



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Estandarización de la técnica de ELISA para cuantificar cortisol
en saliva, elaborando los reactivos biológicos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

BARRERA HERNANDEZ DIANA

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
ASESOR: M. EN C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ

México, D.F. 2014

TESIS APOYADA POR PROYECTO CONACYT CB-2007/83833



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de investigación fue realizado y financiado en el Laboratorio L1 de Inmunología, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rubén Marroquín Segura.

La síntesis orgánica de los conjugados antigénicos se realizó en los laboratorios de Síntesis de Fármacos y Materias Primas de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, a cargo del M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez.

Conjuntamente financiado por una beca de tesista para Diana Barrera Hernández por parte del Dr. Horacio Tovalín Ahumada; como parte del proyecto CONACYT CB-2007/ 83833, *Relación del Síndrome de Quemarse por el trabajo y marcadores de salud cardiovascular en trabajadores de distintas ocupaciones.*

DEDICATORIAS

A DIOS

Gracias por permitirme llegar a este día que tantas veces sentí tan lejos, por darme la oportunidad de conocer a tantas personas tan increíbles que me hace pensar que el mundo puede ser mejor.

A MIS PADRES

Quiero agradecerles tanto apoyo incondicional, sin el no hubiera alcanzado esta meta, gracias por su paciencia y su fe en mi, por todo lo que han enseñado, por su esfuerzo y compañía en todo momento. Mi cariño y mi admiración para siempre.

A MIS HERMANOS

Por compartir este camino que es la vida y por todos los momentos que me han dado, esperando que siempre estemos juntos. Gracias

A MI ESPOSO

Por impulsarme a seguir adelante por tu paciencia y palabras que han sido brújula en muchos momentos. Nuestro camino no ha sido fácil, pero no lo imagino al lado de nadie más. Gracias

DEDICADAD MUY ESPECIALMENTE A DAVID ABRAHAM

Bebecito te dedico este trabajo que para mí significa el inicio de algo mejor en nuestra vida, y sin ninguna pretensión que algún día te sirva para comprender que a pesar de las dificultades, podemos salir adelante y alcanzar nuestros objetivos, cuando estamos decididos a perseverar por lo que deseamos. Siempre voy a estar a tu lado.

AGRADECIMIENTOS

A MI DIRECTOR DE TESIS

Especialmente al Dr. Rubén Marroquín, por su comprensión y apoyo a lo largo del desarrollo de este proyecto y compartir sus conocimientos sin restricción. Fue un honor trabajar a su lado que Dios lo colme de bendiciones en su vida futura.

A MIS SINODALES

M en C. Rodolfo Carreón Sánchez, Dra. Raquel Retana Ugalde, Q.F.B. Carolina Jiménez, Q.F.B. Claudia Martínez Carrera, por su tiempo, disposición y oportunas correcciones y comentarios para mejorar el contenido de este trabajo.

A la Mtra Yolanda Flores Cabrera y al Mtro Luis A. Mora Guevara, por su apoyo e interés en el desarrollo de este trabajo y sus invaluable opiniones.

Al Dr. Horacio Tovalín Ahumada, por su confianza y apoyo al permitirme participar en este gran proyecto.

A mis amigas María el Pilar Meza Valverde, Noemí Mejía Rafael y Maricruz Hernández Ortega, cuentas a los amigos con los dedos de la mano y ustedes son esos dedos de esa mano, gracias por su amistad constante hacia mí a pesar del tiempo y la distancia, por compartir una de las etapas más maravillosas de mi vida. Siempre estarán en mi mente y corazón, deseándoles en todo momento lo mejor.

A Q.B.P. Laura Maldonado Martínez, Lau al final pero no menos importante fuiste una protagonista en esta historia, pocas veces congenias tan especialmente con alguien y para mi tu eres de esas personas. Nunca dejare de agradecer tu ayuda espontánea en la incertidumbre, por siempre tendré una deuda contigo. Dios llene tu vida de bendiciones y alegrías por siempre.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. FUNDAMENTACION TEORICA.....	6
3.1 Sistema endocrino.....	6
3.2 Fisiología corticosuprarrenal.....	6
3.3 Biosíntesis de cortisol.....	7
3.3.1 Regulación y actividad del cortisol.....	9
3.3.2 Metabolismo del cortisol.....	10
3.3.3 Principales funciones y efectos del cortisol en el cuerpo.....	11
3.4 Principios de la técnica inmunológica.....	15
3.4.1 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay) o ELISA.....	17
3.4.2 Reactivos.....	18
3.4.3 Ensayos de enlace competitivo.....	20
3.5 Muestra biológica.....	22
3.5.1 Propiedades.....	22
3.5.2 Recolección y técnica de la muestra.....	24
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos particulares.....	26
6. HIPÓTESIS.....	27

7. DISEÑO METODOLÓGICO	27
7.1 Procedimiento.....	29
7.1.1 Preparación de inmunógenos (cortisol-BSA, cortisol-ovoalbúmina).....	29
7.1.2 Inmunización.....	30
7.1.3 Purificación de Anticuerpo	31
7.1.4 Cuantificación de Proteínas (Método de Lowry)	31
7.1.5 Preparación del conjugado enzimático	33
7.1.6 Determinación del título de conjugado enzimático para ELISA.....	34
7.1.7 Determinación del título de antígeno para ELISA	35
7.1.8 Obtención de la curva de calibración	36
7.1.9 Cuantificación de cortisol por ELISA competitivo.....	37
7.2 Análisis estadístico	38
8. RESULTADOS	39
9. ANALISIS DE RESULTADOS	46
10. CONCLUSIONES.....	49
11. PREPARACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO.....	50
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

1. RESUMEN

El cortisol es el principal glucocorticoide producido por las glándulas suprarrenales, sus funciones son diversas y de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis en el cuerpo humano. La evaluación de estos glucocorticoides a partir de muestras obtenidas de forma no invasiva ha abierto la posibilidad de cuantificar estas hormonas en diversos fluidos. El propósito de este trabajo fue estandarizar el método de ELISA competitivo, para la cuantificación de cortisol en saliva, para esto se elaboraron los reactivos biológicos (antígenos y anticuerpo).

En primer lugar se realizó la síntesis orgánica de dos antígenos, y con uno de los cuales se inmunizó un conejo Nueva Zelanda y se obtuvo el anticuerpo anti-cortisol. La determinación del título de antígeno y conjugado anti-cortisol se realizó mediante la técnica de ELISA competitivo. Posteriormente se realizó la cuantificación de cortisol en saliva en muestras procedentes de trabajadores de diversas profesiones del Distrito Federal. El análisis estadístico se realizó con la correlación de Pearson.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer que los reactivos desarrollados en el laboratorio son altamente específicos para cuantificar cortisol en saliva, como lo mostro el análisis estadístico de los datos utilizando la correlación de Pearson. Al ser comparados con los de un estuche de referencia, se encontró un buen grado de asociación entre uno y otro, lo que respaldaría su uso en la cuantificación de cortisol en saliva.

2. INTRODUCCIÓN

El cortisol es el principal glucocorticoide segregado por la corteza suprarrenal humana y el esteroide más abundante en la sangre periférica.²⁴

El cortisol es conocido como la *hormona del estrés* ya que existe una fuerte correlación entre una condición relacionada con el estrés y los niveles de este glucocorticoide en el organismo.

El término "estrés" se define como una respuesta general del organismo ante demandas externas o internas, inicialmente amenazantes, que consiste en movilizar recursos fisiológicos y psicológicos para poderlas afrontar que tienen en común el hecho de favorecer la secreción de glucocorticoides, existe una amplia gama de situaciones que favorecen esta hipersecreción entre las que se incluyen el ayuno, la hipoglucemia, lesiones físicas, ansiedad y miedo.

El cortisol es vital para varias funciones en el cuerpo humano, entre estas importantes funciones se incluyen: regulación de la presión sanguínea y funciones cardiovasculares, mejorando la regulación del cuerpo en el uso de proteínas, carbohidratos y grasas. El desequilibrio entre los niveles normales de cortisol relacionados con el estrés, se encuentra fuertemente ligado al desarrollo de dislipidemias y consecuentemente problemas cardiovasculares.²⁴

Para analizar cortisol se emplea de manera general muestras de sangre (suero) y orina, de igual forma una porción libre de esta hormona puede encontrarse en *saliva*, la evaluación de estos esteroides se realiza por ensayos inmunológicos como el radioinmunoanálisis (RIA), y *pruebas inmunoabsorbentes de unión enzimática* (ELISA) que han demostrado ser altamente específicos.⁴

En México figuran pocos antecedentes de los niveles de cortisol que prevalecen en la población laboral, careciendo de información necesaria para controlar y prevenir sus efectos, de igual forma la utilización de fluidos biológicos diferentes a la sangre son poco utilizados para su cuantificación; a pesar de la gran facilidad y confiabilidad al obtenerlos y utilizarlos.

Por lo tanto en este trabajo se realizó la síntesis orgánica de dos antígenos, para lo cual fue necesario acoplar dos proteínas de alto peso molecular a la molécula de hidrocortisona, para conferirle las propiedades antigénicas que se requerían, posteriormente uno de los antígenos obtenidos (cortisol-ovoalbumina) fue utilizado para inmunizar un conejo Nueva Zelanda obteniéndose el anticuerpo anti-cortisol, que fue purificado por precipitación con sulfato de amonio. Una vez obtenido el anticuerpo se realizó el conjugado enzimático, con el objetivo de estandarizar la técnica de ELISA competitiva para cuantificar cortisol en saliva.

La técnica de ELISA competitiva al ser una técnica inmunológica es altamente específica, utiliza un antígeno sintético fijado eficazmente a una placa de poliestireno, que al combinarse el antígeno libre de la muestra problema y el anticuerpo conjugado compiten ambos antígenos por los sitios de unión del anticuerpo conjugado específico, los cuales posteriormente son detectados inmunoenzimáticamente y revelados por un cromógeno.

El desarrollo de esta técnica de cuantificación propone un modelo instrumental que promueva la prevención, evaluación y vigilancia de los efectos provocados por altos niveles de cortisol en la salud laboral.

3. FUNDAMENTACION TEORICA

3.1 Sistema endocrino

El sistema endocrino consta de una serie de *glándulas* que producen mensajeros químicos que se denominan *hormonas*. Estos mensajeros provocan cambios en los procesos fisiológicos y químicos que ayudan a mantener el equilibrio del organismo para la homeostasis.¹

Los productos de estas glándulas (hormonas) se liberan de sus células, pasan directamente a la circulación y son transportadas por la sangre a otros tejidos del organismo. Las células que contienen receptores para hormonas específicas de cierto órgano se denominan *células blanco*. El enlace de una hormona con su *receptor* es muy específico, dependiente de la concentración y reversible.

3.2 Fisiología corticosuprarrenal

Una de las diversas glándulas que conforman el sistema endocrino son las glándulas suprarrenales, estas dos glándulas se encuentran ubicadas por encima de los riñones. Estas glándulas están divididas en dos porciones y cada una produce sus propias hormonas. La porción externa, se denomina **corteza** y la interna medula. La corteza tiene contenido lípido y produce hormonas esteroides (Figura 1).^{2,3}

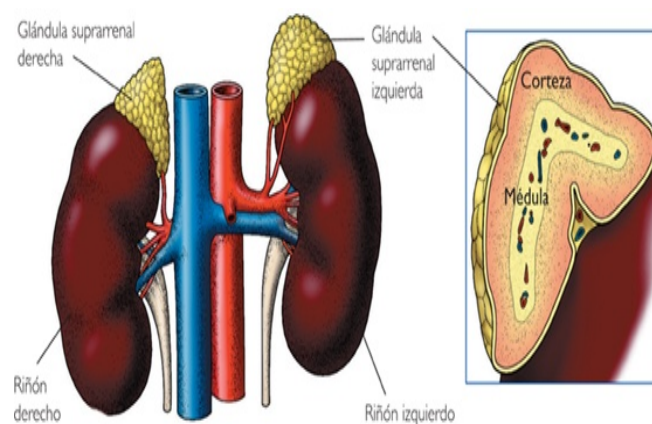


Figura 1. Fisiología de la glándula suprarrenal, y corte transversal de la misma donde se aprecia la porción interna y externa.³

La región cortical de la glándula suprarrenal produce una variedad de hormonas esteroides, las cuales se dividen en dos categorías: **glucocorticoides**, que influyen en el metabolismo de la glucosa y mineralocorticoides, que influyen en la regulación del sodio.

