del trasplante puede resultar en un retraso en el diagnóstico de EICH ocular, en comparación a si se evalúa longitudinalmente. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, los estudios que incluyen pacientes con EICH ocular, como es el caso de los dos primeros trabajos, son incapaces de arrojar datos directos de incidencia, por lo que el presente estudio viene a complementar y enriquecer los resultados observados en los anteriores.

### **8. C. I. Exploración oftalmológica**

El examen ocular que se llevó a cabo en diferentes momentos del seguimiento mostró el desarrollo de la EICH ocular en un 40% de los pacientes reclutados, atendiendo a la evidencia de un empeoramiento de los síntomas de SOS según el cuestionario OSDI, la menor puntuación del test de Schirmer, una disminución del T-BUT y el significativo empeoramiento de la integridad de la superficie ocular, demostrado por un mayor grado de tinción con fluoresceína y rosa de Bengala. Estos resultados son diferentes a los recientemente publicados por Giannaccare et al, quienes afirman que, en un número

significativo de pacientes con enfermedades hematológicas, se encontraban ya signos y síntomas de SOS antes de que se realizara el TAPH.<sup>136</sup> En nuestra cohorte, sólo 5 de los 36 (13,9 %) pacientes reclutados inicialmente, fueron clasificados como SOS, y por ello no fueron incluidos ni considerados en ulteriores análisis, ya que el **fin de nuestro trabajo era estudiar el desarrollo de SOS debido a EICH, y no causado por otros motivos, como puede ser la enfermedad de base de los pacientes o su medicación.** En contraste, el 42,8% de los pacientes del estudio de Giannaccare padecían SOS de forma previa al trasplante y fueron incluidos en su análisis.

En el presente estudio, 10 de los 25 (40%) pacientes finalmente estudiados, desarrollaron EICH ocular después del TAPH. Este hallazgo coincide con un estudio retrospectivo realizado previamente por nuestro grupo, en el que el 38% de los pacientes trasplantados desarrollaron EICH ocular.<sup>17</sup> También es consistente con la prevalencia de esta enfermedad reportada por diferentes grupos, que varía entre el 32% y el 54%.<sup>16,66,137,138</sup> Se encontró, además, que el tiempo medio para el desarrollo de EICH ocular después del trasplante fue de 33 meses, un período significativamente más largo que lo descrito en estudios previos, que describen su aparición entre los 7,8 y los 16,5 meses después del TAPH.<sup>16,17,66,91,137</sup> Una razón que podía justificar las diferencias halladas, puede ser la naturaleza prospectiva de este estudio en comparación con dos de los otros, con carácter retrospectivo y basados en la revisión de historias clínicas.<sup>17,91</sup> El análisis prospectivo de una cohorte es la forma metodológicamente más adecuada de detectar un estado de enfermedad o la aparición de una complicación en un grupo de pacientes.<sup>139</sup> Además, la ausencia de unos criterios diagnósticos universalmente aceptados para EICH ocular, y la evolución de estos criterios a lo largo de los años, puede haber influido en los resultados de los diferentes estudios. Esto viene a remarcar la necesidad de instaurar unos

criterios que no sólo atiendan al resultado de una exploración clínica subjetiva, sino también basados en parámetros objetivos. En cualquier caso, volviendo a la temporalidad del desarrollo de EICH ocular, los presentes resultados sugieren que ésta podría aparecer mucho más tarde de lo que se pensaba anteriormente, lo que hace que las evaluaciones de seguimiento de estos pacientes sean deseables aún años después del trasplante.

### 8. C. II. Factores de riesgo de EICH ocular

Numerosos estudios han intentado determinar una serie de factores de riesgo para el desarrollo de EICH ocular, con el fin de llevar a cabo un diagnóstico precoz e implementar estrategias preventivas en individuos de alto riesgo. Los factores de riesgo de carácter clínico que se han sugerido hasta ahora incluyen el padecimiento de EICH agudo previo,<sup>16,66</sup> la positividad del donante para el virus de Epstein-Barr,<sup>67</sup> y el trasplante de donante femenino a receptor masculino.<sup>66,68</sup> Los resultados de nuestro trabajo no pudieron confirmar ninguna de estas asociaciones previamente sugeridas, así como tampoco otras, tales como la edad del receptor en el momento del trasplante, su género, el tipo de régimen de acondicionamiento utilizado, la relación entre donante y receptor (emparentados o no) o el origen de las células madre.

Por ello, se pretendió ir un paso más allá, y se intentó basar la predicción del desarrollo de EICH ocular en la determinación de biomarcadores, para lo que se estudiaron los niveles de mediadores inflamatorios en lágrima conocidos en lugar de parámetros clínicos. Con ello, se pretendía encontrar factores de riesgo de enfermedad más objetivos, como nuestro grupo hizo anteriormente con otros tipos de SOS.<sup>43-45</sup>

En el campo de la medicina predictiva, preventiva y personalizada, los biomarcadores han desempeñado un papel clave en el descubrimiento de nuevos objetivos

terapéuticos y el diseño de dispositivos de atención médica.<sup>140</sup> De hecho, los enfoques basados en biomarcadores moleculares han sido claramente establecidos por un panel de expertos en el *Proyecto de Desarrollo de Consenso sobre Criterios para Ensayos Clínicos en Enfermedad de Injerto contra Huésped Crónica: III. Informe del Grupo de Trabajo sobre Biomarcadores*, del NIH, donde se insiste en que los marcadores biológicos son imprescindibles para confirmar, ayudar en el diagnóstico o en el pronóstico de dicha enfermedad, además de para su uso en ensayos clínicos.<sup>51</sup>

### 8. C. III. Modelos multiestado

En los 2 primeros trabajos de esta tesis se han propuesto dos modelos predictivos basados en múltiples biomarcadores: en la expresión génica de células epiteliales conjuntivales y en los niveles de diversas moléculas en la lágrima de pacientes con EICH ocular. Partiendo de esta experiencia, se diseñó un estudio prospectivo, en el que se analizó la concentración de moléculas inflamatorias en muestras de lágrima recogidas entre 30 y 7 días antes del TAPH.

A través de un MSM, los pacientes fueron clasificados en una serie de estados de salud que pueden darse en cualquier momento durante el período de seguimiento, de manera que la transición entre los estados representa un cambio en el proceso de la enfermedad. Así, correlacionamos la presencia o concentración de citoquinas y quimioquinas en lágrima con el desarrollo de cuatro estados, incluyendo: de TAPH a muerte, de TAPH a EICH sistémico, de EICH sistémico a muerte y de EICH sistémico a EICH ocular.

La razón por la que se decidió aplicar este enfoque es que permite una mayor precisión en la predicción de la ocurrencia del evento de interés (es decir, EICH ocular),

teniendo en cuenta la aparición de eventos intermedios, como la muerte y el desarrollo de EICH sistémico. Se utilizó un MSM en lugar de un análisis de supervivencia o de tiempo hasta el evento porque la valoración de estos eventos intermedios era muy importante y los datos estaban disponibles, ya que se siguió a los pacientes de cerca y prospectivamente. Mientras que en un análisis de supervivencia aparece una censura cuando el evento de interés no se observa a lo largo del seguimiento de un paciente y, por lo tanto, inevitablemente el resultado es una estimación sesgada de la probabilidad de la ocurrencia del evento de interés, los MSM son muy útiles para la comprensión de los cambios de los estados de enfermedad a través del tiempo.<sup>71</sup> Por todo ello, se estableció que este enfoque concreto era el que más se ajustaba al propósito de nuestro estudio.

#### **8. C. IV. Citoquinas y quimioquinas con capacidad predictora**

Entre las 19 citoquinas y quimioquinas estudiadas, fractalquina, IL-1Ra e IL-6 demostraron tener una influencia significativa en las diferentes transiciones consideradas en el modelo descrito previamente, por lo que estos tres biomarcadores demostraron que podían tener relevancia biológica a la hora de desarrollar EICH ocular.

##### **a) Fractalquina**

Los niveles elevados de esta molécula en lágrima antes del trasplante se vieron asociados con un menor riesgo de desarrollar EICH ocular. Estos resultados se mostraron consistentes con nuestro hallazgo, descrito previamente, de una expresión génica disminuida del gen de la fractalquina en epitelio conjuntival de pacientes con EICH ocular. Esta molécula actúa como una potente sustancia quimio-atrayente para linfocitos intraepiteliales, positivos para el receptor CX3CR1.<sup>141,142</sup> Sin embargo, la fractalquina se ha visto significativamente aumentada en lágrima de pacientes con SOS en comparación con

los controles sanos, y unos niveles más altos se asociaron a una mayor gravedad clínica del cuadro.<sup>39,107</sup> Numerosos estudios han demostrado que esta molécula está involucrada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, como el SS primario, artritis reumatoide, granulomatosis con poliangiítis, enfermedad de Crohn y uveítis autoinmunes, entre otras.<sup>42,142</sup> En este caso, los hallazgos sugieren que esta molécula podría desempeñar un papel importante en la patogénesis de EICH, de manera que una disminución de su secreción y niveles más bajos podrían estar relacionados con el aumento de la supervivencia de estos pacientes, lo que los haría propensos a desarrollar complicaciones oculares.

#### **b) IL-1Ra**

Unos niveles elevados de IL-1Ra se asociaron con un mayor riesgo en la transición de TAPH a muerte. Además, los niveles incrementados de esta molécula se vieron también asociados a un menor riesgo de desarrollar EICH ocular en los pacientes que sufren EICH sistémico. Como se ha mencionado previamente, IL-1Ra es una molécula con efecto como modulador de la respuesta inmune, regulando los efectos de IL-1.<sup>130</sup>

La IL-1Ra se ha implicado adicionalmente en los mecanismos patogénicos de la inflamación de la superficie ocular asociada al SOS, donde se ha observado un aumento de sus niveles en lágrima de pacientes en comparación con los controles.<sup>39,45</sup> La explicación de este aparente papel protector podría estar relacionada con un efecto regulador durante la cascada inflamatoria de la IL-1. En un intento de aprovechar las propiedades antiinflamatorias de esta molécula, se ha utilizado una preparación tópica de IL-1Ra recombinante (anakinra) para el tratamiento de pacientes con SOS en un ensayo clínico aleatorizado, resultando inicialmente eficaz.<sup>143</sup>



**c) IL-6**

Los niveles de IL-6 detectados antes del trasplante, aumentaron el riesgo de muerte antes de desarrollar EICH sistémico u ocular. La IL-6 es una molécula, como ya se ha mencionado, bien conocida en la fisiopatología del EICH<sup>115</sup> y, de hecho muchos estudios han demostrado la existencia de niveles altos de esta molécula en pacientes con EICH severo<sup>110,111</sup> o EICH ocular.<sup>55</sup> Además, el grupo de Jung describió cómo IL-6, entre otras moléculas, se encontraba elevada en lágrima de pacientes recogida después de la aparición de EICH sistémico, en comparación con pacientes trasplantados que no desarrollaron la enfermedad.<sup>56</sup> Por último, también hemos encontrado una expresión génica para esta molécula regulada positivamente en el epitelio conjuntival de los pacientes con EICH ocular, como se ha comentado anteriormente.

Y así, aunque en diversas complicaciones del TAPH, como infecciones, mucositis o enfermedad oclusiva venosa, se han demostrado niveles elevados de IL-6,<sup>118</sup> y por lo tanto su especificidad no sería elevada, se podría proponer esta molécula como un buen indicador pronóstico y un marcador fundamental de la gravedad de la enfermedad ocular.

La combinación de los tres biomarcadores seleccionados, fractalquina, IL-1Ra e IL-6, resultó constituir el mejor modelo de predicción. La nueva variable formada por las tres moléculas, denominada PC1, se asoció significativamente con un mayor riesgo en las transiciones de TAPH a muerte, y de EICH sistémico a ocular. Un aumento en PC1 también se asoció a un menor riesgo de desarrollar EICH ocular. La validación interna del modelo se basó en las curvas ROC dependientes de tiempo, que describen el funcionamiento del modelo en cada momento del seguimiento, estando todas ellas por encima de 0,66, demostrándose así un poder discriminatorio muy adecuado.

## 8. D. LIMITACIONES

Los 3 trabajos de esta tesis presentaron varias limitaciones. La principal y común a los tres es el pequeño tamaño muestral, en especial de pacientes con EICH ocular ya diagnosticado (trabajos 1 y 2). Para explicarlo, hay que tener en cuenta las extraordinarias dificultades que tiene el oftalmólogo para dar seguimiento a los pacientes con EICH. Muchos son individuos extremadamente enfermos que suelen ser seguidos en departamentos de oncología o hematología, pueden tener una variedad de manifestaciones sistémicas que resultan en hospitalizaciones frecuentes o riesgo de muerte y, por ello, requieren regímenes de seguimiento variables. Por otro lado, el número de pacientes finalmente incluidos no fue excesivamente pequeño considerando la baja, aunque creciente, frecuencia de EICH ocular en la población.

El tamaño muestral de los 2 primeros trabajos, asimismo, se vio más limitado por la decisión de excluir a los pacientes graves o incontrolados que no podrían suspender sus medicamentos antiinflamatorios tópicos sin sufrir un claro empeoramiento de su cuadro ocular.

En el caso del tercer trabajo, de carácter prospectivo, el bajo número de pacientes se debió a la gran morbilidad y la mortalidad que afecta a estos pacientes, por lo que su seguimiento se ha visto en gran medida obstaculizado. De hecho, a pesar del éxito mejorado del TAPH, la supervivencia de los pacientes y una mejor calidad de vida después del EICH, siguen siendo un desafío para la medicina actual.

La obtención de lágrima en estos casos de pacientes con SOS severo puede ser un algo muy trabajoso. Afortunadamente, la tecnología empleada (XMAP de Luminex) es una técnica altamente sensible con un alto rango dinámico de detección, mayor que el de

técnicas similares como el ELISA, lo que facilita el análisis de mínimas cantidades de lágrima. Por ello, aunque la muestra en este estudio no era grande, fue suficiente para establecer niveles de citoquinas y quimioquinas, y servir como base para estudios posteriores.

También debe considerarse que, en algunos pacientes con EICH ocular, la cantidad de ARN obtenida por medio de CIC fue limitada y, en algunos casos, no fue suficiente para el análisis individual, por lo que tuvieron que agruparse varias muestras. No debe pasarse por alto que esta cantidad podría ser aún menor en pacientes con un SOS más severo, lo que podría ser una limitación de la prueba al implementarla en la práctica clínica.

Desde un punto de vista metodológico, tratar de encajar un modelo multivariable con un gran número de moléculas como el presentado, también es un desafío. El número de posibles predictores puede, en ocasiones, ser demasiado grande para el pequeño número de individuos en este tipo de estudios, y tratar de combinarlos en un modelo complejo y multivariable podría conducir a un serio problema. Además, las correlaciones entre las variables predictoras pueden conducir a un problema de multicolinealidad. Sin embargo, hemos podido explotar la estructura de correlación entre las variables y así reducir el número de variables del modelo final.

En este caso, además, los MSM pueden producir estimaciones de parámetros deficientes para pequeños conjuntos de datos debido a que dividir un proceso en múltiples estados puede conducir a un número de eventos aún más pequeño en algunas de las transiciones estudiadas. Sin embargo, la alternativa a este enfoque, el análisis de supervivencia, es mucho más parcial, sesgado y menos adecuado metodológicamente.

Por otro lado, se podría pensar que la terapia anti-inflamatoria sistémica utilizada en estos pacientes puede influir en los niveles de citoquinas en la película lagrimal. Creemos

que esto es posible, pero desafortunadamente, la severidad de la enfermedad subyacente hace imposible suspender estos medicamentos sin poner en peligro la vida del paciente.

Para terminar, somos conscientes de que el modelo predictivo ha de ser sometido a una validación más potente en una cohorte más grande de pacientes con EICH ocular para confirmar su sensibilidad y estar así absolutamente seguros de la relevancia de los resultados obtenidos.

---

En resumen, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral sugieren que tanto la determinación de la **expresión génica de moléculas relacionadas con la inflamación en el epitelio conjuntival**, como de los **niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima**, podrían ser **piezas clave** que ayuden a **entender la patofisiología de las complicaciones oculares del EICH** con más detalle. Los **modelos elaborados** pueden suponer una **alternativa al diagnóstico** actual, basado en pruebas poco específicas y subjetivas. Además, el modelo basado en la medición de citoquinas proinflamatorias antes del trasplante podría permitir la **estratificación del paciente según su riesgo de desarrollar EICH ocular**. En caso de tener éxito, esto permitirá a los médicos utilizar medidas preventivas e intensificar los programas de vigilancia en los pacientes de alto riesgo en un intento de evitar, o al menos minimizar, las complicaciones que amenazan la vista y la calidad de vida asociada con esta enfermedad ocular grave.

El siguiente y necesario paso en nuestro trabajo será realizar una validación externa de los modelos, incluyendo una nueva muestra de pacientes, tanto con EICH ocular como con otras patologías de la superficie ocular, que permita la evaluación de estos biomarcadores con un mayor número de muestras.

## 9. CONCLUSIONES



Los datos obtenidos en este estudio permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Es posible establecer un modelo diagnóstico objetivo de EICH ocular basado en la medida de la expresión conjunta de los genes EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT en el epitelio conjuntival, ya que dicha expresión ha mostrado una buena sensibilidad, especificidad y relevancia clínica en la determinación de la afectación de la superficie ocular, lo cual les confiere un buen potencial como biomarcadores diagnósticos en el diseño de ensayos clínicos.
2. Las correlaciones encontradas entre los parámetros clínicos del SOS asociado al EICH ocular y la expresión de dichos genes (EGFR, IL-6, IL-9 y NAMPT) corroboran la implicación de estas moléculas en el desarrollo de la patología, ayudando así a entender las bases fisiopatológicas de la enfermedad. De aquí se deduce que estas moléculas podrían representar nuevas dianas terapéuticas que, al ser abordadas por fármacos específicos, permitirían un mejor control del proceso inflamatorio, mejorando así la calidad de vida de los pacientes.
3. También es posible establecer un diagnóstico de EICH ocular determinando los niveles en lágrima de IL-8 e IP-10 (teniendo en cuenta la edad y el género del paciente) con una sensibilidad y especificidad óptima. Además de tener buena capacidad diagnóstica y de contar con un abordaje mínimamente invasivo, el modelo diseñado es capaz de diferenciar con gran eficacia y sensibilidad el SOS en el contexto de EICH del asociado a otras causas.
4. Al igual que con el análisis génico, se encontraron correlaciones significativas entre marcadores clínicos de gravedad del SOS asociado a EICH y los niveles en lágrima de

- IL-8 e IP-10, entre otras moléculas, de forma que su análisis resultó de utilidad para determinar el grado de severidad del EICH ocular.
5. Asumimos, pero no podemos asegurar con certeza absoluta, que la combinación de la determinación conjunta de los cuatro genes y de las dos moléculas mencionadas, podría tener una potencia diagnóstica de EICH ocular más elevada que cualquiera de las dos determinaciones, genes o moléculas, por separado. Es decir, una simple colección de 1  $\mu$ l de lágrima y una CIC podrían convertirse en dos técnicas mínimamente invasivas de extraordinaria utilidad diagnóstica, y no sólo en el contexto de un ensayo clínico, sino también en el cuidado médico rutinario de estos pacientes, dada su especial gravedad.
  6. La detección de fractalquina, IL-1Ra e IL-6 en lágrima de pacientes antes de ser sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH), puede ayudar a predecir el riesgo de dicho paciente a desarrollar EICH ocular y, por lo tanto, a instaurar medidas de seguimiento y prevención personalizadas para cada uno de estos pacientes.



## 10. BIBLIOGRAFÍA



1. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol.* 1999;36:95-103.
2. Appelbaum DR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG. *Thomas' hematopoietic cell transplantation.* 4th ed. Oxford, England. Wiley-Blackwell; 2009. 705–1199.
3. Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959;38:1709-16.
4. Memoria actividad ONT. Trasplante de progenitores Hematopoyéticos 2015. Organización nacional de trasplantes <http://www.ont.es/infesp/Memorias/memoria%20actividad%20%20tph%202015.pdf>. (acceso a 19 de marzo de 2017).
5. Uchino M, Ogawa Y, Uchino Y, Mori T, Okamoto S, Tsubota K. Comparison of stem cell sources in the severity of dry eye after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol.* 2012;96:34-7.
6. Cheuk DK. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant.* 2013;3:99-112.
7. Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol.* 2008;142:877-88.
8. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373:1550-61.
9. Shikari H, Antin JH, Dana R. Ocular Graft-versus-Host Disease: A Review. *Surv Ophthalmol.* 2013;58:233-51.
10. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966-1967;62:21-78.
11. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng GS, Kerr H, Stratton P, Duarte RF, McDonald GB, Inamoto Y, Vigorito A, Arai S, Datile MB, Jacobsohn D, Heller T, Kitko CL, Mitchell SA, Martin P, Shulman H, Wu RS, Cutler CS, Vogelsang GB, Lee SJ, Pavletic SZ, Flowers ME. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:389-401.
12. Jamil MO, Mineishi S. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int J Hematol.* 2015;101:452-66.
13. Krenger W, Holländer GA. The thymus in GVHD pathophysiology. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21:119-28.
14. Kapur R, Ebeling S, Hagenbeek A. B-cell involvement in chronic graft-versus-host disease. *Haematologica.* 2008;93:1702-11.

15. Riemens A, Boome L, Imhof S, Kuball J, Rothova A. Current insights into ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010;21:485-94.
16. Westeneng AC, Hettinga Y, Lokhorst H, et al. Ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Cornea*. 2010; 7:758–63.
17. De la Parra-Colín P, Agahan AL, Pérez-Simón JA, López A, Caballero D, Hernández E, Barrientos-Gutierrez T, Calonge M. Dry eye disease in chronic graft-versus-host disease: results from a Spanish retrospective cohort study. *Transplant Proc*. 2011;43:1934-8.
18. Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 1125-30.
19. Hessen M, Akpek E. Ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012;12:540–47.
20. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:945-56.
21. Savini G, Prabhawasat P, Kojima T, Grueterich M, Espana E, Goto E. The challenge of dry eye diagnosis. *Clin Ophthalmol*. 2008;2:31-55.
22. Fuentes-Páez G, Herreras JM, Cordero Y, Almaraz A, González MJ, Calonge M. Lack of concordance between dry eye syndrome questionnaires and diagnostic tests. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011;86:3-7.
23. Dry Eye WorkShop (DEWS). Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the diagnostic methodology. *Ocul Surf*. 2007;5:108-52.
24. Dry Eye WorkShop (DEWS). The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75–92.
25. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environ Health Perspect*. 1987;74:3-9.
26. Tan SZ, Begley P, Mullard G, Hollywood KA, Bishop PN. Introduction to metabolomics and its applications in ophthalmology. *Eye (Lond)*. 2016;30:773-83.
27. Ehrmeyer SS, Laessig RH. Point-of-care testing, medical error, and patient safety: a 2007 assessment. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:766-73.
28. Enríquez-de-Salamanca A, Calonge M. Cytokines and chemokines in immune based ocular surface inflammation. *Expert Rev Clin Immunol*. 2008;4:457–67.

