



**Universidad de Valladolid**



## **TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS CRÓNICO EN  
SALIVA, EN PACIENTES CON DISTROFIAS DE LA RETINA,  
FUNDAMENTALMENTE RETINITIS PIGMENTOSA**

**Presentado por Andrés Gálvez García para optar al grado de máster en  
Investigación en Ciencias de la Visión por la Universidad de Valladolid**

**Curso académico 2017/2018**

**Dirigido por:**

**Prof. José Carlos Pastor Jimeno**



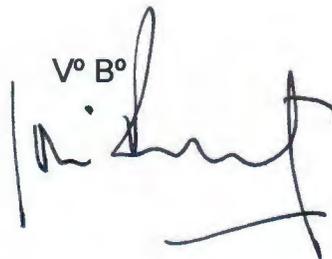
## AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA EXPOSICIÓN PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

*(Art. 6.2. del Reglamento de la UVA sobre la Elaboración y Evaluación del Trabajo Fin de Máster)*

D. José Carlos Pastor Jimeno en calidad de tutor del alumno/a D. Andrés Gálvez García del Máster en Investigación en Ciencias de la Visión. Curso académico 2017/2018.

Certifica haber leído la memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado “Estudio Bibliométrico de biomarcadores de estrés crónico en saliva, en pacientes con distrofias de la retina, fundamentalmente retinitis pigmentosa”, y estar de acuerdo con su exposición pública en la convocatoria extraordinaria del 21 de Noviembre 2017.

En Valladolid a 15 de Noviembre de 2017

Vº Bº  


Fdo: Prof. José Carlos Pastor Jimeno  
El/la Tutor/a

## ***Agradecimientos***

A mi tutor, el Profesor José Carlos Pastor, por su dedicación en la investigación de terapias para patologías de la retina, y por su interés y esfuerzo en la supervisión de este trabajo.

A la Profesora Diebold, la Dra. Eva Sobas, el Profesor Pedro de la Villa y el Profesor Román Blanco por sus útiles consejos acerca del trabajo en el máster y los estudios clínicos relativos a él.

A mi madre, por su paciencia con mis múltiples e impredecibles exploraciones. Y a mi padre, a quien le hubiese gustado leer este ejercicio de intrusismo en un campo que era más el suyo que el mío, por inculcarme el amor por la ciencia.

A todos aquellos, compañeros, familiares y amigos que me han animado y ayudado a realizar este trabajo.

## *Índice*

<b>Índice</b>	<b>2</b>
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>5</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>7</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>4. ESTADO ACTUAL DEL TEMA</b>	<b>9</b>
<b>4.1. Introducción a las Distrofias Hereditarias de Retina</b>	<b>9</b>
<b>4.2. Retinosis Pigmentaria</b>	<b>10</b>
<b>4.3. Enfermedad de Stargardt</b>	<b>10</b>
<b>4.4. Las distrofias de conos y bastones (CRDs)</b>	<b>11</b>
<b>4.5. Definición de estrés</b>	<b>11</b>
<b>4.6. El estrés oxidativo</b>	<b>12</b>
<b>4.7. Determinaciones bioquímicas en saliva</b>	<b>13</b>
4.7.1. La saliva	13
4.7.2. Cortisol	14
4.7.3. Inmunoglobulina A secretora	15
4.7.4. Fracción soluble del receptor 2 del TNF $\alpha$	15
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>17</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>17</b>
<b>6.1. Grupo 1: estudios sobre distrofias de retina y estrés crónico</b>	<b>17</b>
<b>6.2. Grupo 2: biomarcadores, saliva y estrés crónico</b>	<b>20</b>
<b>6.3. Grupo 3: desambiguación con estrés oxidativo</b>	<b>22</b>
<b>6.4. Grupo 4: distrofias, biomarcadores y estrés</b>	<b>23</b>
<b>6.5. Análisis de publicaciones de biomarcadores en saliva por año</b>	<b>24</b>

<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>25</b>
<b>ANEXO A. DISEÑO DEL ESTUDIO CLÍNICO</b>	<b>27</b>
A.1. Resumen del estudio clínico	27
A.2. Objetivos del estudio	28
A.3. Población de referencia	28
A.4. Método de estimación de los límites de referencia	28
A.5. Estimación del tamaño muestral	28
A.6. Sujetos del estudio	29
A.7. Criterios de inclusión	29
A.8. Criterios de exclusión	29
A.9. Procedimiento de medida	29
A.10. Valoración subjetiva	30
A.11. Valoración objetiva	30
A.12. Técnica y recomendaciones para la recogida de saliva	30
A.13. Manipulación y almacenamiento de las muestras	31
A.14. Análisis mediante la técnica ELISA	31
A.15. Determinación de cortisol	31
A.16. Determinación de la inmunoglobulina A secretora	31
A.17. Determinación del TNF $\alpha$	32
A.18. Destino final de las muestras	32
<b>ANEXO B. EVALUACIÓN DE ESTRÉS MEDIANTE MÉTODOS SUBJETIVOS</b>	<b>33</b>
B.1. Escalas para la evaluación de estrés, ansiedad y estado de ánimo	33
B.2. Escalas de somnolencia	34
<b>Bibliografía</b>	<b>35</b>



## **Resumen**

Hay indicios de que el estado anímico es un factor que afecta a la evolución de patologías orgánicas, una categoría que se aplica también a las distrofias de la retina como la Retinosis Pigmentaria (RP). Desde hace algunos años, diversos estudios han intentado determinar la relación del estrés crónico con la RP y la capacidad visual de los enfermos, y han tratado de establecer qué tipo de medidas de estrés pueden ser más apropiadas para este fin. Al mismo tiempo, para evitar una dependencia de la propia percepción del sujeto para evaluar su grado de estrés, se ha propuesto la utilización de biomarcadores objetivos en distintos fluidos corporales, cuyas medidas sean sencillas y no invasivas. Algunos de los más utilizados son el cortisol, la Inmunoglobulina A secretora y la citoquina pro-inflamatoria TNF $\alpha$ , en saliva.

El objetivo de este estudio es analizar las tendencias en investigación en el uso de estos biomarcadores de estrés que se encuentran en la saliva, en pacientes con distrofias de la retina, para comprobar su evolución en los últimos años, así como el grado de originalidad que podría tener un trabajo de investigación posterior sobre este tema.

Para ello, se ha realizado una búsqueda en PubMed en dos grupos de publicaciones, uno sobre los trabajos acerca de los biomarcadores en saliva, que serán objeto de un posible estudio posterior, y otro sobre las distrofias de la retina y la relación con reacciones fisiológicas de estrés crónico. En cada grupo se ha recopilado información para estimar el número de publicaciones que han aparecido en los diez últimos años. Los dos grupos se han analizado primero por separado y después los resultados respectivos se han relacionado para determinar hasta qué punto trabajos ya relativamente frecuentes en otras disciplinas médicas sobre la influencia del estrés crónico en las patologías orgánicas son o no menos habituales en el caso de las enfermedades hereditarias de retina.

El estudio muestra una tendencia creciente en la aparición de publicaciones sobre los compuestos citados anteriormente y sobre el uso de estos biomarcadores en la evaluación del estrés. La aplicación a la evaluación del estrés en pacientes con distrofias de la retina parece muy novedosa, con muy pocos trabajos relacionando ambos temas. La literatura es aún más escasa acerca del uso de biomarcadores en saliva en distrofias de la retina, con publicaciones exclusivamente en el caso del cortisol y la RP.

Se define además el protocolo para un estudio orientado a medir la variabilidad de los biomarcadores de estrés en saliva en el caso de pacientes con RP. Este estudio supondría un paso adelante en el camino hacia el desarrollo de medidas objetivas para investigar la posible influencia del estrés en las variaciones de la capacidad visual de dichos pacientes.

# 1. JUSTIFICACIÓN

Se han publicado numerosos trabajos que señalan a la existencia de vínculos entre estados de estrés crónico y la génesis y evolución de diferentes patologías, incluyendo trastornos psicológicos, depresión y ansiedad, (de Kloet, Joëls, & Holsboer, 2005; Gold, 2015; Krishnan & Nestler, 2008) algunas enfermedades del sistema cardiovascular (Golbidi, Frisbee, & Laher, 2015) y también neurodegenerativas. (Vyas et al., 2016) Aunque también son evidentes las relaciones del estado anímico y la evolución de otras patologías orgánicas.

Hay estudios que han descrito que algunos pacientes afectados de distrofias hereditarias de la retina (DHR) perciben una relación entre su nivel de estrés y las variaciones en su función visual. Bittner, en 2012 relaciona un aumento de fotopsias con un incremento de la percepción de estrés o una disminución del estado de ánimo positivo en un estudio con 36 pacientes de RP. (A K Bittner, Haythornthwaite, Diener-West, & Dagnelie, 2012) En un trabajo anterior estos autores habían descrito una relación entre el incremento agudo del cortisol en saliva y valores más elevados en las puntuaciones de las escalas de depresión en pacientes con RP. En él se realizó una evaluación de la salud emocional de pacientes con RP describiendo la dificultad que tienen en tratar con situaciones cotidianas y la ansiedad que eso les produce. (A K. Bittner, Smith, Haythornthwaite, & Buenaver, 2011) Sin embargo, otro estudio sobre estrés crónico en pacientes con RP ligada al X (XLRP) con edades comprendidas entre los 7 y los 33 años no encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes y el grupo control en las medidas de cortisol en saliva y la percepción de estrés (Wheaton, Fish, Takacs, Fernandez, & Hoffman, 2012).

Parece, por lo tanto, que estos estudios, que no son muy numerosos no han permitido aun establecer una clara relación entre estas enfermedades retinianas y el estrés, ni su efecto sobre la función visual, al menos de una forma concluyente.

Un problema común a gran número de estudios sobre el estrés es la forma de evaluarlo. Muchos se han basado en métodos de evaluación subjetiva, tales como la Escala de Estrés Percibido (Perceived Stress Scale, PSS) (Cohen, Kamarck, & Mermelstein, 1983) que resultan eficientes y que no hacen estrictamente necesario que el sujeto se desplace al centro clínico, pero que dependen por completo de la percepción de estrés que tiene cada individuo.

Para evitar este inconveniente, en los últimos años se han empezado a utilizar medidas objetivas no invasivas tales como el análisis de biomarcadores en fluidos corporales, incluyendo el plasma y la saliva. Este análisis de biomarcadores en saliva tiene algunas ventajas respecto a la determinación en plasma ya que dichas medidas parecen equivalentes y permiten evitar el estrés añadido al paciente por la extracción de sangre. (Bozovic, Racic, & Ivkovic, 2013) El biomarcador más utilizado ha sido el cortisol, por ser esta hormona la segregada principalmente como parte de la respuesta del organismo a una situación estresante, (Herman et al., 2016) y porque parece existir una buena correlación entre sus concentraciones en sangre y en saliva. (Aardal & Holm, 1995; Hellhammer, Wüst, & Kudielka, 2009; Kirschbaum & Hellhammer, 1994)

Pero las medidas de cortisol y de otros biomarcadores en saliva se ven afectadas por otros factores que incluyen la fatiga física, el ciclo circadiano, el ciclo menstrual y las variaciones entre individuos, (Aardal & Holm, 1995; Dorn, Lucke, Loucks, & Berga, 2007; Kajantie & Phillips, 2006) entre otras.

Un estudio reciente realizado en el IOBA concluye que la repetitividad entre sesiones e inter-individual en sujetos sanos es buena para las medidas de inmunoglobulina A secretora (sIgA) y la fracción soluble del receptor 2 de Tumor Necrosis Factor en saliva (sTNF $\alpha$ ), con coeficientes de 0.88 y 0.83 respectivamente. (Sobas et al., 2016) Esta correlación es más baja, pero aun por encima del umbral marcado, en el caso del cortisol (0.53) y muy por debajo del límite aceptable en la Alfa Amilasa Secretora (AAS).