La corteza se divide en tres capas donde cada una produce hormonas distintas. La capa externa denominada zona glomerulosa. La capa intermedia se denomina zona fasciculada y produce glucocorticoides, principalmente **cortisol**. La capa más interna cercana a la medula, es la zona reticular.^{1,2}

3.3 Biosíntesis de cortisol

El cortisol es una potente hormona esteroidea del grupo de los glucocorticoides, la biosíntesis de estos esteroides conlleva un proceso multienzimático (oxigenasas del citocromo P-450) que se lleva a cabo en el citoplasma y en la corteza endocrina. Todas las hormonas esteroides se derivan del **colesterol** y tienen la estructura básica de anillo de ciclo perhidropentanofenantreno. La síntesis de diversas hormonas esteroides se inicia en la mitocondria con la transformación de colesterol, que proviene principalmente de las lipoproteínas plasmáticas, a pregnenolona. Esta última debe transportarse al exterior de la mitocondria y a los diversos sitios intracelulares para continuar con el proceso de síntesis hormonal, este es el paso limitante de la tasa en la síntesis de esteroides suprarrenales y se encuentra bajo control principalmente por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH).^{1,2}

La secreción de cortisol se encuentra regulada por el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (eje HPA), es sintetizada casi en su totalidad a partir del colesterol. Cuando un estímulo actúa sobre los sentidos de un individuo, el sistema periférico aferente lo recibe y lo lleva a las áreas sensitivas del sistema nervioso central (SNC). Ante este estímulo, el organismo organiza una respuesta que va enfocada a disminuir su impacto, a través del sistema nervioso autónomo y actividad neuroendocrina. La estimulación de la parte simpática del sistema nervioso autónomo provoca la secreción de catecolaminas a partir de la medula adrenal. La actividad neuroendocrina activa la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal

(HHA), que empieza con la secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH) por la parte media del hipotálamo. Ésta a su vez, estimula la hipófisis anterior para secretar hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que es transportada a través de la sangre e induce la producción de glucocorticoides de la corteza adrenal (Figura 2). El CRH es un polipéptido de 41 aminoácidos secretado por los cuerpos celulares de las neuronas que se encuentran en el núcleo del hipotálamo. El principal efecto de la ACTH es la activación de la adenilciclase de las membranas de la corteza suprarrenal; como consecuencia se induce la producción de AMP cíclico que actúa como segundo mensajero. El aumento de AMP cíclico activa enzimas intracelulares que forman las hormonas corticosuprarrenales. Una de estas enzimas es la proteína quinasa A, que es la encargada de convertir colesterol en pregnenolona. La secreción de ACTH y CRH es inhibida por los altos niveles de cortisol mediante un mecanismo de *retroalimentación negativa*. De esta manera actúa a través de receptores intracelulares específicos afectando a numerosos sistemas fisiológicos incluyendo la función inmune, regulación de la glucosa, tono muscular y metabolismo óseo. La producción de cortisol se encuentra gobernada por el ritmo circadiano de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH).^{2,4}

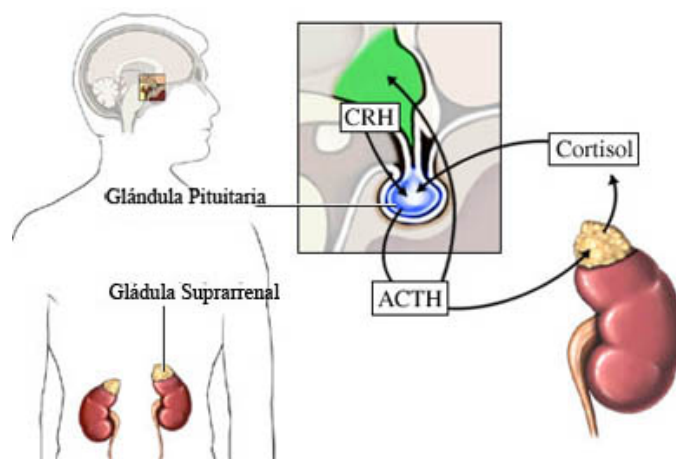


Figura 2. Secuencia de secreciones hormonales que tienen como fin la biosíntesis de cortisol por parte de las glándulas suprarrenales como respuesta a un estímulo externo.⁵

3.3.1 Regulación y actividad del cortisol

Como muchas hormonas el cortisol se secreta por el mecanismo de cascada, frecuentemente la regulación de este patrón de secreción se lleva a cabo mediante un proceso denominado *retroalimentación negativa* (Figura 3). Mediante este proceso, la hormona final que se produce regula su propia secreción, inhibiendo la secreción de una o más hormonas precursoras. Este proceso depende de la concentración, lo que implica que cuando el producto final se encuentra a concentración plasmática alta inhibe la cascada. Si el producto final se encuentra a concentración plasmática baja se elimina la inhibición y se inicia nuevamente la cascada. Por tanto en altos niveles sanguíneos de cortisol deja de secretarse ACTH de hipófisis y CRH de hipotálamo lo que, a su vez, evita la secreción de cortisol.⁶

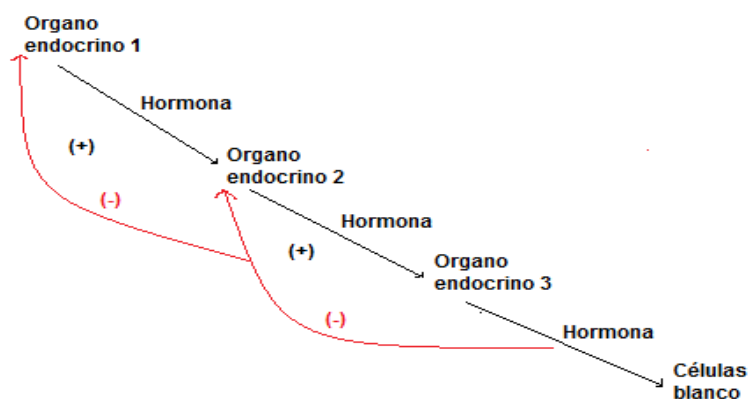


Figura 3. Ejemplo de regulación hormonal por retroalimentación negativa [+], inhibición [-].¹

El cortisol siendo una hormona esteroide es capaz de difundirse a través de la membrana plasmática y penetrar a la célula. Todos los receptores de estas hormonas tienen ubicación intracelular. La mayor parte de los efectos conocidos de los glucocorticoides son mediados por receptores de glucocorticoides ampliamente distribuidos. El receptor tiene sitios de enlace con hormonas y sitios de enlace con DNA, y está asociado con una proteína de choque de calor que se disocia después de que se produce el enlace con la hormona. En apariencia la proteína de choque de calor se disocia para dejar expuesto el sitio de enlace de DNA. Una vez que la hormona esteroide se enlaza con su receptor, el complejo hormona-receptor migra al

DNA y se enlaza con una región específica. El sitio de enlace de DNA es rico en residuos de cisteína y al parecer requiere la presencia de iones zinc para que se produzca un enlace óptimo con el DNA. El enlace del complejo inicia la síntesis de mRNA y posteriormente la síntesis de las proteínas nucleares. Como un homodímero, se une a los elementos del receptor de glucocorticoides (GRE) en los genes de respuesta promotores. Los GRE se componen de dos secuencia palindromicas que se unen al receptor hormonal dimérico.

Adicionalmente de la unión de los GRE, la unión ligando-receptor forma complejos que influyen en otros factores de transcripción, como API y NF- κ B. Estos factores de transcripción tienen amplias acciones en la regulación de factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias, etc., y una gran extensión mediando los efectos anticrecimiento, antiinflamatorio e inmunosupresión de los glucocorticoides.^{2, 7}

3.3.2 Metabolismo del cortisol

El principal sitio para el metabolismo de las hormonas esteroides es el hígado aunque también ocurre en riñón, tejido conectivo, fibroblastos y músculos. La tasa del metabolismo hepático dependerá de que la hormona este enlazada con un transportador de proteínas. El cortisol se une a proteínas en el plasma sanguíneo (~90%), principalmente a la globulina fijadora de cortisol (CBG, por sus siglas en ingles) y un 5% a la albúmina. La albúmina tiene gran capacidad, pero poca afinidad por el cortisol y para propósitos prácticos el cortisol fijado a la albúmina debe considerarse libre, de esta manera aproximadamente entre 10 y 15% se encuentra circulando libre.^{2, 6.}

El metabolismo del cortisol se inicia en el hígado con una enzima reductasa delta y se produce deshidrocortisol. Este último se excreta en la orina y se metaboliza mediante la deshidrogenasa de hidroxisteroide alfa-3. Los metabolitos que se forman de esta reacción son los principales compuestos (50%) de excreción de cortisol (tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisona). Aproximadamente 30% de los metabolitos urinarios son cortol y cortolona formados por hidrogenación del grupo cetónico C-20. Cerca del 10% del cortisol secretado es convertido en derivados 17-cetoesteroides de cortisol, después estos cetoesteroides se conjugan con sulfato y

son eliminados por la orina, cerca del 15% del cortisol secretado se excreta en las heces. El cortisol en su porción libre se encuentra en orina y en saliva.²

Cuando la concentración de cortisol alcanza niveles de 20-30 µg/dL en la sangre, la CBG se encuentra saturada y los niveles de cortisol plasmáticos aumentan velozmente. La vida media del cortisol es de 60-90 minutos, aunque tiende a aumentar con la administración de hidrocortisona, en hipertiroidismo, insuficiencia hepática o situaciones de estrés.

Los glucocorticoides tienen por lo menos dos mecanismos de acción en el SNC. Uno asociado a la percepción y coordinación de los ciclos circadianos de consumo de alimento y sueño. El otro es necesario en procesos metabólicos y de estrés. Una gran variedad de estímulos específicos e inespecíficos pueden aumentar el cortisol: traumatismos, miedo, calor o frío intensos, choque eléctrico, cirugías, ejercicio, enfermedades, gestación, ruido constante, agresiones y otros más.

3.3.3 Principales funciones y efectos del cortisol en el cuerpo

Las principales funciones y efectos del *cortisol* de manera general en el cuerpo son:

- Metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas (acción glucocorticoide).
- Homeostasis del agua y electrolitos (acción mineralocorticoide)
- Incrementar los niveles de azúcar a través de diversas vías.
- Suprimir la acción del sistema inmunitario.

Metabolismo de hidratos de carbono

Los glucocorticoides son hormonas catabólicas por tanto, influyen en el metabolismo de la glucosa estimulando la gluconeogénesis y la glucogenolisis hepática, incrementando la glucosa plasmática. La estimulación de la gluconeogénesis en el hígado ocurre en el estado de ayuno y, junto con la inhibición del consumo de glucosa en los tejidos periféricos debido al cortisol, ocasionando el incremento de la

glucosa plasmática, inhibiéndose la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, aumenta su degradación y proporciona aminoácidos para utilizarlos en el hígado. Estos aminoácidos, cuando se encuentran actuando bajo influencia del cortisol, van a los hepatocitos para formar proteínas plasmáticas para la síntesis de enzimas necesarias para la glucogenolisis. De esta manera el cortisol tiene un efecto antiinsulínico.^{2,7,8.}

Metabolismo de proteínas

El cortisol produce la reducción de proteínas celulares, excepto en las hepáticas, provocando una disminución en la síntesis de proteínas y un aumento en el catabolismo de las mismas, debido a que el cortisol deprime la formación de ARN y a una disminución del transporte de aminoácidos (principalmente de musculo y tejido linfoide).

Al disminuir las proteínas en el organismo, las células hepáticas aumentan, esta diferencia de producción entre células hepáticas y extrahepáticas se debe al efecto del cortisol que favorece el transporte de aminoácidos a células hepáticas. Lo anterior produce a largo plazo el deterioro de tejido muscular y linfoide así como adelgazamiento de la piel.^{9,10,11}

Metabolismo de grasas

Estimula la lipólisis del tejido adiposo de manera que la concentración plasmática de glicerol y ácidos grasos libres se incrementa (la secreción crónica de cortisol, provoca problemas de dislipidemias, que desemboca en problemas cardiovasculares). De tal manera que elevados niveles de cortisol promueven el depósito de grasa en las células subcutáneas y viscerales del abdomen, dichas células grasas son más sensibles a la lipólisis. Los ácidos grasos libres plasmáticos llevan a una disminución en el consumo de insulina en el hígado por lo tanto aumenta la resistencia a la insulina. Suprime la acción de la enzima *5' deiodinasa*, responsable de activar la hormona tiroidea T4 (parcialmente activa) a T3 (totalmente activa), el resultado de esto es que se disminuye la tasa metabólica haciendo más difícil la pérdida de grasa corporal.^{9,10,11}

Sistema inmune

Uno de los principales efectos del cortisol es la disminución de la inmunidad celular y humoral. La activación de los sistemas neuroendocrino y simpático, induce la secreción de cortisol por la corteza adrenal y catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) por la medula adrenal.

