



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**FACTIBILIDAD Y APLICABILIDAD DE SALIVA Y CABELLO COMO
MUESTRAS NO INVASIVAS PARA LA DETECCIÓN DE HORMONAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTOR: SIMÓN ZAPATA NORAMBUENA
PROFESORA GUÍA: TM. Mg Cs. ROXANA ORREGO CASTILLO**

**TALCA, CHILE
2022**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

Dedicatoria:

A mi familia por su apoyo incondicional en este largo trayecto académico, especialmente a mi madre quien siempre creyó en mi desde que tomé la decisión de empezar a estudiar esta hermosa carrera, también a mi prima Paola Salgado quien siempre estuvo ahí en mis momentos de dudas y debilidad emocional, dándome ánimos para levantarme y seguir adelante en este arduo trayecto. Y a todas aquellas personas que aportaron su granito de arena para ayudarme a ser quien soy en este momento.

Agradecimientos:

A mis docentes de la Universidad de Talca quienes participaron en mi formación profesional con sus enseñanzas y consejos, con mención especial para la profesora Roxana Orrego, la cual me entregó las herramientas y la confianza para encaminar mis últimos años de vida universitaria. A mis compañeros, amigos y futuros colegas que compartieron conmigo y me dieron su apoyo en varias etapas del camino. Por último, a todas las personas que trabajan en la Universidad que permiten su correcto funcionamiento para que como estudiantes podamos aprender de mejor manera.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GENERAL:.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN	12
MARCO TEÓRICO	14
1) HORMONAS Y SU IMPORTANCIA EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	14
1.1) Introducción a las hormonas y la endocrinología	14
1.2) Importancia de la medición hormonal clínica.....	18
2) MUESTRAS PARA LA MEDICIÓN HORMONAL	21
2.1) Muestras en la clínica y la investigación	21
2.2) Muestras no invasivas.....	22
3) MÉTODOS DE MEDICIÓN HORMONAL DISPONIBLES PARA SU USO EN SALIVA Y CABELLO.	36
3.1) Radioinmunoanálisis (RIA)	36
3.2) Enzimoinmuno análisis (EIA).....	37
3.3) Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS).....	39
4) METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS NO INVASIVAS Y RESULTADOS OBTENIDOS.....	44
4.1) ELISA.....	44
4.2) RIA	56
4.3) Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas	61
5) BENEFICIOS DEL USO DE MUESTRAS NO INVASIVAS	70
6) ESTADO DEL ARTE EN CHILE.....	77
CONCLUSIONES.....	79
BIBLIOGRAFÍA	81

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Principales hormonas del tipo esteroideas del cuerpo humano.	15
Tabla N° 2: Ejemplos de hormonas tróficas hipofisarias, hormonas de órganos diana y su concentración en plasma sanguíneo.	17
Tabla N° 3: Ejemplos de enfermedades endocrinas y su sintomatología clínica:	19
Tabla N° 4: Hormonas esteroidales encontradas en la saliva.	35
Tabla N° 5: Procedimiento para ELISA en saliva según DiaMetra.	50
Tabla N° 6: Resultados obtenidos por Calamari y colaboradores.	58
Tabla N° 7: Recopilación de estudios con muestras no invasivas.	73
Tabla N° 8: Recopilación de estudios de cortisol en retrospectiva del cabello.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Ilustración del folículo piloso seccionado.	24
Figura N° 2: Etapas del crecimiento capilar.....	25
Figura N° 3: Figura esquemática del funcionamiento hormonal dentro del folículo piloso.	28
Figura N° 4: Representación del ingreso de las hormonas al cabello.	29
Figura N° 5: Folículo piloso y hormonas que se pueden encontrar en él.....	30
Figura N° 6: Representación de las glándulas mayores	31
Figura N° 7: Célula acinar y los componentes de la secreción salival.	33
Figura N° 8: Esquema representativo de un ELISA directo.....	38
Figura N° 9: Representación esquemática de una cromatografía.....	40
Figura N° 10: Diagrama básico de una espectrometría de masas,.....	41
Figura N° 11: Esquemización del proceso de una espectrometría de masas en tándem (MS/MS).....	43
Figura N° 12: Metodología utilizada en el estudio de Slominski.....	46
Figura N° 13: Metodología utilizada en el estudio de Tisdale.	48
Figura N° 14: Metodología recomendada por DiaMetra.....	49
Figura N° 15: Metodología usada por Aydin y Ugur.....	52
Figura N° 16: Comparación entre los niveles de asprosinina e IMC en el estudio de Ugur y col.	53
Figura N° 17: Metodología del kit ELISA DES6611 de la empresa Demeditec Diagnostics	55
Figura N° 18: Metodología utilizada en el estudio de Calamari y colaboradores.....	57
Figura N° 19: Metodología utilizada en el estudio de Bakker-Huvenaars y col.	60
Figura N° 20: Metodología utilizada en el estudio de Althaus y colaboradores.	61
Figura N° 21: Metodología utilizada en el estudio de Kruijff y colaboradores.	63
Figura N° 22: Metodología utilizada en el estudio de Gao y colaboradores.....	64
Figura N° 23: Metodología utilizada en el estudio de Li y colaboradores.	66
Figura N° 24: Metodología utilizada en el estudio de Han y colaboradores.....	68
Figura N° 25: Representación evolutiva de las metodologías para medición hormonal.....	69