29. De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, et al. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol.* 2009;2:243-253.
30. Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009;147:198-205.
31. Enríquez-de-Salamanca A, Bonini S, Calonge M. Molecular and cellular biomarkers in dry eye disease and ocular allergy. *Current Opinion Allergy Clin Immunol.* 2012;12:523–33.
32. Hagan S, Tomlinson A. Tear fluid biomarker profiling: a review of multiplex bead analysis. *Ocul Surf.* 2013;11:219–35.
33. D'Souza S, Tong L. Practical issues concerning tear protein assays in dry eye. *Eye Vis (Lond).* 2014;1:6.
34. Von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Funke S, Grus FH. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Exp Eye Res.* 2013;117:126-37.
35. Bradley JL, Edwards CS, Fullard RJ. Adaptation of impression cytology to enable conjunctival surface cell transcriptome analysis. *Curr Eye Res.* 2014;39:31-41.
36. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009;28:1023-7.
37. Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:7725-30.
38. Meadows JF, Dionne K, Nichols KK. Differential Profiling of T-Cell Cytokines as Measured by Protein Microarray Across Dry Eye Subgroups. *Cornea.* 2016;35:329-35.
39. Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis.* 2010;16:862-73.
40. Jackson DC, Zeng W, Wong CY, Mifsud EJ, Williamson NA, Ang CS, Vingrys AJ, Downie LE. Tear Interferon-Gamma as a Biomarker for Evaporative Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:4824-30.
41. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999;19:201-11.
42. Lee SY, Han SJ, Nam SM, Yoon SC, Ahn JM, Kim TI, Kim EK, Seo KY. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjögren syndrome dry eye patients and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2013;156:247-53.
43. Tesón M, González-García MJ, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Stern ME, Calonge M. Influence of a controlled

- environment simulating an in-flight airplane cabin on dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:2093-99.
44. López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, Enríquez-de-Salamanca A, Stern ME, Calonge M, González-García MJ. Dry eye exacerbation in patients exposed to desiccating stress under controlled environmental conditions. *Am J Ophthalmol.* 2014;157:788-98
45. López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, Enríquez-de-Salamanca A, Stern ME, González-García MJ, Calonge M. Clinical and Molecular Inflammatory Response in Sjögren Syndrome-Associated Dry Eye Patients Under Desiccating Stress. *Am J Ophthalmol.* 2016;161:133-41.
46. Gamache DA, Dimitrijevič SD, Weimer LK, Lang LS, Spellman JM, Graff G, Yanni JM. Secretion of proinflammatory cytokines by human conjunctival epithelial cells. *Ocul Immunol Inflamm.* 1997;5:117-28.
47. Carreño E, Enríquez-de-Salamanca A, Tesón M, García-Vázquez C, Stern ME, Whitcup SM, Calonge M. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmol.* 2010;88:e250-8.
48. Benito MJ, González-García MJ, Tesón M, García N, Fernández I, Calonge M, Enríquez-de-Salamanca A. Intra- and inter-day variation of cytokines and chemokines in tears of healthy subjects. *Exp Eye Res.* 2014;120:43-9.
49. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG, Kuick R. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;113:273-8.
50. Paczesny S, Raiker N, Brooks S, Mumaw C. Graft-versus-host disease biomarkers: omics and personalized medicine. *Int J Hematol.* 2013;98:275-92.
51. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke KR, Lathrop J, Griffith LM, Hansen J, Jagasia M, Miklos D, Pavletic S, Parkman R, Russek-Cohen E, Flowers ME, Lee S, Martin P, Vogelsang G, Walton M, Schultz KR. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:780-92.
52. Yu J, Storer BE, Kushekhar K, et al. Biomarker Panel for Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Oncol.* 2016;34:2583-90.
53. Pidala J, Sigdel TK, Wang A, Hsieh S, Inamoto Y, Martin PJ, Flowers ME, Hansen JA, Lee SJ, Sarwal MM. A combined biomarker and clinical panel for chronic graft versus host disease diagnosis. *J Pathol Clin Res.* 2016;3:3-16.
54. Westekemper H, Meller S, Citak S, Schulte C, Steuhl KP, Homey B, Meller D. Differential chemokine expression in chronic GVHD of the conjunctiva. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:1340-6.

55. Riemens A, Stoyanova E, Rothova A, Kuiper J. Cytokines in tear fluid of patients with ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Mol Vis*. 2012;18:797-802.
56. Jung JW, Han SJ, Song MK, Kim TI, Kim EK, Min YH, Cheong JW, Seo KY. Tear Cytokines as Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:2079-85.
57. Núñez E, Steyerberg EW, Núñez J. Regression modeling strategies. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:501-7.
58. Moons KG, Kengne AP, Grobbee DE, Royston P, Vergouwe Y, Altman DG, Woodward M. Risk prediction models: II. External validation, model updating, and impact assessment. *Heart*. 2012;98:691-8.
59. Michiels S, Ternès N, Rotolo F. Statistical controversies in clinical research: prognostic gene signatures are not (yet) useful in clinical practice. *Ann Oncol*. 2016;27:2160-7.
60. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, Ladd C, Reich M, Latulippe E, Mesirov JP, Poggio T, Gerald W, Loda M, Lander ES, Golub TR. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:15149-54.
61. Kohrt HE, Tian L, Li L, Alizadeh AA, Hsieh S, Tibshirani RJ, Strober S, Sarwal M, Lowsky R. Identification of gene microarray expression profiles in patients with chronic graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Immunol*. 2013;148:124-35.
62. Curtis LM, Datile MB 3rd, Steinberg SM, Mitchell SA, Bishop RJ, Cowen EW, Mays J, McCarty JM, Kuzmina Z, Pirsl F, Fowler DH, Gress RE, Pavletic SZ. Predictive models for ocular chronic graft-versus-host disease diagnosis and disease activity in transplant clinical practice. *Haematologica*. 2015;100:1228-36.
63. Paczesny S, Braun T, Vander Lugt M. A three biomarker panel at days 7 and 14 can predict development of grade II-IV acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17: S167.
64. Kaiser T, Kamal H, Rank A, Kolb HJ, Holler E, Ganser A, Hertenstein B, Mischak H, Weissinger EM. Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;104: 340-9.
65. DiCarlo J, Agarwal-Hashmi R, Shah A, Kim P, Craveiro L, Killen R, Rosenberg-Hasson Y, Maecker H. Cytokine and chemokine patterns across 100 days after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:361-9.
66. Jacobs R, Tran U, Chen H, Kassim A, Engelhardt BG, Greer JP, Goodman SG, Clifton C, Lucid C, Vaughan LA, Savani BN, Jagasia M. Prevalence and risk factors associated

- with development of ocular GVHD defined by NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:1470-3.
67. Wang JC, Teichman JC, Mustafa M, O'Donnell H, Broady R, Yeung SN. Risk factors for the development of ocular graft-versus-host disease (GVHD) dry eye syndrome in patients with chronic GVHD. *Br J Ophthalmol.* 2015;99:1514-8.
68. Kamoi M, Ogawa Y, Uchino M, Tatematsu Y, Mori T, Okamoto S, Tsubota K. Donor-recipient gender difference affects severity of dry eye after hematopoietic stem cell transplantation. *Eye (Lond).* 2011;25:860-5.
69. Schultz KR, Miklos DB, Fowler D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E, Holler E, Ferrara J, Shulman H, Lee SJ, Martin P, Filipovich AH, Flowers ME, Weisdorf D, Couriel D, Lachenbruch PA, Mittleman B, Vogelsang GB, Pavletic SZ. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:126-37.
70. Betensky RA. Measures of follow-up in time-to-event studies: Why provide them and what should they be? *Clin Trials.* 2015;12:403-8.
71. Putter H, Fiocco M, Geskus RB. Tutorial in biostatistics: competing risks and multi-state models. *Stat Med.* 2007;26:2389-430.
72. Keiding N, Klein JP, Horowitz MM. Multi-state models and outcome prediction in bone marrow transplantation. *Stat Med.* 2001;20:1871-85.
73. Klein JP, Shu Y. Multi-state models for bone marrow transplantation studies. *Stat Methods Med Res.* 2002;11:117-39.
74. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:615-21.
75. Efron N, Morgan PB, Jagpal R. Validation of computer morphs for grading contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2002;22:341-9.
76. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea.* 2003;22:640-50.
77. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:research0034.1–research0034.11.
78. Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, Bennett DL, Orengo C, Kohl M. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics.* 2012;13:296.
79. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.



80. Dvinge H, Bertone P. HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics*. 2009;25:3325-6.
81. Ding C, Peng H. Minimum redundancy feature selection from microarray gene expression data. *J Bioinform Comput Biol*. 2005;3:185-205.
82. Vapnik V. *Methods of Function Estimation. The Nature of Statistical Learning Theory*. 2nd edition. New York: Springer-Verlag; 2000:181-216.
83. Meyer D, Dimitriadou E, Hornik K, Weingessel A, Leisch F. e1071: Misc Functions of the Department of Statistics (e1071), 2014. TU Wien. R package version 1.6-4. <http://CRAN.R-project.org/package=e1071>.
84. Webb AR. *Statistical pattern recognition*. 2nd edition. West Sussex (United Kingdom): John Wiley and Sons; 2002: 93-104.
85. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. New York: Springer; 2002:331-352.
86. Steyerberg EW, Vickers AJ, Cook NR et al. Assessing the performance of prediction models: a framework for traditional and novel measures. *Epidemiology*. 2010;21:128-38.
87. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:77.
88. Helsel, DR, Cohn TA. Estimation of descriptive statistics for multiply-censored water-quality data. *Water Resour Res* 1988;24:1997–2004.
89. Lee, L. 2. NADA: Nondetects And Data Analysis for environmental data. 2013. R package version 1.5–6. <http://CRAN.R-project.org/package=NADA>.
90. De Wreede LC, Fiocco M, Putter H. mstate: An R Package for the Analysis of Competing Risks and Multi-State Models. *Journal of Statistical Software* 2011, 38, 1-30. URL <http://www.jstatsoft.org/v38/i07/>
91. Shikari H, Amparo F, Saboo U, Dana R. Onset of ocular graft-versus-host disease symptoms after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cornea*. 2015;34:243-7.
92. Aalen O, Johansen S. An empirical transition matrix for nonhomogeneous Markov chains based on censored observations. *Scand J Statist*. 1978;5:141-50.
93. Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1972;34:187-220.
94. Bair E, Hastie T, Paul D, Tibshirani R. Prediction by supervised principal components. *J Am Stat Assoc*. 2006;101:119-37.

95. Chavent M, Kuentz V, Labenne A, Liqueur B, Saracco J. PCAmixdata: Multivariate Analysis of Mixed Data. R package version 2.2. 2014. <http://CRAN.R-project.org/package=PCAmixdata>.
96. Blanche P, Dartigues JF, Jacqmin-Gadda H. Estimating and comparing time-dependent areas under receiver operating characteristic curves for censored event times with competing risks. *Stat Med*. 2013;32:5381-97.
97. Barton K, Monroy DC, Nava A, Pflugfelder SC. Inflammatory cytokines in the tears of patients with ocular rosacea. *Ophthalmology*. 1997;104:1868-74.
98. Lema I, Durán JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology*. 2005;112:654-9.
99. Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, Calder VL. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:777-84.
100. Sack R, Conradi L, Beaton A, Sathe S, McNamara N, Leonardi A. Antibody array characterization of inflammatory mediators in allergic and normal tears in the open and closed eye environments. *Exp Eye Res*. 2007;85:528-38.
101. Rozmus J, Schultz KR, Wynne K, Kariminia A, Satyanarayana P, Krailo M, Grupp SA, Gilman AL, Goldman FD. Early and late extensive chronic graft-versus-host disease in children is characterized by different Th1/Th2 cytokine profiles: findings of the Children's Oncology Group Study ASCT0031. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1804-13.
102. Hayashida JN, Nakamura S, Toyoshima T, Moriyama M, Sasaki M, Kawamura E, Ohyama Y, Kumamaru W, Shirasuna K. Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:115-23.
103. Pang H, Tong T, Zhao H. Shrinkage-based diagonal discriminant analysis and its applications in high-dimensional data. *Biometrics*. 2009;65:1021-9.
104. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol*. 2013;108:370-7.
105. Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1346-55.
106. Márquez EB, De Ortueta D, Royo SB, Martínez-Carpio PA. Epidermal growth factor receptor in corneal damage: update and new insights from recent reports. *Cutan Ocul Toxicol*. 2011;30:7-14.
107. Na KS, Mok JW, Kim JY, Rho CR, Joo CK. Correlations between Tear Cytokines, Chemokines, and Soluble Receptors and Clinical Severity of Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:5443-50.

108. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878-88.
109. Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, García-Vázquez C, Fernández I, Stern ME, Diebold Y, Calonge M. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine*. 2008;44:160-7.
110. Min CK, Lee WY, Min DJ, Lee DG, Kim YJ, Park YH, Kim HJ, Lee S, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:935-40.
111. Fujii N, Hiraki A, Aoe K, Murakami T, Ikeda K, Masuda K, Matsuo K, Shinagawa K, Ishimaru F, Sugi K, Darzynkiewicz Z, Tanimoto M. Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. *Int J Mol Med*. 2006;17:881-5.
112. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 2003;299:1033-6.
113. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, Drobyski WR. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114:891-900.
114. Tawara I, Koyama M, Liu C, Toubai T, Thomas D, Evers R, Chockley P, Nieves E, Sun Y, Lowler KP, Malter C, Nishimoto N, Hill GR, Reddy P. Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Cancer Res*. 2011;17:77-88.
115. Toubai T, Tanaka J, Paczesny S, Shono Y, Reddy P, Imamura M. Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD): are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT)? *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7:229-39.
116. Kawasaki S, Kawamoto S, Yokoi N, Connon C, Minesaki Y, Kinoshita S, Okubo K. Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res*. 2003;77:17-26.
117. Narayanan S, Miller WL, McDermott AM. Conjunctival cytokine expression in symptomatic moderate dry eye subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2445-50.
118. Schots R, Kaufman L, Van Riet I, Ben Othman T, De Waele M, Van Camp B, Demanet C. Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia*. 2003;17:1150-6.

119. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *J Immunol.* 2011;186:3283-8.
120. Tan C, Gery I. The unique features of Th9 cells and their products. *Crit Rev Immunol.* 2012;32:1-10.
121. Tawara I, Maeda Y, Sun Y, Lowler KP, Liu C, Toubai T, McKenzie AN, Reddy P. Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol.* 2008;36:988-96.
122. Sun Z, Lei H, Zhang Z. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), a cytokine with multiple physiological functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24:433-42.
123. Dalamaga M. Obesity, insulin resistance, adipocytokines and breast cancer: New biomarkers and attractive therapeutic targets. *World J Exp Med.* 2013;3:34-42.
124. Romacho T, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:1-15.
125. Bruzzone MG, Eoli M, Cuccarini V, Grisoli M, Valletta L, Finocchiaro G. Genetic signature of adult gliomas and correlation with MRI features. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9:709-20.
126. Weng Y, Siciliano SJ, Waldburger KE, Sirotina-Meisher A, Staruch MJ, Daugherty BL, Gould SL, Springer MS, DeMartino JA. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem* 1998;273:18288-91.
127. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus host disease. *Blood* 2005;105:4191-9.
128. Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, Teshima T, Williams DL, Reddy P, Ordemann R, Clouthier SG, Lowler K, Liu C, Gerard C, Cooke KR, Ferrara JL. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol* 2003;31:897-902.
129. Piper KP, Horlock C, Curnow SJ, Arrazi J, Nicholls S, Mahendra P, Craddock C, Moss PA. CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 2007;110:3827-32.
130. Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Mantovani A. Negative regulatory receptors of the IL-1 family. *Semin Immunol* 2013;25:408-415.
131. Cullup H, Stark G. Interleukin-1 polymorphisms and graft-vs-host disease. *Leuk Lymphoma* 2005;46:517-23.
132. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10:593-619.
133. Levine JE, Logan BR, Wu J, Bolaños-Meade J, Ferrara JL, Ho VT, Weisdorf DJ, Paczesny S. Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict

- treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study. *Blood* 2012;119:3854-60.
134. Weber M, Stein P, Prüfer S, Rudolph B, Kreft A, Schmitt E, Bopp T, Roers A, Schild H, Fillatreau S, Radsak MP. Donor and host B cell-derived IL-10 contributes to suppression of graft-versus-host disease. *Eur J Immunol* 2014;44:1857-65.
135. Sakata N, Yasui M, Okamura T, Inoue M, Yumura-Yagi K, Kawa K. Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:1153-61.
136. Giannaccare G, Bonifazi F, Sessa M, Fresina M, Arpinati M, Bandini G, Versura P. Dry Eye Disease Is Already Present in Hematological Patients Before Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cornea*. 2016;35:638-43.
137. Leite SC, de Castro RS, Alves M, Cunha DA, Correa ME, da Silveira LA, Vigorito AC, de Souza CA, Rocha EM. Risk factors and characteristics of ocular complications, and efficacy of autologous serum tears after haematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:223-27.
138. Ivanir Y, Shimoni A, Ezra-Nimni O, Barequet IS. Prevalence of dry eye syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cornea*. 2013;32:e97-101.
139. Jensen SM, Pipper CB, Ritz C. Evaluation of multi-outcome longitudinal studies. *Stat Med*. 2015;34(12):1993-2003.
140. Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J*. 2016;7:15.
141. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv*. 2010;10:263-70.
142. Brissot E, Bossard C, Malard F, Braudeau C, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, Josien R, Gregoire M, Gaugler B, Mohty M. Involvement of the CX3CL1 (fractalkine)/CX3CR1 pathway in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol*. 2015;97:227-35.
143. Amparo F, Dastjerdi MH, Okanobo A, Ferrari G, Smaga L, Hamrah P, Jurkunas U, Schaumberg DA, Dana R. Topical interleukin 1 receptor antagonist for treatment of dry eye disease: a randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131:715-23.



## **11. ANEXOS**





## **ANEXO 1**

### **TRABAJO 1**

# Gene Expression–Based Predictive Models of Graft Versus Host Disease–Associated Dry Eye

Lidia Cocho,<sup>1</sup> Itziar Fernández,<sup>1,2</sup> Margarita Calonge,<sup>1,2</sup> Verónica Martínez,<sup>1</sup> María J. González-García,<sup>1,2</sup> Dolores Caballero,<sup>3</sup> Lucía López-Corral,<sup>3</sup> Carmen García-Vázquez,<sup>1</sup> Lourdes Vázquez,<sup>3</sup> Michael E. Stern,<sup>4</sup> and Amalia Enríquez-de-Salamanca<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Applied Ophthalmobiology (IOBA), University of Valladolid, Valladolid, Spain

<sup>2</sup>Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

<sup>3</sup>Hematology Service, University Hospital, Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>4</sup>Allergan, Inc., Irvine, California, United States

Correspondence: Amalia Enríquez-de-Salamanca, IOBA, University of Valladolid, Paseo de Belén 17, E47011 Valladolid, Spain; amalia@ioba.med.uva.es.

Submitted: February 23, 2015

Accepted: June 8, 2015

Citation: Cocho L, Fernández I, Calonge M, et al. Gene expression-based predictive models of graft versus host disease-associated dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:4570-4581. DOI:10.1167/iovs.15-16736

**PURPOSE.** To develop a predictive model based on inflammatory gene mRNA expression in conjunctival cells of graft versus host disease (GvHD)-associated dry eye (DE) patients, as well as to find meaningful correlations between gene signals and clinical signs.

**METHODS.** Twenty GvHD-DE patients and 14 healthy controls were recruited. Patients discontinued medications for 1 week before examination. Dry eye-related symptoms and signs were recorded, and conjunctival epithelial cells were collected by impression cytology after spending 20 minutes under standard conditions within a Controlled Environmental Research Laboratory. Gene expression of inflammatory molecules was determined by polymerase chain reaction, and the results were correlated with clinical signs. Shrinkage discriminant analysis, support vector machine, and k-nearest neighbor classifier methods were used to develop predictive models that were validated considering accuracy, calibration, and discriminant capability.

**RESULTS.** Out of the 84 genes analyzed, 34 showed significant differences in expression. *IL-6*, *IL-9*, *CCL24*, *CCL18*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* , and *CCL2* were highly increased (>6-fold); 26 genes were moderately upregulated (2- to 6-fold), whereas *EGFR* was downregulated (2.63 fold) in GvHD-DE samples. A panel based on *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* had an area under the receiver operating characteristic curve of 0.994, a sensitivity of 100%, and a specificity of 92.9%. *EGFR* expression correlated negatively with ocular surface damage markers, while *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* correlated positively with these tests.

**CONCLUSIONS.** *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* have the greatest potential as diagnostic biomarkers, with excellent sensitivity, specificity, and clinical relevance to the ocular surface status of GvHD.

**Keywords:** ocular GvHD, dry eye disease, keratoconjunctivitis sicca, graft versus host disease, conjunctiva, cytokine, biomarker, gene expression

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has rapidly evolved over the past decades, becoming a cornerstone in the management of malignant and nonmalignant hematologic disorders.<sup>1</sup> However, patients subjected to allogeneic HSCT can develop graft versus host disease (GvHD), which constitutes the main cause of morbidity and mortality in these patients.<sup>2</sup> Graft versus host disease, which has both acute and chronic forms,<sup>3</sup> is an immune-mediated destruction of host tissues by immunocompetent cells from the donor.<sup>4</sup>

Ophthalmic findings are more frequent in chronic GvHD, affecting up to 60% to 90% of patients.<sup>5-7</sup> Although the posterior segment can be affected, usually in the form of infectious complications from the concomitant immunosuppressive state, anterior segment involvement is much more prevalent. For the anterior segment GvHD, dry eye (DE) disease (keratoconjunctivitis sicca) is the most common complication.