Las catecolaminas y corticoides (cortisol) influyen sobre el sistema inmunitario ya que suprimen la producción de IL-12 y las células presentadoras de antígeno ocasionando que las células sean incapaces de producir el factor de crecimiento de células T, modificando el equilibrio existente entre la respuesta Th1/Th2 favoreciendo la respuesta Th2 e incrementando la producción de interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13. El cortisol también tiene un efecto negativo sobre la IL-1. La IL-1 reduce la fiebre, así como la vasodilatación y es muy importante para combatir infecciones particularmente de tipo bacterianas. La desregulación de los mecanismos homeostáticos neuroinmunológicos son causados principalmente por estados de estrés crónico, que adicionalmente afecta la expresión de citocinas.^{9,10,11,12}

El cortisol en concentraciones normales tiene la capacidad de reducir las manifestaciones de la inflamación. Esto se debe a los efectos sobre la concentración, distribución y función de los leucocitos periféricos al aumentar la concentración de neutrófilos, mientras que los linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos disminuyen, así como la capacidad de estas células para responder a antígenos y mitógenos. Influye sobre la acción de la *fosfolipasa A2* y reduce la producción de *prostaglandinas* y *leucotrienos* así como la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX II).

Aparato cardiovascular

El aparato cardiovascular posee receptores de glucocorticoides, por lo que el exceso de cortisol produce alteraciones cardiovasculares. La fisiopatología a nivel cardiaco es compleja ya que en el intervienen factores intrínsecos tanto vasculares como extravasculares, de manera general predomina el aumento del volumen plasmático, del gasto cardiaco y resistencia periférica que conduce con frecuencia a la hipertensión arterial originados principalmente por la retención renal de sodio y potenciación de hormonas con efectos vasopresores.¹¹

Otros efectos

En elevadas concentraciones inhibe la función de las células óseas y el depósito de la matriz de colágeno e inhibe la absorción intestinal de calcio reduciendo sus niveles plasmáticos, de modo que altera la calcificación de la matriz ósea predisponiendo a la osteoporosis. El cortisol en exceso puede conducir también a la hipertensión, por causa de retención de sodio y excreción de potasio.¹³

La disponibilidad de cobre, se encuentra de igual forma muy relacionada con los niveles de cortisol existente, lo anterior con fines inmunológicos al estimular la síntesis de la superóxido dismutasa, esta enzima dependiente del cobre es muy valiosa para el sistema inmune para hacer frente a infecciones bacterianas.

El cortisol puede interferir con la síntesis gástrica de prostaglandinas necesarias para la protección contra el jugo gástrico y pepsina, ya que estimula la secreción ácida gástrica, siendo su efecto directo, la excreción de ion hidrogeno de los riñones por estimulación de la eliminación de iones amonio mediante la inactivación de la enzima glutaminasa renal.^{9,10,11}

El cortisol actúa también como una hormona antidiurética, ya que la excreción de agua a través de los riñones se encuentra influenciada por los niveles de cortisol existentes, debido probablemente a la estimulación inversa de la hormona antidiurética (ADH).

El cortisol tiene un efecto permisivo sobre otras hormonas, de manera que favorece su función. En este contexto facilita los efectos termogénicos, vasopresores y catabólicos de las catecolaminas; así como de hormonas tiroideas. Así también produce un aumento en la concentración de hemoglobina y el número de eritrocitos en la sangre.¹⁴

3.4 Principios de la técnica inmunológica

Actualmente el uso de los ensayos inmunoenzimáticos se encuentra ampliamente utilizado, en los cuales se requieren anticuerpos como reactivos enlazantes “específicos”, empleando enzimas como marcadores y reacciones enzima-sustrato para cuantificar la molécula de interés.

Para comprender los principios generales del ensayo inmunológico, es necesario definir algunos términos. Principalmente términos como **antígeno y anticuerpo**, el primero frecuentemente tomado como un sinónimo de inmunógeno.

La inmunogenicidad puede definirse como la propiedad de una sustancia (inmunógeno) que le proporciona la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria específica. Esta consiste en la elaboración de anticuerpo, el desarrollo de inmunidad mediada por células, o ambos. En tanto que la antigenicidad es la propiedad de una sustancia (**antígeno**) que le permite reaccionar con productos de la respuesta inmunitaria específica. De esta manera las sustancias que son inmunogénicas siempre son antigénicas, pero las sustancias con antigenicidad no son necesariamente inmunógenas. En este contexto se puede referir sustancias de bajo peso molecular (menos de 10 000 daltons), que se denominan **haptenos** y no son inmunógenos pero pueden provocar una respuesta inmunitaria intensa, cuando se acoplan a una molécula acarreadora de mayor volumen que generalmente es una proteína. Este tipo de antígenos pueden ser sintéticos y obtenerse en el laboratorio.¹⁵

Las moléculas para ser antigénicas deberán presentar características como:

- Complejidad química
- Peso molecular arriba de 10 000 Da.
- Presentar radicales ácidos
- Ser extraños al organismo

Es de observarse que la respuesta de un complejo de *hapteno-proteína* está dirigida: 1) contra el hapteno, 2) contra el acarreador y 3) contra una zona de especificidad que se superpone y que incluye el hapteno y constituyentes vecinos del acarreador.^{15,16,17}

Por otra parte es posible aumentar la respuesta inmune cuando se inyecta junto con un inmunógeno o *hapteno*, sustancias denominadas *adyuvantes* por ejemplo el *adyuvante de Freund*. Al incorporarse con el antígeno, forma un complejo insoluble con el mismo. Esto no permite el escape de antígeno de un depósito subcutáneo o intramuscular. Se tienen dos clases de adyuvantes, el incompleto consistente en una emulsión de agua en aceite, y el adyuvante completo que contiene 0.5 mg/ml de micobacterias cuya propiedad reside en el péptido que contiene.¹⁵

Cuando se inyecta un antígeno complejo que contiene muchos sitios determinantes antigénicos, casi todos los animales responderán con formación de **anticuerpos** o inmunoglobulinas, que al reconocer al inmunógeno se enlaza con él. La inyección de un antígeno en un animal puede iniciar varios cambios importantes. Después de la primera inyección de antígeno hay varios días sin que se demuestre anticuerpo, este, aparecerá en algún momento entre el quinto y décimo días y generalmente produce IgM en lo que se conoce como *respuesta primaria*. Si mas tarde se vuelve a exponer al mismo animal al antígeno, la respuesta de anticuerpo difiere notablemente de la primaria. Inmediatamente después, luego de un término de dos o

tres días, es patente el aumento notable del contenido de anticuerpos en la sangre, este aumento continuará, hasta que el título excede en mucho el de la respuesta primaria. Este tipo de respuesta se conoce como *respuesta secundaria* o de memoria (que no se olvida) con producción de IgG principalmente (Figura 4).¹⁸

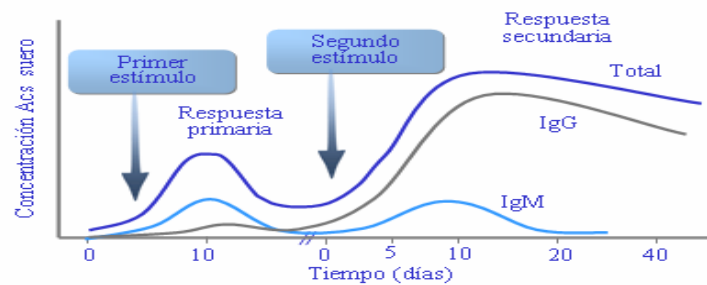


Figura 4. Niveles de IgG e IgM que participan en una respuesta primaria¹⁹

La IgG es la inmunoglobulina más abundante y representa más del 70% de las inmunoglobulinas séricas totales. Esta Ig posee capacidad neutralizante, precipitante, de fijar complemento y de unirse a células NK y macrófagos y son capaces de atravesar las membranas biológicas.¹⁶

3.4.1 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay) o ELISA

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, es el ensayo inmunológico por excelencia para determinar todo tipo de hormonas. Mejor conocido como método de ELISA por sus siglas en inglés, fue desarrollado en 1970 por el Dr. Eva Engvall, un estudiante graduado del laboratorio del Dr. Peter Perlman, el Dr. Engvall desarrollo este método basándose en la ya conocida RIA, pero utilizando anticuerpos marcados con una enzima, la cual posteriormente fue fijada a una superficie plástica.²⁰

El método ELISA se basa en el uso de antígenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) de fase sólida, como bolas, tubos o placas de microtitulación ya sea de poliestireno o poliacrilamida. El poliestireno es el material ideal debido a que su estructura química lo hace un material naturalmente hidrofóbico, lo que permite la adsorción pasiva de un gran número de biomoléculas por enganche covalente.

Adicionalmente el poliestireno puede ser fácilmente modificado para aumentar sus propiedades hidrofobicas, encontrando que un método fácilmente aplicable es su exposición a la luz UV, de esta manera la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. Este principio le confiere muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal al ser versátil, simple en su realización con la facilidad de utilizar reactivos económicos.^{17,21,22}

Se conocen dos técnicas principales de ensayos inmunoenzimáticos que utilizan marcadores enzimáticos: el inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) ensayo heterogéneo y el ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT) de tipo homogéneo.

3.4.2 Reactivos

Los anticuerpos que se emplean para la técnica de ELISA pueden ser de origen *monoclonal* o *policlonal* que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada y pueden ser solubles o estar inmóviles sobre un soporte sólido. Se emplean como conjugados no marcados o enzimáticos. Para controlar la actividad de los anticuerpos en los inmunoanálisis, es importante

tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas que estabilizan la estructura proteica, parámetros como pH, fuerza iónica, temperatura y adición de agentes deshidratantes o disolventes orgánicos. Se utilizan soluciones amortiguadoras para diluir las muestras o como diluyente esto mantiene el pH de la reacción y la concentración iónica apropiada.

Los antígenos se purifican, o se producen con tecnología recombinante y de igual forma se pueden utilizar como conjugados no marcados o enzimáticos y de manera soluble o inmóvil, dependiendo del protocolo de análisis.

Los conjugados enzimáticos son antígenos o anticuerpos unidos en forma covalente a la enzima de elección. El reactivo que se forma por enlace covalente de dos moléculas se denomina **conjugado**. La enzima escogida como marcador debe unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, encontrarse en estado puro a un precio razonable, un alto recambio enzimático, ser solubles, poseer actividad específica elevada, ser estables en las condiciones de la prueba y tener un sustrato cromogénico o fluorogénico conveniente y de fácil preparación. Las enzimas más utilizadas son fosfatasas alcalinas, *peroxidasa de rábano* y β -galactosidasa.

Las operaciones de marcado o conjugación, llevan implícitas dos etapas:

- Purificación de los anticuerpos o a partir de un antisuero bruto mediante una precipitación generalmente salina de las proteínas del antisuero, seguida de una diálisis y purificación de la fracción de anticuerpos mediante filtración molecular, cromatografía o separación en gradiente de densidad mediante ultracentrifugación. Finalmente, se suele concentrar los anticuerpos purificados y ajustarlos a una dosis de 1 mg/mL.
- Marcado de los anticuerpos con la enzima mediante el uso de un agente puente que normalmente suele ser el glutaraldehído o el del m-peryodato sódico.^{17,20}

Las enzimas se conjugan (acoplan) con el antígeno o anticuerpo utilizando reactivos bifuncionales como el glutaraldehído. Este requiere que haya grupos amino de restos de lisina reactivos en la enzima y en el anticuerpo.

La ventaja de emplear antígenos conjugados con enzimas y anticuerpos es que pueden almacenarse en condiciones estériles y utilizarse durante años, sin pérdida apreciable de su actividad enzimática inmunológica. El uso de enzimas como marcadores conlleva un riesgo mínimo de contaminación, y los procedimientos son relativamente sencillos. No requiere equipo costoso y el análisis puede llevarse a la automatización. Adicionalmente a diferencia de la técnica de EMIT, utilizada de manera análoga con ELISA, esta última no pierde o altera su actividad enzimática.