Unos biomarcadores en saliva que fueran fiables, es decir repetibles, sensibles y específicos podrían aplicarse al estudio de la influencia del nivel de estrés en DHR, y guiar acciones para minimizar su impacto sobre la capacidad funcional de los individuos.

El primer paso debería ser el análisis de los estudios publicados acerca de biomarcadores de estrés en saliva y su posible aplicación en pacientes con DHR, que es el principal objetivo de este trabajo junto con la definición de la metodología para un posterior estudio clínico sobre el mismo tema.

## **2. HIPÓTESIS**

El estrés crónico es un factor que afecta a la evolución de las DHR, fundamentalmente a la RP y es posible medirlo mediante determinados biomarcadores en saliva, si presentan en los pacientes unos valores adecuados de repetibilidad intraindividual. Y que se trata de una aproximación bastante novedosa, que puede ser origen de un proyecto de investigación clínica sobre un tema relevante, actual y del que no existe demasiada bibliografía específica.

## **3. OBJETIVOS**

1. Realizar un análisis bibliométrico, concretamente de marcadores de producción, sobre las publicaciones existentes en la base de datos PubMed sobre los biomarcadores de estrés crónico seleccionados y/o el efecto del estrés crónico en las DHR en los últimos 10 años, comprobando que se trata de una aproximación con una fuerte componente de originalidad.
2. Proponer un estudio clínico para determinar la variabilidad interindividual y repetitividad inter-sesión de estas determinaciones en sujetos normales y en pacientes con DHR, en particular RP.

## 4. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

### 4.1. Introducción a las Distrofias Hereditarias de Retina

Las DHR son patologías de la retina progresivas de origen genético. Las distrofias retinianas humanas tienen una gran diversidad genética y clínica, estando actualmente relacionadas con más de 260 *loci* distintos identificados. (Figura 1)

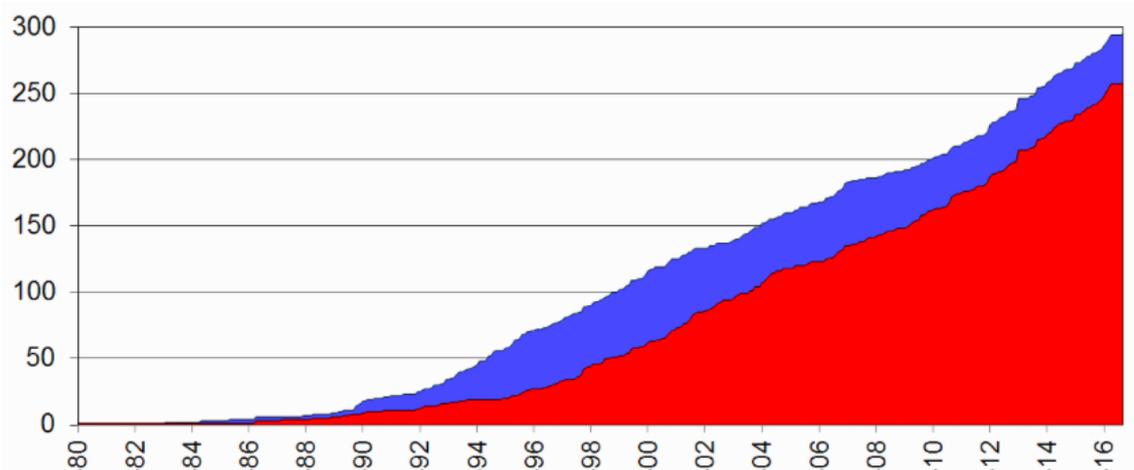


Figura 1 Números acumulativos de genes mapeados (azul) y genes identificados (rojo) en distrofias de la retina en humanos de 1980 a 2017. Extraído de RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet>, con permiso (Stephen P. Daiger, PhD, y la Universidad de Texas Health Science Center, Houston, Texas). En abscisas el número de publicaciones y en ordenadas los años

Aunque ya hay en marcha algunos ensayos clínicos con diferentes opciones terapéuticas (Pinilla, 2012) no existe, por el momento, un tratamiento eficaz para la mayoría de estas patologías. Algunas técnicas, como la terapia génica, se perfilan como posibles soluciones a medio plazo. A más corto plazo hay interés en desarrollar fármacos que puedan prolongar la vida de los fotorreceptores y de las otras neuronas de la retina no afectadas primariamente por el error genético, pero que pueden verse dañadas secundariamente, por ejemplo por ausencia de factores tróficos, y proporcionar así más años de una relativa buena visión a los pacientes, fundamentalmente mediante terapéuticas encaminadas a la neuroprotección.

Existen varias decenas de distrofias de retina entre las más de 900 enfermedades raras oftalmológicas en el registro Orphanet (<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=ES>). A priori no existe razón para pensar que la relación entre estrés crónico y las distrofias de retina exista en un caso como la RP, y no en otras enfermedades retinianas de base genética que están relacionadas. En el presente estudio se han seleccionado tres distrofias hereditarias que afectan primariamente a bastones (RP), primariamente a conos (Startgardt), o a ambos fotorreceptores (distrofias de conos y bastones). Otros casos muy estudiados como la Amaurosis Congénita de Leber, no han sido incluidos porque la edad muy temprana de aparición de síntomas y la rapidez del progreso de la enfermedad limitan los estudios de la posible relación entre el estrés crónico y la enfermedad.

## **4.2. Retinosis Pigmentaria**

La RP es un conjunto de enfermedades genéticas que provocan la muerte gradual de los bastones y otras células implicadas en el proceso de fototransducción, y pueden acabar causando la ceguera.

Se asocian con RP que se transmite de forma autosómica dominante (adRP) las mutaciones encontradas en más de 20 genes diferentes; de ellas, sólo algunos representan un porcentaje significativo de casos e incluyen RHO (26,5%), PRPH2 / RDS (5-9,5%), PRPF31 (8%) y RP1 (3,5%).

Más de 30 genes y *loci* se han implicado en la RP autosómica recesiva. La mayoría de ellos son poco frecuentes, causando el 1% o menos de los casos. Sin embargo, para algunos de ellos (RPE65, PDE6A, PDE6B y RP25) los porcentajes pueden ser más altos, de hasta el 2-5% de los casos.

Alrededor del 10% -15% de los pacientes con RP tienen RP ligada a X (XLRP) y se caracterizan por un fenotipo de mucha severidad en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad. Se han correlacionado seis *loci* de genes responsables de XLRP en el cromosoma X (RP6, RP23, RP24, RP34, RP2 y RPGR), pero solo dos de ellos se han identificado hasta ahora: el regulador de la retinosis pigmentaria GTPasa (RPGR) o RP3) y la proteína retinosis pigmentaria 2 (RP2).(Ferrari et al., 2011)

A pesar de ser considerada como una enfermedad rara oftalmológica, la prevalencia de la RP es relativamente alta, de aproximadamente 1 por cada 4.000 individuos. (Shintani, Shechtman, & Gurwood, 2009; Wood-Gush, 1989).

## **4.3. Enfermedad de Stargardt**

La enfermedad de Stargardt es la distrofia hereditaria más común que afecta a la retina central (inicialmente conos, pero también a bastones). En la mayoría de los pacientes, la enfermedad de Stargardt se hereda como un rasgo autosómico recesivo y se han identificado mutaciones del gen ABCA4. Debido a la falta de la proteína ABCA4, el todo-trans-retinal se acumula, reacciona con la etanolamina y forma el fluoróforo A2E, la parte hidrofóbica de la lipofuscina. El acumulo progresivo de la A2E (y la lipofuscina) en el epitelio pigmentario de la retina (EPR), se considera un factor clave en la enfermedad de Stargardt y sus niveles pueden alcanzar hasta cinco veces los valores normales. Este acumulo de lipofuscina tiene un efecto negativo sobre la función y la supervivencia del EPR.

Hay estudios que sugieren que la enfermedad de Stargardt y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) podrían estar causadas por la inflamación crónica del EPR. (Radu et al., 2011)

Se estima que la enfermedad de Stargardt tiene una prevalencia de una cada 8.000 a 10.000 personas. (Trapani, Banfi, Simonelli, Surace, & Auricchio, 2015)

#### **4.4. Las distrofias de conos y bastones (CRDs)**

Las distrofias de conos y bastones (Cone-Rod Dystrophies, CRDs) se incluyen en el grupo de la RP pero a diferencia de las RP típicas se caracterizan por una pérdida primaria de los conos, o con una pérdida de función simultánea de conos y bastones. La CRD conlleva por tanto una agudeza visual disminuida, visión cromática reducida y fotofobia, seguido por una pérdida paulatina de la visión periférica y ceguera nocturna, llegando a la ceguera total en estadios más avanzados.

Las CRDs no sindrómicas son genéticamente heterogéneas, con 10 genes clonados y tres *loci* identificados. Entre los genes ya clonados está el ABCA4, que como ya se ha mencionado, provoca la enfermedad de Stargardt y del 30 a 60% de las CRDs autosómicas recesivas; los CRX y GUCY2D, que están ligados a muchos casos de CRDs autosómicas dominantes; y RPGR, que provoca alrededor de dos tercios de las RPs ligadas al X y una fracción importante de las CRDs ligadas al X.

Las CRDs tienen una prevalencia estimada de 1 caso cada 40.000 personas. (Hamel, 2007)

#### **4.5. Definición de estrés**

El estrés (del latín *stringere* 'apretar' a través de su derivado en inglés *stress* 'fatiga de material') es una reacción fisiológica del organismo al afrontar una situación que se percibe como amenazante o de demanda incrementada.

Un estímulo estresante, endógeno o exógeno, activa una respuesta fisiológica compleja. La respuesta puede estar provocada por una amenaza aguda o estar ligada a exigencias y miedos psicosociales, incertidumbre, etc. Esto mismo es cierto para algunas alteraciones de la homeostasis de carácter biológico tales como la fatiga, los niveles bajos de energía, el daño físico, las hemorragias o la inflamación.

La reacción fisiológica conlleva la secreción de hormonas, lo que a su vez produce una vasoconstricción, la dilatación de la vía respiratoria y consecuentemente un aumento en la concentración de oxígeno en sangre y una mayor capacidad muscular; además, tiene lugar un incremento de glucosa en sangre, mayor resistencia al dolor y nivel de alerta, en anticipación a una mayor exigencia física y mental.

La respuesta del estrés se produce en dos etapas: de forma rápida a través del sistema nervioso simpático de activación, las glándulas suprarrenales responden liberando catecolaminas, como la adrenalina y la noradrenalina. Después, la respuesta a través del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) resulta en la secreción desde las glándulas adrenales de glucocorticoides (GC) como el cortisol. (Herman et al., 2016) Menos del 15% de este cortisol está libre, es biológicamente activo y puede ser medido en saliva. (Kirschbaum & Hellhammer, 1994)

Las catecolaminas liberadas en la respuesta aguda de estrés afectan a la respuesta inflamatoria, dando lugar a un incremento de la interleuquina 10 (IL-10), citoquina con capacidad antiinflamatoria e inhibiendo las citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1

beta y –de forma independiente al aumento de IL10- el TNF- $\alpha$ . (Connor, Brewer, Kelly, & Harkin, 2005) Esta disminución puede ser medida a través de las concentraciones de la fracción soluble del receptor 2 de TNF- $\alpha$  en la saliva. La activación del eje HHA también resulta en una inhibición de la función inmune con una variación asociada de la IgA y de la lisozima.

El estrés crónico se manifiesta cuando la activación del eje HHA se produce de forma mantenida en el tiempo, con concentraciones anormales de glucocorticoides (GC). Esto provoca diversos cambios neurofisiológicos de adaptación a la nueva situación, que pueden tener consecuencias importantes en términos de reconfiguración neuronal (Vyas et al., 2016) y de la respuesta inmunológica.