Graft versus host disease-associated DE (GvHD-DE) can be mild or moderate, but it is often the most severe type of DE, similar to and often worse than Sjögren-related DE. It can lead

to serious abnormalities of the ocular surface, affecting the patient's quality of life and eventually leading to permanent visual loss. Graft versus host disease-DE is mainly due to aqueous tear deficiency, and histological analysis shows Sjögren syndrome-like inflammatory destruction of the conjunctiva and lacrimal gland with fibrosis, resulting in tear production deficiency.<sup>8</sup> In 2005, the Schirmer test was proposed as the paramount diagnostic test for GvHD-DE patients<sup>5</sup> despite its well-known lack of sensitivity and specificity.<sup>9</sup> The general lack of adequately validated objective tests to diagnose DE was recognized in the 2007 International Dry Eye Workshop,<sup>10</sup> and controversy remains as to whether or not GvHD-DE diagnosis should rely on tear dynamic testing, clinical exams, or new technologies.<sup>11</sup> As DE has been defined as an inflammatory disease of the lacrimal functional unit (LFU),<sup>12</sup> inflammatory mediators are being researched as potential biomarkers in DE in general, and in GvHD-DE in particular. In fact, different study groups have already described changes in cytokines, chemokines, growth factors, and their receptor levels in tear and/or

conjunctival epithelial cells in DE patients.<sup>13–20</sup> Thus, there is a growing interest in the identification of the molecules that could be specifically involved in the pathogenesis of GvHD-DE.

A major barrier to GvHD-DE research and treatment is that diagnosis and prognosis rely almost entirely on the presence of clinical symptoms and unreliable tests, like the Schirmer test. No currently used laboratory tests can predict the risk of developing the disease, responsiveness to treatment, or patient survival. Thus, the importance of biomarkers is crucial. A good diagnostic test for GvHD must be able to distinguish patients with GvHD-DE from those without GvHD-DE. Further, any biomarker should specifically and sensitively reflect the disease state and should be noninvasive, inexpensive, and standardized.<sup>21</sup> Several clinical trials related to GvHD-DE patients are currently in progress, evaluating the efficacy of different anti-inflammatory drugs. Thus, the progress in GvHD-DE biomarker identification and validation is important, as clinical trial design will begin incorporating these biomarkers.

Moreover, there is a lack of studies focused on LFU changes in these GvHD-DE patients, and to our knowledge, only one study has been published describing gene expression analysis in the conjunctival cells of these patients.<sup>22</sup> In this context, the use of predictive models could help in understanding not only the importance of single gene expression, but also the importance of the coordinated expression of groups of genes involved in GvHD-DE. Such predictive models rely on the identification of gene signatures that consist of a group of genes expressed in association with a biological state of interest. A properly constituted predictive model could increase the diagnostic and prognostic power of gene expression data in clinical applications. These kinds of models seek to predict a classification variable, for example, susceptibility to GvHD-DE, based on known gene expression responses. Additionally, model validation, which evaluates how close the statistical model is to reality, is necessary and gives important information about the reliability of the model and the means by which it is derived.

The first aim of the present study was to analyze the expression of a panel of inflammatory gene mediators in conjunctival epithelial cells collected from GvHD-DE patients. The second aim was to develop and validate different prediction models based on the expression of these genes.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Healthy Controls

This study was approved by the Institute of Applied Ophthalmobiology (IOBA) institutional review board and the University of Valladolid Clinical Hospital Ethics Committee, Valladolid, Spain, and followed the tenets of the Declaration of Helsinki. All enrolled patients and subjects were informed of the nature of this study, and written consent was obtained from all of them.

Graft versus host disease-DE patients were selected from those referred to IOBA by the Hematology Department of the University of Salamanca Clinical Hospital, Salamanca, Spain. To ensure as much as possible that the results would not be influenced by the effects of topical medications and/or any other condition, inclusion and exclusion criteria were established to ensure that patients were stable. Consequently, the most severely affected patients were excluded. For the same reason, patients included in the study were asked to discontinue their topical therapies for 7 days before the samples were taken. Only artificial tears and lubricants were allowed. Thus, inclusion criteria for patients were as follows: (1) abnormal results of at least three DE diagnostic tests that included the ocular surface disease index (OSDI) score > 12

points, fluorescein tear breakup time (T-BUT) < 7 seconds, corneal fluorescein staining and conjunctival Lissamine green staining > 1 (Oxford scale), and Schirmer test without topical anesthesia ≤ 5 mm in 5 minutes; (2) feasibility of discontinuing topical anti-inflammatory medications for 1 week, as judged by the attending ophthalmologist (MC); and (3) patients had to be systemically stable with GvHD under control with no relapse of the patient's primary malignancies and no secondary infections as judged by the referral physician (DC). Exclusion criteria included any ocular active disease other than DE, contact lens wear, any ophthalmic surgery in the past 6 months, any eye drop other than artificial tears and lubricants, and any systemic medication that was not continuous or constant in treatment and dosage for at least 3 months prior to this study.

Healthy volunteers, similar in age and sex to the study cases, were selected as the control group and were examined to make certain their ocular status was within normal limits. Inclusion criteria for this group included (1) absence of ocular surface-related symptoms (OSDI score ≤ 12 points) and (2) normal limits in at least two of the following four ocular surface tests: fluorescein T-BUT ≥ 7 seconds, corneal fluorescein staining and conjunctival Lissamine green staining (Oxford Scale) ≤ grade 1, and Schirmer test without anesthesia > 5 mm in 5 minutes. Exclusion criteria for this control group included any present or previous history of ophthalmic or systemic disease, any ophthalmic surgery, under any medication, pregnancy, or current contact lens wear.

### Clinical Evaluation and Sample Collection

All individuals were evaluated after 20-minute exposure in a controlled environmental chamber (VISIÓN I+D, SL; Valladolid, Spain) located in the Controlled Environmental Research Laboratory (CERLab) at IOBA, University of Valladolid, Valladolid, Spain.<sup>23,24</sup> The temperature was maintained at 23°C and the relative humidity (RH) at 45%, which corresponds to a comfortable indoor temperature and the average RH in Valladolid.

Clinical evaluation was always performed by the same two clinicians (LC and VM). Each one always evaluated the same tests in the following sequence: (1) OSDI questionnaire,<sup>25</sup> (2) conjunctival hyperemia, (3) tear stability, (4) corneal integrity, (5) tear production, and (6) conjunctival epithelial cell collection.

For the OSDI questionnaire, the eye with the higher score was selected as the most symptomatic eye. A random data table was used in those cases in which both eyes were equally symptomatic and for control subjects. The most symptomatic eye was used in the clinical evaluation and for conjunctival cell sampling. Conjunctival hyperemia was evaluated under a slit lamp and based on the Nathan-Efron scale (0–4).<sup>26</sup> Tear stability was evaluated by measuring T-BUT. Five microliters of 2% sodium fluorescein was gently applied into the outer third of the inferior fornix with a micropipette. The time between the last of three blinks and the appearance of the first dry spot was measured three times, and the mean value was recorded.

Corneal integrity was evaluated using a slit lamp mounted with a cobalt blue filter (Topcon Corp., Tokyo, Japan) and a yellow Wratten no. 12 filter (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). The evaluation was done 2 minutes after instillation of 5 µL 2% sodium fluorescein. For the evaluation of conjunctival integrity, Lissamine green strips (GreenGlo; HUB Pharmaceuticals, LLC, Rancho Cucamonga, CA, USA) were wet with 25 µL sodium chloride and then gently applied into the inferior fornix. Corneal and conjunctival staining were scored using the Oxford Scale (score 0–5).<sup>27</sup> Tear production was assessed by

Schirmer test without topical anesthesia. A Schirmer sterile strip (Tearflo; HUB Pharmaceuticals, LLC) was placed in the lateral canthus of the inferior lid margin. The length of wetting was measured in millimeters after 5 minutes with eyes closed.

Conjunctival epithelial cell collection was performed by conjunctival impression cytology (CIC) under topical anesthesia. Two halves of polyethersulfone filter (Supor 200, pore size: 0.20  $\mu\text{m}$ , diameter: 13 mm; Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA) were gently applied on the upper and upper-temporal bulbar conjunctiva for 10 seconds under moderate pressure. Then the filters were suspended in 1 mL lysis buffer (RLT Buffer; Qiagen, Hilden, Germany) containing 1% 2-mercaptoethanol (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent isolation of total RNA.

### Gene Expression Analysis in Conjunctival Epithelial Cells by Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

**RNA Isolation and cDNA Synthesis.** For RNA isolation, total RNA was extracted from each CIC sample by a commercial kit (RNeasy Micro Kit, Qiagen) and treated with RNase-free DNase following the manufacturer's instructions. The first strand of cDNA was synthesized from the total extracted RNA using the commercial kit HT RT2 First Strand (Qiagen). One hundred nanograms of cDNA from each sample was synthesized.

**Real-Time PCR Array Analysis.** Gene analysis using a real-time PCR (RT-PCR) array was performed according to the manufacturer's recommendations using a customized array Profiler (SuperArray SABioscience, Qiagen, Izasa, S.A., Barcelona, Spain) that used SYBR Green I dye detection. We determined the expression of 84 human genes (Table 1), along with the expression of five housekeeping genes: actin beta, beta-2-microglobulin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, and large ribosomal protein P0. Additionally, the array included one control to monitor genomic DNA contamination, three reverse transcription controls for first strand synthesis, and three positive PCR controls for real-time PCR efficiency. Genes included in the customized array were selected based in part on a previous study (unpublished results) in which differential gene expression was analyzed in a pool of patient samples versus a pool of control samples. Other genes were included because they were known to be important in either GvHD or DE.<sup>19,21</sup>

The assay was done following the manufacturer instructions. Briefly, 102  $\mu\text{L}$  (100 ng) of the diluted first strand cDNA synthesis reaction was mixed with 1275  $\mu\text{L}$  2 $\times$  SuperArray PCR Master Mix (SABioscience, Qiagen, Izasa, S.A.) and 1173  $\mu\text{L}$  double-distilled  $\text{H}_2\text{O}$ . This mixture and the template cocktail (25  $\mu\text{L}$  each) were added to each well of the PCR array. Real-time PCR (7500 Real Time PCR System; Applied Biosystems, Madrid, Spain) was then performed as follows: 10 minutes at  $95^{\circ}\text{C}$ , 40 cycles of 15 seconds at  $95^{\circ}\text{C}$ , and 1 minute at  $60^{\circ}\text{C}$ . A melting curve program generated the dissociation curve for each well in the entire plate to verify the identity of each gene amplification product.

Samples were individually analyzed. However, in some GvHD-DE patients, the amount of RNA obtained from CIC was not enough for individual analysis ( $<100$  ng); therefore, three of these samples consisted of a pool of patients. The first pooled sample was from patients 2, 3, and 4, and the second was from patients 5 and 6. The third pooled sample was from patients 17, 18, 19, and 20.

For data analysis, the Ct method, where the target fold =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (User Bulletin, No. 2, P/N 4303859; Applied Biosystems), was used. The results were reported as a fold upregulation when the fold change for patients was greater than 1 compared to the healthy controls. If the fold change was

less than 1, the negative inverse of the result was reported as a fold downregulation.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by a licensed statistician (IF) using the R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and packages from the Bioconductor project.<sup>28</sup> Data were determined as means  $\pm$  standard deviations, unless otherwise specified. To compare samples of independent groups, the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test was used. To assess the association between qualitative variables, Fisher's exact test was used. A  $P$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

The expression stability of two candidate reference genes, actin beta and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, was estimated using the geNorm algorithm<sup>29</sup> with the ReadqPCR and NormqPCR packages.<sup>30</sup> The analysis of selected genes was conducted using moderated  $t$ -test,<sup>31</sup> implemented in the HTqPCR package.<sup>32</sup> To quantify correlations between gene expression levels and clinical parameters, the Spearman ranked correlation coefficient ( $\rho$ ) was used, along with a  $P$  value that contrasts the null hypothesis  $\rho = 0$ ; that is, there is no correlation between tear levels and clinical parameters. Moreover, a bootstrap confidence interval for this coefficient was built using 5000 bootstrap samples.

### Construction of the Gene Expression-Based Predictive Models

We conducted gene signature identification using three different classification models. The selection of relevant genes was based on the minimum redundancy-maximum relevance (mRMR) algorithm<sup>33</sup> through repetitions of the leave-one-out cross-validation (LOOCV) process (Fig. 1). We used incremental feature selection to determine the optimal size of the signature. The LOOCV process was repeated 84 times, the total number of candidate genes. The LOOCV-based error rate for each  $m$ -gene signature was estimated, where an  $m$ -gene signature is a group of " $m$ " genes within which the combined expression could be used to identify GvHD-DE patients. The optimal size of the signature was defined as the size of the set with the best prediction accuracy and smallest gene number.

Two-class discriminative models were built using three techniques: (1) shrinkage discriminant analysis (SDA), (2) support vector machine (SVM), and (3)  $k$ -nearest neighbor classifier (kNN). The classical discriminant analysis involves the determination of a linear combination of predictors of gene expression, termed the "discriminant function," that maximizes the differences between classes. In general, this method has suboptimal performance when the sample size is small and the number of predictors is large because the commonly used estimators for the variances can become unstable and reduce the classification accuracy. One solution is to make use of shrinkage-based variance estimators. In this study, we used SDA based on James-Stein-type shrinkage estimators.<sup>34</sup>

Support vector machine aims at searching for a hyperplane that separates the two classes with the largest margin or distance between the hyperplane and the point closest to it.<sup>35</sup> A key factor in SVM is to use kernels to construct the decision boundaries. We used linear kernels with the e1071 package<sup>36</sup> to fit this model.

The kNN is a distance-based approach for classification.<sup>37</sup> To classify a new observation with the kNN algorithm, the setting  $k$ , as a predefined parameter, finds the  $k$ -closest observations and classifies the new observation by majority vote. Thus, it chooses the class that is most common among the  $k$  neighbors. In this work, we used the Euclidean distance,



TABLE 1. Panel of Inflammatory Genes Included in Customized SuperArray Profiler

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

and the optimal *k* was decided based on the classification error estimated by a LOOCV procedure. The class package<sup>38</sup> was used to fit this model.

Using the Brier score as a global measure, we determined the accuracy, calibration, and discrimination capability of the models.<sup>39</sup> The Brier score is based upon individual differences between predicted risks in terms of likelihood and observed final outcomes. The Brier score ranges from 0 for a perfect degree of agreement to 1 for the worst possible degree of agreement.

We used two methods to evaluate the calibration of the model, measured as the degree of agreement between the predicted and observed values. With the calibration in the large (CL) method, a perfectly calibrated model will have a CL value of 0 and a calibration slope of 1. For this method, the scores are not bounded, so the model will be badly calibrated if the values

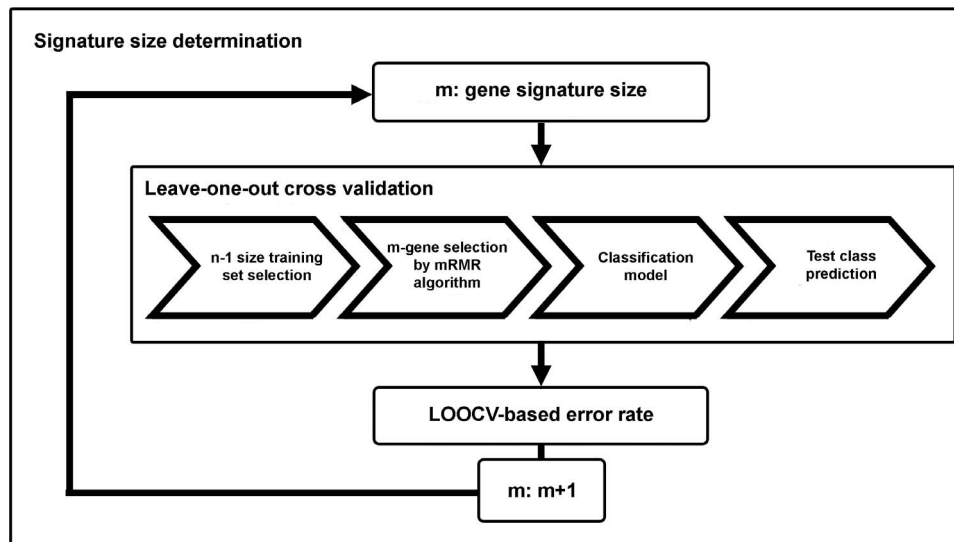
depart from the optimal values. We also used the Hosmer-Lemeshow test, which is significant for badly calibrated models.

We used the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis to assess the discriminant ability of the fitted models. They were evaluated and compared according to the area under the ROC curve (AUC). In addition, the sensitivity and specificity for each ROC curve were obtained by setting an optimal threshold using the pROC package.<sup>40</sup>

## RESULTS

### Clinical Evaluation

A total of 20 GvHD-DE patients (13 males, 7 females; 56.8 ± 11.6 years of age; range, 34–72 years) and 14 healthy volunteers (8



**FIGURE 1.** Gene signature identification process. Gene signature ( $m$ ) identification was conducted using three different classification models. The selection of relevant genes was based on the minimum redundancy-maximum relevance (mRMR) algorithm, through repetitions of the leave-one-out cross-validation (LOOCV) process.

males, 6 females;  $51.9 \pm 14.7$  years of age; range, 30–75 years) were recruited. There were no significant differences in sex ( $P = 0.916$ ) or age ( $P = 0.3533$ ) between the groups. Clinical history, including previous diagnosis for HSCT, time to GvHD-DE diagnosis, and systemic and topical therapies, is shown in Table 2.

The GvHD-DE patients had significantly more frequent and intense ocular surface symptoms than controls, as reflected by a higher OSDI questionnaire score (Table 3). Ocular surface examination, including conjunctival hyperemia, T-BUT, corneal fluorescein staining, Lissamine green conjunctival staining, and Schirmer test, revealed that GvHD-DE patients always had significantly altered clinical tests compared with controls. However, the values were not extremely altered, reflecting the fact that patients were selected from among those who could stop topical medications for 1 week and who therefore had only a moderate level of inflammation.

### Conjunctival Epithelial Cell Gene Expression Analysis

Out of the 84 genes studied (Table 1), 33 were significantly upregulated in GvHD-DE patients compared to controls (Table 4). Of those, the genes most upregulated were *IL-6*, *IL-9*, *CCL24*, *CCL18*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* , and *CCL2*, with a fold increase in value between 17.50 and 6.26. The expression of *IL-17E*, *IFNA2*, *IL-12A*, *TNF*, *BMP2*, *CCL3*, *CXCL12*, *CSF2*, *IL-18*, *IL-17B*, *CCL11*, *IL-4*, *CSF3*, *IL-9R*, *CXCL3*, *TGFB3*, *IL-12B*, *IL-1B*, *IL-5*, *TGFB2*, *TNFSF11*, *IL-22R*, *CXCL13*, *VEGFA*, *IL-15*, and *NAMPT* genes was upregulated 2- to 6-fold. Additionally, the expression of *IL-5RA*, *IL-2*, *CCL4*, *CXCL1*, and *TNFSF10* was upregulated with borderline statistical significance ( $0.05 < P$  value  $\leq 0.08$ ). Finally, *EGFR* gene was the only gene significantly downregulated ( $-2.59$  fold) in GvHD-DE patients compared to healthy controls.

### Predictive Model Results

Three different classification methods, SDA, SVM, and kNN, were used to analyze a panel of molecules expressed in conjunctival epithelial cells that could help diagnose and monitor GvHD-DE in a better way than any single-gene

evaluation (Fig. 2). Based on the output of the mRMR algorithm, we tested the accuracy of each of the three models with  $m$  genes as predictors. The  $m$ -parameter was determined by incremental feature selection, starting with  $m = 1$  and adding one gene at a time until  $m = 84$ . The LOOCV-based performance for each of the  $m$ -gene models was estimated and used to determine the optimal  $m$  in each case. The accuracy reached the maximum value when four genes, *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT*, were included in the SVM-based model (Fig. 2). For the kNN- and SDA-based models, a panel of five and eight genes, respectively, was optimal. For the kNN model, *IFN- $\gamma$*  was included along with the four genes used in the SVM model. For the SDA model, *IFN- $\gamma$* , *TGFB2*, *CCL3*, and *VEGFA* were included with the four genes from the SVM model.

### Internal Validation

We used the LOOCV procedure to validate our results (Table 5). Three aspects were evaluated in each case: accuracy, calibration, and discrimination ability. All models were accurate, with Brier scores close to 0, and none of them presented serious problems of calibration. With respect to the discriminative performance, the SVM-based model was somewhat better than the others, with an AUC of 0.995, a sensitivity of 100%, and a specificity of 92.9%.

Taking into account all of these results, we determined that the model obtained by the SVM method, based on *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* gene expression levels, produced the best model to predict the occurrence of GvHD-DE. Thus, this panel consisting of four biomarkers effectively discriminated between patients with and without GvHD-DE.

### Correlations Between Selected Gene Expression and Clinical Data

There were significant correlations between the expression of *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* and the clinical tests (Fig. 3). Considering the entire sample of patients and controls, the expression of *EGFR* was negatively correlated with the OSDI questionnaire score, conjunctival hyperemia, fluorescein corneal staining, and Lissamine green conjunctival staining. In contrast, *EGFR* expression was positively correlated with T-

TABLE 2. Clinical Data of Graft Versus Host Disease Dry Eye (GvHD-DE) Patients

Patient	Previous Diagnosis	HSC T Date	Time From HSC T to GvHD-DE Diagnosis, mo	Systemic Therapy	Topical Therapy (Discontinued 7 d Before Sample Collection)
1	Hodgkin disease	2003	36	Tacrolimus	Autologous serum, 0.4% preserved medroxyprogesterone
2	Non-Hodgkin lymphoma	2006	9	None	Autologous serum, 0.05% unpreserved cyclosporin A
3	Acute lymphoblastic leukemia	2000	24	None	None
4	Acute myeloid leukemia	2005	12	None	Autologous serum, 0.1% preserved fluorometholone
5	Acute myeloid leukemia	2008	3	Cyclosporin A	None
6	Hodgkin disease	2006	18	None	0.05% unpreserved cyclosporin A
7	Acute lymphoblastic leukemia	2004	12	None	None
8	Myelodysplastic syndrome	2010	3	Tacrolimus	Autologous serum
9	Acute myeloid leukemia	2007	36	Tacrolimus, prednisone	None
10	Chronic myeloid leukemia	1997	12	None	0.1% preserved fluorometholone, autologous serum
11	Chronic myeloid leukemia	2011	2	None	Autologous serum
12	Myelodysplastic syndrome	2012	1	Rapamycin	Autologous serum
13	Chronic lymphoblastic leukemia	2012	15	Rapamycin, tacrolimus, methylprednisolone	0.1% unpreserved dexamethasone
14	Myelodysplastic syndrome	2012	6	Prednisone	Autologous serum
15	Chronic myeloid leukemia	2011	27	Rapamycin	Autologous serum
16	Multiple myeloma	2012	6	Rapamycin, thalidomide, cyclophosphamide	Autologous serum
17	Myelodysplastic syndrome	2007	2	Tacrolimus	0.1% preserved fluorometholone, autologous serum, 0.05% unpreserved cyclosporin A
18	Myelodysplastic syndrome	2012	6	Tacrolimus	Autologous serum, 1.5% hydrocortisone ointment
19	Chronic myeloid leukemia	2010	3	Prednisone	0.03% tacrolimus ointment, autologous serum
20	Acute myeloid leukemia	2012	10	Methylprednisolone	Autologous serum, 0.1% unpreserved dexamethasone

HSTC, hematopoietic stem cell transplantation.