3.4.3 Ensayos de enlace competitivo

Existen diferentes tipos de ELISA, para detectar *antígenos* o *haptenos* con frecuencia se utiliza la reacción de ELISA de *enlace competitivo* en fase sólida. En este tipo de análisis, una cantidad fija de antígeno compite con el antígeno sin marcar del espécimen por el número limitado de lugares de unión del anticuerpo marcado (Figura 5). Tras una incubación breve, se procede a separar el ligando enzimático conjugado enlazado y libre. La concentración del antígeno del espécimen puede determinarse a partir de la proporción del antígeno fijo que está unido al anticuerpo. Se agrega sustrato y la enzima presente en la fracción enlazada transforma el sustrato en un producto coloreado. La cantidad de producto que se forma se relaciona de manera inversa con la concentración del ligando no marcado en la muestra problema. Las absorbancias se determinan con un espectrofotómetro calibrado a la longitud de onda adecuada. La reducción de color es por tanto proporcional a la cantidad de antígeno presente en estándares, controles y muestras problema.

Es fundamental que las cantidades de antígeno y anticuerpo marcado se mantengan constantes, de forma que la cantidad de antígeno fijo (o libre) pueda compararse con una serie de calibradores para obtener un resultado cuantitativo.^{17,21,23}

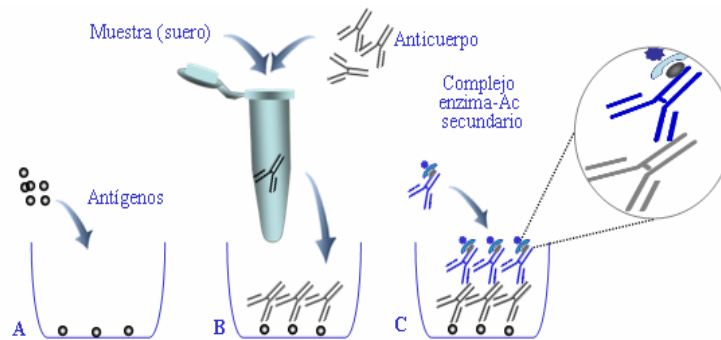


Figura 5. Principio básico de la técnica de ELISA competitivo: a) se fija el antígeno a los pocillos, b) se añade a los pocillos la muestra, c) se adiciona el anticuerpo marcado con una enzima cuyo producto es coloreado.¹⁹

Los inmunoanálisis presentan, en general, curvas de calibración no lineales. Los datos obtenidos pueden transformarse para ajustar mejor las curvas de calibración, que pueden realizarse en el eje de respuesta (*eje y*) y en el eje de la concentración (*eje x*), utilizando generalmente el ajuste lineal y expresión logarítmica.

La curva estándar se obtiene graficando sobre papel milimétrico o mediante la utilización de un software, el valor de la absorbancia promedio de cada conjunto de estándares por duplicado en el eje *y*, contra la concentración de antígeno que contiene cada estándar en el eje *x*, el resultado es una línea recta. Para determinar la concentración de la muestra problema, se localiza la absorbancia promedio en el eje *y* de la curva estándar y se lee la concentración correspondiente en el eje *x*. Este método de cálculo es rápido y, generalmente, proporciona una buena gráfica.¹⁷

La calibración es una parte fundamental de los métodos analíticos, ya que con ella se produce la transferencia del valor de los estándares a lecturas instrumentales. Por tanto es fundamental la identidad del estándar, con relación a las sustancias de bajo peso molecular, como lo son las hormonas, los estándares para la calibración han de prepararse a partir de la sustancia químicamente pura (>99%).

El método competitivo es muy sensible, capaz de detectar picogramos de hormonas y otras sustancias.²³

3.5 Muestra biológica

El cortisol es un importante *biomarcador* secretado por la glándulas adrenales, y distribuida a todos los espacios intracelulares a través del agua, y es posible detectarse en suero, orina y *saliva*.^{24,25}

Por excelencia la muestra utilizada para cuantificar cortisol es el suero, este ofrece ciertas desventajas, la principal es la necesidad de realizar una venopunción que proporciona un factor de estrés adicional, incrementando el cortisol circulante.

Por el contrario, las muestras de *saliva* tienen la ventaja de ser fácilmente recolectadas, al no ser un método invasivo, se conoce que la fracción encontrada es bioactiva, ya que no se encuentra vinculada a la globulina transportadora de cortisol (CBG) u otras proteínas y es proporcional a la encontrada en sangre. La evaluación de este glucocorticoide es fundamental para analizar la función adrenal, monitorización terapéutica, y como un anal.3ito importante en la investigación sobre el estrés.^{10,24,26}

Varios investigadores han comparado las mediciones de cortisol salival por el método RIA, contra el de cortisol en suero total, y han concluido que la saliva es un medio confiable para la evaluación de esta hormona en condiciones basales.^{10,24,27}

3.5.1 Propiedades

La **saliva** es una secreción exocrina hipotónica compleja, de osmolaridad parecida a la del plasma, proveniente de las glándulas salivales mayores en el 93% de su volumen y menores en el 7% restante. El 99% de la saliva es agua mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas, importante en el mantenimiento de la homeostasis, los mecanismos fisiológicos y la composición molecular que constituyen a su vez los mecanismos de defensa a nivel bucal, es uno de los aspectos más importantes de ella; el flujo salival está sujeto a una serie de cambios, como son la ingesta de alimentos, el ciclo circadiano, la edad y género.^{28,29}

Es estéril cuando sale de las glándulas salivales, pero deja de serlo inmediatamente cuando se mezcla con el fluido crevicular, restos de alimentos, microorganismos, y células descamadas de la mucosa oral, etc.²⁹

La composición molecular de la saliva está constituida por una compleja composición molecular (proteínas, glicoproteínas, hormonas, enzimas) las cuales difieren en su estructura química, propiedades biológicas y funcionales, que intervienen en un gran número de procesos biológicos, como el soporte celular, la tensión, y respuesta inmune.³⁰

Las glándulas salivales están formadas por células acinares y ductales, las células acinares de la parótida producen una secreción principalmente serosa y con mucinas, las glándulas menores producen secreciones mucosas (Figura 6). Las glándulas salivales tienen un abundante flujo de sangre, y la dirección de esta es contra corriente del flujo de saliva, esto, y el hecho de que este fluido tenga que pasar entre dos barreras como la glándula basal y glandular, contribuyen a que se lleven a cabo

diversos mecanismos de difusión del tipo pasivo, activo y en contra del gradiente de concentración, permitiendo el libre paso de hormonas esteroideas que son moléculas pequeñas de bajo peso molecular (menos de 400 Da) obteniendo finalmente un ultrafiltrado de la sangre.^{29,31}

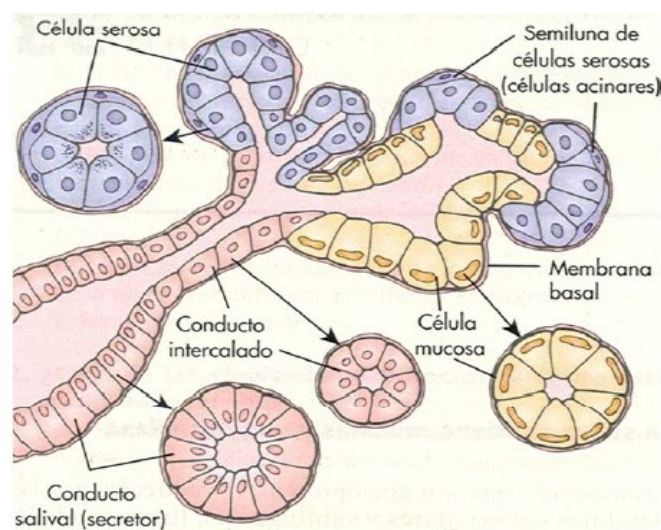


Figura 6. Fisiología de las glándulas salivales donde se muestran las principales células que la constituyen y que participan en la formación de la secreción salival.²⁹

Una producción constante de saliva, con un promedio en el flujo de 1-3 mL/min, es secretada con características específicas en respuesta a un grupo diverso de estímulos. El volumen total de producción de saliva cada día en adultos es aproximadamente 500 mL a 700 mL, con un volumen medio en la boca de 1.1 mL. Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo. La saliva es un buen indicador de diversas sustancias entre las que se encuentran casi todos los componentes orgánicos del plasma como hormonas, inmunoglobulinas, enzimas, ADN pueden ser detectadas en cantidades proporcionales a las de plasma.^{29,30,31}

3.5.2 Recolección y técnica de la muestra

En las determinaciones hormonales, resulta crucial una adecuada toma de muestra con condiciones pre-analíticas específicas, ya que dichas hormonas presentan ritmos y ciclos propios que determinarán el horario óptimo de extracción.

Los métodos más comunes para la recolección de saliva se llevan a cabo utilizando hisopos de algodón (Salivette®, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) o bien por vía pasiva salivando en tubos estériles de plástico, siendo este último el más recomendable, ya que no presenta interferencias a causa del algodón como es el caso en el uso de hisopos.^{31,32}

Medicamentos como glucocorticoides sintéticos, hormonas sexuales, dexametasona, e insulina pueden variar los resultados, previo a la toma de muestra se debe informar al participante ciertos requisitos que incluyen no cepillar los dientes, no ingerir, tomar, o fumar 30 minutos antes de donar la muestra. La muestra se deberá recolectar en las primeras horas de la mañana entre 07:00 y 09:00 de la mañana. Las muestras de saliva recolectadas se centrifugan 10 000 rpm, durante 10 minutos para eliminar mucinas y pueden ser almacenadas hasta -80 °C hasta el momento de ser utilizadas.¹⁷

Actualmente las determinaciones de cortisol en saliva se llevan a cabo mediante la técnica de ELISA de enlace competitivo, existen en el mercado un extenso catálogo

de proveedores que ofrecen estuches con todos los aditamentos necesarios para llevar a cabo dicha prueba con precios generalmente costosos.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En años recientes las adversidades psicosociales desarrolladas en el ambiente de trabajo, han provocado un elevado interés debido a un fenómeno conocido como *estrés laboral*, que ha sido reconocido como un factor de riesgo a la salud en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Uno de los *biomarcadores* mas importantes que caracterizan este estado de tensión es el *cortisol*. Aunque existen técnicas perfectamente estandarizadas para cuantificar cortisol estas por lo regular son de difícil acceso por su costo económico al no ser pruebas de rutina. En este contexto es de gran importancia estandarizar un método cuantitativo que sea sensible y a la vez económico como el de ELISA, con la posibilidad de obtener en el laboratorio los antígenos y anticuerpos necesarios para llevar a cabo dicha técnica.

Una vez estandarizada esta técnica se contara con un método fácil de procesar, y de bajo costo con el cual sería posible manejar un número considerable de muestras a la vez. Los datos obtenidos podrían establecer un referente junto a otros parámetros, de la dinámica que juega el cortisol en estados de *estrés laboral* en personas susceptibles y sus repercusiones en la salud.

Por tanto se plantea obtener un anticuerpo anticortisol a partir de la síntesis de un antígeno (cortisol) unido a un acarreador (ovoalbúmina) y de esta manera adaptar una técnica de ELISA para cuantificar cortisol en un líquido biológico como lo es la saliva.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Estandarizar la técnica de ELISA (inmunoensayo enzimático) para cuantificar cortisol en saliva.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener mediante síntesis orgánica los conjugados: ovoalbúmina-cortisol y albumina sérica bovina-cortisol.
- Obtener y purificar el anticuerpo anticortisol, a partir de conejos inmunizados con el conjugado ovoalbúmina-cortisol.
- Realizar la validación del método estandarizado utilizando como referencia un estuche comercial para cuantificar cortisol en saliva (Cortisol salivary HR ELISA, Diagnostics DRG™), y determinar la variación, inter-ensayo e intra-ensayo.
- Utilizar la técnica estandarizada en 1200 muestras de saliva provenientes de trabajadores de diversas profesiones propensos a estrés laboral.
- Proponer el uso de esta técnica estandarizada para la cuantificación de cortisol en otros trabajos experimentales relacionados.

