

PC_06- ANÁLISIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN SALIVA MEDIANTE TÉCNICAS ELISA

Plataformas Científico-Tecnológicas: Laboratorios de Investigación

Plataforma de Proteómica

Técnico Especialista Responsable: Sonia Morales Santana

www.ibsgranada.es



ibs.GRANADA
INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
BIOSANITARIA

PC_06- Análisis de hormonas esteroideas en saliva mediante técnicas ELISA

1. Antecedentes

Las hormonas esteroideas producidas por el ovario (por ejemplo, estrógenos y progesterona) y el testículo (por ejemplo, la testosterona) y por las glándulas suprarrenales (por ejemplo, cortisol) constituyen un ejemplo de sustancias que se pueden medir en la saliva. Estas hormonas circulan en el torrente sanguíneo unidas a proteínas de transporte y en menor porcentaje lo hacen en forma libre. La fracción libre pasa a la saliva y su concentración salival es reflejo de la cantidad de hormona que produce el cuerpo.

2. Ensayo.

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es un método de prueba basado en anticuerpos. Esta tecnología de uso extendido es sensible, rápida y fiable.

Principios del ensayo ELISA

Los anticuerpos son proteínas producidas en las células plasmáticas de los vertebrados como parte del sistema inmunitario adaptativo frente a estructuras (antígenos) que el cuerpo reconoce como elementos extraños. Los anticuerpos se enlazan a los antígenos correspondientes utilizando un patrón diferenciado de interacciones iónicas e hidrofóbicas, enlaces de puente de hidrógeno y fuerzas de Van-der-Waals. La interacción entre el anticuerpo y el antígeno correspondiente es selectiva y muy específica, similar a la de una cerradura y una llave.

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas se basa en este reconocimiento anticuerpo-antígeno selectivo y específico. Se han establecido muchos formatos de ensayos ELISA cualitativos y cuantitativos. La realización de un ensayo ELISA requiere como mínimo un anticuerpo específico para un antígeno concreto. De acuerdo con el método básico, uno de los componentes inmunológicos se inmoviliza en una fase sólida, en las cavidades de la placa de microtitulación. El analito de la muestra interactúa en el sistema anticuerpo-antígeno. Esta interacción se puede visualizar mediante enzimas, enlazadas a anticuerpos primarios o secundarios, e indica si se ha producido un enlace antígeno-anticuerpo. La enzima enlazada convierte en el caso de uso de enzima, un sustrato agregado, lo que da lugar a un cambio de color, que se puede medir mediante un espectrofotómetro.

Tipos de ELISA, según marca comercial:

Como ya hemos comentado en la introducción, en base al modo en el que se den las interacciones antígeno-anticuerpo, los ELISAs se clasifican en 4 tipos: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich y ELISA competitivo.

1. ELISA directo

El ELISA directo es el ensayo ELISA más simple y rápido de todos, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se unirá directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación del mismo.

2. ELISA indirecto

Es un ensayo parecido al ELISA directo, pero en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. En este caso se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, y es este último el que irá conjugado a una enzima.

3. ELISA tipo sándwich

En el [ELISA tipo sándwich](#) el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección también conocidos como [pares de anticuerpos](#), que se unirán a dos epítomos distintos de un mismo antígeno.

4. ELISA competitivo

El ELISA competitivo es una variante más compleja de la técnica ELISA, también conocido como ELISA de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario.

Se utiliza generalmente para detectar y/o cuantificar antígenos presentes en muy bajas cantidades.

Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de interés presente en la muestra.

3. Equipos de análisis y muestras a analizar.

- a) **Lector de placas Varioskan**, modelo Modular Multimode
- b) **Tipo de muestra:** saliva
- c) **Especies:** Humano
- d) **Volumen requerido:** 50 µl por muestra (mejor entregar exceso). Si requiere duplicados o triplicados, hay que entregar la muestra correspondiente.

4. Reactivos.

Kit comercial (dependiendo de preferencias de cliente y disponibilidad de analitos en casas comerciales). Tenemos experiencia para estos ensayos con hormonas salivares con la casa comercial LDN y Cayman.

5. Ensayo Elisa.

El protocolo de cada ensayo elisa está determinado por la casa comercial donde se adquiere el kit.

6. Recepción de muestras.

- Las muestras serán entregadas por el investigador o por la empresa transportadora a la hora acordada (antes de las 10:00 de la mañana).
- Se avisará al técnico al menos dos días antes de la recepción con objeto de que el equipo esté previamente preparado.
- Tras la recepción de la muestra, el técnico responsable del área le dará entrada en su hoja de registro y se la identificará con el nombre del investigador, lugar de procedencia y el código indicado por el responsable del proyecto.
- Las muestras se habrán centrifugado a 5000g durante 20 minutos, entregando los sobrenadantes alicuotados en placas de 96 pocillos, con su correspondiente hoja de registro de muestras entregada en Excel

7. Precios.

Solicitar precios a la Plataforma.

8. Contacto.

- **Técnico Especialista Responsable Plataforma de Proteómica**
Dra. Sonia Morales Santana
Mail: smorales@ibsgranada.es
Teléfono: 676131460
- **Coordinadora Laboratorios de Investigación**
Dra. Paloma Muñoz de Rueda
Mail: palomalancha@ibsgranada.es
Teléfono: 958023980
- **Web:** <https://www.ibsgranada.es/plataformas/plataforma-de-genomica-y-proteomica/>
- **Solicitud de recurso:** <https://www.ibsgranada.es/solicitud-de-recursos-de-la-unidad-cientifico-tecnica-de-laboratorios-de-investigacion/>
- **Tarifas:** <https://www.ibsgranada.es/wp-content/uploads/2020/11/Lista-de-Tarifas-UCT-Lab-Investigacion-2022-v02.pdf>