#### **4.6. El estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es un fenómeno muy distinto al estrés como respuesta del organismo. La ambigüedad de la palabra “estrés” puede llevar a confusión entre ambos términos.

El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. En el ser humano, el estrés oxidativo y por ende las denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS) participan en los mecanismos etiopatogénicos primarios o en sus consecuencias en un gran número de enfermedades de gran importancia clínica y social, (Dalle-Donne, Rossi, Colombo, Giustarini, & Milzani, 2006) Por ejemplo, en diversas enfermedades oftalmológicas (Beyazyıldız et al., 2013) y neurodegenerativas, (Halliwell, 2001) y en las enfermedades relacionadas con la edad, como la arteriosclerosis, (Stocker & Keaney, 2004) y en el propio proceso de envejecimiento. (Finkel & Holbrook, 2000)

Trabajos realizados con modelos animales de RP han demostrado que, en ése caso, el daño oxidativo contribuye en gran manera a la muerte de los conos. Hay intentos de trasladar este hallazgo al estudio de la RP en humanos; un estudio indica que en el humor acuoso de afectos de RP se produce una reducción significativa en la relación entre especies reducidas y oxidadas de glutatión (GSH / GSSG), un importante antioxidante endógeno. También observaron un aumento significativo en el contenido de carbonilo. Dichos signos no se manifiestan en el suero, lo que indican que en RP se produce estrés oxidativo y daño ocular, pero no hay manifestaciones de estrés oxidativo ni daño a nivel sistémico. Esto lleva a los autores a concluir que, también en ése caso, se podría producir muerte celular por daño oxidativo, y a proponer que la aplicación de antioxidantes podría por tanto promover la supervivencia de conos en pacientes con RP; además, sugieren que las proporciones de GSH/GSSG y carbonilo en el humor acuoso podrían ser usadas como biomarcadores del daño oxidativo. (Campochiaro et al., 2015)

Las alteraciones del equilibrio del GSH que conlleva un aumento de estrés oxidativo han sido observadas tanto in vitro como in vivo. (Miranda, Alvarez-Nölting, Araiz, & Romero Gómez, 2010) El proceso de muerte se desarrolla por diferentes caminos (con mediación de caspasas o sin ella) pero siempre conducen a la apoptosis (Lohr, Kuntchithapautham, Sharma, & Rohrer, 2006). En este contexto, las terapias basadas

en antioxidantes de diversos tipos podrían tener efectos neuroprotectores de amplio espectro, con independencia de si el origen del desequilibrio inicial es de origen genético o ambiental.

Entre los ejemplos de sustancias que se están investigando está la melatonina. Esta hormona se ha empleado desde hace algún tiempo en modelos animales de retinopatía diabética por sus propiedades antioxidantes y también porque parece ejercer un efecto atenuante en la inflamación en la retina por efectos de señalización mediados por receptores. (Sanvicens, Gómez-Vicente, Masip, Messeguer, & Cotter, 2004) Otro estudio, también con un modelo animal de retinopatía diabética encontró efectos protectores antiinflamatorios y antioxidantes de la melatonina en la retina ya que la producción de citoquinas y proteínas proinflamatorias incluyendo interleuquina 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , y la oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) fue inhibida por la melatonina a través del factor nuclear NF- $\kappa$ B. (Jiang et al., 2016)

También se ha implicado al estrés oxidativo en otros procesos. (Schiavone, Jaquet, Trabace, & Krause, 2012) Algunos autores afirman que el estrés oxidativo es una de las causas más importantes de las lesiones endoteliales y de los fenómenos de senescencia cardiovascular. Este mecanismo se implica también en los efectos adversos producidos por los glucocorticoides, ya que la dexametasona induce una hiperproducción de ROS, disregulando los procesos fisiológicos. Tanto en humanos como en animales con hipertensión arterial inducida por corticoides se observan niveles bajos de oxido nítrico, y pacientes a los que se les administran exceso de glucocorticoides, pueden sufrir también depresiones a consecuencia de niveles bajos de serotonina y melatonina. (Bjelaković et al., 2007) Además, es de sobra conocida la implicación de la melatonina en la sincronización de los ritmos circadianos, y no solo en el del sueño-vigilia sino también en otros.

#### **4.7. Determinaciones bioquímicas en saliva**

A continuación se describen las principales características de la saliva y se resumen algunos estudios acerca del cortisol, de la inmunoglobulina A secretora y de la fracción soluble del receptor 2 del TNF $\alpha$ , y su aplicación como biomarcadores de estrés en saliva.

##### **4.7.1. La saliva**

La saliva está producida por las glándulas salivares y se estima que se producen entre 1 y 1.5 litros de saliva al día. Esta cantidad se mantiene básicamente constante con la edad, si bien se producen cambios en la composición de la saliva. (Vissink, Spijkervet, & van Nieuw Amerongen, 1997)

Dicha composición se caracteriza por una concentración masiva de agua (99,5%) siendo el resto moléculas orgánicas grandes (proteínas, glicoproteínas y lípidos), moléculas orgánicas pequeñas (glucosa, urea) y electrolitos. (Humphrey & Williamson, 2001)

La producción de saliva está relacionada con el ritmo circadiano, de tal manera que por la noche se segrega una menor cantidad que durante el día. (Gómez de Ferraris & Campos Muñoz, 2009)

Las glándulas parótidas y las submaxilares están ubicadas por fuera de la cavidad oral, y producen entre el 80% y el 90% de la saliva total en condiciones estimuladas.

Las glándulas sublinguales ubicadas en el tejido conectivo de la cavidad oral producen solo el 5% del total de saliva. (Gómez de Ferraris & Campos Muñoz, 2009)

Las glándulas salivares menores se encuentran distribuidas en la mucosa de los diferentes órganos de la cavidad bucal y son labiales, genianas, palatinas y linguales. Aunque son responsables de una cantidad de saliva relativamente pequeña (del 5% al 10% del total) son las que mantiene la lubricación y humedad de la boca por su producción continua y se encargan de la secreción en reposo. (Gómez de Ferraris & Campos Muñoz, 2009)

#### **4.7.2. Cortisol**

El cortisol es una hormona esteroidea importante en la regulación del metabolismo y el estrés a través del eje HHA. (Hellhammer et al., 2009; Kirschbaum & Hellhammer, 1994) Es el principal glucocorticoide producido en la corteza suprarrenal, (Carrasco & Van de Kar, 2003) circula por la sangre y se difunde en la saliva. (Baum, 1993)

La producción de cortisol sigue un ritmo circadiano (Dorn et al., 2007), alcanzando los niveles más altos por la mañana temprano y cayendo a los valores más bajos en la noche. (Hucklebridge, Hussain, Evans, & Clow, 2005) Independientemente del ritmo circadiano los niveles se elevan en respuesta al estrés. (Miller, Chen, & Zhou, 2007)

En la sangre, sólo un 5-10% del cortisol se encuentra en forma libre, es decir, no unido a las proteínas séricas. La forma libre es la biológicamente activa. (C.-J. Törnbage & Tournhage, 2009) En la saliva la mayoría del cortisol permanece en forma libre, sin enlace a las proteínas. Existe una alta relación entre los niveles de cortisol en saliva y en sangre. (Aardal & Holm, 1995)

Los niveles salivares de cortisol no se ven afectados por la tasa de flujo salival y son relativamente resistentes a la degradación por enzimas o por los ciclos de congelación. (Garde & Hansen, 2005; Vining & McGinley, 1987)

Por el contrario, se sabe que existen distintos factores que influyen en la concentración del cortisol en la saliva:

- La hora del día: si el ritmo es normal, la concentración es mayor en la mañana y disminuye gradualmente. (C. J. Törnbage, 2002; Tzortzi et al., 2009).
- La edad: los niños tienen niveles de cortisol mayores que los adultos. Entre los propios niños también hay diferencias. (C. J. Törnbage, 2002). La explicación a este fenómeno estaría en la influencia de la interacción con otros esteroides endógenos, que tiene lugar en la pubertad. En las niñas influye la menarquía.

- El sexo: un estudio realizado en adultos no encontró relación entre los niveles de cortisol salivar y el sexo. (Kanegane, Penha, Munhoz, & Rocha, 2009)
- Actividad física: Tornhage asegura que la actividad física y psicológica actúan entre sí e influyen en la concentración de cortisol salival. (C.-J. Törnbage & Tournhage, 2009). Mientras que algunos estudios encuentran una correlación entre ejercicio y los niveles de cortisol en saliva, (Alghadir, Gabr, & Aly, 2015) otros no muestran que esa correlación sea significativa. (Ben-Aryeh et al., 1989)

Los niveles de cortisol en saliva se han considerado como un marcador de estrés y ansiedad. Aunque existe un estudio que no encuentra ninguna asociación (Kanegane et al., 2009), otros, más recientes, refieren que la ansiedad y el estrés aumentan los niveles de cortisol. (Andrews et al., 2007; Heaney, Phillips, & Carroll, 2010; Scholey et al., 2009; C.-J. Törnbage & Tournhage, 2009) Wadiwalla puntualiza que puede haber diferencias de sexo en la percepción de ansiedad ante una situación dada, que se manifieste tanto en pruebas subjetivas como en los niveles de cortisol. (Wadiwalla et al., 2010)

Así, las medidas de cortisol parece que reflejan el estrés agudo. (Russell, Koren, Rieder, & Van Uum, 2012) El estudio del estrés crónico y su relación con el cortisol, es mas complejo y requiere medidas en saliva durante periodos extensos; un estudio reciente indica que el número de muestras necesarias en días separados para caracterizar las variabilidad interindividual en las medidas de cortisol salivar es de tres, datos suficientes para establecer un promedio de forma totalmente fiable; (Segerstrom, Boggero, Smith, & Sephton, 2014). Actualmente, empieza a ser mas frecuente la medida de la concentración del cortisol en el cabello como biomarcador para el estudio del estrés crónico, ya que permite una evaluación de forma retrospectiva del nivel de cortisol acumulado en periodos más largos. (Wright, Hickman, & Laudenslager, 2015) y podría ser por tanto un método complementario a las medidas de cortisol en saliva. Estudios recientes han comparado ambos métodos y, en ocasiones, han encontrado discrepancias, que sería útil abordar en detalle. (Iglesias et al., 2015)

#### **4.7.3. Inmunoglobulina A secretora**

En una revisión de los trabajos publicados hasta 1999, Tsujita et al encuentran dos tipos de comportamiento del sIgA, un incremento inmediatamente después de que tenga lugar la respuesta al estrés, y otro unos días más tarde; los autores concluyen que si dichos componentes se tienen en cuenta por separado, la sIgA podría considerarse como un marcador fiable de estrés. (Tsujita & Morimoto, 1999)

#### **4.7.4. Fracción soluble del receptor 2 del TNF $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral (TNF) es un grupo de citoquinas que están consideradas como modificadores de la inflamación y de las respuestas inmunológicas producidas por una herida, por una infección o por enfermedades autoinmunes. Se han identificado dos receptores diferentes para los TNF, el RI o tipo  $\beta$  (también denominado p60) y el RII o tipo  $\alpha$  (denominado p80).