6. HIPÓTESIS

A partir de la inmunización de un conejo con un conjugado antigénico (cortisol-ovoalbúmina) se obtiene un *anticuerpo policlonal anticortisol* que será de utilidad para estandarizar la técnica de ELISA competitiva.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

Material biológico

- Conejo blanco Nueva Zelanda (NZW) adulto
- 1200 muestras de saliva

Material de vidrio

- Matraz volumétrico 50, 100, 1000, 2000 mL
- Pipetas graduadas 1, 2, 5, 10 mL
- Probetas 50, 100, 500 mL
- Vasos de precipitados 50, 100, 500 mL
- Tubos de ensaye 13 x 100 mm
- Pipetas Pasteur

Material diverso

- Espátula
- Gradillas
- Octapipeta, Costar Octapette de 100 μ L
- Papel parafilm, Pechiney Plastic Packaging
- Pipetas tipo Eppendorf, Finnpipette, Extend, Biohit Proline de 100 μ L, 1000 μ L
- Placas de poliestireno de alta adherencia 96 pozos
- Plástico adherente

-
- Puntas para pipeta tipo Eppendorf
 - Placas de microtitulación para ELISA

Equipo

- Balanza analítica, Explorer®Pro OHAUS
- Centrifuga, Hamilton Bell
- Espectrofotómetro, Spectronic 20
- Incubadora, UL Listed
- Lámpara de UVP, UV, Mineralight y Black-Ray Lamps
- Lector de ELISA, Awareness Technology INC
- Vortex, Scientific Industries, Inc.

Reactivos

Sólidos

- Acido cítrico, Baker
- Albumina sérica bovina, Sigma Chemical Company
- Bicarbonato de sodio, Merck
- Carbonato de sodio, Sigma Chemical Company
- Cloruro de potasio, Merck
- Cloruro de sodio, Sigma
- Fosfato disódico dodecahidratado, Merck
- Fosfato monosódico, Baker
- Gelatina para agar, Merck
- Hidróxido de sodio, Baker
- Ovoalbúmina, Sigma Chemical Company
- Peroxidasa de rábano, Sigma Chemical Company
- Sulfato de cobre, Baker
- Tartrato de sodio y potasio, Merck
- Timerosal, Sigma de Mexico

Líquidos

- Folin-Ciocalteus, Merck
- Formaldehído al 37%, Baker
- Glutaraldehído al 25%, Sigma-Aldrich
- Peróxido de hidrógeno 20%, Sigma
- Sulfato de Amonio 36%
- Tween 20, Sigma

Otros

- Tubo de diálisis, Sigma
- Ortofenilendiamina (OPD), Sigma
- Hidrocortisona, Janssen-Cilag
- Adyuvante completo de Freund
- Estuche diagnóstico Cortisol salivary HR ELISA Diagnostics DRG

7.1 Procedimiento

7.1.1 Preparación de inmunógenos (cortisol-BSA, cortisol-ovoalbúmina)

Debido al bajo peso molecular del cortisol (362.46 Da) no presenta propiedades inmunogénicas, para lograrlo es necesario acoplar a esta molécula una proteína acarreadora que le confiera inmunogenicidad.³³

El cortisol (hidrocortisona)^a se acoplo con BSA^b (albúmina sérica bovina) por el método modificado de ester de N-hidroxisuccinimida. A 20 mg de cortisol, se adiciono 800 µL de dioxano y dimetilformamida respectivamente. A esta solución se le adiciono 400 µL de agua que contiene 40 mg de NHS (N-hidroxisuccinimida) y 80 mg de EDAC (clorhidrato de 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida). La mezcla de reacción se activó por 24 horas a 4°C. Una vez activada la solución se agregó una solución acuosa de BSA (4 mg/0.12 mL), se mezcló con agitación constante en un vortex por 24 horas a temperatura ambiente. El conjugado cortisol-BSA^a se dializó de tres a cuatro veces contra solución salina, después de lo cual será posible congelar o liofilizar pudiendo ser almacenada a 4°C en alícuotas (1 mL) para inmunización.³³

^a Succinato sódico de hidrocortisona (Flebocortid ®)

^b Mismo procedimiento para obtener el conjugado cortisol-ovoalbúmina.

7.1.2 Inmunización

El anticuerpo contra el conjugado cortisol-ovoalbúmina se generó en un conejo blanco Nueva Zelanda (NZW), siguiendo el protocolo de inmunización con proteínas, como se indica el cuadro 1.³⁴

Cuadro 1. Esquema de inmunización con el conjugado <i>cortisol-ovoalbúmina</i>	
Día 0	1 mg de cortisol-ovoalbúmina en 1 mL de solución salina, más 1 mL de adyuvante completo de Freund, aplicado en sitios múltiples, vía subcutánea.
Día 14	1 mg de cortisol-ovoalbúmina en 1 mL de solución salina más 1 mL de adyuvante incompleto de Freund, aplicarlo en sitios múltiples, vía subcutánea.
Día 35	0.5 mg de cortisol-ovoalbúmina en 1 mL de solución salina, aplicado en sitios múltiples.
Día 40	0.5 mg de cortisol-ovoalbúmina en 1 mL de solución salina aplicada en sitios múltiples.
Día 45	Sangrar.

El antisuero se obtuvo después de centrifugar a 2 500 rpm durante 10 minutos y fue almacenado a -30°C.

7.1.3 Purificación de Anticuerpo

La purificación se realizó por precipitación con *sulfato de amonio*. Siguiendo el protocolo a continuación descrito:

- 20 mL de suero mas 10 mL de sulfato de amonio agregado gota a gota con agitación constante, centrigrar por 20 minutos a 6 000 rpm.
- Retirar sobrenadante y resuspender con 20 mL de solución salina al 0.85 % y agregar 10 mL de sulfato de amonio al 33% gota a gota (segunda precipitación), con agitación constante por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar nuevamente 20 minutos a 6 000 rpm.
- Decantar y resuspender el paquete con solución salina, colocarlo en un tubo de diálisis, dializar contra solución salina, hasta eliminar el sulfato de amonio.

7.1.4 Cuantificación de Proteínas (Método de Lowry)

Una vez obtenidos los antígenos y el anticuerpo correspondiente se determinó su concentración por el método de Lowry.³⁵

Solución A

2.0 g de Carbonato de sodio en 100 mL de Hidróxido de sodio al 0.4%

Solución B1

1.0 g de Tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua destilada.

Solución B2

0.5 g de Sulfato de cobre en 50 mL de agua destilada.

Solución C

50 mL de solución A más 0.5 mL de solución B1 y 0.5 mL de solución B2.

Estándar

Albumina sérica bovina partiendo de una concentración de 250 µg/mL hasta 25 µg/mL, a fin de tener diez series de diluciones, como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Curva estándar para cuantificar proteínas				
Tubo	mL STD	mL agua	mL sol. C*	Sol. Folin-Ciocalteus**
1	0.1	0.9	3	0.1
2	0.2	0.8	3	0.1
3	0.3	0.7	3	0.1
4	0.4	0.6	3	0.1
5	0.5	0.5	3	0.1
6	0.6	0.4	3	0.1
7	0.7	0.3	3	0.1
8	0.8	0.2	3	0.1
9	0.9	0.1	3	0.1
10	1.0	0.0	3	0.1

Blanco

1 mL de agua destilada + 3 mL de solución C* + 0.1 mL de solución Folin-Ciocalteus**

Muestra

0.1 mL de muestra (antígeno o anticuerpo)+ 0.9 mL de agua destilada+ 3 mL de solución C* + 0.1 mL de Folin-Ciocalteus.**

* Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

** Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Estándar, blanco y muestra se trabajan simultáneamente, las lecturas se realizan en espectrofotómetro a 600 nm.

7.1.5 Preparación del conjugado enzimático

La reacción de conjugación del anticuerpo (anticortisol) con la enzima (HRP) peroxidasa de rábano picante se realizó utilizando el método descrito por Avrameas, el cual utiliza *glutaraldehído*, técnica muy utilizada para acoplar enzimas a anticuerpos, ya que elimina anticuerpos inespecíficos.³⁶

El protocolo a seguir fue el siguiente:

1. Disolver 20 mg de peroxidasa en 0.4 mL de solución buffer de fosfatos 0.1M, pH=6.8, conteniendo 1.25% de glutaraldehído, dejar reposar 18 horas a temperatura ambiente.
2. Eliminar el glutaraldehído por diálisis contra salina normal 0.85%.
3. Concentrar si es necesario a 1 mL y adicionar 1 mL de salina normal que contiene 5 mg de anticuerpo y 0.1 mL de buffer de bicarbonato-carbonato de sodio 1M pH 9.5.
4. Dejarlo 24 horas a 4 °C y adicionar 0.1 mL de lisina 0.2M.
5. Dejarlo 2 horas a temperatura ambiente y dializar exhaustivamente contra solución salina a 4 °C.
6. Se procede a centrifugar a 3 500 rpm durante 5 minutos, al conjugado precipitado se le elimina el sobrenadante, el precipitado se resuspende en un mililitro de PBS (solución buffer de fosfatos), adicionando timerosal o formalina hasta una concentración de 0.01% como conservador.

7.1.6 Determinación del título de conjugado enzimático para ELISA

Irradiar placa de microtitulación con lámpara de luz UV por una hora.

Hacer diluciones del antígeno (cortisol-BSA) partiendo de una concentración inicial de 128 µg/mL en 3 mL de buffer de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH 9.6) y realizar diluciones al doble hasta tener siete diferentes concentraciones, como se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Diluciones del antígeno (cortisol-BSA)	
Tubo/fila	Concentración (µg/mL)
A	128
B	64
C	32
D	16
E	8
F	4
G	2
H	0

Colocar 100 µL en cada pozo, dejando el pozo H como testigo agregando únicamente buffer de recubrimiento, tapar con plástico e incubar por una hora a 36.5°C, lavar 6 veces con PBS-tween al 0.05%, bloquear la placa con gelatina al 1% colocando 300 µL en cada pozo, incubar a 36.5° C por 45 minutos, lavar 6 veces.

Hacer diluciones del anticuerpo conjugado partiendo de una dilución inicial de 1:200 en el tubo uno hasta llegar al tubo 11, realizando diluciones al doble con PBS. Poner 100 µL del anticuerpo en cada pozo dejando el pozo 12H solo con PBS que será el testigo, incubar por 45 minutos a 36.5° C y lavar con PBS-Tween al 0.05%.

Colocar 100 μ L por pozo del sustrato y el cromógeno en cada pozo, cubrir la placa e incubar a 36.5° C por 15 a 30 minutos revisando constantemente la formación de color. Leer la placa en un lector de ELISA a 450 nm.

Graficar absorbancia contra logaritmo de dilución del conjugado, reportar la dilución de anticuerpo con la mejor respuesta.

7.1.7 Determinación del título de antígeno para ELISA

Irradiar placa de microtitulación con lámpara de luz UV por una hora.

Hacer diluciones del antígeno (cortisol-BSA) partiendo de una concentración inicial de 128 μ g/mL en 3 mL de buffer de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH= 9.6) y realizar diluciones al doble hasta tener siete diferentes concentraciones.

Colocar 100 μ L en cada pozo, dejando el pozo H como testigo agregando únicamente buffer de recubrimiento, tapar con plástico e incubar por una hora a 36.5°C, lavar 6 veces con PBS-tween al 0.05%, bloquear la placa con gelatina al 1% colocando 300 μ L en cada pozo, incubar a 36.5° C por 45 minutos, lavar 6 veces.

Colocar 100 μ L de una dilución 1:200 del anticuerpo conjugado con PBS, en cada pozo dejando el pozo 12H solo con PBS que será el testigo, incubar por 45 minutos a 36.5° C y lavar con PBS-Tween al 0.05%.

Colocar 100 μ L por pozo del sustrato y el cromógeno (OPD) en cada pozo, cubrir la placa e incubar a 36.5° C por 15 a 30 minutos revisando constantemente la formación de color. Leer la placa en un lector de ELISA a 450 nm.

Graficar absorbancia contra logaritmo de la concentración del antígeno, sobre esta grafica se calculara el 80% de respuesta de esta, que por ley de Lambert-Beer será la concentración previa a la saturación.

7.1.8 Obtención de la curva de calibración

La curva de calibración se obtuvo, utilizando como *antígeno libre* (hidrocortisona), utilizando la técnica de ELISA competitivo, utilizando los títulos de conjugado y antígeno que previamente se hayan determinado.