BUT and Schirmer test results. *IL-6* and *IL-9* were positively correlated with hyperemia and fluorescein staining, and negatively correlated with T-BUT and Schirmer test results. Additionally, *IL-6* was positively correlated with OSDI questionnaire score. Finally, *NAMPT* gene expression was positively correlated with OSDI, hyperemia, and corneal staining while inversely correlated with T-BUT and Lissamine green staining.

DISCUSSION

In the present study, we analyzed the expression of a panel of inflammatory mediator genes in conjunctival epithelial cells of patients with GvHD-DE. Inflammation-related genes were

selected as both pathologies, DE and GvHD, have been demonstrated to have an inflammatory etiology, and proteins encoded by them have shown an important role in mobilization and recruitment of immune cells in affected tissues.<sup>12,21</sup> We then developed and validated different prediction models based on the expression of these genes.

Clinical evaluation of the enrolled patients revealed that all of them suffered a moderate-to-severe DE as shown by the clinical test scores. The GvHD-DE patients had significantly more DE symptoms, lower Schirmer test scores, and considerably decreased T-BUT values compared to healthy controls. Ocular surface integrity, as evaluated by fluorescein and Lissamine green vital staining, was significantly altered compared to controls; however, it was not so severely damaged

TABLE 3. Ocular Examination Parameters

	Healthy Controls, n = 14	GvHD-DE Patients, n = 20	P Value
OSDI questionnaire	3 ± 3.7	45.3 ± 22.7	<0.0001
Conjunctival hyperemia	0 ± 0	1 ± 1	<0.0001
T-BUT, s	6.8 ± 2.8	2.5 ± 2.4	0.0001
Corneal fluorescein staining	0 ± 0	2 ± 2	<0.0001
Lissamine green conjunctival staining	0 ± 0	2 ± 1	0.0006
Schirmer test without anesthesia	10.9 ± 7.5	3.8 ± 3	0.001

Data are presented as mean ± standard deviation in OSDI, T-BUT, and Schirmer test. Data are presented as median ± interquartile range in hyperemia, fluorescein corneal staining, and Lissamine green conjunctival staining. Significant changes (P < 0.05) are denoted in bold.

**TABLE 4.** Fold Up- or Downregulation of Gene Expression in Conjunctival Epithelial Cells of Graft Versus Host Disease-Dry Eye Patients Compared to Healthy Controls

Gene	Fold Change	P Value	Gene	Fold Change	P Value
<i>AIMP1</i>	-1.0526	0.9456	<i>IL4</i>	4.6064	<b>0.0300</b>
<i>BMP2</i>	5.1207	<b>0.0028</b>	<i>IL5</i>	3.8667	<b>0.0488</b>
<i>CCL1</i>	-1.0124	0.9884	<i>IL6</i>	17.5002	<b>0.0002</b>
<i>CCL2</i>	6.2658	<b>0.0028</b>	<i>IL8</i>	4.7912	<b>0.0134</b>
<i>CCL11</i>	4.6814	<b>0.0316</b>	<i>IL9</i>	9.7630	<b>0.0004</b>
<i>CCL17</i>	2.6773	0.0856	<i>IL10</i>	7.7101	<b>0.0020</b>
<i>CCL18</i>	8.4752	<b>0.0080</b>	<i>IL12A</i>	5.5056	<b>0.0156</b>
<i>CCL24</i>	8.8615	< <b>0.0001</b>	<i>IL12B</i>	3.9194	<b>0.0304</b>
<i>CCL26</i>	-1.5463	0.6100	<i>IL13</i>	2.9178	0.0878
<i>CCL3</i>	5.0640	<b>0.0030</b>	<i>IL15</i>	2.3694	<b>0.0170</b>
<i>CCL4</i>	3.0156	<i>0.0770</i>	<i>IL16</i>	1.1224	0.8694
<i>CCL5</i>	1.6693	0.2822	<i>IL17A</i>	2.5200	0.1148
<i>CCL7</i>	2.3739	0.1652	<i>IL17B</i>	4.7314	<b>0.0108</b>
<i>CCR1</i>	1.5794	0.5286	<i>IL17C</i>	-2.1992	0.3248
<i>CCR2</i>	1.3312	0.6224	<i>IL17E</i>	5.9851	<b>0.0218</b>
<i>CCR3</i>	2.4451	0.2550	<i>IL17F</i>	1.2965	0.7560
<i>CCR4</i>	2.4328	0.1768	<i>IL18</i>	1.2295	0.4744
<i>CCR5</i>	-1.4112	0.4908	<i>IL27</i>	3.0838	0.1082
<i>CCR6</i>	2.6908	0.1572	<i>IL1RN</i>	1.5494	0.1816
<i>CD40LG</i>	1.5925	0.5306	<i>IL5RA</i>	3.7640	<i>0.0796</i>
<i>CSF2</i>	4.9735	<b>0.0294</b>	<i>IL9R</i>	4.0484	<b>0.0484</b>
<i>CSF3</i>	4.2827	<b>0.0072</b>	<i>IL17RA</i>	-1.3229	0.4312
<i>CX3CL1</i>	-1.5436	0.6382	<i>IL17RC</i>	1.0978	0.8658
<i>CX3CR1</i>	1.3032	0.6588	<i>IL22R</i>	3.1344	<b>0.0184</b>
<i>CXCL1</i>	2.9250	<i>0.0754</i>	<i>LTA</i>	2.8006	0.1692
<i>CXCL2</i>	1.7630	0.2720	<i>LTB</i>	2.4248	0.1952
<i>CXCL3</i>	3.9719	<b>0.0418</b>	<i>MIF</i>	1.2832	0.2566
<i>CXCL9</i>	3.0113	0.0960	<i>NAMPT</i>	2.2890	<b>0.0002</b>
<i>CXCL10</i>	2.7774	0.2396	<i>TNF</i>	5.3940	<b>0.0036</b>
<i>CXCL11</i>	1.8866	0.4146	<i>TNFRSF11B</i>	1.0220	0.9686
<i>CXCL12</i>	5.0477	<b>0.0076</b>	<i>TNFSF10</i>	1.4051	<i>0.0792</i>
<i>CXCL13</i>	2.9757	<b>0.0208</b>	<i>TNFSF11</i>	3.2002	<b>0.0490</b>
<i>XCL1</i>	2.1767	0.2232	<i>TNFSF4</i>	-1.9841	0.1702
<i>CXCR1</i>	2.2647	0.2136	<i>VEGFA</i>	2.9702	<b>0.0014</b>
<i>CXCR2</i>	1.0780	0.9268	<i>EGF</i>	1.2352	0.6720
<i>CXCR3</i>	1.0825	0.9180	<i>EGFR</i>	-2.5926	< <b>0.0001</b>
<i>FASLG</i>	1.4435	0.5344	<i>MMP9</i>	2.5997	0.1080
<i>IFNA2</i>	5.6058	<b>0.0458</b>	<i>TGFB1</i>	1.3618	0.4410
<i>IFNG</i>	6.9790	<b>0.0050</b>	<i>TGFB2</i>	3.3314	<b>0.0254</b>
<i>IL1A</i>	2.2711	0.2490	<i>TGFB3</i>	3.9609	<b>0.0474</b>
<i>IL1B</i>	3.8988	<b>0.0174</b>	<i>TLR2</i>	-1.1571	0.7290
<i>IL2</i>	3.1437	<i>0.0658</i>	<i>TLR4</i>	1.2942	0.6900

Significant changes ( $P < 0.05$ ) are denoted in bold. Borderline significant  $P$  values ( $0.05 < P < 0.08$ ) are denoted in italics.

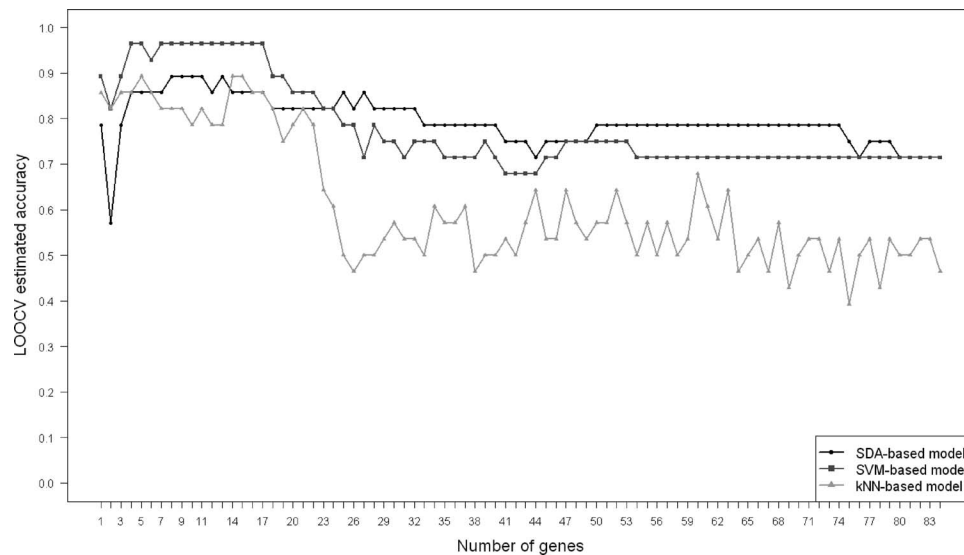
that the patients could not stop their anti-inflammatory topical medications for a week as required by the inclusion criteria.

Of the 84 genes studied in conjunctival epithelial cells, 34 had a statistically significant different expression in the GvHD-DE patients compared to the controls. Those that demonstrated the most significant differences between groups were *IL-6*, *IL-9*, *CCL24*, *CCL18*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* , *CCL2*, and *EGFR*. Some of the proteins encoded by these genes have already been related to GvHD or to DE.<sup>18,41,42</sup> When we look at the changes in mRNA expression, these results give us information about which inflammatory pathways may be active in the disease.

When developing a disease predictive model, not only should differential gene expression be taken in account, but also the biological significance of the results must be assessed. Multiple biomarker-based predictive models may increase sensitivity, specificity, and predictive or diagnostic performance compared to the use of single-molecule models. Multiple biomarker models are a frequently applied technique

in the study of systemic GvHD. Paczesny et al.<sup>43</sup> determined that a panel of four biomarkers in serum (*IL-2R $\alpha$* , *TNFR1*, *IL-8*, and *HGF*) could discriminate patients with acute GvHD from controls. Most recently, a three-biomarker panel in serum, consisting of *IL-2Ra*, *TNFR1*, and elafin, was tested prospectively at different times, and it showed reasonably good specificity (75%) and fair sensitivity (57%) for the development of acute GvHD.<sup>44</sup> Furthermore, other research groups have established different biomarker-based models in GvHD.<sup>45,46</sup> We intended to apply this technology to the accurate diagnosis and prediction of ocular complications of GvHD, and for that we used minimally invasive techniques like CIC for ocular sample collection and biomarker determination. To find the best model, we selected genes for which the activity or expression was not redundant or a reflection of the increase or activation of another gene. Additionally, the three predictive models that we used, SDA, SVM, and kNN, are appropriate for small sample size and large number of feature datasets, as in our case.<sup>47</sup>





**FIGURE 2.** Leave-one-out cross-validation method for estimating accuracy of the SDA, SVM, and kNN predictive models for GvHD-DE. The number of genes used for classification is represented on the *x*-axis, and the *y*-axis corresponds to the estimated accuracies evaluated by LOOCV of each of the three fitted models. The LOOCV-based error rate for each *m*-gene signature was estimated. The optimal size of the signature was defined as the size of the set with best prediction accuracy and smallest number of genes. LOOCV, leave-one-out cross-validation; SDA, linear discriminant analysis; SVM, support vector machine; kNN, k-nearest neighbor classifier.

According to the results obtained by these methods, the panel of four genes, *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT*, produced the best model to predict the occurrence of GvHD-DE.

EGFR, which encodes the protein epidermal growth factor receptor, was the only mRNA that was downregulated in GvHD-DE patients. The EGFR protein is one of the most targeted receptors in the field of oncology, where inhibitors have demonstrated clinical success in specific cancers.<sup>48</sup> Moreover, EGFR is expressed on corneal epithelial cell surfaces, where it is considered to play an important role in cell proliferation during corneal wound healing.<sup>49</sup> Its activation appears to be effective in reducing the time of re-epithelialization and has potential uses in severe DE.<sup>50</sup> In fact, soluble EGFR is significantly increased in tears of DE patients compared to healthy controls.<sup>51</sup> To our knowledge, it has not been described in ocular samples of GvHD-DE patients or elsewhere in systemic GvHD patients.

In contrast to EGFR, IL-6 is a well-known molecule in GvHD. It is a multifunctional cytokine involved in the regulation of the immune response, hematopoiesis, and inflammation, and there is evidence suggesting that IL-6 plays a pivotal role during the transition from innate to acquired immunity.<sup>52</sup> Furthermore, under proinflammatory stimuli, conjunctival epithelial cells are an important source of this cytokine.<sup>53</sup> Regulatory T cell function is inhibited by IL-6 produced by activated dendritic cells,<sup>54</sup> and anti-IL-6 receptor antibody administration in an acute GvHD mouse model induced T-regulatory cells<sup>55</sup> and decreased GvHD-related mortality.<sup>56</sup> Therefore, IL-6 plays a critical role in GvHD pathophysiology.<sup>57</sup> Many studies have shown increased levels of IL-6 in patients with severe GvHD.<sup>58,59</sup> The median level of tear IL-6 from ocular GvHD patients is significantly elevated compared to controls,<sup>60</sup> and additionally, expression is increased in CIC samples of DE patients.<sup>15,16</sup> Based on these data, IL-6 could be a sensitive disease biomarker, but it seems to lack specificity, as it is increased in diverse post-HSCT complications, such as infections, mucositis, and venous occlusive disease.<sup>61</sup>

IL-9 has been most frequently associated with allergic inflammation and immunity to extracellular parasites. Additionally, it plays a role in Th1/Th17-mediated inflammation and

in T-regulatory response.<sup>62</sup> IL-9 was first recognized as a Th2-related cytokine, but it is now clear that it is produced by various CD4<sup>+</sup> T-cell subsets, including the newly defined Th9 cells.<sup>63</sup> In the present study, IL-9 seems to play an important role in the pathogenesis of GvHD-DE, but to our knowledge, serum or tear levels have not been studied yet. Tawara et al.<sup>64</sup> concluded that deficiency of the four classical Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13) in mice enhances T-cell proliferative responses and aggravates GvHD. The importance of this finding has to be confirmed, and further investigation is needed. If substantiated, this molecule could play an important role in the pathogenesis of GvHD-DE because an allergic disease was definitely excluded in all of our patients. IL-9 might be a good biomarker for this disease, as its specificity is higher than that of other molecules studied.

The fourth gene in the predictive model, *NAMPT* (nicotinamide phosphoribosyltransferase, also called visfatin), produces an enzyme that catalyzes nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) synthesis. NAMPT is also a proinflammatory cytokine that promotes B cell maturation and inhibits neutrophil apoptosis.<sup>65</sup> It has been implicated in the susceptibility to and pathogenesis of a number of human pathologic conditions, including malignancies, obesity, and diabetes. Interestingly, NAMPT has been considered a novel marker of chronic inflammation, and the mRNA is upregulated in mononuclear cells from patients suffering chronic inflammatory diseases like psoriasis, rheumatoid arthritis, or inflammatory bowel disease. The high level of mRNA expression can be used to discriminate these patients from healthy controls.<sup>66</sup> Previous studies have determined that NAMPT inhibition has catastrophic consequences in activated T cells, leading to functional impairment and cell death. This approach could be a novel strategy to selectively eliminate activated T cells and block immune reactions such as those occurring in GvHD.<sup>67</sup> To our knowledge, NAMPT levels have not been described in GvHD patients in general or in ocular surface-related pathology. Based on our results, this still poorly understood cytokine looks promising, and more studies should be done in this direction.

In this study, we correlated differential gene expression of the four selected genes with the clinical tests performed in our

TABLE 5. Internal Validation Output

Model	Accuracy		Calibration		Discrimination		
	Brier Score (95% CI)	Calibration in the Large (95% CI)	Calibration Slope (95% CI)	Hosmer-Lemeshow P Value	AUC (95% CI)	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)
SDA	0.089 (0.087, 0.006)	1.460 (-0.485, 3.406)	0.708 (0.151, 1.265)	0.3925	0.959 (0.891, 1)	92.9 (79.4, 100)	92.9 (79.4, 100)
SVM	0.054 (0.053, 0.025)	-1.178 (-4.025, 1.67)	3.712 (-0.341, 7.765)	0.9344	0.995 (0.981, 1)	100 (100, 100)	92.9 (79.4, 100)
kNN	0.071 (0.069, 0)	0.14 (-1.183, 1.463)	0.929 (0.377, 1.48)	0.465	0.929 (0.83, 1)	92.9 (79.4, 100)	92.9 (79.4, 100)

The Brier score is a measure of accuracy. The calibration in the large, calibration slope, and Hosmer-Lemeshow test are calibration measures. The AUC, sensitivity, and specificity are discrimination measures for the predictive models. SDA, linear discriminant analysis-based model; SVM, support vector machine-based model. CI, confidence interval; AUC, area under the curve.

sample of GvHD-DE patients and healthy subjects. We found significant correlations for *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* with multiple tests that are clinically meaningful. For instance, lower expression of *EGFR* was associated with lower levels of T-BUT and Schirmer test scores, denoting worse tear stability and production, respectively. Conversely, lower *EGFR* expression was also associated with higher OSDI questionnaire scores, hyperemia, and ocular surface staining, denoting a worsening in symptoms, redness, and ocular surface damage, respectively. Similarly, increased expression of the proinflammatory genes *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* correlated in general with higher symptoms, more ocular surface damage, and lower tear production and stability. These meaningful clinical correlations strengthen the potential role of these four genes as biomarkers of disease.

Gene signatures, consisting of groups of genes expressed in a pattern that is uniquely characteristic of a biological phenotype or medical condition, are widely used in oncology,<sup>68</sup> hematology, and also in chronic GvHD studies.<sup>69</sup> These signatures, in association with a very large set of functional association data, may help reveal other genes that are related to a set of input genes. The gene signature that we found for GvHD-DE is an attempt to apply this technology to ophthalmology in general and in particular to the ocular surface inflammatory diseases. The predictive model that we have developed goes beyond testing currently available in the clinical practice, mainly Schirmer test, which lacks the sensitivity and specificity required to make a correct diagnosis. If it works properly in an external validation setting, it will provide a more accurate and earlier diagnosis that will allow physicians to promptly address the ocular manifestations of these patients, avoiding sight-threatening and permanent complications.

The present study was limited by the relatively small sample of GvHD-DE patients. However, the number of participating patients was not inordinately small considering the low (although increasing) frequency of ocular GvHD. It was also limited by the necessity to exclude patients who were either so severely ill that they were unable to attend our clinic or could not discontinue their topical anti-inflammatory medications. Additionally, it should be considered that in some GvHD-DE patients the amount of RNA obtained from CIC was not enough for individual analysis, and this amount might be lower in more severe patients of GvHD-DE, which could be a limitation of the test in clinical practice.

In summary, we showed that the LFU of GvHD-DE patients presented alterations in the expression of several inflammatory molecule mRNAs in conjunctival epithelial cells that could help explain the pathophysiology of this ocular disorder. Furthermore, the biomarker-based models that we developed showed that the expression of four promising genes could become diagnostic biomarkers of ocular GvHD-DE. Future directions include evaluation of these biomarkers with a larger patient population in prospective studies.<sup>70</sup> The next (and necessary) step in our work will be performing an external validation of the selected gene-predictive model, including not only the new cohort of GvHD-DE patients, but also other groups of patients, such as GvHD patients without DE, GvHD-independent DE patients (Sjögren-related DE, for instance) and a group of patients with a different ocular surface inflammatory disease (like allergic keratoconjunctivitis, for instance). This work is warranted before using this predictive model. Such studies could facilitate the successful design of subsequent clinical trials. Furthermore, biomarkers may represent novel therapeutic targets that could be inhibited by specific drugs, thus enabling control of these processes and improving patient quality of life.