La reacción de estrés agudo produce una inhibición de citoquinas proinflamatorias entre las que se incluye el TNF- $\alpha$  (Connor et al., 2005), Se ha observado también una relación entre el TNF- $\alpha$  en saliva y la respuesta fisiológica al dolor.(Goodin et al., 2012)

Por su papel en la inflamación crónica, las estrategias anti-TNF tienen además un interés terapéutico. (Holtmann, Schuchmann, Zeller, Galle, & Neurath, 2002). Un estudio utilizó Adalimumab, un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , en el ratón rd10, un modelo animal de RP autosómica dominante, encontrando una ralentización de la pérdida de fotorreceptores, un restablecimiento de la capacidad antioxidante total, una reducción de la gliosis reactiva, y produciendo una normalización del patrón metabólico en la retina, sugiriendo que el bloquear el TNF- $\alpha$  podría ser un camino efectivo hacia una terapia paliativa para la RP. (Martínez-Fernández de la Cámara et al., 2015)

## 5. METODOLOGÍA

El trabajo se ha realizado en tres etapas:

1. Se han establecido dos subtemas, DHR y biomarcadores en saliva, en los que se ha realizado el análisis bibliométrico focalizado en las medidas de estrés crónico y efectos del mismo. Se han formado cuatro grupos; el grupo 1, con los trabajos que se han encontrado publicados sobre las distrofias de retina, y más concretamente en RP, enfermedad de Stargardt y CRDs; el grupo 2, acerca de los biomarcadores en saliva que serán objeto del posterior estudio clínico: el cortisol, la sIgA y el TNF- $\alpha$ ; el grupo 3 de desambiguación entre estrés como respuesta del eje HHA y estrés oxidativo; y, por último, el grupo 4, en el que se relacionan los términos correspondientes tanto a DHR como a biomarcadores y estrés, La selección de las palabras clave (en inglés) está orientada a limitar la ambigüedad de las búsquedas en PubMed. Esto conlleva también añadir búsquedas con términos que, sin estar directamente relacionados con las búsquedas acerca de biomarcadores y estrés crónico, permitan poner los resultados en contexto. Por ejemplo, al estimar el número de publicaciones totales sobre una patología, y de distinguir por ejemplo artículos sobre la enfermedad de Stargardt (incluyendo la palabra clave “photoreceptor”) de otras referencias en las que aparezca el nombre “Stargardt”.

2. Se ha realizado una evaluación del número de trabajos totales y por año en el periodo 2007-2017 y en cada uno de los dos subtemas. Los números de publicaciones son los correspondientes a datos de PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). La última puesta al día de los datos se ha realizado el 30 de Octubre de 2017.

3. Los valores numéricos anuales normalizados de trabajos acerca de biomarcadores en saliva se han comparado para determinar las tendencias.

## 6. RESULTADOS

Las palabras clave y búsquedas en las tablas han sido elegidas para que, a partir de los resultados, sea posible deducir simultáneamente y con la menor ambigüedad posible las tendencias generales. Las búsquedas se han agrupado en tablas separadas para facilitar el análisis.

### **6.1. Grupo 1: estudios sobre distrofias de retina y estrés crónico**

La Tabla 1 muestra los resultados de las búsquedas de artículos sobre las distrofias retinianas seleccionadas y las palabras clave tales como “respuesta al estrés” y al “estrés crónico”.

Los resultados de las búsquedas son básicamente nulos. La Tabla 1 muestra que entre la multitud de trabajos dedicados a la RP y, en menor medida, a la enfermedad de Stargardt y las distrofias de conos o conos y bastones, no parece haber una referencia directa a términos relacionados con el estrés. El número de artículos que contiene la palabra “stress” (estrés) es numeroso, pero un análisis de desambiguación indica que los resultados se refieren a menudo al estrés oxidativo que provoca daños celulares en

la retina, o a otros tipos de factores de estrés a nivel molecular o celular, que son completamente distintos al estrés como respuesta del eje HHA.

Para poner los resultados en perspectiva, la tabla muestra también el número total de referencias a cada una de las patologías. Se intenta estimar el número de trabajos en los que aparece una referencia directa y que tratan acerca de cada una de ellas; para ello se puede comparar la búsqueda de los términos “Retinitis Pigmentosa”. “Stargardt” y “Cone-rod dystrophy” que resulta en n=9.340, n=834 y n=508 trabajos en PubMed, respectivamente. Si la búsqueda incluye además el término “photoreceptor” (n=2.183, n=218, n=248, respectivamente), es más probable que los artículos traten de las patologías en detalle y no sólo mencionen su nombre (por ejemplo en una lista de enfermedades genéticas).

**Tabla 1 Distrofias retinianas y estrés**

	<b>Palabras clave</b>	<b>n</b>	<b>Comentarios</b>
1	retinitis AND pigmentosa	9.345	
2	retinitis AND pigmentosa AND photoreceptor	2.184	Incluyen descripción de la patología: ref. a fotorreceptor
3	retinitis pigmentosa AND chronic AND stress AND saliva	0	
4	retinitis pigmentosa AND chronic AND stress AND salivary	0	
5	retinitis pigmentosa AND chronic AND stress	15	No especifico a estrés crónico
6	retinitis pigmentosa AND stress AND response	71	En general, sobre estrés oxidativo (desambiguación)
7	retinitis pigmentosa AND stress	261	
8	Stargardt	836	
9	Stargardt AND photorreceptor	218	Incluyen descripción de la patología: ref. a fotorreceptor
10	Stargardt AND chronic AND stress AND saliva	0	
11	Stargardt AND stress AND saliva	0	
12	Stargardt AND chronic AND stress	2	estrés en retina
13	Stargardt AND stress AND response	4	estrés en retina (ej. exposición a luz intensa)

	Palabras clave	n	Comentarios
14	Stargardt AND stress	20	
15	Cone-rod dystrophy	508	Incluyendo "CRD": n=96
16	Cone-rod dystrophy AND photoreceptor	248	Con "CRD": n=48
17	Cone-rod dystrophy AND chronic AND stress AND saliva	0	
18	Cone-rod dystrophy AND stress AND saliva	0	
19	Cone-rod dystrophy AND chronic AND stress	0	
20	Cone-rod dystrophy AND stress AND response	2	No relacionados con estrés crónico
21	Cone-rod dystrophy AND stress	8	No relacionados con estrés crónico

La Figura 2 muestra algunos de estos resultados, año por año.

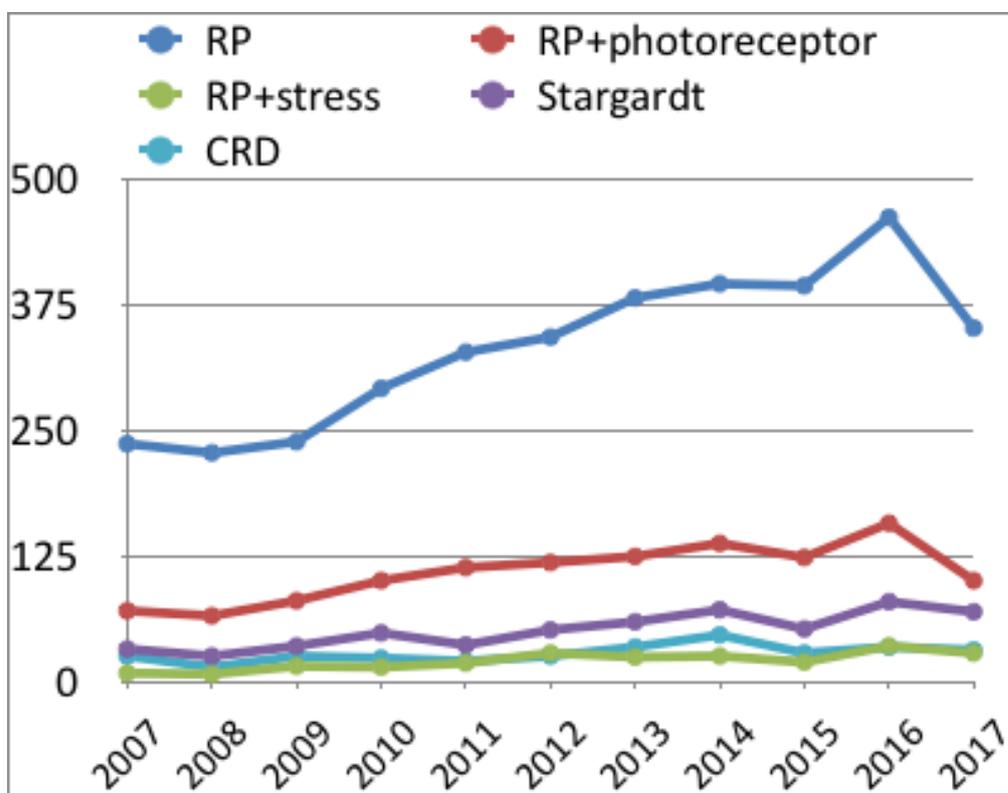


Figura 2 Resultados de búsquedas referentes (número de ellas encontradas en abscisas) a las distrofias de retina año por año. El valor del año 2017 corresponde al del 30/10/17. RP: Retinitis Pigmentosa, CRD: Cone Rod Dystrophy

La Tabla 2 muestra los números de trabajos relativos a otras patologías como la ansiedad, depresión, pérdida de memoria, enfermedades neurodegenerativas y la relación con el estrés crónico.

**Tabla 2 Patologías relacionadas con el SNC, y estrés crónico**

	<b>Palabras clave</b>	<b>n</b>	<b>Referencia / ejemplo</b>
1	anxiety AND chronic AND stress	5.141	(de Kloet et al., 2005)
2	depression AND chronic AND stress	8.261	(Gold, 2015; Krishnan & Nestler, 2008)
3	neurodegenerative AND chronic AND stress	1.390	(Vyas et al., 2016)
4	memory loss AND chronic AND stress	1.032	(Finsterwald & Alberini, 2014)

## **6.2. Grupo 2: biomarcadores, saliva y estrés crónico**

Con la misma metodología que en el caso del grupo 1, en este grupo 2 se obtienen resultados de búsquedas de palabras clave que ayudan a establecer la importancia numérica de los trabajos en PubMed en este subtema del uso de biomarcadores en saliva para la caracterización del estrés crónico. La

Tabla 3 muestra los resultados de búsquedas que incluyen los biomarcadores seleccionados, es decir cortisol, sIgA y TNF- $\alpha$ , con los términos como “saliva” y “stress”.

Como era de esperar, por su papel en la respuesta del eje HHA, existe un gran número de artículos que incluyen las palabras clave “cortisol” y “stress”. Si las búsquedas incluyen “saliva” el resultado es un número importante de publicaciones (tabla 3.2, n=3.562). También junto al término “chronic” el número de artículos es elevado (tabla 3.3, n=2.268). Si se incluye tanto la palabra clave “chronic” como “saliva”, junto con “cortisol” y “stress”, se obtienen n=486 artículos en PubMed potencialmente relacionados con el uso de cortisol como biomarcador de estrés en saliva.

En el caso de la sIgA los números de publicaciones son más bajos al incluir los términos “chronic” y “stress” (n=25).

Cuando se introducen términos que apunten a una relación entre los compuestos estudiados, el estrés, y la retina, el número de artículos se reduce. Por ejemplo, la búsqueda “cortisol” AND “stress” AND “retina” resulta tan solo en 12 artículos (

Tabla 3.7).

Tabla 3 Biomarcadores

	Palabras clave	n	Comentarios
1	Cortisol	92.021	
2	cortisol AND stress AND saliva	3.563	
3	cortisol AND chronic AND stress	2.268	
4	cortisol AND chronic AND stress AND saliva	486	
5	cortisol AND retina	201	
6	cortisol AND stress AND retina	12	No relacionados con el estrés crónico
7	slgA	6.982	
8	slgA AND chronic AND stress	25	Temáticas en parte relevantes at estudio
9	slgA AND stress AND retina	0	
10	slgA AND retina	1	
11	TNF $\alpha$	148.897	
12	TNF $\alpha$ AND chronic AND stress	1.568	
13	TNF $\alpha$ AND cortisol AND retina	0	
14	TNF $\alpha$ AND glucocorticoid AND retina	6	

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** compara la tendencia en el número de publicaciones acerca de cortisol, saliva y estrés con los de otra medida no

invasiva de cortisol, las basadas en muestras de cabello como marcador de estrés crónico.