Irradiar placa de microtitulación con lámpara de luz UV por una hora.

Colocar 0.1 μL del antígeno (cortisol-BSA) en 17.5 μL de buffer de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH= 9.6), poner 100 μL en todos los pozos de la placa, dejando el pozo *H* como testigo, únicamente con buffer de recubrimiento. Cubrir con plástico e incubar por una hora a 36.5° C. Tirar el sobrenadante y lavar 6 veces con PBS-Tween al 0.05%.

Bloquear la placa con gelatina al 1% colocando 300 μL en cada pozo, incubar a 36.5° C por 45 minutos, lavar 6 veces.

Realizar diluciones del antígeno libre (hidrocortisona), para lo cual se pesó previamente el contenido de un frasco con hidrocortisona liofilizada químicamente pura (Flebocortid), pesar 14.86 mg que contengan 10.24 mg de fármaco y diluir con 100 mL de PBS en un matraz aforado, para partir de una concentración de 102.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De esta solución madre tomar 2 mL y diluir al doble con PBS, para tener las siguientes concentraciones y colocar 100 μL en cada pozo, como se observa en el cuadro 4.

Cuadro 4. Concentraciones de antígeno libre	
Columna	Concentración [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
1	0.05
2	0.1
3	0.2
4	0.4
5	0.8
6	1.6
7	3.2
8	6.4
9	12.8
10	25.6
11	51.2
12	102.4

Simultáneamente colocar 100 μ L de una dilución 1:200 del anticuerpo conjugado con PBS, en cada pozo dejando el pozo H solo con PBS que será el testigo, incubar por 45 minutos a 36.5° C y lavar con PBS-Tween al 0.05%.

Colocar 100 μ L por pozo del sustrato y el cromógeno (OPD) en cada pozo, cubrir la placa e incubar a 36.5° C por 15 a 30 minutos revisando constantemente la formación de color. Leer la placa en un lector de ELISA a 450 nm.

Realizar la grafica absorbancia contra logaritmo de la concentración del antígeno libre, sobre la cual se realizará el ajuste por cada ensayo que se realice.

7.1.9 Cuantificación de cortisol por ELISA competitivo

Las muestras previamente recolectadas a la llegada al laboratorio se fraccionaron en tubos Eppendorf con capacidad de 500 μ L y congeladas a -20° C, el día del ensayo se descongelan hasta temperatura ambiente, se homogenizaron cuidadosamente y a continuación se centrifugaron durante cinco minutos a 3000 rpm. Únicamente se utilizo el sobrenadante.

Las muestras se analizaron por la técnica de ELISA competitiva para lo cual se sensibilizo una placa de ELISA irradiada con luz UV por una hora, con una dilución de 0.1 μ L de antígeno en 17.5 μ L de buffer de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH 9.6), colocando 100 μ L en cada pozo, dejando un pozo como testigo únicamente con buffer de recubrimiento. Tapar e incubar una hora a 36.5° C, lavar seis veces con PBS-Tween 0.05% y colocar 300 μ L de bloqueador (gelatina al 1%) en cada uno de los pozos, incubar a 36.5° C por 45 minutos, lavar y adicionar 100 μ L de cada una de las muestras biológicas previamente rotuladas en cada pozo y a continuación colocar 100 μ L de una disolución 1:200 del conjugado por pozo. Cubrir la placa e incubar a 36.5° C por 45 minutos. Lavar los pozos con PBS-Tween. Colocar 100 μ L del sustrato y el cromógeno en cada pozo, cubrir nuevamente la placa e incubar a 36.5° C 15 a 30 minutos revisando constantemente la formación de color. Leer la placa en un lector de ELISA, a 450 nm.

Las absorbancias obtenidas se relacionaron con la curva de calibración de antígeno libre (hidrocortisona) que se ajustó con los valores obtenidos del testigo de conjugado, una muestra que resulte con absorbancia mayor a la de la curva de calibración, tendrá que diluirse con PBS y volver a analizarse conforme al procedimiento previamente descrito.

Simultáneamente se realizó el corrimiento de estas mismas muestras utilizando el estuche de referencia

7.2 Análisis estadístico

Se obtuvieron los coeficientes de correlación entre el método estandarizado propuesto y el estuche de prueba utilizado como referencia (Cortisol salivary HR ELISA, Diagnostics DRG™), para determinar la variación, inter-ensayo e intra-ensayo. Para lo anterior se efectuó la correlación de Pearson en el programa estadístico SPSS versión 11.5 y ANOVA.^{37,38,}

8. RESULTADOS

Cuantificación de proteínas del conjugado antigénico

Posterior a la purificación de los conjugados antigénicos obtenidos en el laboratorio se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

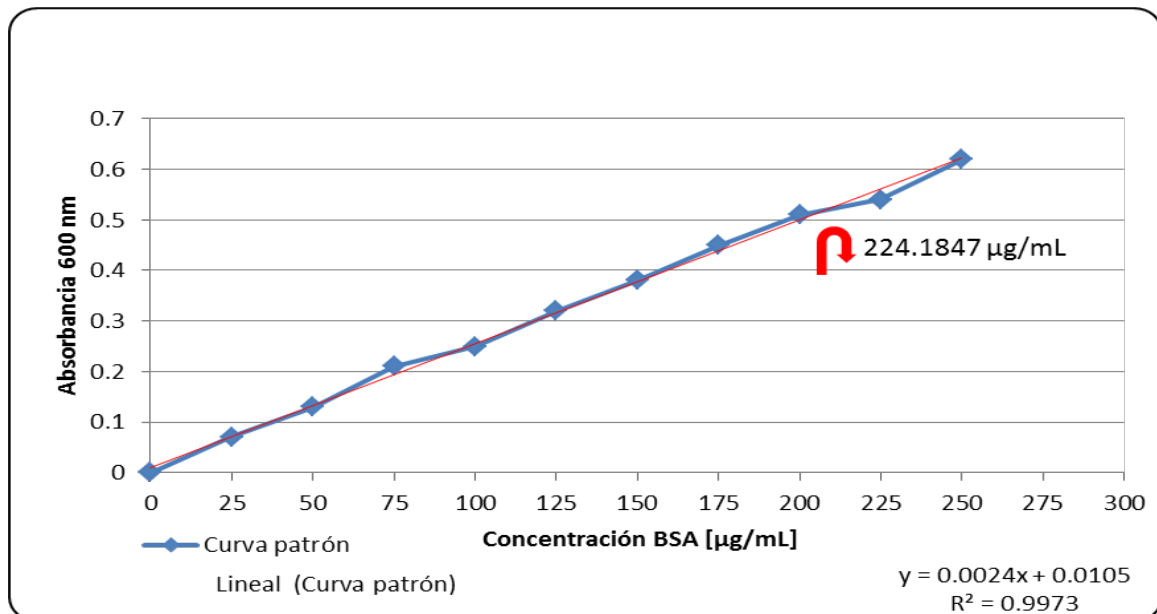


Figura 7. Curva patrón de proteínas por el método de Lowry, en rojo curva estándar de proteínas, en azul curva lineal obtenida por regresión lineal, donde se interpola la absorbancia obtenida de la dilución 1:50 de conjugado antigénico.

Cálculos

Ecuación de la recta $y=mx+b$

Donde

x = concentración de proteínas (BSA)

y = absorbancia

m = pendiente

b = ordenada al origen

$$y=0.0024x+0.0105$$

$$x=0.56-0.0105/0.00245$$

$x=224.184782$ por el factor de dilución 50

Concentración final de conjugado antigénico: 11,209.239 µg/mL.

Cuantificación de proteínas para el anticuerpo anti-cortisol.

Después de la inmunización con el conjugado antigénico cortisol-ovoalbúmina, se obtuvo el antisuero anticortisol, que posteriormente fue purificado por precipitación con sulfato de amonio y se realizó la cuantificación de proteínas.

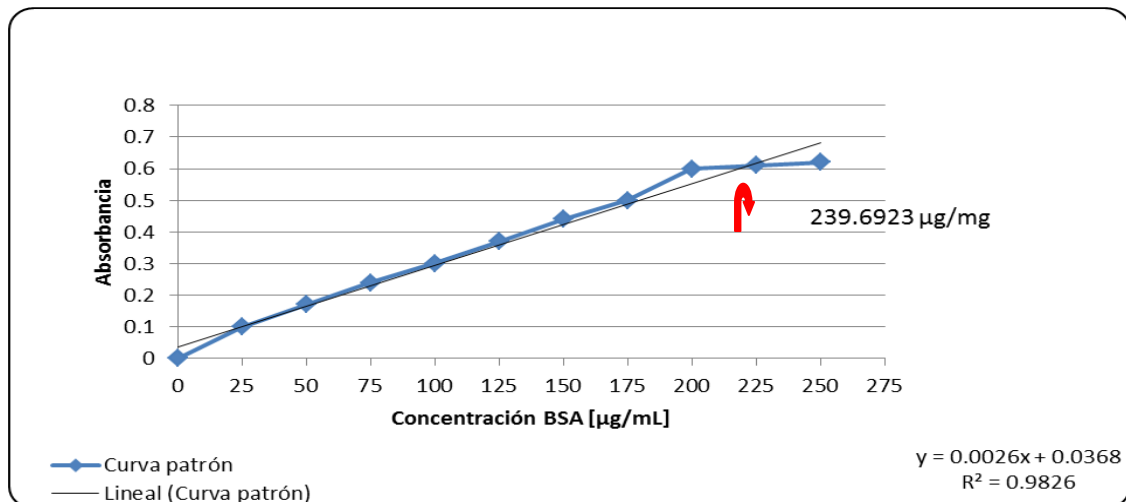


Figura 8. Curva patrón de proteínas por el método de Lowry, en negro curva estándar de proteínas, en azul curva lineal obtenida por regresión lineal donde se interpola la absorbancia obtenida de la dilución 1:20 del anticuerpo.

Cálculos

Ecuación de la recta $y=mx+b$

$$y=0.0026x+0.0368$$

$$x=0.66-0.0368/0.0026$$

$$x=239.692307 \text{ por el factor de dilución } 20$$

Concentración final del anticuerpo anti-cortisol: $4,783.8461 \mu\text{g/mL}$.

Resultados de la titulación del conjugado anti-cortisol

Se realizó la titulación del conjugado anti-cortisol por el método de tablero de ajedrez; estableciéndose que la dilución de conjugado con mejor respuesta frente a las diversas disoluciones de antígeno (cortisol-BSA) es 1:200

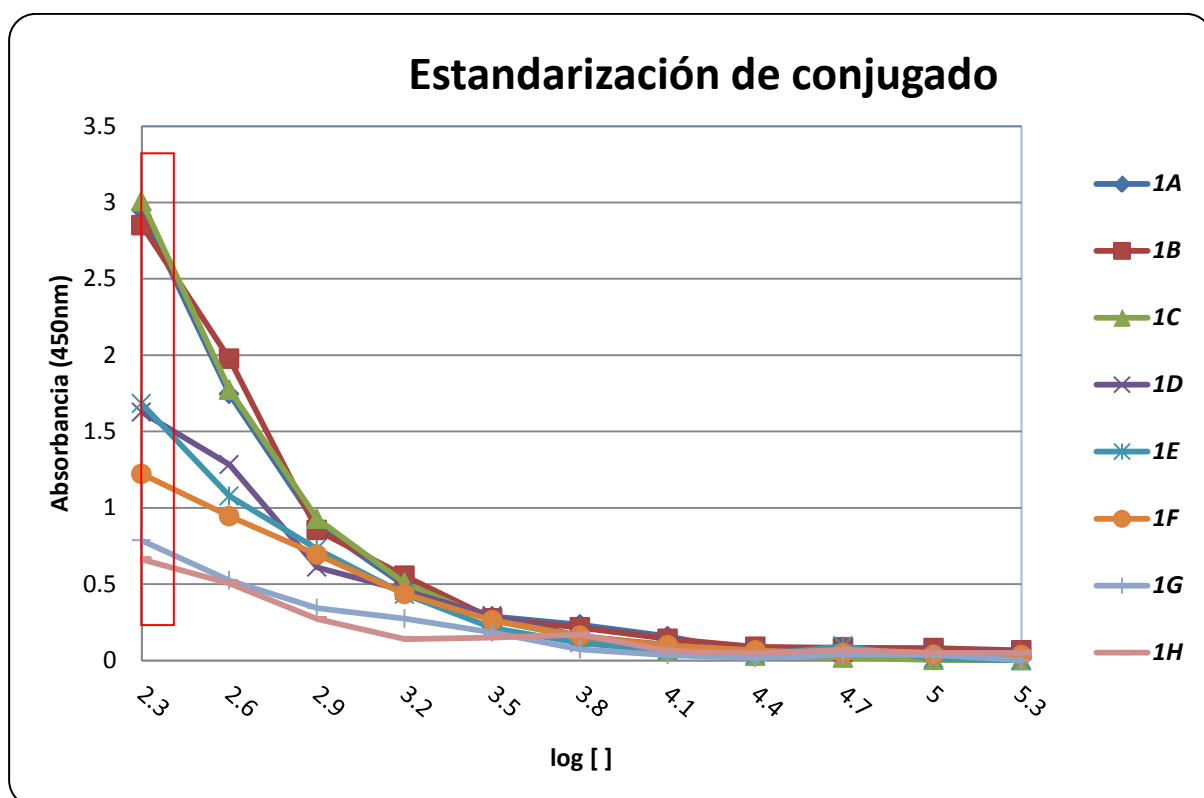


Figura 9. Comparación de las respuestas a las diversas diluciones de conjugado obtenido frente a diferentes diluciones de antígeno. Marcada en el recuadro rojo la dilución del conjugado con la mejor respuesta en relación con las diluciones de antígeno.