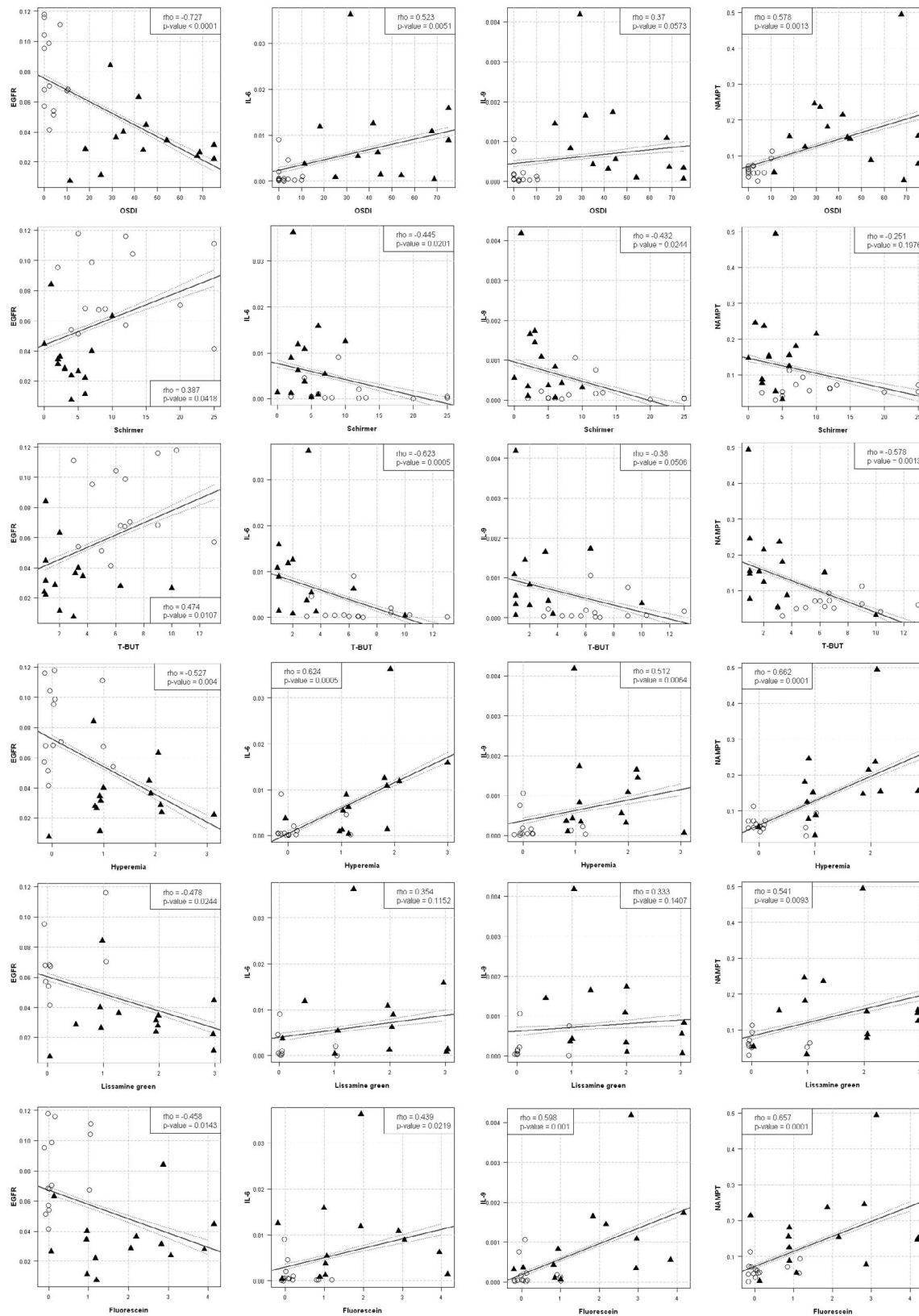


FIGURE 3. Correlations of *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* gene expression with clinical parameters. Correlations were determined for the entire study population, both patients and controls together.  $\blacktriangle$ , GvHD-DE patients;  $\circ$ , control group subjects; values of hyperemia, corneal fluorescein staining, and conjunctival Lissamine green staining were jittered to reduce overplotting. Dashed lines represent the 95% confidence interval; rho, Spearman ranked correlation coefficient.



### Acknowledgments

Supported by a national grant from Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain, SAF-2010 15631 (AES). The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Disclosure: **L. Cocho**, None; **I. Fernández**, None; **M. Calonge**, None; Allergan, Inc. (C); **V. Martínez**, None; **M.J. González-García**, None; **D. Caballero**, None; **L. López-Corral**, None; **C. García-Vazquez**, None; **L. Vazquez**, None; **M.E. Stern**, Allergan, Inc. (E); **A. Enríquez-de-Salamanca**, None

### References

- Hessen M, Akpek E. Ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012;12:540-547.
- Shikari H, Antin JH, Dana R. Ocular graft-versus-host disease: a review. *Surv Ophthalmol*. 2013;58:233-251.
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:945-956.
- Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA. Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest*. 2014;32:349-362.
- Riemens A, Boome L, Imhof S, Kuball J, Rothova A. Current insights into ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010;21:485-494.
- de la Parra-Colín P, Agahan AL, Pérez-Simón JA, et al. Dry eye disease in chronic graft-versus-host disease: results from a Spanish retrospective cohort study. *Transplant Proc*. 2011;43:1934-1938.
- Nassar A, Tabbara KF, Aljurf M. Ocular manifestations of graft-versus-host disease. *Saudi J Ophthalmol*. 2013;27:215-222.
- Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:1125-1130.
- Macri A, Pflugfelder S. Correlation of the Schirmer I and fluorescein clearance tests with the severity of corneal epithelial and eyelid disease. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:1632-1638.
- Dry Eye WorkShop (DEWS). Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the diagnostic methodology. *Ocul Surf*. 2007;5:108-152.
- Tatematsu Y, Ogawa Y, Abe T, et al. Grading criteria for chronic ocular graft-versus-host disease: comparing the NIH eye score, Japanese dry eye score, and DEWS 2007 score. *Sci Rep*. 2014;4:6680.
- Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res*. 2004;78:409-416.
- Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res*. 1999;19:201-211.
- Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2283-2292.
- Kawasaki S, Kawamoto S, Yokoi N, et al. Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res*. 2003;77:17-26.
- Narayanan S, Miller WL, McDermott AM. Conjunctival cytokine expression in symptomatic moderate dry eye subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2445-2450.
- De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, et al. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol*. 2009;2:243-253.
- Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2009;147:198-205.
- Enríquez de Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis*. 2010;16:862-873.
- Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:7725-7730.
- Paczynski S, Raiker N, Brooks S, Mumaw C. Graft-versus-host disease biomarkers: omics and personalized medicine. *Int J Hematol*. 2013;98:275-292.
- Westkemper H, Meller S, Citak S, et al. Differential chemokine expression in chronic GVHD of the conjunctiva. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1340-1346.
- Tesón M, González-García MJ, López-Miguel A, et al. Influence of a controlled environment simulating an in-flight airplane cabin on dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:2093-2099.
- López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, et al. Dry eye exacerbation in patients exposed to desiccating stress under controlled environmental conditions. *Am J Ophthalmol*. 2014;157:788-798.
- Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:615-621.
- Efron N, Morgan PB, Jagpal R. Validation of computer morphs for grading contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2002;22:341-349.
- Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea*. 2003;22:640-650.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5:R80.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3:research0034.1-research0034.11.
- Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, et al. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics*. 2012;13:296.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3.
- Dvinge H, Bertone P. HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics*. 2009;25:3325-3326.
- Ding C, Peng H. Minimum redundancy feature selection from microarray gene expression data. *J Bioinform Comput Biol*. 2005;3:185-205.
- Ahdesmäki M, Zuber V, Gibb S, Strimmer K. Sda: Shrinkage Discriminant Analysis and CAT Score Variable Selection. R package version 1.3.4. 2014. <http://CRAN.R-project.org/package=sda>.
- Vapnik V. *Methods of Function Estimation. The Nature of Statistical Learning Theory*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2000:181-216.
- Meyer D, Dimitriadou E, Hornik K, Weingessel A, Leisch F. e1071: Misc Functions of the Department of Statistics (e1071). 2014; Wien TU. R package version 1.6-4. <http://cran.r-project.org/web/packages/e1071/>.
- Webb AR. *Statistical Pattern Recognition*. 2nd ed. West Sussex, UK: John Wiley and Sons; 2002:93-104.

38. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S*. 4th ed. New York: Springer; 2002:331-352.
39. Steyerberg EW, Vickers AJ, Cook NR, et al. Assessing the performance of prediction models: a framework for traditional and novel measures. *Epidemiology*. 2010;21:128-138.
40. Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:77.
41. Rozmus J, Schultz KR, Wynne K, et al. Early and late extensive chronic graft-versus-host disease in children is characterized by different Th1/Th2 cytokine profiles: findings of the Children's Oncology Group Study ASCT0031. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1804-1813.
42. Hayashida JN, Nakamura S, Toyoshima T, et al. Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:115-123.
43. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113:273-278.
44. Paczesny S, Braun T, Vander Lugt A, Harris B, Fiema J, Hernandez J. A three biomarker panel at days 7 and 14 can predict development of grade II-IV acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:S167.
45. DiCarlo J, Agarwal-Hashmi R, Shah A, et al. Cytokine and chemokine patterns across 100 days after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:361-369.
46. Kaiser T, Kamal H, Rank A, et al. Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;104:340-349.
47. Pang H, Tong T, Zhao H. Shrinkage-based diagonal discriminant analysis and its applications in high-dimensional data. *Biometrics*. 2009;65:1021-1029.
48. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol*. 2013;108:370-377.
49. Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1346-1355.
50. Márquez EB, De Ortueta D, Royo SB, Martínez-Carpio PA. Epidermal growth factor receptor in corneal damage: update and new insights from recent reports. *Cutan Ocul Toxicol*. 2011;30:7-14.
51. Na KS, Mok JW, Kim JY, Rho CR, Joo CK. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:5443-5450.
52. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878-888.
53. Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, et al. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine*. 2008;44:160-167.
54. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 2003;299:1033-1036.
55. Chen X, Das R, Komorowski R, et al. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114:891-900.
56. Tawara I, Koyama M, Liu C, et al. Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Cancer Res*. 2011;17:77-88.
57. Toubai T, Tanaka J, Paczesny S, et al. Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD): are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT)? *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7:229-239.
58. Min CK, Lee WY, Min DJ, et al. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:935-940.
59. Fujii N, Hiraki A, Aoe K, et al. Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. *Int J Mol Med*. 2006;17:881-885.
60. Riemens A, Stoyanova E, Rothova A, Kuiper J. Cytokines in tear fluid of patients with ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Mol Vis*. 2012;18:797-802.
61. Schots R, Kaufman L, Van Riet I, et al. Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia*. 2003;17:1150-1156.
62. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *J Immunol*. 2011;186:3283-3288.
63. Tan C, Gery I. The unique features of Th9 cells and their products. *Crit Rev Immunol*. 2012;32:1-10.
64. Tawara I, Maeda Y, Sun Y, et al. Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol*. 2008;36:988-996.
65. Sun Z, Lei H, Zhang Z. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), a cytokine with multiple physiological functions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24:433-442.
66. Romacho T, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:1-15.
67. Bruzzone S, Fruscione F, Morando S, et al. Catastrophic NAD+ depletion in activated T lymphocytes through Nampt inhibition reduces demyelination and disability in EAE. *PLoS One*. 2009;4:e7897.
68. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:15149-15154.
69. Kohrt HE, Tian L, Li L, et al. Identification of gene microarray expression profiles in patients with chronic graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Immunol*. 2013;148:124-135.
70. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-Versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:780-792.

## **ANEXO 2**

### **TRABAJO 2**

# Biomarkers in Ocular Chronic Graft Versus Host Disease: Tear Cytokine- and Chemokine-Based Predictive Model

Lidia Cocho,<sup>1</sup> Itziar Fernández,<sup>1,2</sup> Margarita Calonge,<sup>1,2</sup> Verónica Martínez,<sup>1</sup> María J. González-García,<sup>1,2</sup> Dolores Caballero,<sup>3</sup> Lucía López-Corral,<sup>3</sup> Carmen García-Vázquez,<sup>1</sup> Lourdes Vázquez,<sup>3</sup> Michael E. Stern,<sup>4</sup> and Amalia Enríquez-de-Salamanca<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Applied Ophthalmobiology (IOBA), University of Valladolid, Valladolid, Spain

<sup>2</sup>Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Valladolid, Spain

<sup>3</sup>Hematology Service, University Hospital, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>4</sup>Allergan, Inc., Irvine, California, United States

Correspondence: Amalia Enríquez-de-Salamanca, IOBA, University of Valladolid, Paseo de Belén 17, E47011 Valladolid, Spain; amalia@ioba.med.uva.es.

Submitted: November 10, 2015

Accepted: January 16, 2016

Citation: Cocho L, Fernández I, Calonge M, et al. Biomarkers in ocular chronic graft versus host disease: tear cytokine- and chemokine-based predictive model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:746–758. DOI:10.1167/iov.15-18615

**PURPOSE.** To develop a tear molecule level-based predictive model based on a panel of tear cytokines and their correlation with clinical features in ocular chronic graft versus host disease (cGVHD).

**METHODS.** Twenty-two ocular cGVHD patients and 21 healthy subjects were evaluated in a controlled environmental research laboratory (CERLab). Clinical parameters were recorded, and tears were collected. Levels of 15 molecules (epidermal growth factor [EGF], IL receptor antagonist [IL-1Ra], IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, interferon inducible protein [IP]-10/CXCL10, IFN- $\gamma$ , VEGF, TNF- $\alpha$ , eotaxin 1, and regulated on activation normal T cell expressed and secreted [RANTES]) were measured by multiplex-bead assay and correlated with clinical parameters. Logistic regression was used to develop a predictive model. Leave-one-out cross-validation was applied. Classification capacity was evaluated in a cohort of individuals with dry eye (DE) of other etiologies different from GVHD.

**RESULTS.** Epidermal growth factor and IP-10/CXCL10 levels were significantly decreased in ocular cGVHD, positively correlating with tear production and stability and negatively correlating with symptoms, hyperemia, and vital staining. Interleukin-1Ra, IL-8/CXCL8, and IL-10 were significantly increased in ocular cGVHD, and the first two correlated positively with symptoms, hyperemia, and ocular surface integrity while negatively correlating with tear production and stability. Predictive models were generated, and the best panel was based on IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10 tear levels along with age and sex, with an area under the receiving operating curve of 0.9004, sensitivity of 86.36%, and specificity of 95.24%.

**CONCLUSIONS.** A predictive model based on tear levels of IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10 resulted in optimal sensitivity and specificity. These results add further knowledge to the search for potential biomarkers in this devastating ocular inflammatory disease.

**Keywords:** ocular chronic GVHD, dry eye, cytokine, biomarker, tears

Graft versus host disease (GVHD) is a major cause of nonrelapsing mortality and morbidity after allogeneic hematological stem cell transplantation (HSCT). Hematological stem cell transplantation has rapidly evolved in recent years, resulting in an increase in the number of recipients who become long-term survivors. Thus patient quality of life and the possibility of late complications have become increasingly important.<sup>1</sup> Graft versus host disease is an immune-mediated inflammatory disease that causes destruction of host tissues by immunocompetent cells from the donor.<sup>2</sup> There are two forms of GVHD, acute (aGVHD) and chronic (cGVHD), and differentiation between the two forms is currently based on clinical manifestations. Typical ocular complications in aGVHD are pseudomembranous conjunctivitis and acute hemorrhagic conjunctivitis, which appear in approximately 12% to 17% of GVHD patients.<sup>3,4</sup> However, ophthalmic findings are more frequent in chronic GVHD. Approximately 30% to 70% of human leukocyte antigen-matched patients develop cGVHD.<sup>3</sup>

Ocular manifestations occur in up to 60% to 90% of patients with cGVHD, primarily affecting structures of the ocular surface.<sup>4</sup>

Ocular cGVHD usually mimics typical dry eye (DE); it frequently severely impairs the patient's quality of life with highly disturbing symptoms and may cause severe vision loss due to corneal involvement.<sup>5</sup> According to the National Institutes of Health (NIH) consensus criteria definition, "diagnosis of chronic GVHD requires at least 1 diagnostic manifestation of cGVHD or at least 1 distinctive manifestation plus a pertinent biopsy, laboratory, or other tests (e.g., Schirmer's test)."<sup>6</sup> However, in 2007 the International Dry Eye Workshop recognized the lack of adequately validated and objective tests to diagnose DE.<sup>7</sup> The lack of correlation between symptoms and signs in DE (also shown among our own patients)<sup>8</sup> greatly complicates DE diagnosis, and is the main culprit in the frequent failure of clinical trials due to the scarcity of reliable evaluation end points. For this reason, efforts





are being made to find objective biomarkers that could be used as diagnostic, prognostic, and monitoring tools.<sup>9</sup> Inflammatory mediators are being analyzed as potential biomarkers, and to date, an increasing number of cGVHD candidate biomarkers are available for further investigation.<sup>9</sup> Some research groups have reported the possibility that levels of certain cytokines in serum can serve as specific biomarkers of GVHD and thus have the potential to act as accurate diagnostic and prognostic tools.<sup>10,11</sup> Regarding ocular cGVHD, our group has already shown that inflammatory gene expression in conjunctival epithelial cells may act as biomarkers for this disease.<sup>12</sup> However, identifying tear biomarkers in ocular cGVHD is even more desirable, because tears can easily be obtained in a noninvasive manner, and their close anatomical relationship to the disease site makes them highly specific for ocular disease.

With the description of changes in tear cytokine levels, significant progress has been made toward the characterization of underlying inflammatory mechanisms in the ocular surface in DE patients.<sup>13-15</sup> Despite this progress, little is known about the specific pathogenesis of ocular cGVHD. Some studies have already found differences in some tear cytokine levels in cGVHD patients, particularly one study by Riemens et al.<sup>16</sup> and recently (2015) another one by Jung et al.,<sup>17</sup> which suggested that tear cytokines are useful biomarkers for the diagnosis of cGVHD.

It is clear, however, that any single biomarker lacks the sensitivity and specificity needed for most clinical applications.<sup>18</sup> Thus, multivariate predictive modeling techniques have emerged as useful tools to easily manage not just a single biomarker but a panel of biomarkers, which increases the diagnostic and prognostic power. Such models may be designed to predict a classification variable, for example, susceptibility to ocular cGVHD, based on known continuous parameters, that is, cytokine tear levels. Predictive models have also focused on clinical parameters in an effort to determine which aspects are most predictive of ocular cGVHD diagnosis.<sup>19</sup> Additionally, model validation is necessary as it gives important information about the reliability of the process. Thus, the purpose of this study was to develop and validate a prediction model for the diagnosis of ocular cGVHD based on the levels of a panel of inflammatory mediators in tears and the correlation of those mediators with the clinical ophthalmic phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Healthy Controls

This study was approved by the Institute of Applied Ophthalmobiology (IOBA) institutional review board and the University of Valladolid Clinical Hospital Ethics Committee and followed the tenets of the Declaration of Helsinki. All enrolled patients and subjects were informed of the nature of this study, and written consent was obtained from each of them.

Ocular cGVHD patients were selected from those referred to IOBA by the Hematology Department of the University of Salamanca Clinical Hospital from among new-onset DE patients, as we excluded patients with previous diagnosis of DE. To ensure as much as possible that the results would not be influenced by the effects of topical medications and/or any other condition, inclusion and exclusion criteria were established to ensure that patients were stable. Consequently, the most severely affected patients were excluded. For the same reason, patients included in the study were asked to discontinue their topical therapies for 7 days before the samples were taken. Only artificial tears and lubricants were allowed. Thus, inclusion criteria for patients were as follows:

(1) abnormal results of at least three DE diagnostic tests that included an ocular surface disease index (OSDI) score  $> 12$  points, fluorescein tear breakup time (T-BUT)  $< 7$  seconds, corneal fluorescein staining and conjunctival Lissamine green staining  $> 1$  (Oxford scale), and Schirmer test without topical anesthesia  $\leq 5$  mm in 5 minutes; (2) feasibility of discontinuing topical anti-inflammatory medications (artificial tears and lubricants were allowed) for 1 week, as judged by the attending ophthalmologist (MC); and (3) patients had to be systemically stable with GVHD under control and no relapse of the patient's primary malignancies and no secondary infections as judged by the referral physician (DC). Exclusion criteria included any ocular active disease other than DE, contact lens wear, any ophthalmic surgery in the past 6 months, any topical medicine other than artificial tears and lubricants, and any systemic medication that was not continuous or constant in treatment and dosage for at least 3 months prior to this study.

Healthy volunteers, similar in age and sex to the study cases, were selected as the control group and were examined to make certain their ocular status was within normal limits. Inclusion criteria were the following: (1) absence of ocular surface-related symptoms (OSDI score  $\leq 12$  points) and (2) normal limits in at least two of the following four ocular surface tests: fluorescein T-BUT  $\geq 7$  seconds, corneal fluorescein staining and conjunctival Lissamine green staining (Oxford scale)  $\leq$  grade 1, and Schirmer test without anesthesia  $> 5$  mm in 5 minutes. Exclusion criteria for this control group included any present or previous history of ophthalmic or systemic disease, ocular allergy, any ophthalmic surgery, under any medication, pregnancy, or current contact lens wear.

### Clinical Examination and Sample Collection

All individuals were evaluated after 20-minute exposure in a controlled environmental chamber (VISIÓN I+D, SL; Valladolid, Spain) located in the Controlled Environmental Research Laboratory (CERLab) at IOBA, University of Valladolid, Valladolid, Spain, with the purpose of normalization and standardization of the conditions of clinical evaluation and collection of samples. The temperature was maintained at 23°C and the relative humidity (RH) at 45%, which corresponds to a comfortable indoor temperature and the average RH in Valladolid.<sup>20-22</sup>

Clinical evaluation was always performed by the same clinicians (LC, VM), each one always evaluating the same tests in the following sequence. First, the OSDI questionnaire, which consists of 12 questions, was administered, and the presence of symptoms over the preceding week was assessed.<sup>23</sup> The OSDI questionnaire was performed for each eye separately, and the eye with the higher score was selected as the most symptomatic and used in clinical evaluation and for tear sampling. A random data table was used to select the study eye in those cases where both eyes were equally symptomatic and for control subjects. Second, tear sample collection was performed before any other tests to avoid any ocular vital dye interference. As previously described by our group,<sup>15</sup> we used a glass capillary tube (Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA) to collect a 1- $\mu$ L tear sample from the external canthus, avoiding tear reflex as much as possible. The collected sample was then deposited into a sterile tube containing 9  $\mu$ L cold cytokine assay buffer (Millipore Ibérica, Madrid, Spain) and immediately frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. Tear samples were not pooled. Third, conjunctival hyperemia was evaluated under a slit-lamp and scored on the Nathan-Efron scale (0-4).<sup>24</sup> Fourth, tear stability was evaluated by measuring T-BUT. Five microliters of 2% sodium fluorescein was gently applied into the outer third of the inferior fornix



with a micropipette. The time between the last of three blinks and the appearance of the first dry spot was measured three times, and the mean value was recorded. Fifth, ocular surface integrity was evaluated at the cornea and at the interpalpebral bulbar conjunctiva by vital staining. Corneal integrity was evaluated with a slit-lamp mounted with a cobalt blue filter (Topcon Corp., Tokyo, Japan) and a yellow Wratten no. 12 filter (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). The evaluation was done 2 minutes after instillation of 5  $\mu$ L 2% sodium fluorescein. For the evaluation of conjunctival integrity, Lissamine green strips (GreenGlo; HUB Pharmaceuticals, LLC, Rancho Cucamonga, CA, USA) were wetted with 25  $\mu$ L sodium chloride and then gently applied into the inferior fornix. Corneal and conjunctival staining were scored using the Oxford scale (score 0-5).<sup>25</sup> Sixth, tear production was assessed by Schirmer test without topical anesthesia. This test was performed using a Schirmer sterile strip (TearFlo; HUB Pharmaceuticals, LLC, Rancho Cucamonga, CA, USA) placed in the lateral canthus of the inferior lid margin. The length of wetting was measured in millimeters with eyes closed for 5 minutes.