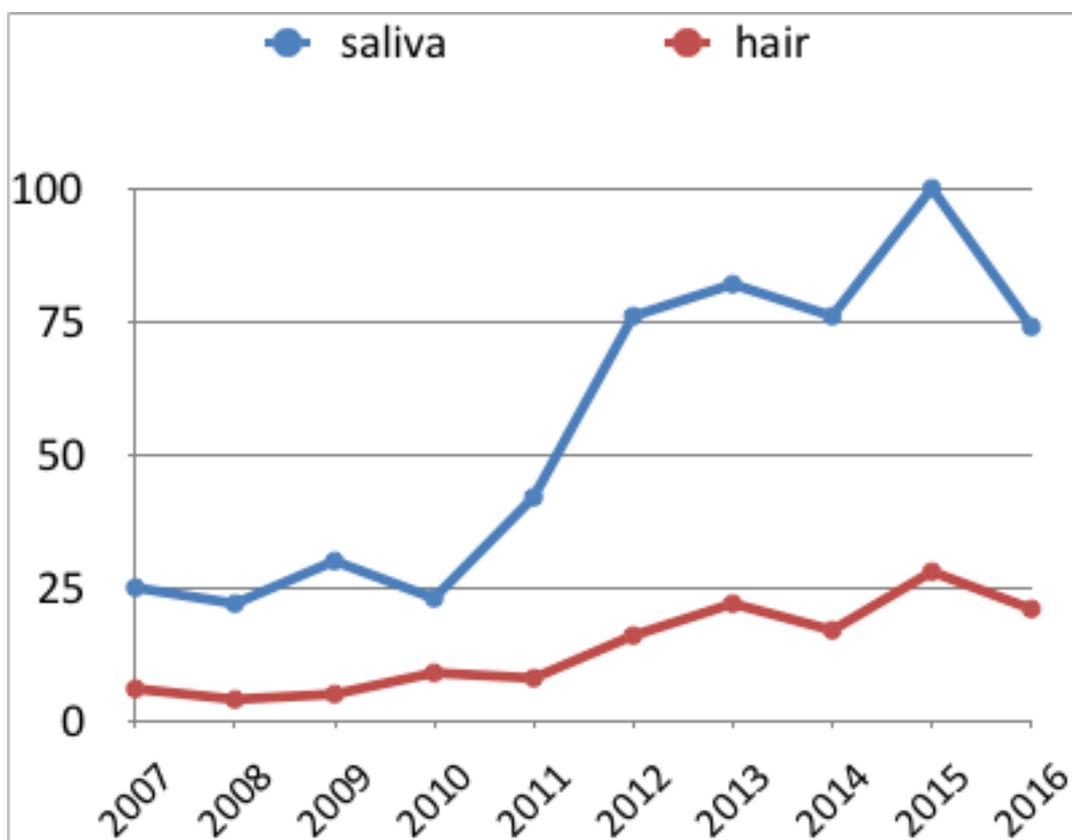


Figura 3 Número de artículos por año que incluye los términos “biomarkers” y “stress” además de “saliva” o “hair”.

### 6.3. Grupo 3: desambiguación con estrés oxidativo

Este apartado trata de las referencias al estrés oxidativo que como ya se ha comentado es un fenómeno distinto del estrés crónico. Sin embargo, artículos tratando uno u otro incluirán la misma palabra clave “stress”; por tanto, es útil analizar los resultados que incluyan también la palabra “oxidative” para entender mejor hasta que punto las referencias a las palabras clave corresponden a uno u otro tema.

Este análisis también permite explorar la existencia de artículos que se refieran a estrés oxidativo y glucocorticoides (GC) como el cortisol. Algunos autores apuntan a una relación no puramente circunstancial entre las disfunciones de la respuesta de estrés y el estrés oxidativo. (Bjelaković et al., 2007; Schiavone et al., 2012)

La búsqueda “oxidative AND stress AND glucocorticoid” arroja un número relativamente elevado de publicaciones (n=1.101), que se reduce a menos de la mitad si se sustituye el término “glucocorticoid” por el más específico “cortisol” (n=475). Con “oxidative AND stress AND glucocorticoid AND retina” el número de artículos se queda en n=19. No se encuentra en PubMed ningún artículo que incluya los términos

“oxidative AND stress AND cortisol AND retina”. Las búsquedas que incluyen los nombres de las distrofias de retina están recogidas en las tres últimas filas.

Tabla 4 Estrés oxidativo y GC

	Palabras clave	n	Comentarios
1	oxidative AND stress AND glucocorticoid	1.101	En general, no relevantes
2	oxidative AND stress AND cortisol	475	En general, no relevantes
3	oxidative AND stress AND glucocorticoid AND retina	19	Relativos a bioquímica de retina, no a estrés crónico
4	oxidative AND stress AND cortisol AND retina	0	No hay artículos en PubMed
5	retinitis pigmentosa AND oxidative AND stress	120	En general, no relativos a estrés crónico
6	Stargardt AND oxidative AND stress	10	No relativos a estrés crónico
7	cone-rod dystrophy AND CRD AND oxidative AND stress	0	No hay artículos en PubMed

#### 6.4. Grupo 4: distrofias, biomarcadores y estrés

Como verificación añadida, se realizaron búsquedas adicionales recogidas en la tabla 5, con búsquedas con resultado nulo o escaso al incluir todas las palabras clave.

Tabla 5 Patologías retinianas y biomarcadores de estrés

	Palabras clave	n	Comentarios
1	cortisol AND retinitis pigmentosa AND stress	0	No hay artículos
2	cortisol AND retinitis pigmentosa	6	No relativos a estrés crónico
3	cortisol AND Stargardt AND stress	0	No hay artículos
4	cortisol AND Stargardt	0	No hay artículos
5	cortisol AND Cone-rod dystrophy AND stress	0	No hay artículos
6	cortisol AND Cone-rod dystrophy AND CRD	0	No hay artículos

En la tabla 4 las palabras clave incluyen las patologías retinianas (por ejemplo “retinitis pigmentosa”) y los biomarcadores de estrés; en este ejemplo, el cortisol. No hay resultados cuando los términos se relacionan también con la palabra clave “stress”.

### 6.5. *Análisis de publicaciones de biomarcadores en saliva por año*

Para estudiar las tendencias, la

Tabla 6 muestra el número de artículos por año y los valores normalizados, en búsquedas relativas a los biomarcadores.

Tabla 6. Comparación entre los resultados Grupo 1 y Grupo 2 por año

i	Cortisol AND saliva AND biomarker		IgA AND saliva AND biomarker		TNF $\alpha$ AND saliva AND biomarker	
	$n_i$	$n_i/\sum n_i$	$n_i$	$n_i/\sum n_i$	$n_i$	$n_i/\sum n_i$
2017	57	0,10	14	0,11	7	0,10
2016	65	0,11	14	0,11	11	0,10
2015	92	0,15	18	0,14	8	0,13
2014	77	0,13	14	0,11	7	0,10
2013	76	0,13	17	0,13	7	0,13
2012	76	0,13	21	0,16	12	0,15
2011	48	0,08	8	0,06	5	0,06
2010	31	0,05	7	0,05	6	0,05
2009	30	0,05	9	0,07	1	0,07
2008	17	0,03	5	0,04	4	0,04
2007	29	0,05	5	0,04	5	0,04
$\sum n_i$	598	1,00	132	1,00	73	0,03

Las gráficas de la Figura 4 y Figura 5 muestran los mismos resultados, en valores absolutos y como porcentaje del total de artículos en el periodo 2007-2017.

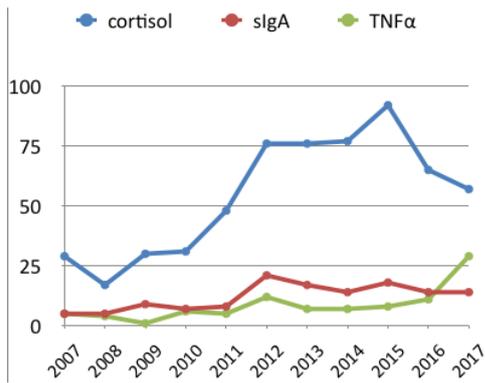


Figura 4 Biomarkers + saliva + (cortisol, IgA, TNFα) número de artículos 2007-2017

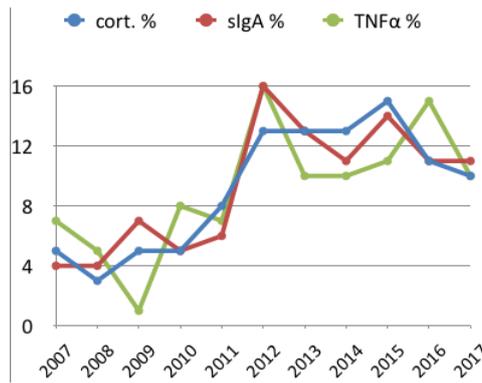


Figura 5 Biomarkers + saliva + (cortisol, IgA, TNFα) % de artículos sobre el total del periodo 2007-2017

## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados parecen indicar que los trabajos indexados en PubMed no relacionan directamente las patologías retinianas con el estrés crónico. Las búsquedas que incluyen el término “estrés” (en inglés, “stress”) y otras palabras clave que están vinculadas a la retina o a las tres distrofias que son objeto de este estudio bibliográfico en su gran mayoría tienen que ver con procesos bioquímicos como el estrés oxidativo, que, como ya se ha mencionado, es algo completamente diferente de la respuesta de estrés.

Este resultado es hasta cierto punto sorprendente, cuando los análisis bibliométricos también indican con claridad que existe un gran número de artículos que relaciona el estrés crónico con efectos en el SNC y en la patogénesis de muchas enfermedades.

Por ejemplo, la Tabla 2 muestra los números de trabajos relativos a otras patologías como la ansiedad, depresión, pérdida de memoria, enfermedades neurodegenerativas y la relación con el estrés crónico; en todos estos casos las búsquedas arrojan un número elevado de publicaciones. Como muestran los ejemplos de referencias en la misma tabla, la investigación acerca de los efectos del estrés en estas patologías parece estar comprobada.

Aunque la relación entre estrés crónico y la evolución de la capacidad visual no esté establecida y se base en evidencia circunstancial como testimonios de pacientes, y no en resultados clínicos, la ausencia de trabajos en este campo resulta llamativa.

En el caso del grupo 2 (biomarcadores y estrés), se puede deducir lo contrario al caso del grupo 1: es evidente que existe un gran número de trabajos que incluyen las palabras clave, también cuando la referencia al estrés fisiológico (como respuesta del eje HHA) y el estrés crónico es explícita. El análisis de los resultados numéricos es corroborado por un examen más detenido de los temas tratados por los artículos.

Hay una gran cantidad de trabajos acerca del TNF-α, que puede explicarse por la importancia de esta citoquina proinflamatoria como mediador y posible diana terapéutica en muchas enfermedades degenerativas, incluyendo algunas de la retina

(Martínez-Fernández de la Cámara et al., 2015) y que no están relacionados con su posible uso como biomarcador en saliva. Aun así, hay un gran número de trabajos en los que se trata el uso tanto del cortisol para estudiar el estrés crónico y sus efectos, como el del TNF- $\alpha$  para evaluar la inflamación crónica. Aunque el número es menor, también hay numerosos estudios que utilizan el sIgA como biomarcador de estrés en saliva, por el efecto de la respuesta de estrés sobre el sistema inmunológico.

Los resultados del grupo 3 indican que muchas de las búsquedas que contienen la palabra “estrés” y palabras clave relacionadas con las distrofias de retina dan resultados que no son directamente relevantes al estudio sobre el estrés crónico, y subrayan la importancia de tratar los resultados con cautela.