Titulación del antígeno (cortisol-BSA)

Se realizó la determinación de la concentración de antígeno necesaria para llevar a cabo el ensayo por la técnica de ELISA competitiva determinándose una concentración óptima al 80% de 8.76 microgramos/mL.

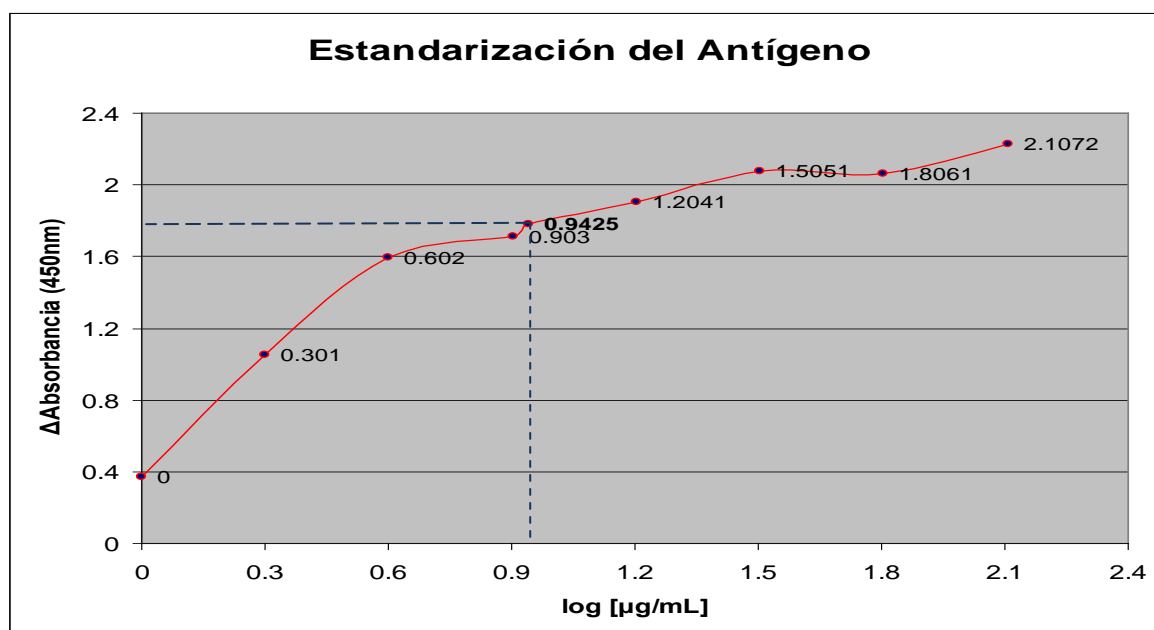


Figura 10. Determinación de la concentración requerida de antígeno (cortisol-BSA), para la estandarización de la técnica de ELISA competitiva, punteada en azul el punto de saturación del sistema correspondiente al 80%.

Elaboración de la curva de calibración (antígeno libre)

Se llevó a cabo la elaboración de una curva de calibración para poner a prueba la técnica de ELISA competitiva utilizando las concentraciones propuestas derivadas de los ensayos antes realizados tanto para antígeno como para conjugado. Se utilizó como antígeno libre, hidrocortisona químicamente pura. Determinando una sensibilidad para los reactivos utilizados en este ensayo de 50 ng/mL.

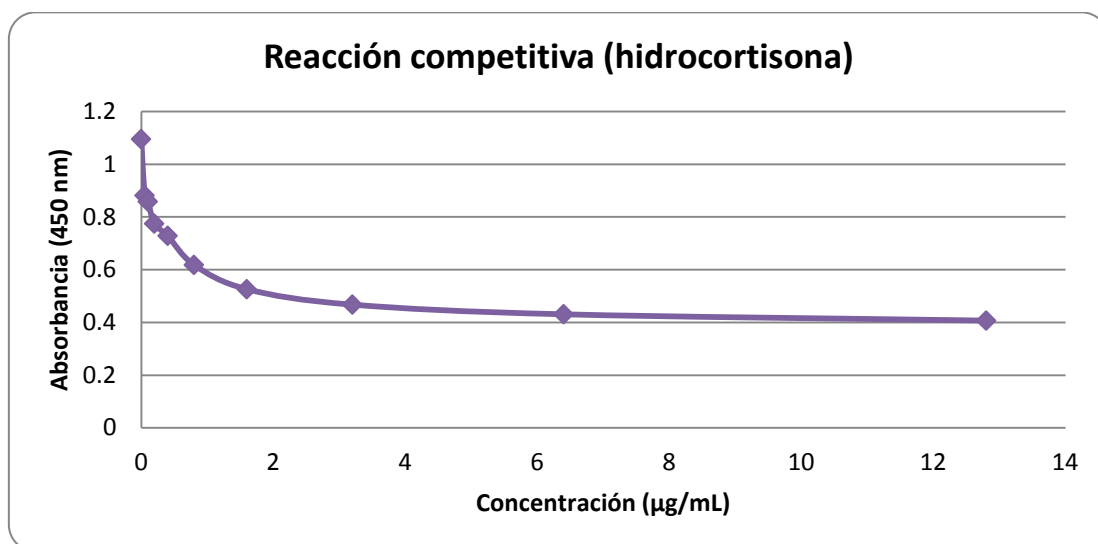


Figura 11. Gráfico obtenido de las diferentes absorbancias obtenidas por la técnica de ELISA competitiva versus concentración del antígeno libre (hidrocortisona).

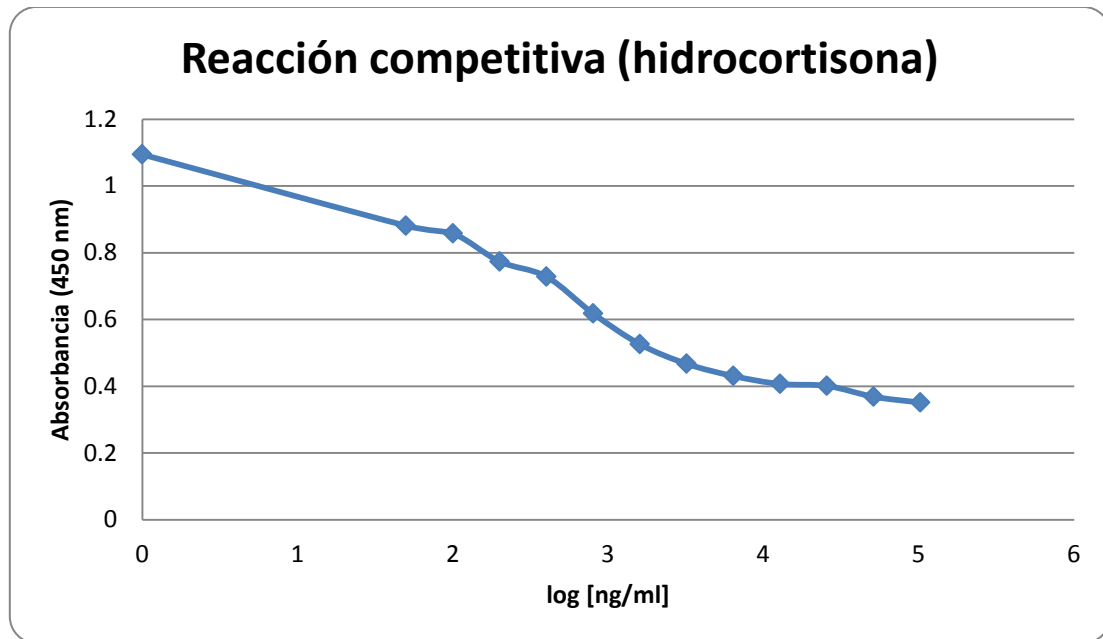


Figura 12. Gráfico linealizado aplicando logaritmo a las concentraciones de antígeno libre y representadas en nanogramos por mililitro, se puede observar por la tendencia del gráfico donde comienza a obtenerse las lecturas perceptibles para el antígeno libre.

El presente trabajo formó parte del proyecto CONACYT: *Relación del Síndrome de Quemarse por el trabajo y marcadores de salud cardiovascular en trabajadores de distintas ocupaciones*, en el cual uno de sus objetivos era el desarrollo de herramientas instrumentales para la determinación y cuantificación de biomarcadores relacionados con el síndrome de quemarse por el trabajo. El tratamiento de las muestras obtenidas se menciona puesto que la técnica implementada en este trabajo fue utilizada para el desarrollo de proyectos alternos, sin embargo el manejo, resultados y estadísticas no forman parte de este proyecto.

Se recolectaron 1.252 muestras de saliva de trabajadores de diversas profesiones en el Distrito Federal susceptibles a cuantificar altos niveles de cortisol derivado de las exigencias de su vida laboral principalmente.

Se realizó la técnica de ELISA competitiva, fue posible el tratamiento del 60.23% del total de las muestras las cuales se reportaron en concentraciones de nanogramo por mililitro.

Se utilizó la variable de absorbancia para minimizar los efectos del factor de dilución que pudieran presentar las muestras al ser procesadas, de esta manera se aplicó el modelo de regresión a las variables obtenidas reportando una R cuadrado de 0.98

Al realizar la prueba de ANOVA se observó que los valores de absorbancia entre el método de referencia y el método propuesto tienen una significancia de $P= 0.0001$, por lo que no existe una diferencia entre las medias de los valores obtenidos por el método estandarizado y el de referencia.

Con la correlación de Pearson se pudo determinar que existe una buena correlación entre los valores obtenidos entre ambas pruebas, siendo paralelas una respecto a la otra, en cuanto al comportamiento que siguen, demostrando el grado de asociación entre una y otra.

9. ANALISIS DE RESULTADOS

En este proyecto se llevo a cabo la elaboración de los reactivos biológicos y se determinaron las cantidades óptimas, para desarrollar la estandarización de la técnica de ELISA para cuantificar el cortisol en saliva. Esto servirá posteriormente como parámetro para determinar un estado de estrés fisiológico.

La estandarización de una técnica de ELISA competitiva para la cuantificación de cortisol en saliva dio como resultado la elaboración de dos reactivos biológicos en el laboratorio (antígeno y anticuerpo), utilizando como primer paso dos proteínas de fácil adquisición y bien conocidas como la ovoalbúmina y BSA las cuales fueron acopladas a la molécula de cortisol para conferirle a esta molécula propiedades antigénicas, a través de síntesis química según la metodología que describe S. Nara et al.³³, la cual refiere las condiciones de temperatura que debe mantener la mezcla de reacción en la síntesis del antígeno sintético las cuales deben de ser a 4°C por 24 horas, sin embargo en el desarrollo de nuestro proyecto se obtuvieron excelentes resultados (rendimientos) con agitación a temperatura ambiente por 24 horas con lo cual se facilito la preparación del antígeno sintético.

Así mismo se realizó la inoculación de uno de los haptenos obtenidos (ovoalbúmina-cortisol) en un conejo por vía subcutánea en compañía de un coadyuvante completo de Freud, como describe R. Marroquín et al.³⁴ La cantidad de antisuero obtenida fue excelente lo cual permitió la realización de las múltiples titulaciones y diluciones que fue necesario realizar, demostrando contener altos niveles de anticuerpo como se determinó en la cuantificación de proteínas (Figura 7 y 8).