### Analysis of Tear Cytokines/Chemokines

The presence and concentration of 15 molecules were determined in tear samples by a multiplex immunobead-based array (Milliplex 15x-MPXHCYTO-60 Human Cytokine/Chemokine Panel; Millipore, Watford, UK), using a Luminex IS-100 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The following molecules were assayed: epidermal growth factor (EGF), interleukin (IL) 1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, interferon inducible protein (IP)-10/CXCL10, eotaxin 1/CCL11, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)/CCL5. Samples were analyzed as previously described,<sup>15</sup> following the manufacturer's protocol.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by a licensed statistician (IF) using the R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Statistical significance was set at 5%.

Sample size was statistically determined. Statistical power analysis for logistic regression with continuous predictor and a balanced design determined that a sample of 19 subjects per group would give 80% statistical power to detect odds ratio of 2.5 at a significance level of 0.05.

Quantitative data were expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD), and qualitative variables were described in percentages. Median and interquartile range (IQR) were used to summarize distributions of ordinal variables. Univariate tests to check differences in the distribution of each variable across the studied groups were performed. Normality assumption was checked by the Shapiro-Wilk test. To compare quantitative characteristics, we used the Student's *t*-test for two independent samples or the nonparametric alternative, Mann-Whitney *U* test, if the normality hypothesis was not valid. To check homogeneity of variances, the Brown-Forsythe test was used. When there was significant heterogeneity of variance, Welch's *t*-test was employed. To assess the association between qualitative variables and group, the  $\chi^2$  test was used or Fisher's exact test with small expected frequencies.

To quantify correlations between cytokine levels and clinical parameters, the Spearman ranked correlation coefficient ( $\rho$ ) was used. Moreover, a bootstrap confidence interval

(CI) for this coefficient was built, using 5000 bootstrap samples.

### Tear Cytokine/Chemokine-Based Predictive Model Development and Validation

Cytokines were analyzed as log-transformed variables. Cytokine levels below the limit of detection were imputed using the robust regression on order statistics (robust ROS) method introduced by Helsel and Cohn<sup>26</sup> and implemented in the NADA (nondetects and data analysis) R package.<sup>27</sup> However, molecules that were detected in less than 50% of the samples were not further analyzed.

Logistic regression, adjusted for age and sex, was used to quantify the association between ocular cGVHD group and each cytokine separately. Molecules associated with the outcome at the 10% significance level were identified as candidate biomarkers. Potential biomarkers were evaluated simultaneously to fit a multivariate logistic regression model. The final panel of inflammatory molecules in ocular cGVHD patients was defined as the optimal subset of potential biomarkers. The first step was to identify the few most important candidate biomarkers that help in predicting ocular cGVHD. An exhaustive search was conducted, building logistic regression models with every possible combination of candidate molecules and age and sex as confounding variables. The optimal model was the one with the minimum Akaike information criterion value. The variance inflation factor (VIF) measure was used to check for multicollinearity. A VIF greater than 5 was considered evidence of multicollinearity.

The leave-one-out-cross-validation (LOOCV) procedure was used to estimate the prediction accuracy of the fitted model, and receiver operation characteristic (ROC) curve analysis was used to assess the discriminate ability. The final model was evaluated according to the area under the ROC curve (AUC). In addition, sensitivity and specificity were obtained by setting an optimal threshold using the pROC (display and analyze ROC curves) R package.<sup>28</sup>

The Brier score was used as global measure of precision. It is based upon individual differences between predicted risks in terms of likelihood and observed final outcomes, and ranges from 0 for a perfect degree of agreement to 1 for the worst possible degree of agreement. We used two methods to evaluate the calibration of the model, measured as the degree of agreement between the predicted and observed values. With the calibration in the large (CL) and calibration slope (CS), a perfectly calibrated model will have a CL value of 0 and a CS of 1. For these methods, the scores are not bounded, so the model will be badly calibrated if the values depart from the optimal values. We also used the Hosmer-Lemeshow test, which is significant for badly calibrated models.

In order to evaluate the external capacity of the fitted model to properly classify individuals with DE of different etiologies, an independent dataset of 48 DE patients (14 Sjögren DE and 34 non-Sjögren-associated DE) and 32 healthy controls from previously published studies by our group was used,<sup>20-22</sup> where tear samples were collected in the same standard conditions described above. The percentage of individuals successfully classified was estimated.

## RESULTS

### Clinical Evaluation

A total of 22 ocular cGVHD patients (15 males, 7 females; 55.6  $\pm$  11.6 years; range, 34-72 years) and 21 healthy

TABLE 1. Clinical Data of Ocular Chronic Graft Versus Host Disease (cGVHD) Patients

Patient	Previous Diagnosis	Time From HSCT to Ocular cGVHD Diagnosis, mo	Time From GVHD Diagnosis to Development of Ocular cGVHD, mo	Systemic Therapy	Topical Therapy Discontinued 7 d Before Sample Collection
1	Hodgkin disease	36	99	Tacrolimus	Autologous serum 0.4% preserved medroxyprogesterone
2	Non-Hodgkin lymphoma	9	45	None	Autologous serum 0.05% unpreserved cyclosporine A
3	Acute lymphoblastic leukemia	24	63	None	None
4	Acute myeloid leukemia	12	60	None	Autologous serum 0.1% preserved fluorometholone
5	Acute myeloid leukemia	3	126	Cyclosporine A	None
6	Hodgkin disease	18	67	None	Unpreserved 0.05% cyclosporine A
7	Acute lymphoblastic leukemia	12	Unknown	None	None
8	Non-Hodgkin lymphoma	38	49	Tacrolimus	Autologous serum 0.1% preserved fluorometholone
9	Myelodysplastic syndrome	3	81	Tacrolimus	Autologous serum
10	Acute myeloid leukemia	36	Unknown	None	None
11	Chronic myeloid leukemia	12	Unknown	None	0.1% preserved fluorometholone
12	Chronic myeloid leukemia	2	Unknown	None	Autologous serum
13	Acute myeloid leukemia	18	21	Rapamycin Prednisone Imatinib	0.1% preserved fluorometholone
14	Myelodysplastic syndromes	1	Unknown	Rapamycin	Autologous serum
15	Chronic lymphoblastic leukemia	15	Unknown	Rapamycin Tacrolimus Methylprednisolone	0.1% unpreserved dexamethasone
16	Myelodysplastic syndrome	6	26	Prednisone	Autologous serum
17	Chronic myeloid leukemia	27	10	Rapamycin	Autologous serum
18	Multiple myeloma	6	Unknown	Rapamycin Thalidomide Cyclophosphamide	Autologous serum
19	Myelodysplastic syndrome	2	20	Tacrolimus	0.1% preserved fluorometholone Autologous serum 0.05% unpreserved cyclosporine A
20	Myelodysplastic syndrome	6	Unknown	Tacrolimus	Autologous serum 1.5% hydrocortisone ointment
21	Chronic myeloid leukemia	3	Unknown	Prednisone	0.03% tacrolimus ointment Autologous serum
22	Acute myeloid leukemia	10	7	Methylprednisolone	Autologous serum 0.1% unpreserved dexamethasone

HSTC, hematopoietic stem cell transplantation; systemic therapy had to be stable for the 3 preceding months of the study per inclusion/exclusion criteria.

volunteers (12 males, 9 females;  $53.1 \pm 12.6$  years; range, 30–75 years) were recruited. There were no significant differences in sex ( $P = 0.665$ ) or age ( $P = 0.4873$ ) between patients and controls. The clinical histories of the ocular cGVHD patients, including previous diagnosis for HSCT, time from HSCT and systemic cGVHD diagnosis to ocular cGVHD diagnosis, and systemic and topical therapies are shown in Table 1.

Ocular cGVHD patients had significantly more frequent and intense ocular surface symptoms than controls, as reflected by the higher OSDI questionnaire scores (Table 2). Ocular surface examination revealed that patients had moderate conjunctival hyperemia (grade 0 in 1 patient, grade 1 in 10 patients, grade 2 in 6 patients, grade 3 in 4 patients, and grade 4 in 1 patient), although scores were significantly higher compared to control group scores.

TABLE 2. Ocular Examination Parameters

	Healthy Controls, <i>n</i> = 21	Ocular cGVHD Patients, <i>n</i> = 22	<i>P</i> Value
OSDI questionnaire	4.29 ± 5.11	44.58 ± 21.76	<0.0001
Conjunctival hyperemia	0 ± 0	1.5 ± 0.5	<0.0001
T-BUT, s	6.79 ± 2.87	2.39 ± 2.30	<0.0001
Corneal fluorescein staining	0 ± 0	2 ± 1	<0.0001
Lissamine green conjunctival staining	0 ± 0	2 ± 1	<0.0001
Schirmer test without anesthesia, mm	13.60 ± 10.25	3.68 ± 2.90	<0.0001

Data are presented as mean ± standard deviation in OSDI, T-BUT, and Schirmer test. Data are presented as median ± interquartile range in hyperemia, fluorescein corneal staining, and Lissamine green conjunctival staining. Significant changes ( $P < 0.05$ ) are denoted in bold.

Regarding tear stability and production, ocular cGVHD patients had significantly lower T-BUT and Schirmer test scores than controls. Corneal fluorescein staining and conjunctival Lissamine green staining scores were significantly higher in ocular cGVHD patients (Table 2).

### Tear Cytokine/Chemokine Detection, Concentration, and Correlation With Clinical Data

For each of the 15 molecules studied, the percentage of detection in each group and the concentration in each sample were analyzed (Table 3). Epidermal growth factor and IL-17A were detected in significantly fewer ocular cGVHD patients than in healthy controls. For the other 13 molecules, there were no differences between the percent of patients and controls expressing them.

Regarding molecule concentrations, EGF and IP-10/CXCL10 tear levels were significantly decreased, whereas IL-1Ra, IL-8/CXCL8, and IL-10 were significantly increased in ocular cGVHD patients compared to healthy subjects (Table 3; Fig. 1). Interleukin-12, IL-6, IL-8/CXCL8, and RANTES levels were found significantly increased in males compared to females for both ocular cGVHD patients and control subjects (Fig. 2).

Interleukin-1Ra and IL-8/CXCL8 tear levels positively correlated with OSDI questionnaire score, conjunctival hyperemia, fluorescein corneal staining, and Lissamine green conjunctival staining. They were negatively correlated with T-BUT and Schirmer test scores (Fig. 3). Epidermal growth factor and IP-10/CXCL10 levels were positively correlated with T-BUT and Schirmer test scores, and negatively correlated with OSDI,

hyperemia, and fluorescein and Lissamine green staining. Other molecules had diverse correlations (Fig. 4): RANTES and TNF- $\alpha$  correlated positively with age; eotaxin correlated positively with age and OSDI questionnaire score; IFN- $\gamma$  correlated positively with age and hyperemia; and IL-10 correlated positively with OSDI questionnaire score, hyperemia, and corneal fluorescein staining, and negatively with T-BUT.

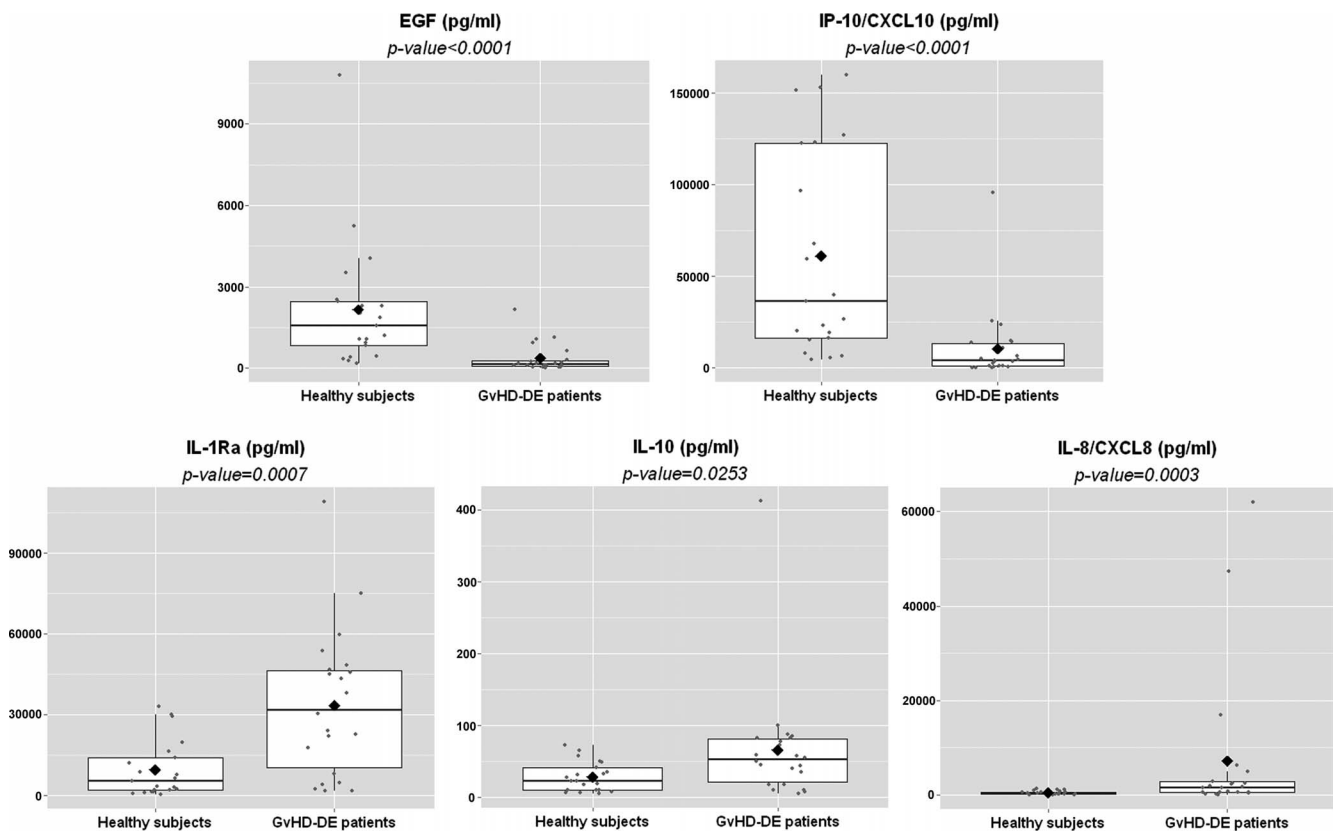
### Multivariate Predictive Modeling

Logistic regression for each of the cytokines, adjusted for age and sex, was fitted. Table 4 shows the estimated odds ratio values (with 95%CI) and AUC based on LOOCV procedure. Elevated levels of EGF and IP-10/CXCL10 were statistically identified as protective factors, while higher levels of IL-8/CXCL8 and IL-1Ra were identified as risk factors for ocular cGVHD development. The elevated level of IL-10 was a borderline risk factor. Classification ability of EGF, IL-1Ra, IL-2, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, RANTES, TNF- $\alpha$ , and VEGF was significant, showing AUC values statistically different from 0.5, which corresponds to random chance. An exhaustive search to select the best subset of cytokines for the final multivariate model was performed. The best models by number of molecules included in them, based on the lower value of the Akaike information criterion, are shown in Table 5. Model based on two cytokines, IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10, along with age and sex, was identified as the optimal model. The estimated odds ratio values were 3.37 (95%CI: 1.24–9.17) and 0.23 (95%CI: 0.07–0.82) for IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10, respectively.

TABLE 3. Percentage of Detection and Concentration of the 15 Molecules Analyzed in Tears of Ocular cGVHD Patients and Healthy Controls

Molecule	% Detection			Concentration, pg/mL		
	Healthy Controls	Ocular cGVHD Patients	<i>P</i> Value	Healthy Controls	Ocular cGVHD Patients	<i>P</i> Value
EGF	100	77.27	<b>0.0485</b>	2,154.71 ± 2,385.56	357.83 ± 527.95	<0.0001
Eotaxin	47.62	72.73	0.1703	69.95 ± 61.34	83.75 ± 60.95	0.1936
IFN- $\gamma$	47.62	77.27	0.09	28.24 ± 26.56	36.86 ± 24.31	0.1203
IL-1 $\beta$	57.14	63.64	0.9018	15.71 ± 14.51	84.65 ± 299.02	0.3259
IL-1Ra	100	90.91	0.4884	9,384.52 ± 10,474.92	33,330.96 ± 26,982.06	<b>0.0007</b>
IL-2	71.43	45.45	0.1566	21.84 ± 17.79	20.16 ± 17.44	0.8093
IL-6	80.95	86.36	0.6981	51.44 ± 48.49	119.5 ± 117.4	0.1169
IL-8/CXCL8	95.24	100	0.4884	385.18 ± 401.72	7,131.18 ± 15,956.77	<b>0.0003</b>
IL-10	76.19	86.36	0.4566	28.16 ± 20.74	65.7 ± 82.99	<b>0.0253</b>
IL-12 p70	66.67	86.36	0.1623	49.12 ± 55.4	59.32 ± 53.44	0.1331
IL-17A	61.9	22.73	<b>0.0218</b>	20.89 ± 17.74	12.16 ± 12.42	0.1913
IP-10/CXCL10	100	90.91	0.4884	60,999.05 ± 56,159.34	10,511.33 ± 20,431.76	<0.0001
RANTES	80.95	86.36	0.6981	121.74 ± 108.6	120.55 ± 112.58	0.8126
TNF- $\alpha$	66.67	72.73	0.92	20.2 ± 17.19	36.43 ± 74.89	0.3203
VEGF	61.9	81.82	0.2648	415.78 ± 347.08	578.01 ± 528.14	0.4575

Significant differences ( $P < 0.05$ ) are denoted in bold.



**FIGURE 1.** Molecules with significant differences in tear levels between ocular chronic graft versus host disease patients and healthy subjects. EGF and IP-10/CXCL10 tear levels were significantly decreased, whereas IL-1Ra, IL-8/CXCL8, and IL-10 levels were significantly increased in ocular cGVHD patients compared to healthy subjects. *Diamonds* represent the mean values. EGF, epidermal growth factor; GVHD, chronic graft versus host disease; IL, interleukin; IP, interferon inducible protein.

### Internal Validation

To determine the validity of the IL-8/CXCL8- and IP-10/CXCL10-based model, internal validation by the LOOCV procedure was developed. The Brier score obtained corresponded to an accurate model (Table 6). Furthermore, the CL and CS measures, along with the Hosmer-Lemeshow test, indicated the absence of calibration problems. The model obtained an AUC of 0.9004, with a sensitivity of 86.36% and a specificity of 95.24% (Table 6).

### Classification of an External Cohort Without Ocular cGVHD

In order to evaluate the capacity of the fitted model to properly classify individuals without ocular cGVHD, we tested it in cytokine tear levels from a cohort of 48 DE patients (14 severe Sjögren DE and 34 mild/moderate non-Sjögren-associated DE) and 32 healthy controls from previously published studies from our group.<sup>20-22</sup> Results showed that the IL-8/CXCL8- and IP-10/CXCL10-based predictive model (sex and age adjusted) had 100% specificity when classifying both controls and mild/moderate non-Sjögren-associated DE patients; Sjögren-associated DE patients were correctly classified as negative for ocular cGVHD in 78.57% of the cases (Table 7).

### DISCUSSION

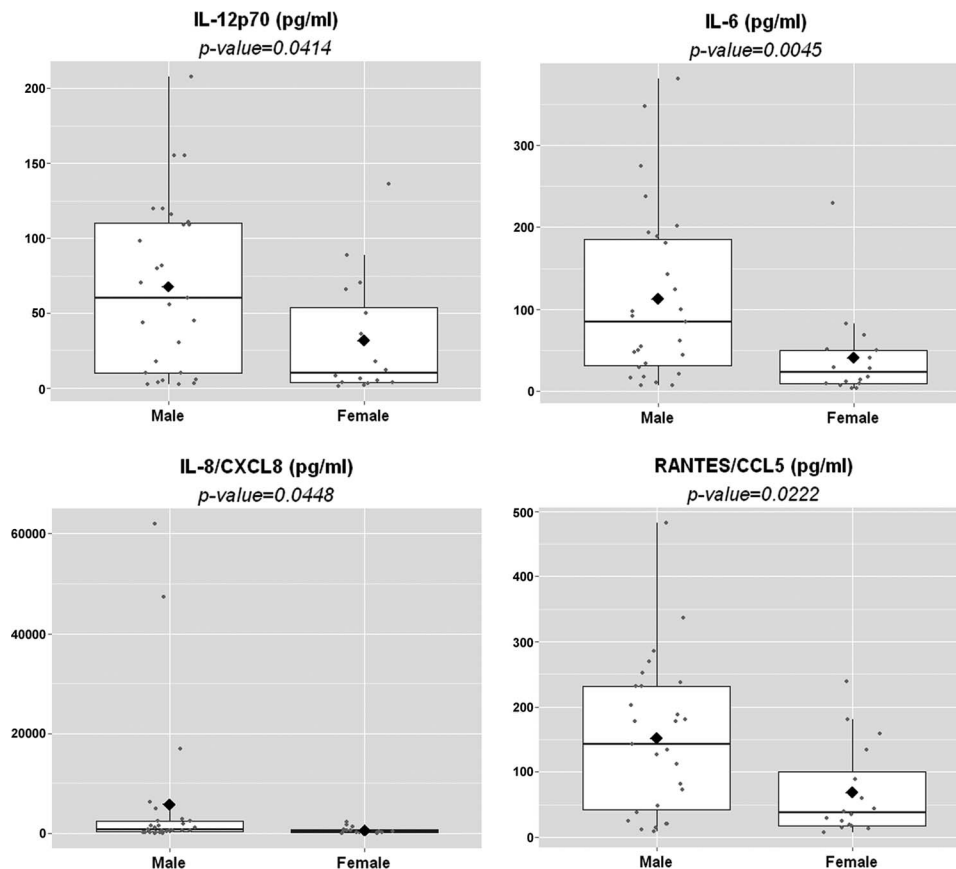
So far, little is known about the etiopathogenesis of ocular cGVHD, and this limits the emergence of objective and reliable diagnostic tests. In this study we intended to identify

molecules that are specifically involved in the pathogenic mechanisms of this disease. To do this, we analyzed tear levels of a panel of inflammatory molecules in ocular cGVHD patients, and we then compared them to those in healthy subjects. Based on this information, we intended to design a tear biomarker-based predictive model that may facilitate the diagnosis of this disease. The final panel of inflammatory molecules included was defined after analysis of the most important candidate biomarkers, and logistic regression models were built with every possible combination of candidate molecules and age and sex as confounding variables.