Por último, los resultados del grupo 4 corroboran que no existen artículos en PubMed que relacionen las medidas de biomarcadores de estrés en saliva y las distrofias de retina que han sido el objeto de este estudio. No obstante, existen algunos trabajos que, en los últimos años, han iniciado el empleo de medidas de cortisol en saliva en el caso de enfermos de RP. (Ava K. Bittner et al., 2011; Wheaton et al., 2012).

Por tanto, la aplicación a la evaluación del estrés por medio de biomarcadores en saliva en distrofias de retina puede considerarse un tema novedoso y probablemente su desarrollo permitiría progresar hacia la evaluación del impacto del estrés crónico en la evolución de la capacidad visual de los enfermos con distrofias de la retina.

Los trabajos anteriormente citados emplearon sólo el cortisol en saliva como biomarcador y no incluyeron una evaluación de su variabilidad inter-sesión e interindividual lo que resulta necesario para garantizar la fiabilidad de los estudios. La incorporación de medidas relacionadas con la respuesta inmunológica (sIgA) e inflamatoria (TNF- $\alpha$ ) pueden servir para contrastar los resultados obtenidos con estos biomarcadores en sujetos normales ( Sobas et al, 2016) y la determinación del cortisol podría permitir establecer relaciones con fármacos, como los anti-TNF- $\alpha$  que, como se mencionó anteriormente, han demostrado tener un cierto interés como posibles nuevas terapias orientadas a reducir la inflamación crónica de la retina que se manifiesta en la RP. No obstante estos trabajos realizados sobre modelos experimentales, deben ser confirmados mediante ensayos clínicos.

Por tanto, un paso necesario para la utilización fiable de los biomarcadores en saliva es la caracterización de la repetitividad de las medidas, que es el objeto del estudio clínico cuya metodología se describe en el Anexo A, y que incluiría una evaluación subjetiva de estado de ansiedad y somnolencia, que se describe en el Anexo B. Dicho estudio clínico ha sido aprobado por la Comisión de Investigación del IOBA y por el CEIC del Hospital Clínico Universitario de Valladolid en junio de 2017 y se espera iniciarlo de forma inmediata.

## Anexo A. Diseño del estudio clínico

Los resultados de este estudio bibliométrico, junto con los de otros trabajos previos, (Sobas et al, 2016) sirven como base a la propuesta de un protocolo para un estudio clínico para evaluar los biomarcadores en saliva y su uso como indicadores fiables del estrés en pacientes de RP, una de las distrofias hereditarias de retina con mayor prevalencia y más estudiadas. El estudio supondría un paso más en el desarrollo de medidas objetivas para investigar la posible influencia del estrés en las variaciones de la capacidad visual.

Como parte del trabajo de máster, el protocolo completo ha sido sometido a la aprobación de la Comisión de Investigación del IOBA y a la del CEIC del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. La aprobación del estudio se hizo efectiva en junio de 2017. En Octubre de 2017 se ha firmado un acuerdo para la realización del estudio entre la Asociación de Castilla-León de Afectados por Retinosis Pigmentaria (ACLARP) y el IOBA.

### A.1. Resumen del estudio clínico

Se trata de un estudio clínico observacional con grupo control, orientado a medir la variabilidad de los biomarcadores en saliva en el caso de pacientes con RP de ambos sexos con edades comprendidas entre los 20 y 60 años. Las pruebas que se realizarán a los voluntarios son de dos tipos, objetivas y subjetivas. Por un lado, a cada sujeto se le tomará dos muestras de saliva en un intervalo de tiempo que va de un día a una semana entre toma y toma, siempre a primera hora de la mañana. Por otro, se realizará una evaluación del estado de ánimo del paciente utilizando un cuestionario estándar a tal efecto, incluyendo las pruebas ESS y STAI (ver anexo B) ya utilizadas en un estudio clínico reciente (Pinilla, 2012). Además, se llevarán a cabo pruebas oftalmológicas para evaluar el grado de afectación de la RP, en particular agudeza visual, campimetría y OCT (tomografía óptica de coherencia). La obtención de las muestras consistirá en la recogida de saliva durante cinco minutos en unos tubos específicos mediante la técnica pasiva denominada de babeo. En total, incluyendo el cuestionario, la prueba durará unas tres horas el primer día y dos horas el segundo. La prueba será realizada por personal especializado. Las muestras serán almacenadas y posteriormente analizadas para obtener las concentraciones de biomarcadores, datos que serán después objeto de un análisis estadístico que determine la variabilidad inter-sesión e interindividual. Los datos individuales serán comparados con los resultados de las pruebas subjetivas en un análisis separado.

Tabla 7 Ejemplo de cronograma correspondiente a las pruebas

Hora	Dia 1	Dia 2
08:30	Inicio	Inicio
08:45	Encuesta ESS	Encuesta ESS
09:00	Toma saliva	Toma saliva
09:15	Fin toma saliva	Fin toma saliva
09:30	Encuesta STAI	Encuesta STAI
10:00	Medida AV	Fin
10:30	Campimetria	
11:15	Medida OCT	
11:30	Fin	

## **A.2. Objetivos del estudio**

Los objetivos del estudio clínico propuesto serán:

1. Analizar la variabilidad interindividual y repetitividad inter-sesión de biomarcadores de estrés en sujetos normales y en pacientes con RP.
2. Analizar la correlación entre el estrés, la fatiga, la ansiedad, y las variaciones de las concentraciones de estos parámetros a través de determinadas escalas subjetivas.
3. Relacionar las concentraciones de biomarcadores con el grado de evolución de la RP, estimado mediante la escala propuesta por el Moorfields Eye Hospital (2013).

## **A.3. Población de referencia**

A efectos del análisis estadístico y la estimación del tamaño de la muestra, la población de referencia está compuesta por pacientes con RP e individuos sanos de edades de entre 20 y 60 años.

## **A.4. Método de estimación de los límites de referencia**

Asumiendo que la distribución de cada uno de estos marcadores es normal, el intervalo de referencia se estima utilizando el intervalo inter-fractílico, cuya expresión es:

$$\bar{X} \pm kS_X$$

donde  $\bar{X}$  representa la media muestral,  $S_X$  la desviación estándar y  $k$  es el valor de la distribución normal para el nivel de probabilidad fijado, generalmente  $\alpha = 0.05$ .

Los límites así estimados, se corresponden con los fractiles 0.025 y 0.975.

Para cada fractil, es necesario calcular un intervalo de confianza (90%). Fijando un nivel del 90%, se calcula este IC utilizando la expresión,

$$fractil \pm 2.81 \frac{S_X}{\sqrt{n}},$$

donde  $n$  es el tamaño de la muestra.

## **A.5. Estimación del tamaño muestral**

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

### **A.6. Sujetos del estudio**

Los sujetos del estudio serán pacientes afectos de RP y voluntarios sanos que acepten participar en el estudio tras un consentimiento informado.

La severidad de la enfermedad de los pacientes será evaluada de acuerdo con la escala propuesta por Smith et al. en 2013.(Smith, Chandra, & Zambarakji, 2013)

El protocolo completo ha sido aprobado por la Comisión de Investigación del IOBA y por el CEIC del Hospital Clínico Universitario de Valladolid en junio de 2017.

Todos los pacientes firmarán el consentimiento informado previamente a su inclusión en el estudio y serán tratados según las normas de la declaración de Helsinki.

### **A.7. Criterios de inclusión**

- Pacientes con RP e individuos sanos (grupo control) que acepten participar en el estudio tras haber sido informados.
- Sujetos de raza blanca de ambos sexos con edad comprendida entre 20 y 60 años.

### **A.8. Criterios de exclusión**

En una primera entrevista de evaluación preliminar (presencial o por teléfono), el personal sanitario cualificado que dé apoyo al estudio preguntará al sujeto participante si reúne algunas de las siguientes circunstancias y/o condiciones:

- Historial de trastornos psiquiátricos.
- Presencia de una enfermedad autoinmune.
- Mujeres embarazadas o en período de lactancia.
- Mujeres en tratamiento hormonal, incluyendo anticonceptivos.
- Consumo habitual de fármacos psicotrópicos (antipsicóticos, benzodiazepinas, fármacos anticonvulsivos o antidepresivos) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y analgésicos.

En caso de respuesta afirmativa en cualquiera de estos puntos, el sujeto será excluido del estudio.

### **A.9. Procedimiento de medida**

En este estudio la medición del estrés se realizará de dos formas:

- A. Valoración subjetiva de estrés, fatiga, ansiedad y grado de vigilia por parte del paciente a través de la escala de calificación numérica.
- B. Valoración objetiva mediante las determinaciones de las concentraciones de cortisol, IgA secretora y el TNF $\alpha$ .

### **A.10. Valoración subjetiva**

Se presentarán las escalas subjetivas a los pacientes en los siguientes momentos: 30 minutos antes de la evaluación oftalmológica, si la hubiera, y en la mañana de los días siguientes hasta la siguiente visita, que se realizará en un periodo máximo de seis días y un mínimo de 24h después de la primera sesión. La primera vez, el cuestionario será realizado con la ayuda del personal de enfermería, el resto serán cumplimentada por los mismos pacientes. En la mañana del día en el que acudan de nuevo a la consulta, el personal de enfermería les propondrá de nuevo estas escalas.

El primer y el último día, en la clínica, el personal de enfermería le explicará al paciente los significados de los extremos. Previo a la anotación del dato, el paciente será nuevamente preguntado para evitar un error en la comunicación.

### **A.11. Valoración objetiva**

Se valorará el flujo salivar de todos los pacientes incluidos en el estudio.

La recolección de saliva se realizará usando la secreción pasiva, es decir “por babeo”.(Navazesh, 1993)

La muestra se recogerá a primera hora (9:00-10:00 AM), 30 minutos antes de la revisión oftalmológica del paciente, si la hubiera, y entre 24h y una semana después, a la misma hora que el primer día. La toma se realizará en una habitación en la que la temperatura y la humedad permanezcan estables entre toma y toma; los valores de ambos parámetros se registrarán.

### **A.12. Técnica y recomendaciones para la recogida de saliva**

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

- El paciente no debe comer, beber (excepto agua), usar goma de mascar o lavarse los dientes al menos una hora antes de la recogida de la muestra.
- El consumo de cafeína se debe evitar una hora antes de la extracción.
- El ejercicio se debe evitar una hora antes de la participación en el estudio.
- Justo antes de la toma de saliva, se realizará un enjuague con agua limpia durante 5 minutos para evitar la contaminación de la saliva con restos de alimentos y la activación del flujo salivar.
- El paciente tiene que tragar toda la saliva de la boca antes de empezar la recogida de la muestra.
- El paciente debe depositar en el tubo de forma intermitente toda la saliva que fuese acumulando durante un período de 5 minutos. Aproximadamente, se necesita 1 ml de saliva para la determinación. Se recogerán un máximo de 5 ml de saliva en cada tubo, y sólo se recogerá un tubo de saliva por paciente en cada una de las dos tomas previstas, separadas entre 24h y una semana (ver §A.11).
- Es importante aclarar que en este método de recolección no puede existir estimulación intencionada de la saliva, como pueden ser estímulos gustativos

como el ácido cítrico (Froehlich, Pangborn, & Whitaker, 1987) o estímulos mecánicos utilizando la masticación de parafina.(Mackie & Pangborn, 1990)

- No se recogerán muestras cuando haya enfermedades bucales, inflamación o lesiones de la boca. Si existiera una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta deberá ser descartada, se esperará 10 minutos y se recogerá una nueva muestra.