La purificación del anticuerpo por precipitación con sulfato de amonio, resulto ser un medio fácil y económico este fue cuantificado por método de Lowry otra técnica ya bien establecida por su practicidad, confiabilidad y reactivos de fácil acceso. Posteriormente el anticuerpo se conjugo con peroxidasa de rábano, esta enzima es muy estable de fácil acceso y de propiedades bien establecidas, el método utilizado

fue el de Avrameas o del glutaraldehído el cual garantizo la eliminación de grupos funcionales que pudieran interferir en las reacciones a realizar, así mismo se duplicaron las cantidades utilizadas para asegurar el total acoplamiento de todo el anticuerpo y finalmente se dializo con buffer de carbonatos para eliminar todo el glutaraldehido.

Se estandarizo la cantidad de conjugados requeridos para la elaboración de la técnica, para lo cual se realizaron siete series de diluciones que se colocaron en una placa de ELISA de poliestireno irradiada con luz UV para conferir mayor viscosidad a la misma, y colocando testigos de buffer de carbonatos, utilizando como bloqueador gelatina al 1%, por ser una proteína totalmente diferente a las utilizadas en la estandarización, se rebeló con ortofenilendiamina a 450 nm en un lector de ELISA. De lo anterior se observó que la disolución 1:200 para el anticuerpo conjugado es la que mejor responde respecto a diferentes concentraciones de antígeno. De forma similar se realizó la misma batería de disoluciones para establecer la concentración de antígeno requerida, basándose en el 80% de saturación del sistema que es cuando ya se han ocupado la mayoría de los sitios de unión del anticuerpo, observando que la concentración de antígeno optima es de 8.76 microgramos/mL (Figura 9).

Estandarizadas las concentraciones para realizar la técnica de ELISA, fue necesario conocer la sensibilidad del sistema propuesto para lo cual se utilizó cortisona pura en presentación del fármaco Flebocortic™(Janssen Cilag) utilizado como antígeno libre, el cual fue pesado y del cual se realizaron once diluciones, para posteriormente aplicar el mismo protocolo de la técnica de ELISA anteriormente descrita pudiendo establecer la sensibilidad del sistema propuesta hasta en 0.4µg/mL o 400 ng/mL (Figura 10 y 11).

Para determinar la confiabilidad, de manera paralela se analizó un grupo de muestras de saliva que como ha reportado H.Brouset et al.⁶ se ha convertido en uno de los medios más confiables para cuantificar cortisol, utilizando el método de ELISA establecido en comparación a un estuche de referencia (Salivary cortisol HS ELISA™), el cual sigue el mismo fundamento que la técnica propuesta en este

proyecto. De acuerdo a la correlación de Pearson, se determinó una correlación significativa entre ambos métodos, resultando ser paralelas una respecto a la otra, pudiendo ser confiable el método propuesto para la determinación de cortisol en saliva.

En la actualidad es difícil establecer un valor de corte para este tipo de ensayos por la naturaleza de la molécula analizada así como sus patrones de secreción como describe W. Gozansky et al.²⁴, en el cual estas diversas variables complican el establecer referencias sólidas llevando a que cada laboratorio determine sus valores de corte. Para fines prácticos en este proyecto se tomó como referencia el valor de corte establecido por el estuche de referencia utilizado.

La técnica de ELISA tiene una gran ventaja por su simplicidad, sensibilidad y especificidad. La estandarización de la prueba de ELISA para determinar cortisol en saliva fue realizada con la tentativa de obtener una prueba altamente sensible y específica, su desarrollo logró conjuntar varios conceptos y aplicaciones en la formación de un QFB, resultando altamente reproducible y de aplicación práctica para laboratorios docentes.

10. CONCLUSIONES

- ✓ Se estandarizó la técnica de ELISA competitiva para determinar cortisol en saliva, a partir de los reactivos biológicos.
- ✓ Se obtuvieron por síntesis orgánica dos moléculas hapteno.
- ✓ Se determinaron las concentraciones óptimas de antígeno y anticuerpo para el desarrollo de la técnica de ELISA.
- ✓ Se determinó la sensibilidad de los reactivos biológicos.
- ✓ Se obtuvo una óptima correlación de la técnica propuesta con la de referencia.

11. PREPARACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO

Solución salina fisiológica SSF

Cloruro de sodio NaCl.....	8.5 g
Agua destilada.....	1000 mL

Preparación de buffer

Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.4 (PBS)

Cloruro de sodio NaCl.....	8.0 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0.2 g
Fosfato de sodio dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	2.9 g
Cloruro de potasio KCl.....	0.2 g
Agua bidestilada.....	1000 mL

Solucion amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.05%

Cloruro de sodio NaCl.....	8.0 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0.2 g
Fosfato de sodio dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	2.9 g
Cloruro de potasio KCl.....	0.2 g
Tween 20.....	0.5 mL
Agua bidestilada.....	1000 mL

Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 1M pH 9.5

Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃).....	1.59 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃).....	2.93 g
Agua destilada.....	1000 mL

Lisina 0.2 M

L-Lisina.....	146 mg
Agua destilada.....	5 mL

Reactivos para determinación de proteínas

Solución A

Carbonato de sodio al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio 0.1 N.

Solución B

Cu₂SO₄ al 0.5 % de agua destilada

Solución C

Mezclar 50 mL del reactivo A con 1 mL del reactivo B.

Solución D

Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Sustrato de Peroxidasa de rábano**Solución A**

Fosfato bibásico dodecahidratado de sodio (Na₂HPO₄.12H₂O) 0.2 M.....1.4 g
Agua destilada.....50 mL

Solución B

Acido cítrico 0.1 M.....1.0507 g
Agua destilada..... 50 mL

Solución de trabajo C

24.3 mL de solución A

25.7 mL de solución B

Mezclar las cantidades arriba indicadas para obtener un volumen total de 50 mL de solución de trabajo.

Preparación del sustrato colorimétrico

O-fenilendiamina.....20 mg (proteger de la luz)
Peróxido de hidrogeno al 30%20 µL
Solución de trabajo C.....50 MI

Disolver en la solución de trabajo C los 20 mg de O-fenilendiamina y agregar los 20 µL de peróxido de hidrogeno al 30% (realizar esta solución al momento de ser utilizada).

Bloqueador para ELISA

Gelatina para agar al 1%.....0.5 g
Agua destilada.....50 mL

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anderson SC, Cockayne S. Química Clínica. México: Mc Graw-Hill, 1995; p.95-107, 481-486, 539-547.
2. Katzung BG. Farmacología básica y clínica, 10 ma ed. México: Manual Moderno, 2007; p. 659-670.
3. Glándulas suprarrenales. HyperText Transfer Protocol [on line] Agosto 2011 [citado 08 Octubre 2011] Disponible en: URL: <http://www.cienciasnaturalesonline.com/wp-content/uploads/2010/05/glandulas-suprarrenales.png>
4. Druker S. Disorders of adrenal steroidogenesis. *Pediatr Clin N Am.* 1987; 34: 1055-1066.
5. Cortisol. Enciclopedia Médica. HyperText Transfer Protocol [on line] Agosto 2011 [citado 18 Agosto 2011] Disponible en: URL: http://www.ferato.com/wiki/images/1/17/20080728_mgb_Cortisol .jpg
6. Brouset HD, Galindo MF, Valdez PR, Romano PM. Cortisol en saliva, orina y heces. *Vet México.* 2005; 36 (3):325-337.
7. Miralles JM, Hiperkortisolismo de origen suprarrenal: Síndrome de Cushing. *Medicine.* 2008;10(15):967-75.
8. Benítez JD. Valoración del estrés oxidativo producido por el ejercicio físico inducido en dos grupos de varones prepuberales y puberales [Tesis doctoral]. Córdoba: Universidad de Córdoba; 2008.
9. Larsson CHA, Gullberg BO, Rastam L, Lindblad U. Salivary cortisol differs with age and sex and shows inverse association with WHR in Swedish women: a cross-sectional study. *BMC Endoc. Disord.* 2009; 9:16.

-
-
10. Greenberg N, Carr JA, Summers C, Summers CH. Causes and consequences of stress. *Integr and Comp Biol.* 2002; 42: 508-516.
 11. Mahia VM, Díaz BA, García M, Hernández J, Alonso C. Estudio de los niveles de cortisol serico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Rev Mex Patol Clin.* 2009; 56(4): 257-261.
 12. Montoro J, Mullol J, Jáuregui I, Davila I, Ferrer M, Bartra J, et al. Stress and allergy. *J Invest Allerg Clin.* 2009; 19(1): 40-47.
 13. Pruessner JC, Hellhammer DH, Kirschbaum C, Bournout, perceived stress, and cortisol responses to awakening. *Psychosom Med.* 1999; 61: 197-204.
 14. Steptoe A, Gylfe A, Shamaei-Tousi A, Bergstrom S. Pathogen burden and cortisol profiles over the day. *Epidemiol Infect.* 2009; 1: 1-9.
 15. Bellanti JA. *Inmunología*, 3ra ed. México: Interamericana, 1980; p.87-116.
 16. Arce MA. *Inmunología e inmunopatología oral*. México: Manual moderno, 2009; p. 70-71.
 17. González de Buitrago JM. *Técnicas y métodos del laboratorio clínico*. España: Elsevier Masson, 2010; p.131-158.
 18. Barret JT. *Inmunología. Inmunoquímica e Inmunobiología*, 4ta ed. México, D.F.: Interamericana; 1985. p. 29-47, 101-143.
 19. Peña J. *Inmunopatología. Bases moleculares y celulares*. México: ARAN, 2000; p. 78-82.
 20. Hyde A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) an overview. *Advance for medical laboratory professionals* 2006;9: 14-16.

-
21. Soluciones ELISA, protocolos y técnicas. Cultek [on line] Feb. 2006 [citado 05 Mayo 2011] Disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
22. Galicia JG. Estandarización de la técnica de ELISA polimixina para la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras de individuos con enfermedad periodontal. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, FES Zaragoza, UNAM. 2009.
23. Cardona NI, Lora F, Gomez JE. Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón. Parasitol Latinoam. 2005; 60: 97-101.
24. Gozansky WS, Lynn JS, Laudenslager ML. Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. Clin Endocrinol. 2005; 63: 336-341.
25. Lewis JG. Steroid analysis in saliva: An overview. Clin Biochem. 2006; 27: 139-146.
26. Poll ME, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. Clin Chem . 2007; 382: 15-19.
27. Llana CP. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11:E449-55.
28. Zarate DN, Leyva ER, Franco MF. Determinación de pH y proteínas totales en saliva en pacientes con o sin aparatología ortodóncica fija. Rev. Odont Mex. 2004; 8(3): 59-63.
29. Maina G, Bovenzi M, Palmas A. Association between two job stress models and measures of salivary cortisol. Int Arch Occup Environ Health. 2009; 6: 30-33.
-

-
-
30. Banderas JA, González M, Sánchez M. Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana. *Salud Pública México*. 1997; 39(5): 433-441.
31. Martini PL, Análisis estadístico de los cambios de valores de cortisol salivar como indicador de estrés en profesionales de la odontología. [Tesis de Licenciatura]. Guatemala: Universidad Francisco Marroquín, Facultad de odontología; 2002.
32. Kidd S, Midgley P, Lone N, Wallace M. A re-investigation of saliva collection procedures that highlights the risk of potential positive interference in cortisol immunoassay. *Steroids* 2009; 74: 666-668.
33. Nara S, Tripathi V, Chaube K, Rangari K. Influence of hydrophobic and hydrophilic spacer-containing enzyme conjugates on functional parameters of steroid immunoassay. *Anal. Biochem.* 2008; 373: 18-25.
34. Marroquín SR, Flores PM. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2007. p.27.
35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
36. Avrameas S, Ternynck T, Guesdon JL. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Inmmunol.* 1978;8: 7-23.
37. Brossaud J, Barat P, Gualde D. Cross reaction elicited by serum 17-OH progesterone and 11-desoxycortisol in cortisol assay. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 407: 72-74.
38. Basu A. Nara S, Chaube S, Rangari K. The influence of spacer-containing enzyme conjugate on the sensitivity and specificity of enzyme immunoassay for hapten. *Clinica Chimica.* 2006; 366: 287-292.