Evaluation of the enrolled patients revealed that all of them suffered a moderate DE, as shown by the clinical test scores. Ocular cGVHD patients had significantly more DE symptoms, lower Schirmer test scores, and considerably decreased T-BUT values compared to healthy controls. The ocular surface integrity of patients' eyes, as evaluated by fluorescein and Lissamine green, was significantly altered compared to controls. However, the damage was not so severe as to prevent the patients from stopping their anti-inflammatory topical medications for 1 week as required by the inclusion criteria. Sampling patients with more severe disease could potentially have given different results, but then the confounding effects of topical medication upon inflammatory molecules could not have been excluded.

Tear cytokine analysis revealed that levels of EGF and IP-10/CXCL10 were significantly lower in tears of ocular cGVHD patients. Epidermal growth factor is secreted mainly by the lacrimal gland and is one of the most important growth factors present in human tears. Studies from Pflugfelder et al.<sup>13</sup> and Lam et al.<sup>14</sup> found lower levels in patients with Sjögren





**FIGURE 2.** Association between sex and molecule tear levels. IL-12p70, IL-6, IL-8/CXCL8, and RANTES/CCL5 were found significantly increased in males compared to females for both patients and controls together. Diamonds represent the mean values. IL, interleukin; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

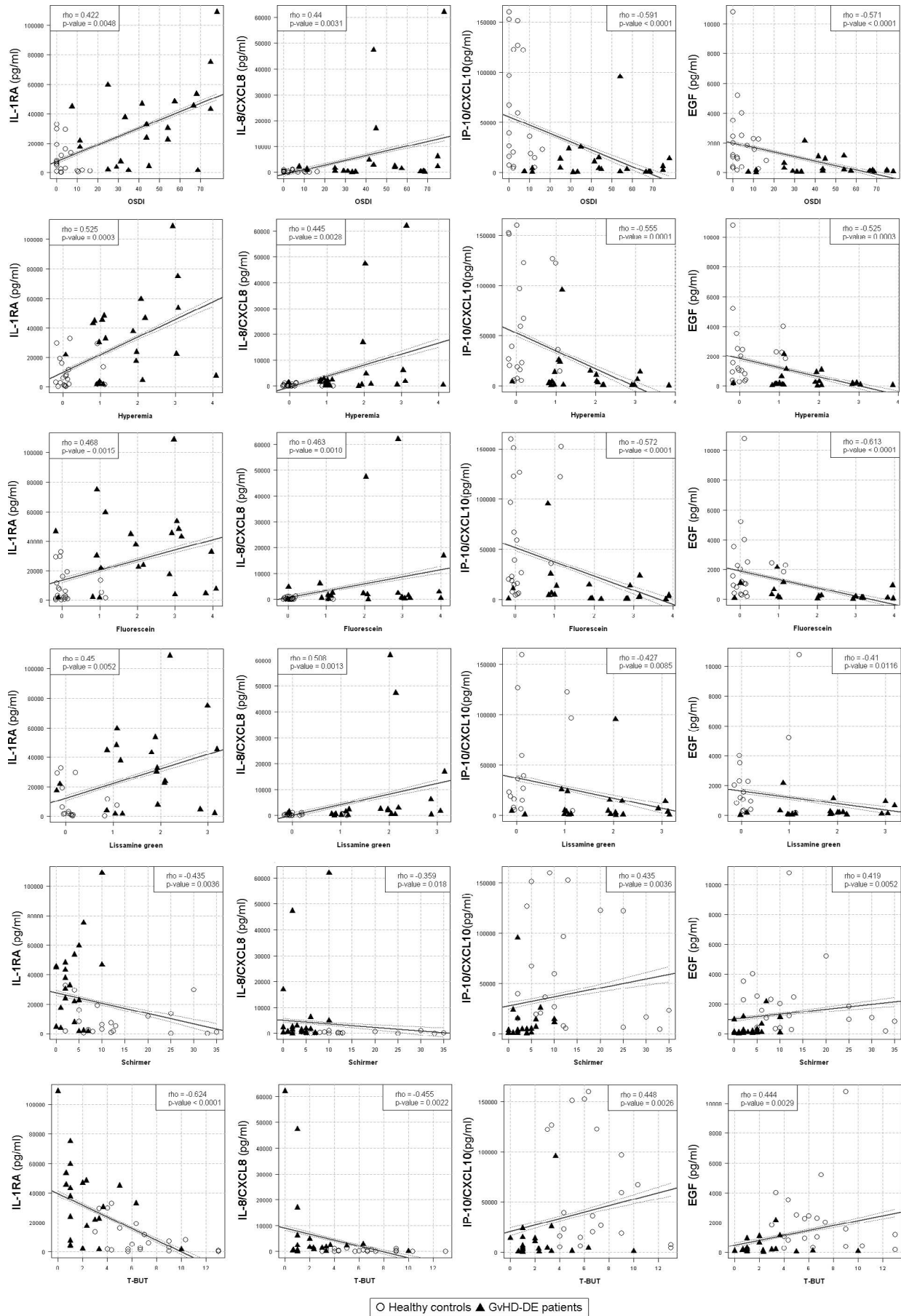
syndrome-associated hyposecretory DE compared to healthy controls. The significant decrease in EGF tear levels found in our ocular cGVHD patients is in agreement with those studies, as cGVHD causes an aqueous-deficient Sjögren-like DE. Additionally, we found that epithelial growth factor receptor (*EGFR*) gene expression in conjunctival epithelial cells of ocular cGVHD patients decreased by 2.6 fold,<sup>12</sup> which confirms the importance of this finding.

We found that IP-10/CXCL10, a chemotactic molecule that attracts T lymphocytes, natural killer cells, and monocytes,<sup>29</sup> was also decreased in tears of ocular cGVHD patients. Activated T cells lead to the release of the chemokines CXCL9, IP-10/CXCL10, and CXCL11 at tissue sites, and these recruit CXCR3<sup>+</sup> T cells, mediating the tissue damage characteristic of GVHD.<sup>30</sup> The importance of the role of IP-10/CXCL10 in GVHD patients has been established by different authors. Using a murine model, Duffner et al.<sup>31</sup> concluded that the migration of donor T cells to GVHD target organs depends on the expression of CXCR3 and contributes significantly to GVHD damage and overall mortality. Meanwhile, Piper et al.<sup>32</sup> found significantly elevated serum levels of IP-10/CXCL10, suggesting that the specific interaction of this molecule with its receptor was critical for the recruitment of T cells to the skin in patients with acute GVHD. Moreover, Westkemper et al.<sup>33</sup> demonstrated by polymerase chain reaction that IP-10/CXCL10 was markedly upregulated in conjunctival biopsies of ocular cGVHD patients compared with healthy controls. The fact that this chemokine was decreased in our patients could be due to selection criteria applied, which allowed only patients whose GVHD was under relatively good control to be included.

On the other hand, we found that the levels of IL-1Ra, IL-8/CXCL8, and IL-10 were increased in tears of the ocular cGVHD group. This is consistent with previous reports of tear levels of these molecules in patients with DE.<sup>13-15,34,35</sup> Interleukin-1Ra is a naturally occurring cytokine receptor antagonist that serves as a modulator of immune response, regulating the agonist effects of IL-1 during chronic inflammatory diseases such as arthritis.<sup>36</sup> Moreover, polymorphisms in IL-1 family genes have been associated with variability in the production of the respective cytokines and have been implicated in patient susceptibility to GVHD.<sup>37</sup>

Interleukin-8/CXCL8 is one of the major mediators of the inflammatory response, and patients suffering acute GVHD develop higher levels at times of maximal clinical signs.<sup>38</sup> More importantly, IL-8/CXCL8 is included in two biomarker panels that predicted death, treatment failure, and risk of developing GVHD.<sup>18,39</sup> In agreement with these results, previous results from our group have found that *IL-8/CXCL8* gene expression in conjunctival epithelium from ocular cGVHD patients was almost five times increased compared to healthy controls.<sup>12</sup> More studies are warranted to determine the exact role of IL-8/CXCL8 in ocular cGVHD, as it seems to play an important role in the pathogenesis.

Finally, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that reduces activation of T cells. A lack of this cytokine results in increased allogeneic T-cell responses and strongly aggravates the course of the disease.<sup>40</sup> Several groups have studied the association between increased IL-10 levels and GVHD, and in spite of its anti-inflammatory function, they have reported an association between increased IL-10 levels and GVHD.<sup>41,42</sup> Thus, it has



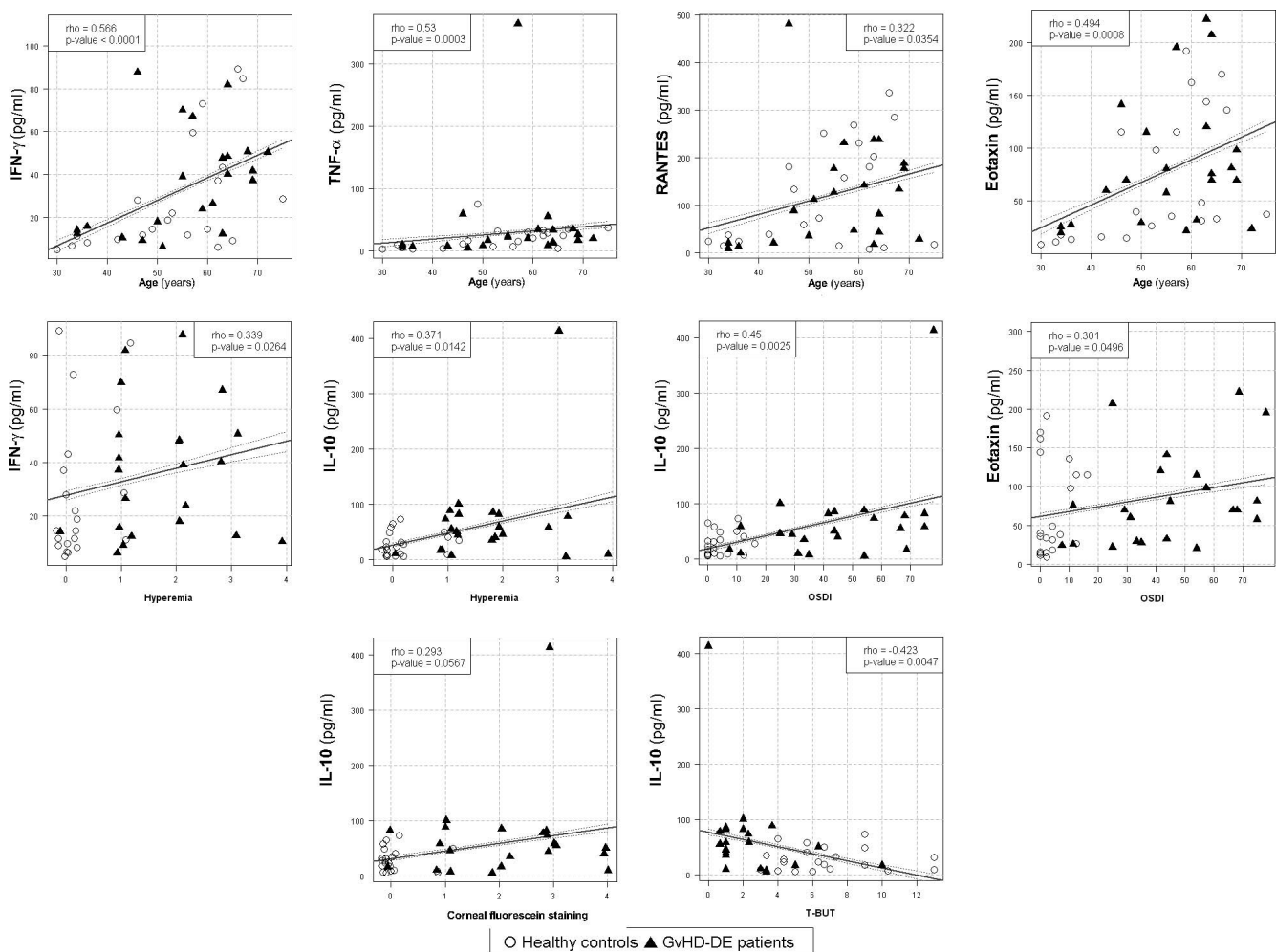
○ Healthy controls ▲ GvHD-DE patients

**FIGURE 3.** Correlations between IL-1RA, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, and EGF tear levels and clinical parameters. Correlations were determined for the entire study population, both patients and controls together. ▲, ocular cGVHD patients; ○, control group subjects. Values of hyperemia, corneal fluorescein staining, and conjunctival Lissamine green staining have been jittered to reduce overplotting. *Dashed lines* represent the 95% confidence interval. cGVHD, chronic graft versus host disease; EGF, epidermal growth factor; IL, interleukin; IP, interferon inducible protein;  $\rho$ , Spearman ranked correlation coefficient.

been suggested that because this molecule is a strong suppressor of T-cell immunity, high levels of IL-10 might lead to functional immunodeficiency contributing to a poor disease prognosis.<sup>10</sup> These results are reinforced by a 7.7-fold increase in *IL-10* conjunctival gene expression in ocular cGVHD patients previously reported by our group.<sup>12</sup> Increased levels of IL-10 are also consistent with those present in tears of patients with Sjögren syndrome-associated DE.<sup>35</sup> Our results are, however, in disagreement with those reported by Riemens et al.,<sup>16</sup> who failed to detect IL-10 in tear levels of ocular cGVHD patients. Interestingly, in the same study, Riemens et al. found increased IFN- $\gamma$  and IL-6 tear levels, both of which they proposed as key molecules for this disease. However, in our study, tear levels of these molecules in ocular cGVHD patients were not significantly different from those in controls. An explanation for these differences could be the different diagnostic criteria for ocular cGVHD (based on the National

Institutes of Health consensus criteria) used in each study, a different tear sample collection method (obtained directly from Schirmer test strips in the study by Riemens et al.<sup>16</sup> instead of by the capillarity collection in ours), and the potential influence of topical medications used by patients in Riemens' study.

Increased IL-10 in tears of GVHD patients has also been recently described by Jung et al.<sup>17</sup> In this study, they investigated levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, INF- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  in tears of patients after HSCT, trying to evaluate whether they are associated with the presence of systemic GVHD, regardless of ocular status. They found that IL-2, IL-10, IL-17A, INF- $\gamma$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  were elevated in patients with cGVHD compared to transplanted patients without cGVHD. While our results are in agreement regarding increased IL-10 in tears of cGVHD patients, we did not find significant increase in IL-2, IL-17A, INF- $\gamma$ , IL-6, or TNF- $\alpha$ . An explanation for the



**FIGURE 4.** Other correlations between tear molecule levels and clinical parameters. Correlations were determined for the entire study population, both patients and controls together. ▲, ocular cGVHD patients; ○, control group subjects. Values of hyperemia, corneal fluorescein staining, and conjunctival Lissamine green staining have been jittered to reduce overplotting. *Dashed lines* represent the 95% confidence interval. cGVHD, chronic graft versus host disease; EGF, epidermal growth factor; IL, interleukin; IP, interferon inducible protein;  $\rho$ , Spearman ranked correlation coefficient.

TABLE 4. Estimated Odds Ratio by Logistic Regression Models for Each of the Tear Molecules, Adjusted by Age and Sex

Molecule	OR	95% CI for OR		P Value	AUC	95% CI for AUC	
		Lower	Upper			Lower	Upper
EGF	<b>0.3881</b>	<b>0.2302</b>	<b>0.6545</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.8333</b>	<b>0.7073</b>	<b>0.9594</b>
Eotaxin	1.3538	0.7494	2.4453	0.3154	0.3961	0.2196	0.5726
IFN- $\gamma$	1.5635	0.7963	3.0697	0.1942	0.5455	0.3673	0.7236
IL-1 $\beta$	1.1648	0.8254	1.6439	0.3854	0.6472	0.4792	0.8152
IL-1Ra	<b>1.7720</b>	<b>1.2091</b>	<b>2.5971</b>	<b>0.0034</b>	<b>0.7078</b>	<b>0.5476</b>	<b>0.868</b>
IL-2	0.8687	0.5246	1.4383	0.5842	<b>0.6861</b>	<b>0.5233</b>	<b>0.849</b>
IL-6	1.3057	0.8859	1.9243	0.1777	0.539	0.3596	0.7184
IL-8/CXCL8	<b>1.7878</b>	<b>1.2060</b>	<b>2.6501</b>	<b>0.0038</b>	<b>0.7446</b>	<b>0.5936</b>	<b>0.8956</b>
IL-10	1.6817	0.9967	2.8373	<i>0.0515</i>	0.5649	0.3847	0.7452
IL-12 p70	1.2188	0.8908	1.6676	0.2160	0.4156	0.2313	0.5999
IL-17A	0.6397	0.3834	1.0674	0.0872	0.4892	0.3083	0.6701
IP-10 /CXCL10	<b>0.4501</b>	<b>0.2766</b>	<b>0.7323</b>	<b>0.0013</b>	<b>0.8182</b>	<b>0.69</b>	<b>0.9464</b>
RANTES	0.9491	0.6275	1.4355	0.8044	<b>0.7424</b>	<b>0.5919</b>	<b>0.893</b>
TNF- $\alpha$	1.1965	0.6958	2.0574	0.5166	<b>0.6905</b>	<b>0.5287</b>	<b>0.8523</b>
VEGF	1.1107	0.7542	1.6358	0.5951	<b>0.71</b>	<b>0.5538</b>	<b>0.8661</b>

EGF and IP-10/CXCL10 were identified as protective factors, while IL-8/CXCL8 and IL-1Ra were identified as risk factors for the development of disease. Significant results are denoted in bold. Borderline  $P$  values ( $0.05 < P < 0.08$ ) are denoted in italics. AUCs for each of the single molecule models are shown. OR, odds ratio.

discrepancies between the results from the Jung study and ours might be the different sample of patients and controls analyzed, as the authors compared a cohort of transplanted patients with and without cGVHD regardless of their ocular surface status, while we compared patients certainly diagnosed with ocular cGVHD with healthy individuals. Also sample collecting methods were different, as they took tears after buffer washout, whereas we took basal tears by capillarity collection. Finally, tear molecule analysis and cytokine array kits were not exactly the same, as they used a cytometric array with a BD array (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences), while we used a Milliplex cytokine array with Luminex technology. All these methodological differences might be responsible for the differences found between the two studies.

In the present study EGF, IL-1Ra, IL-8/CXCL8, and IP-10/CXCL10 show significant individual diagnostic abilities (IL-10 is borderline), evidenced by their corresponding individual odds ratio and AUC values. Significant diagnostic abilities of IL-10 and IL-17A were also described by Jung et al.<sup>17</sup> However, we did not find significant results for IL-6 and TNF- $\alpha$  as described in their study.<sup>17</sup>

We also correlated cytokine tear levels and clinical tests results. There were significant correlations for EGF, IL-1Ra, IL-8/CXCL8, and IP-10/CXCL10 tear levels with clinical parameters. The majority of the correlations that we found were

intuitive, such as that of IL-8/CXCL8 (proinflammatory) tear levels correlating with all of the clinical markers of disease severity. Additionally, EGF showed logical negative correlations with ocular surface damage tests. We found that IP-10/CXCL10 and IL-1Ra, correlated negatively with tests for ocular surface damage (fluorescein staining and Lissamine green) and positively with tear production (Schirmer test) or stability (T-BUT). These results suggest a response by the tissues that counteracts the damage. These findings are in agreement with those described in the literature, as several inflammatory cytokines have been correlated with clinical parameters in DE.<sup>13,35,43</sup> Additionally, our results agree with those found by Jung et al.<sup>17</sup> regarding correlation between IL-10 and OSDI score, hyperemia, corneal staining, and TBUT; in contrast, we did not find significant correlations between IL-2, IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  with clinical parameters as described by those authors.<sup>17</sup> This might be due to the fact that our correlation studies include a healthy nontransplanted group, while Jung et al.<sup>17</sup> studied only transplanted patients.

The aim of our study was to develop a tear cytokine-based predictive model for ocular cGVHD patients. Predictive models are developed to give health care providers objective estimates of risks of having a particular disease to assist them in the decision-making process.<sup>44</sup> A variety of such approaches have recently been used in an attempt to diagnose ocular cGVHD, including clinical parameters-based predictive models, such as

TABLE 5. Better Multivariate Logistic Regression Models of Ocular cGVHD by Size (Number of Variables)

	Age	Sex	EGF	IL-10	IL-17A	IL-1Ra	IL-8/CXCL8	IP-10/CXCL10	AIC
M0	✓	✓							64.64
M1	✓	✓	✓						49.90
M2	✓	✓					✓	✓	26.32
M3	✓	✓	✓				✓	✓	26.72
M4	✓	✓			✓	✓	✓	✓	26.50
M5	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	28.27
M6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*

Variables included in the multivariate model are those that showed a  $P$  value less than 0.1 individually: EGF, IP-10/CXCL10, IL-17A, IL-8/CXCL8, and IL-10 IL-1Ra and confounding variables as age and sex. M0, M1, M2, M3, M4, M5, and M6 are models based on 0, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 variables, respectively. The better model by size is that with the lower AIC; thus the M2 model (two cytokine levels IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10) was the best. AIC: Akaike information criterion.

\* The complete model does not converge; it is not a valid model.