### ***A.13. Manipulación y almacenamiento de las muestras***

Las muestras de saliva se almacenarán entre 2-8°C hasta una semana, y deberán congelarse a -20°C para períodos más largos; no es aconsejable el descongelado y congelado repetido. (Yuana et al., 2015) Cada muestra ha de ser congelada, descongelada y centrifugada al menos una vez para separar las mucinas por centrifugación. Cuando llegan las muestras al laboratorio, estas han de permanecer en el congelador al menos durante una noche. A la mañana siguiente las muestras congeladas se calentarán hasta 2-8°C y se mezclarán cuidadosamente. Entonces, las muestras se centrifugarán 10 minutos a 4000 x g). (Yuana et al., 2015)

### ***A.14. Análisis mediante la técnica ELISA***

Varios de los análisis propuestos se basan en la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), que permite identificar inmunocomplejos por medio de enzimas unidas al antígeno o anticuerpo, estando uno de ellos adsorbido a un soporte sólido (placa de poliestireno). La reacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la utilización de una enzima conjugada químicamente al antígeno o anticuerpo. La enzima convierte un sustrato incoloro (tras añadirlo) en un producto coloreado, cuyo color es proporcional a la cantidad de inmunocomplejos. (Engvall & Perlmann, 1971; Van Weemen & Schuurs, 1971)

### ***A.15. Determinación de cortisol***

Para la determinación del cortisol se usará el Kit de inmunoensayo enzimático disponible en el mercado, tal como el DRG Salivary Cortisol ELISA (DRG Instruments GmbH, Germany).

### ***A.16. Determinación de la inmunoglobulina A secretora***

Para la determinación de la sIgA en saliva se utilizará la técnica de inmunodifusión radial simple, que será adquirida a un proveedor comercial (The Binding Site, Birmingham, UK).

Este método se basa en la difusión de proteínas (antígenos) de forma radial desde un “pocillo” atravesando un gel de agarosa que contiene anticuerpos específicos para la proteína que deseamos cuantificar (sIgA). Los complejos antígeno-anticuerpo que se han formado, bajo las condiciones correctas, precipitarán en forma de anillo. La lectura del ensayo se basa en estos complejos antígeno-anticuerpo insolubles que acaban precipitando. Aunque la formación de estos complejos en medio semisólido, como la

agarosa, depende de electrolitos, pH y temperatura, los factores más determinantes en su formación son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo.

El tamaño del anillo aumentará hasta que se alcance el equilibrio entre la formación y ruptura de estos inmuno-complejos; a este punto se le denomina “finalización”. En este momento existe una relación lineal entre el cuadrado del diámetro del anillo y la concentración de la proteína que estamos estudiando (sIgA).

#### ***A.17. Determinación del TNF $\alpha$***

Para la determinación del TNF  $\alpha$  se utilizará la técnica de ELISA Quantikine, Human sTNF RII/TNFRSF1B Immunoassay de R&D systems, Minneapolis, MN, EEUU.

#### ***A.18. Destino final de las muestras***

Al finalizar el estudio las muestras de saliva se conservaran en la colección de muestras del IOBA dada de alta en el Instituto de Salud Carlos III ([www.isciii.es](http://www.isciii.es)). Las muestras serian conservadas para su utilización en estudios posteriores de otros biomarcadores.

En cumplimiento del Real Decreto 1716/2011 del 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de muestras biológicas de origen humano, los pacientes tendrán conocimiento a través de la Hoja de Información del estudio y en su caso aceptarán que las muestras sean almacenadas, autorizándolo con su firma en el Consentimiento Informado. Cada nuevo estudio que se realice con esas muestras será remitido para su evaluación por parte del CEIC/CEIm.

## **Anexo B. Evaluación de estrés mediante métodos subjetivos**

Existen cuestionarios estándares para la determinación del nivel de estrés, el estado de ánimo y de vigilia de un sujeto.

### ***B.1. Escalas para la evaluación de estrés, ansiedad y estado de ánimo***

El PSS es el instrumento psicológico más utilizado para medir la percepción del estrés. (Cohen et al., 1983) Es una medida del grado en que las situaciones en la vida de un individuo son consideradas estresantes por él mismo. Los elementos en el examen fueron diseñados para evaluar cómo de impredecibles, incontrolables y difíciles de sobrellevar consideran los encuestados que son sus vidas. La escala también incluye una serie de preguntas directas sobre sus niveles actuales de estrés. Además, las preguntas son de carácter general y, por lo tanto, están relativamente libres de contenido específico de cualquier subgrupo de población. Las preguntas en el PSS inquieran acerca de los sentimientos y pensamientos durante el último mes.

Para evaluar la fatiga y estado de ánimo general se ha utilizado el Perfil de los Estados de Ánimo (Profile of Mood States, POMS). (McNair, D. M., Lorr, M., & Droppleman, 1971) propuesta en 1971 por McNair y cols. Esta escala evalúa seis dimensiones distintas de cambios de humor que pueden ser experimentados por cualquier persona: tensión o ansiedad, depresión o abatimiento, cólera u hostilidad, vigor o actividad, fatiga o inercia, y confusión o desconcierto. La primera edición de la escala POMS se componía de 65 preguntas. Los autores publicaron una segunda edición revisada en 1992. (McNair, D. M., Lorr, M., & Droppleman, 1992) La denominada POMS-SF ("Short Form") propuesta en 1983, consta de sólo 37 preguntas y es utilizada cuando las circunstancias del estudio o la condición de los sujetos encuestados no hace aconsejable administrar cuestionarios muy extensos. Hay estudios que avalan que los resultados de pruebas usando la POMS y la POMS-SF son consistentes, y que existe una buena correlación ( $>0.95$ ) entre las alteraciones de estados de ánimo general y las puntuaciones en subescalas en POMS y POMS-SF. (Curran et al., 1995)

El State-Trait Anxiety Inventory (STAI) se usa para medir la presencia y severidad de los síntomas de ansiedad generalizada y la propensión a estar ansioso. (Spielberger, Gonzalez-Reinosa, Martinez-Urrutia, Natalicio, & Natalicio, 1983) El STAI tiene 40 elementos, 20 en cada una de las dos sub-escalas de las que consta, ansiedad-estado y ansiedad-rasgo. La escala de ansiedad-estado (Ansiedad-E) evalúa el estado actual de ansiedad, preguntando cómo se sienten los encuestados "ahora mismo", utilizando elementos que miden sentimientos subjetivos de aprensión, tensión, nerviosismo, preocupación y actividad / activación del sistema nervioso autónomo. La escala de ansiedad-rasgo (Ansiedad-R) evalúa aspectos relativamente estables de la "propensión a la ansiedad", incluyendo estados generales de calma, confianza y seguridad. El STAI se ha empleado en estudios con pacientes depresivos (Kennedy, Schwab, Morris, & Beldia, 2001) y también se está empleando en estudios clínicos en curso con pacientes de RP. (Pinilla, 2012)

Existen también otras herramientas de evaluación psicométrica relevantes en estudios de ansiedad y estrés. En una revisión comparativa de casi 200 trabajos, Rossi (2012) y

sus colaboradores analizaron el uso del POMS, el STAI y otros Instrumentos psicométricos como las escalas Positive and Negative Affect Schedule (PANAS)(Watson, Clark, & Tellegen, 1988) y Visual Analog Scales (VAS) para la medida de estados de ansiedad en periodos cortos (<24h); el análisis concluyó que los resultados de los estudios donde el uso de las escalas no se solapan son coherentes, y que por tanto, todas ellas son herramientas válidas para evaluar estados de ansiedad transitorios.(Rossi & Pourtois, 2012)

## ***B.2. Escalas de somnolencia***

La Stanford Sleepiness Scale (SSS) se utiliza para evaluar el grado de somnolencia de los sujetos encuestados, en momentos específicos de tiempo. La escala consiste de un sólo elemento y requiere que los encuestados seleccionen de entre siete afirmaciones la que mejor represente su nivel de somnolencia percibida. (Hoddes, Zarcone, Smythe, Phillips, & Dement, 1973)

La escala de somnolencia Epworth (Epworth Sleepiness Scale, ESS) es un cuestionario autoadministrado de ocho preguntas, propuesto como un método simple para medir la somnolencia diurna en adultos; su consistencia interna y fiabilidad han sido verificadas de forma independiente.(Johns, 1991) También se está utilizando en el estudio clínico citado anteriormente.(Pinilla, 2012) Esto podría permitir la validación de resultados de los test de evaluación subjetivos. Esta es una razón para la utilización de las ESS y STAI en este proyecto.

## **Bibliografija**

- Aardal, E., & Holm, A. C. (1995). Cortisol in saliva--reference ranges and relation to cortisol in serum. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry : Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 33(12), 927–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8845424>
- Alghadir, A. H., Gabr, S. A., & Aly, F. A. (2015). The effects of four weeks aerobic training on saliva cortisol and testosterone in young healthy persons. *Journal of Physical Therapy Science*, 27(7), 2029–33. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.2029>
- Andrews, J. of manipulating the amount of social-evaluative threat on the cortisol stress response in young healthy men., Wadiwalla, M., Juster, R. P., Lord, C., Lupien, S. J., & Pruessner, J. C. (2007). 134. Andre. *Behavioral Neuroscience*, 121(5), 871–876. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.871>
- Baum, B. J. (1993). Principles of saliva secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694, 17–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8105741>
- Ben-Aryeh, H., Roll, N., Lahav, M., Dlin, R., Hanne-Paparo, N., Szargel, R., ... Laufer, D. (1989). Effect of Exercise on Salivary Composition and Cortisol in Serum and Saliva in Man. *Journal of Dental Research*, 68(11), 1495–1497. <https://doi.org/10.1177/00220345890680110501>
- Beyazyıldız, E., Cankaya, A. B., Ergan, E., Anayol, M. A., Ozdamar, Y., Sezer, S., ... Oztürk, F. (2013). Changes of total antioxidant capacity and total oxidant status of aqueous humor in diabetes patients and correlations with diabetic retinopathy. *International Journal of Ophthalmology*, 6(4), 531–6. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2013.04.23>
- Bittner, A. K., Haythornthwaite, J. A., Diener-West, M., & Dagnelie, G. (2012). Photopsias are related in part to perceived stress and positive mood in retinitis pigmentosa. *Eye (London, England)*, 26(1), 101–8. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.247>
- Bittner, A. K., Smith, M., Haythornthwaite, J., & Buenaver, L. (2011). Increased Salivary Cortisol Social Stress Reactivity in Retinitis Pigmentosa vs. Normally-sighted Healthy Controls Investigative ophthalmology & visual science. (Vol. 52, pp. 5557–5557). Hagerstown, MD : Association for Research in Vision and Ophthalmology06). Retrieved from <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2361613>
- Bjelaković, G., Beninati, S., Pavlović, D., Kocić, G., Jevtović, T., Kamenov, B., ... Basić, J. (2007). Glucocorticoids and oxidative stress. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 18(2), 115–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715567>
- Bozovic, D., Racic, M., & Ivkovic, N. (2013). Salivary cortisol levels as a biological marker of stress reaction. *Medical Archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 67(5), 374–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24601177>
- Campochiaro, P. A., Strauss, R. W., Lu, L., Hafiz, G., Wolfson, Y., Shah, S. M., ... Scholl, H. P. (2015). Is There Excess Oxidative Stress and Damage in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa? *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(7), 643–648. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6327>
- Carrasco, G. A., & Van de Kar, L. D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European*

*Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 235–272. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01285-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01285-8)

- Cohen, S., Kamarck, T., & Mermelstein, R. (1983). A global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior*, 24(4), 385–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6668417>
- Connor, T. J., Brewer, C., Kelly, J. P., & Harkin, A. (2005). Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production. *Journal of Neuroimmunology*, 159(1–2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.10.016>
- Curran, S. L., Studts, J. L., Andrykowski, M. A., Curran, S. L., Andrykowski, M. A., & Studts, J. L. (1995). Short Form of the Profile of Mood States (POMS-SF): Psychometric information. *Psychological Assessment*, 7(1), 80–83. <https://doi.org/10.1037/1040-3590.7.1.80>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601–623. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
- de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Dorn, L. D., Lucke, J. F., Loucks, T. L., & Berga, S. L. (2007). Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Annals of Clinical Biochemistry*, 44(3), 281–284. <https://doi.org/10.1258/000456307780480954>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5135623>
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F. S., & Parmeggiani, F. (2011). Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current Genomics*, 12(4), 238–49. <https://doi.org/10.2174/138920211795860107>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Finsterwald, C., & Alberini, C. M. (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.017>
- Froehlich, D. A., Pangborn, R. M., & Whitaker, J. R. (1987). The effect of oral stimulation on human parotid salivary flow rate and alpha-amylase secretion. *Physiology & Behavior*, 41(3), 209–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3501593>
- Garde, A. H., & Hansen, Å. M. (2005). Long-term stability of salivary cortisol. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 65(5), 433–436. <https://doi.org/10.1080/00365510510025773>
- Golbidi, S., Frisbee, J. C., & Laher, I. (2015). Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(12), H1476–H1498.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00859.2014>

- Gold, P. W. (2015). The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Molecular Psychiatry*, *20*(1), 32–47. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.163>
- Gómez de Ferraris, M. E., & Campos Muñoz, A. (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. Medica Panamericana.
- Goodin, B. R., Quinn, N. B., King, C. D., Page, G. G., Haythornthwaite, J. A., Edwards, R. R., ... McGuire, L. (2012). Salivary cortisol and soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor II responses to multiple experimental modalities of acute pain. *Psychophysiology*, *49*(1), 118–27. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2011.01280.x>
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, *18*(9), 685–716. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599635>
- Hamel, C. P. (2007). Cone rod dystrophies. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *2*, 7. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-7>
- Heaney, J. L. J., Phillips, A. C., & Carroll, D. (2010). Ageing, depression, anxiety, social support and the diurnal rhythm and awakening response of salivary cortisol. *International Journal of Psychophysiology*, *78*(3), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2010.07.009>
- Hellhammer, D. H., Wüst, S., & Kudielka, B. M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.026>
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., ... Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 6, pp. 603–621). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>
- Hoddes, E., Zarcone, V., Smythe, H., Phillips, R., & Dement, W. C. (1973). Quantification of Sleepiness: A New Approach. *Psychophysiology*, *10*(4), 431–436. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1973.tb00801.x>
- Holtmann, M. H., Schuchmann, M., Zeller, G., Galle, P. R., & Neurath, M. F. (2002). The emerging distinct role of TNF-receptor 2 (p80) signaling in chronic inflammatory disorders. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *50*(4), 279–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12371624>
- Hucklebridge, F., Hussain, T., Evans, P., & Clow, A. (2005). The diurnal patterns of the adrenal steroids cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in relation to awakening. *Psychoneuroendocrinology*, *30*(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.04.007>
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *85*(2), 162–169. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>
- Iglesias, S., Jacobsen, D., Gonzalez, D., Azzara, S., Repetto, E. M., Jamardo, J., ... Fabre, B. (2015). Hair cortisol: A new tool for evaluating stress in programs of stress management. *Life Sciences*, *141*, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.006>

- Jiang, T., Chang, Q., Cai, J., Fan, J., Zhang, X., & Xu, G. (2016). Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/3528274>
- Johns, M. W. (1991). A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*, 14(6), 540–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1798888>
- Kajantie, E., & Phillips, D. (2006). The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 31(2), 151–178. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.07.002>
- Kanegane, K., Penha, S. S., Munhoz, C. D., & Rocha, R. G. (2009). Dental anxiety and salivary cortisol levels before urgent dental care. *Journal of Oral Science*, 51(4), 515–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032602>
- Kennedy, B. L., Schwab, J. J., Morris, R. L., & Beldia, G. (2001). Assessment of State and Trait Anxiety in Subjects with Anxiety and Depressive Disorders. *Psychiatric Quarterly*, 72(3), 263–276. <https://doi.org/10.1023/A:1010305200087>
- Kirschbaum, C., & Hellhammer, D. H. (1994). Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, 19(4), 313–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8047637>
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894–902. <https://doi.org/10.1038/nature07455>
- Lohr, H. R., Kuntchithapautham, K., Sharma, A. K., & Rohrer, B. (2006). Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death. *Experimental Eye Research*, 83(2), 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.014>
- Mackie, D. A., & Pangborn, R. M. (1990). Mastication and its influence on human salivary flow and alpha-amylase secretion. *Physiology & Behavior*, 47(3), 593–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2359773>
- Martínez-Fernández de la Cámara, C., Hernández-Pinto, A. M., Olivares-González, L., Cuevas-Martín, C., Sánchez-Aragó, M., Hervás, D., ... Rodrigo, R. (2015). Adalimumab Reduces Photoreceptor Cell Death in A Mouse Model of Retinal Degeneration. *Scientific Reports*, 5, 11764. <https://doi.org/10.1038/srep11764>
- McNair, D. M., Lorr, M., & Droppleman, L. F. (1971). Manual for the Profile of Mood States. San Diego: Educational and Industrial Testing Services . Retrieved from <http://garfield.library.upenn.edu/classics1984/A1984SW52600001.pdf>
- McNair, D. M., Lorr, M., & Droppleman, L. F. (1992). *Revised manual for the Profile of Mood States*. San Diego, CA: Educational and Industrial Testing Services.
- Miller, G. E., Chen, E., & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychological Bulletin*, 133(1), 25–45. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.133.1.25>
- Miranda, M., Alvarez-Nölting, R., Araiz, J., & Romero Gómez, F. J. (2010). Antioxidant therapy in retinitis pigmentosa. In J. R. Gómez, M. Maria, & J. M. Soria (Eds.), *Novel Aspects of*

*Neuroprotection.*

- Navazesh, M. (1993). Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694, 72–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8215087>
- Pinilla, I. (2012). Ensayo Clínico EC11-441 “Efecto de la melatonina sobre las alteraciones visuales y del sueño en enfermos afectados de Retinosis Pigmentaria.” Retrieved from <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2012-002436-82/ES>
- Radu, R. A., Hu, J., Yuan, Q., Welch, D. L., Makshanoff, J., Lloyd, M., ... Bok, D. (2011). Complement System Dysregulation and Inflammation in the Retinal Pigment Epithelium of a Mouse Model for Stargardt Macular Degeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18593–18601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191866>
- Rossi, V., & Pourtois, G. (2012). Transient state-dependent fluctuations in anxiety measured using STAI, POMS, PANAS or VAS: a comparative review. *Anxiety, Stress & Coping*, 25(6), 603–45. <https://doi.org/10.1080/10615806.2011.582948>
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), 589–601. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009>
- Sanvicens, N., Gómez-Vicente, V., Masip, I., Messeguer, A., & Cotter, T. G. (2004). Oxidative Stress-induced Apoptosis in Retinal Photoreceptor Cells Is Mediated by Calpains and Caspases and Blocked by the Oxygen Radical Scavenger CR-6. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39268–39278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402202200>
- Schiavone, S., Jaquet, V., Trabace, L., & Krause, K.-H. (2012). Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(12), 1475–1490. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4720>
- Scholey, A., Haskell, C., Robertson, B., Kennedy, D., Milne, A., & Wetherell, M. (2009). Chewing gum alleviates negative mood and reduces cortisol during acute laboratory psychological stress. *Physiology & Behavior*, 97(3–4), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.028>
- Segerstrom, S. C., Boggero, I. A., Smith, G. T., & Sephton, S. E. (2014). Variability and reliability of diurnal cortisol in younger and older adults: implications for design decisions. *Psychoneuroendocrinology*, 49, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.07.022>
- Shintani, K., Shechtman, D. L., & Gurwood, A. S. (2009). Review and update: Current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry - Journal of the American Optometric Association*, 80(7), 384–401. <https://doi.org/10.1016/j.optm.2008.01.026>
- Smith, H. B., Chandra, A., & Zambarakji, H. (2013). Grading severity in retinitis pigmentosa using clinical assessment, visual acuity, perimetry and optical coherence tomography. *International Ophthalmology*, 33(3), 237–244. <https://doi.org/10.1007/s10792-012-9678-2>
- Sobas, E. M., Reinoso, R., Cuadrado-Asensio, R., Fernández, I., Maldonado, M. J., & Pastor, J. C. (2016). Reliability of potential pain biomarkers in the saliva of healthy subjects: Inter-individual differences and intersession variability. *PLoS ONE*, 11(12), 1–12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166976>

Spielberger, C. D., Gonzalez-Reinosa, F., Martinez-Urrutia, A., Natalicio, L. F. S., & Natalicio, D. S. (1983). State-Trait Anxiety Inventory.

<https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0943>

Stocker, R., & Keane, J. F. (2004). Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis.

*Physiological Reviews*, 84(4), 1381–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>

Törnåge, C.-J., & Törnåge, C.-J. (2009). Salivary Cortisol for Assessment of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 284–289.

<https://doi.org/10.1159/000216186>

Törnåge, C. J. (2002). Reference values for morning salivary cortisol concentrations in healthy school-aged children. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism : JPEM*, 15(2), 197–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874185>

Trapani, I., Banfi, S., Simonelli, F., Surace, E. M., & Auricchio, A. (2015). Gene Therapy of Inherited Retinal Degenerations: Prospects and Challenges. *Human Gene Therapy*, 26(4), 193–200. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.030>

Tsujita, S., & Morimoto, K. (1999). Secretory IgA in saliva can be a useful stress marker.

*Environmental Health and Preventive Medicine*, 4(1), 1–8.

<https://doi.org/10.1007/BF02931243>

Tzortzi, C., Proff, P., Redlich, M., Aframian, D. J., Palmon, A., Golan, I., ... Baumert, U. (2009). Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children. *International Dental Journal*, 59(1), 12–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19323306>

Van Weemen, B. K., & Schuur, A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15(3), 232–236. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11945853>

Vining, R. F., & McGinley, R. A. (1987). The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *Journal of Steroid Biochemistry*, 27(1–3), 81–94. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3320544>

Vissink, A., Spijkervet, F. K., & van Nieuw Amerongen, A. (1997). Changes in secretion and composition of saliva with aging. *Nederlands Tijdschrift Voor Tandheelkunde*, 104(5), 186–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924395>

Vyas, S., Rodrigues, A. J., Silva, J. M., Tronche, F., Almeida, O. F. X., Sousa, N., ... Sotiropoulos, I. (2016). Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. *Neural Plasticity*, 2016, 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2016/6391686>

Wadiwalla, M., Andrews, J., Lai, B., Buss, C., Lupien, S. J., & Pruessner, J. C. (2010). Effects of manipulating the amount of social-evaluative threat on the cortisol stress response in young healthy women. *Stress*, 13(3), 214–220.

<https://doi.org/10.3109/10253890903277561>

Watson, D., Clark, L. A., & Tellegen, A. (1988). Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *Journal of Personality and Social Psychology*, 54(6), 1063–70. Retrieved from

<https://doi.org/10.1037/0022-3514.54.6.1063>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3397865>

- Wheaton, D. K., Fish, M., Takacs, A., Fernandez, J., & Hoffman, D. R. (2012). Perceived Stress And Biochemical Stress In X-linked Retinitis Pigmentosa (XLRP). In *Investigative Ophthalmology & Visual Science - ARVO Annual Meeting* (Vol. 53, pp. 4588–4588). Hagerstown, MD : Association for Research in Vision and Ophthalmology, 1988. Retrieved from <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2357563>
- Wood-Gush, H. G. (1989). Retinitis pigmentosa research: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82(6), 355–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2681777>
- Wright, K. D., Hickman, R., & Laudenslager, M. L. (2015). Hair Cortisol Analysis: A Promising Biomarker of HPA Activation in Older Adults. *The Gerontologist*, 55 Suppl 1(Suppl 1), S140-5. <https://doi.org/10.1093/geront/gnu174>
- Yuana, Y., Böing, A. N., Grootemaat, A. E., van der Pol, E., Hau, C. M., Cizmar, P., ... Nieuwland, R. (2015). Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.29260>