TABLE 6. Internal Validation of IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10 Ocular cGVHD Predictive Model

Accuracy	Calibration			Discrimination		
	Brier Score (95%CI)	Calibration in the Large (95%CI)	Calibration Slope (95%CI)	Hosmer-Lemeshow P Value	AUC (95%CI)	Sensitivity % (95%CI)
0.1018 (0.035, 0.1853)	-0.2918 (-1.2163, 0.6326)	0.7463 (0.4194, 1.0731)	0.3866	0.9004 (0.7936, 1)	86.36 (72.02, 100)	95.24 (86.13, 100)

The Brier score is a measure of accuracy. The calibration in the large, calibration slope and Hosmer-Lemeshow test are calibration measures. The AUC, sensitivity, and specificity are discrimination measures for the predictive models.

the National Institutes of Health Eye Score and Schirmer's test,<sup>19</sup> and a multiple conjunctival gene-based predictive model.<sup>12</sup>

Multiple biomarker-based models, built upon the simultaneous use of a group of biomarkers, may improve performance compared to the use of a single-molecule analysis for diagnosis issues. Some investigators have attempted to use proteomic approaches to identify candidate biomarkers in GVHD practice, with promising results.<sup>18,45,46</sup> Regarding ocular cGVHD, as mentioned above, our group has already proposed a biomarker-predictive model based on conjunctival epithelial *EGFR*, *IL-6*, *IL-9*, and *NAMPT* gene expression that showed very good sensitivity and specificity.<sup>12</sup> Although tear cytokines have been proposed by Jung et al.<sup>17</sup> as cGVHD biomarkers based on individual AUC and odds ratio values, to our current knowledge, no multiple biomarker-based predictive models have been described utilizing tears of ocular cGVHD patients. Thus, we intended to apply this technology to the accurate diagnosis of ocular complications of cGVHD; and the predictive model that resulted, based on the tear levels of IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10, showed very good sensitivity (86.36%) and specificity (95.24%). As expected, discriminant capacity of this multiple biomarker model was higher than those models obtained by any single cytokine alone.

Technical resources available at the time of sample collection and analysis, compared to the previous method using impression cytology, make these results more valuable.<sup>12</sup> Both gene expression and tear cytokine level predictive models have shown to have good sensitivity and specificity, although the latter does not reach the results previously obtained (sensitivity of 100% and specificity of 92.9%).<sup>12</sup> A tear-based model has the advantage that tears are more accessible and that the handling is easier than with impression cytology, and tears can be obtained without the need for anesthesia, which would make it easier to implement in daily clinical practice.<sup>47</sup> Moreover, the advent of point-of-care diagnostic tests for measurement of molecule levels in tears provides a new opportunity to diagnose and monitor ocular cGVHD patients in everyday clinics. The current tear cytokine/chemokine model also provides complementary information about the processes studied. However, limitation in the amount of tear sample that can be obtained from these patients (sometimes even 1  $\mu$ L is difficult to obtain) could be a downside of this predictive model compared to the gene based.

We did perform an internal validation of our predictive model, but it is known that this is not enough to demonstrate acceptable outcomes of a model on the initial sample only, being absolutely necessary to confirm that the model predicts well in a different subset of individuals.<sup>44</sup> In order to further generalize the discriminatory capability of our model we used an external cohort of patients with Sjögren DE, non-Sjögren DE, and healthy controls from previous studies of our group.<sup>20-22</sup> Classification results obtained by our two-molecule-based model seem very promising, as it identified most of these patients as negative for ocular cGVHD. However, the external validation cannot be considered complete yet, and it would be worth checking classifier performance using a new cGVHD sample with and without ocular involvement.

We want to emphasize that although these cytokines and chemokines are expected to be elevated in other inflammatory diseases of the ocular surface, and not to be exclusively increased in tears of ocular cGVHD patients, based on the very good preliminary classification results, we are convinced that the changes observed reflect the underlying origin of the DE disease.

There are a number of limitations in the present study. First of all, obtaining tear fluid from these severe DE patients who have very little in the way of tears is a challenge. Fortunately, bead-based arrays utilizing X-MAP technology overcome this limitation in sample amount. Also, the low number of ocular cGVHD patients recruited may be a limitation; but while currently there are relatively few patients who manifest the disease, the number is increasing. Additionally, the small number of patients recruited is the result of the inclusion criteria, which restricted the participation of severe and uncontrolled cases that were unable to discontinue their topical medication. Nevertheless, although the sample in this study was not big, it was large enough to establish levels of cytokines/chemokines in tears and serve as the basis for further studies. We are aware that the predictive model has to be further validated in a bigger cohort of patients with ocular cGVHD in order to confirm its sensitivity and that the results obtained so far are totally relevant.

Finally, one could think that systemic anti-inflammatory therapy used on these patients may influence cytokine levels in the tear film. We believe that this is possible, but unfortunately, the severity of the underlying disease made it impossible to

TABLE 7. Classification Performance of the Fitted Model in a Cohort of Sjögren and Non-Sjögren-Associated DE Patients and Healthy Controls

	Well Classified, <i>n</i>	Wrongly Classified, <i>n</i>	Percentage of Well-Classified Individuals	
			%	95%CI
Healthy controls	32	0	100	86.66, 100
Mild/moderate non-SS DE	34	0	100	87.36, 100
Severe SS DE	11	3	78.57	48.82, 94.29
Total	77	3	96.25	88.68, 99.03

SS, Sjögren syndrome; DE, Dry eye.

remove these medications and analyze tear cytokine and chemokine levels in untreated patients.

In conclusion, this study shows that ocular cGVHD patients presented different patterns of inflammatory molecules in tears compared to normal controls and other kinds of DE. This information adds further knowledge to the understanding of the molecular mechanisms underlying this disease. Additionally, the predictive model based on IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10 tear levels showed good sensitivity and specificity results. Due to the accessibility of tear film, it may become a useful tool in daily clinical practice, as biomarkers are now considered a cornerstone for the diagnosis of several pathologies. Future directions include evaluation of these biomarkers with a larger number of samples collected in prospective studies that will facilitate the successful design of subsequent clinical trials.

### Acknowledgments

Supported by a national grant from the Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain, SAF-2010 15631 (AES). The sponsor or funding organization had no role in the design or conduct of this research. The publication of this paper was funded in part by an ARVO Publications Grant. At the time of the study MES was an employee of Allergan, Inc. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Disclosure: L. Cocho, None; I. Fernández, None; M. Calonge, Allergan, Inc. (C); V. Martínez, None; M.J. González-García, None; D. Caballero, None; L. López-Corral, None; C. García-Vázquez, None; L. Vázquez, None; M.E. Stern, Allergan, Inc. (E); A. Enríquez-de-Salamanca, None

### References

- Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:1125-1130.
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:945-956.
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373:1550-1561.
- Anderson NG, Regillo C. Ocular manifestations of graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2004;15:503-507.
- Hessen M, Akpek E. Ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012;12:540-547.
- Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:389-401.
- Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5: 108-152.
- Fuentes-Páez G, Herreras JM, Cordero Y, et al. Lack of concordance between dry eye syndrome questionnaires and diagnostic tests. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2011;86:3-7.
- Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:780-792.
- Toubai T, Tanaka J, Paczesny S, et al. Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD): are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT)? *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7: 229-239.
- Berger M, Signorino E, Muraro M, et al. Monitoring of TNFR1, IL-2R $\alpha$ , HGF, CCL8, IL-8 and IL-12p70 following HSCT and their role as GVHD biomarkers in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:1230-1236.
- Cocho L, Fernández I, Calonge M, et al. Gene expression-based predictive models of graft versus host disease-associated dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:4570-4581.
- Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res*. 1999;19: 201-211.
- Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, et al. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2009;147: 198-205.
- Enríquez de Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis*. 2010;16:862-873.
- Riemens A, Stoyanova E, Rothova A, et al. Cytokines in tear fluid of patients with ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Mol Vis*. 2012;18:797-802.
- Jung JW, Han SJ, Song MK, et al. Tear cytokines as biomarkers for chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:2079-2085.
- Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113:273-278.
- Curtis LM, Datile MB III, Steinberg SM, et al. Predictive models for ocular chronic graft-versus-host disease diagnosis and disease activity in transplant clinical practice. *Haematologica*. 2015;100:1228-1236.
- Tesón M, González-García MJ, López-Miguel A, et al. Influence of a controlled environment simulating an in-flight airplane cabin on dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54: 2093-2099.
- López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, et al. Dry eye exacerbation in patients exposed to desiccating stress under controlled environmental conditions. *Am J Ophthalmol*. 2014; 157:788-798.
- López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, et al. Clinical and molecular inflammatory response in Sjögren syndrome-associated dry eye patients under desiccating stress. *Am J Ophthalmol*. 2016;161:133-141, e2.
- Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:615-621.
- Efron N, Morgan PB, Jaggal R. Validation of computer morphs for grading contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2002;22:341-349.
- Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea*. 2003;22:640-650.
- Helsel, DR, Cohn TA. Estimation of descriptive statistics for multiply-censored water-quality data. *Water Resour Res*. 1988; 24:1997-2004.
- Lee L. NADA: Nondetects and data analysis for environmental data. R package version 1.5-6. 2013. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/NADA/index.html>. Accessed January 2014.
- Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:77.
- Weng Y, Siciliano SJ, Waldburger KE, et al. Binding and functional properties of recombinant and endogenous

- CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem*. 1998;273:18288-18291.
30. Wyszocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, et al. Leukocyte migration and graft-versus host disease. *Blood*. 2005;105:4191-4199.
  31. Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, et al. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol*. 2003;31:897-902.
  32. Piper KP, Horlock C, Curnow SJ, et al. CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110:3827-3832.
  33. Westkemper H, Meller S, Citak S, et al. Differential chemokine expression in chronic GVHD of the conjunctiva. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1340-1346.
  34. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, et al. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea*. 2009;28:1023-1027.
  35. Lee SY, Han SJ, Nam SM, et al. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjögren syndrome dry eye patients and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *Am J Ophthalmol*. 2013;156:247-253.
  36. Garlanda C, Riva E, Bonavita E, et al. Negative regulatory receptors of the IL-1 family. *Semin Immunol*. 2013;25:408-415.
  37. Cullup H, Stark G. Interleukin-1 polymorphisms and graft-vs-host disease. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:517-523.
  38. Schots R, Kaufman L, Van Riet I, et al. Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia*. 2003;17:1150-1156.
  39. Levine JE, Logan BR, Wu J, et al. Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study. *Blood*. 2012;119:3854-3860.
  40. Weber M, Stein P, Prüfer S, et al. Donor and host B cell-derived IL-10 contributes to suppression of graft-versus-host disease. *Eur J Immunol*. 2014;44:1857-1865.
  41. Sakata N, Yasui M, Okamura T, et al. Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:1153-1161.
  42. Fujii N, Hiraki A, Aoe K, et al. Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. *Int J Mol Med*. 2006;17:881-885.
  43. Enríquez-de-Salamanca A, Calonge M. Cytokines and chemokines in immune-based ocular surface inflammation. *Expert Rev Clin Immunol*. 2008;4:457-467.
  44. Moons KG, Kengne AP, Grobbee DE, et al. Risk prediction models: II. External validation, model updating, and impact assessment. *Heart*. 2012;98:691-698.
  45. Kaiser T, Kamal H, Rank A, et al. Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;104:340-349.
  46. Chen YB, Cutler CS. Biomarkers for acute GVHD: can we predict the unpredictable? *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:755-760.
  47. Von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Funke S, Grus FH. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Exp Eye Res*. 2013;117:126-137.

## ANEXO 3

### INFORME FAVORABLE DEL COMITÉ ÉTICO DE LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA  
C/ RAMÓN Y CAJAL,7  
47005 VALLADOLID.

Reunión  
10 de 05 de 2010



COMITÉ ÉTICO DE  
INVESTIGACIÓN CLÍNICA  
DE LA UNIVERSIDAD DE  
VALLADOLID

## INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Evaluados y Ponderados los Aspectos Éticos y Legales aplicables, según la legislación vigente, en territorio nacional, europeo y de organismos internacionales para la Evaluación de Ensayos Clínicos y Proyectos de Investigación, realizada por el Comité Ética de Investigación Clínicas de la Universidad de Valladolid, contemplada en la directiva Europea 2001/20/EC y el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero.

En estudios experimentales con animales, se considera la normativa de protección de los animales de investigación según el R.D. 223/1998, la Orden 13-X-1989 y la norma de la CCEE 86/608. En los aspectos que sean aplicables al proyecto evaluado:

En investigación ocular se considera la norma de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

### DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO EVALUADO:

Versión/Fecha del protocolo: V1/ 10/05/Mayo 2010

Hoja de información al paciente/sujeto: V1/ 10/05/Mayo 2010

Título: Biomarcadores y nuevas diana terapéuticas en inflamación de la superficie ocular

Diseñado como: caso-control prospectivo, multicentrico, observacional.

Con los objetivos de: Determinar los niveles de citoquinas, quimioquinas y metaloproteinasas en la lágrima así como la expresión de diversas moléculas relacionadas con la inflamación en células epiteliales conjuntivales de pacientes afectados con Síndrome de Ojo Seco o con Queratoconjuntivitis atópica para el estudio de posibles biomarcadores y/o dianas terapéuticas en dichas patologías.

Para ser realizado en el IOBA: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada.

Cuyo Investigador responsable es: Amalia Enríquez de Salamanca y Aladro

Investigadores colaboradores: Jose M<sup>a</sup> Herreras Cantalapiedra, María Jesús González García, Alfredo Corell Almuzara, Itziar Fernández

El CEIC resuelve **INFORMAR FAVORABLEMENTE**, la realización del estudio reseñado.

Valladolid a 10 de mayo de 2010

Fdo.: Dr. José Luis García Roldán

Secretario Técnico del CEIC de la Universidad de Valladolid.

**COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**  
Universidad de Valladolid  
Facultad de Medicina  
C/. Ramón y Cajal, 7  
47005 Valladolid

## ANEXO 4

### CONSENTIMIENTO INFORMADO TRABAJOS 1 y 2

**TITULO DEL ESTUDIO:** “BIOMARCADORES MOLECULARES EN SINDROME DE OJO SECO SECUNDARIO A LA ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUESPED (EICH)”.

#### **Propósito del estudio**

Está invitado a participar en un estudio de investigación en el que se pretende analizar los niveles de expresión de moléculas relacionadas con procesos de inflamación (citoquinas/quimioquinas) en lágrima y células de la superficie ocular de pacientes afectados por síndrome de ojo seco o alergia ocular crónica.

#### **Condiciones del estudio**

Si se decide a participar, usted accede a que se le realicen pruebas oftalmológicas, sometido durante una hora y media aproximadamente a unas condiciones ambientales normales de presión (nivel del mar), temperatura (22°C) y humedad (40%), dentro de la cámara de ambiente controlado (habitación aislada donde se puede controlar la humedad, la temperatura, la presión atmosférica, el flujo de aire y la actividad visual) situada en las instalaciones del IOBA. La realización de las pruebas es indolora, y a veces requiere la instilación de colirios (tinciones vitales). Además, accede a que se le tome una muestra de lágrima de cada ojo y se le realice una citología por impresión conjuntival y una por cepillado.

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

Las pruebas oftalmológicas que se le realizarán serán las mismas que se le hacen de rutina durante su consulta Oftalmológica habitual. Ninguna de las pruebas es experimental, es decir, ya han sido probadas con anterioridad en humanos y son utilizadas en la práctica clínica de muchos otros centros además del nuestro.

Las pruebas serán las siguientes:

*1) Evaluación de la sintomatología de Ojo Seco:*

- OSDI y SODQ tests.

*2) Evaluación de la producción y estabilidad de lágrima:*

- Producción lagrimal: Altura del menisco lagrimal, test de Schirmer, Estabilidad: TBUT test.

*3) Evaluación de la integridad de la superficie ocular:*



- Tests de tinción con fluoresceína y test de tinción con verde de Lisamina.

#### 4) Evaluación de la calidad de la secreción de las glándulas de meibomio

- Lámpara de hendidura

#### A. Se recogerán tres tipos de muestras: lágrima, sangre y células epiteliales conjuntivales

1) Lágrima: El procedimiento de obtención de lágrima es un proceso no invasivo, completamente indoloro e inócuo para Usted. No es necesaria ninguna preparación previa. La toma de lágrima se realizará por capilaridad, utilizando un capilar de vidrio de 4 μl apoyado en el canto externo del ojo.

2) Células epiteliales conjuntivales: Se obtendrán células epiteliales conjuntivales por citología por impresión conjuntival (CIC). La citología por impresión conjuntival para la obtención de células conjuntivales es una prueba **mínimamente invasiva** y sin riesgo que se realizará bajo el efecto de anestésico tópico; se procederá a aplicar un pequeño fragmento de filtro en la superficie conjuntival superior del ojo. Dicho filtro se retirará posteriormente y las células adheridas se utilizarán para los estudios de expresión génica.

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

#### **Riesgos que entraña el presente estudio**

Ninguno. Usted será, de hecho, tratado siempre según las normas de Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki. El estudio no tiene como objetivo evaluar ni comparar la eficacia de ningún fármaco o tratamiento, por lo que éste será indicado de acuerdo a su enfermedad, pudiendo ser incluso el mismo que tenía antes de participar en este estudio. En ningún momento se le administrará ninguna medicación o se le realizará prueba alguna que no pertenezca a la rutina médica para el cuidado de la enfermedad ocular que Usted pudiera padecer. No se trata pues, de un ensayo clínico, sino de **un estudio de recogida de datos y muestras** de manera sistematizada, que permitirá conocer e intentar solucionar mejor sus posibles problemas oculares.

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

En todo momento se seguirán las normativas establecidas en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm. 298, de 14-12-1999, pp. 43088-43099), lo cual garantiza el que su identificación será siempre confidencial fuera del equipo oftalmológico que cuidará su salud. Sólo se emplearán los datos de su

historia clínica para correlacionarlos con los obtenidos en los análisis de las muestras, estando en todo momento de este estudio desvinculado su nombre de los mismos.

Los resultados de este estudio podrán ser divulgados en revistas científicas, congresos y otro tipo de reuniones médicas, pero siempre guardando la confidencialidad de sus datos personales

Para cualquier duda sobre el estudio debe dirigirse al oftalmólogo responsable (Dra. Calonge), o al coordinador del mismo (Dr. A Enríquez de Salamanca Aladro), IOBA, Campus Miguel Delibes, Universidad de Valladolid, 47011 Valladolid.

Tfn: 983- 423274 y 983-184750; Fax 983-184762

**Por todo ello, declaro que entiendo la naturaleza del estudio, he sido informado de todos sus aspectos y se me ha permitido hacer tantas preguntas y aclaraciones como he deseado, por lo que DOY MI CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO**

FIRMA:

---

Nombre y apellidos del **paciente (o representante legal, en caso de un menor):**

FIRMA:

---

Nombre y apellidos del **médico oftalmólogo** responsable del estudio en cada centro



## ANEXO 5

### CONSENTIMIENTO INFORMADO TRABAJO 3

**TITULO DEL ESTUDIO:** “BÚSQUEDA PROSPECTIVA DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN SINDROME DE OJO SECO SECUNDARIO A ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUESPED (EICH)”.

#### **Propósito del estudio**

Está invitado a participar en un estudio en el que se pretende recoger correctamente todas las complicaciones oculares que usted pudiera sufrir tras su trasplante hematológico. El ojo se afecta en, aproximadamente un 50% de los pacientes trasplantados y en un 70% de los que sufren la enfermedad de injerto contra huésped que su hematólogo ya le ha explicado.

#### **Condiciones y beneficios del estudio**

Si se decide a participar, deberá acudir a las visitas programadas de Oftalmología, que coincidirán con alguna de las programadas por su equipo hematológico. Además, si en algún momento su condición ocular empeorara, podrá ser visto con anterioridad a lo programado, por el mismo oftalmólogo. La evaluación de sus ojos será más exhaustiva y reglada, suponiendo esto un claro beneficio para su visión y confort ocular.

El número total de visitas que tendrá que realizar será de 10 a lo largo de 3 años; serán algo más frecuentes durante el primer año por la mayor posibilidad de sufrir EICH: antes del trasplante (donde se determinará la salud previa de sus ojos), y cada 3 meses hasta completar el 1º año. Posteriormente, las visitas serán cada 6 meses hasta completar los 3 años.

Naturalmente, Usted seguirá siendo visto por su equipo oftalmológico tras estos 3 años, siempre que lo necesite.

#### **Pruebas que se realizarán durante el estudio**

Los procedimientos que se realizarán durante las revisiones serán los mismos que Usted precisaría si no estuviera incluido en este estudio, con la ventaja de que no se excluirá ninguna por falta de tiempo o personal.

Además, y como se hace en los centros especializados en el cuidado de esta enfermedad, se le realizará una toma de lágrima (totalmente indolora y sin riesgos); dicha muestra será remitida al IOBA (Universidad de Valladolid), garantizando la confidencialidad de las mismas y servirán para intentar definir si es posible predecir el riesgo de presentar EICH, el problema más grave que puede surgir tras su trasplante.

### **Riesgos que entraña el presente estudio**

Ninguno. Usted será, de hecho, tratado siempre según las normas de Buena Práctica Clínica, la Declaración de Helsinki sobre estudios clínicos y lo establecido en la “Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm. 298, de 14-12-1999, pp. 43088-43099), lo cual garantiza el que su identificación será siempre confidencial fuera del equipo hematológico y oftalmológica que cuidará su salud.

En ningún momento se le administrará ninguna medicación o se le realizará prueba alguna que no pertenezca a la rutina médica para el cuidado de la enfermedad ocular que Usted pudiera padecer. No se trata pues, de un ensayo clínico, sino de un estudio de recogida de datos de manera sistematizada, que permitirá conocer e intentar solucionar mejor sus posibles problemas oculares.

Para cualquier duda sobre el estudio debe dirigirse a sus médicos habituales, y al coordinador del mismo:

Dra. Margarita Calonge Cano

IOBA, Campus Miguel Delibes, Universidad de Valladolid, 47005 Valladolid.

Tfn: 983- 423274 y 983-423559

**Por todo ello, declaro que entiendo la naturaleza del estudio, he sido informado de todos sus aspectos y se me ha permitido hacer tantas preguntas y aclaraciones como he deseado, por lo que DOY MI CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO.**

FIRMA:

---

Nombre y apellidos del **paciente (o representante legal, en caso de un menor)**:

FIRMA:

---

Nombre y apellidos del **médico oftalmólogo** responsable del estudio en cada centro

## ANEXO 6

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

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

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

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

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

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

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

## ANEXO 7






## ESCALA DE NATHAN EFRON PARA LA VALORACIÓN DE LA HIPEREMIA CONJUNTIVAL



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

## ANEXO 8

**ESCALA OXFORD PARA LA EVALUACIÓN DE TINCIÓN CORNEAL CON FLUORESCÉINA Y  
CONJUNTIVAL CON VERDE DE LISAMINA/ ROSA DE BENGALA**

- A  Grado 0: Tinción igual o menor a figura A.
- B  Grado 1: Tinción mayor a figura A y menor o igual que B.
- C  Grado 2: Tinción mayor a figura B y menor o igual que C.
- D  Grado 3: Tinción mayor a figura C y menor o igual que D.
- E  Grado 4: Tinción mayor a figura D y menor o igual que E.