Figura N° 26: Mecanismo de aumento del cortisol debido a una punción venosa..... 71

Figura N° 27: Representación de la longitud de cabello y la retrospectividad hormonal. ... 74

RESUMEN

Enfoque: La medición hormonal es una herramienta útil para la investigación, permite comprender al cuerpo y asociar esos valores a alguna condición que la persona este cursando en ese momento. Las muestras no invasivas comprenden un gran número de matrices que destacan por no incluir una perforación en la piel de la persona de la cual se obtiene, reduciendo con ello la variabilidad causada por el trauma de una punción.

Metodología: La presente revisión recopiló información de bases de datos como PubMed, ScienceDirect, entre otras, sobre el uso de cabello y saliva para la medición hormonal en la investigación y cómo estos metabolitos pueden ser cuantificados a partir de dichas muestras.

Objetivos: Recopilar información acerca del uso de muestras no invasivas para la medición hormonal, destacando sus beneficios e importancia para la población.

Resultados de la búsqueda: Las hormonas, fisiológicamente se pueden encontrar en el cabello y la saliva debido a la circulación sanguínea y las características de cada estructura, estas pueden ser cuantificadas por diversos métodos, como inmunológicos o basados en su masa atómica. Cada investigador establece un protocolo de medición para su estudio, no existiendo una única forma de trabajar. Los beneficios expuestos son: Una muestra libre de estrés y una matriz que permite cuantificar hormonas a largo plazo, es decir, en retrospectiva

Conclusiones: El uso de estas muestras abre nuevos horizontes para los investigadores, dado los beneficios que estas presentan, su uso es una opción que está disponible en el mundo, incluyendo a Chile y los estudios realizados en su territorio.

Palabras clave: No invasivo, medición hormonal, cabello, saliva, estrés, largo plazo

INTRODUCCIÓN

Históricamente el laboratorio clínico ha sido una red de apoyo continuo para el diagnóstico de los pacientes, entregando información que no se obtiene a simple vista o con una exploración rápida por parte del profesional clínico. Hoy en día es difícil poder entregar una valoración para una persona que acude a una consulta médica, sin solicitar exámenes complementarios que nos entreguen esa visión más específica de lo que ocurre con el paciente en ese momento.

Uno de los exámenes diagnósticos más importantes y solicitados que se realizan en la clínica diariamente, son las mediciones hormonales. Las hormonas cumplen diversas funciones en el organismo, por ejemplo, participan regulando y manteniendo ciclos, además de la homeostasis, la cual se define como la regulación de todos los procesos que se llevan a cabo internamente, conservando un estado de salud en cada persona o también llamado homeostasis corporal. Como ejemplo se puede mencionar el cortisol, el cual tiene efectos sobre el sistema óseo, el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, las respuestas del sistema inmune, entre otras funciones. También está la testosterona, hormona importante que permite el desarrollo de características sexuales tanto primarias como secundarias (1). Por lo cual un desbalance en dichos metabolitos, pueden desencadenar problemas fisiológicos en las personas, alterando el equilibrio entre salud y enfermedad, lo que podría llegar a dañar el bienestar de cada uno (1).

Las muestras usadas para la realización de los exámenes son variadas, desde la sangre total, plasma o suero, orina, o líquidos corporales, estos últimos con un acceso difícil como el líquido céfalo raquídeo o el líquido sinovial. Todas estas muestras tienen sus ventajas y desventajas a la hora de aplicar la técnica correspondiente para lo que se quiera medir. Se hace necesario mencionar que el principal problema de algunas muestras es la invasividad y malestar que podría causar a una al momento de la obtención de esta, a esto se le puede sumar

un aumento en los niveles de estrés. Por lo que se han buscado metodologías que tratan de evitar estos problemas.

El uso de muestras no invasivas como cabello y saliva no es algo que se haya desarrollado hace poco tiempo, una de las primeras investigaciones realizadas data desde 1979, donde *Baumgartner y col.* demostraron que era posible la detección de opiáceos en pelo de rata mediante radioinmunoensayo (RIA), metabolitos similares a las hormonas humanas debido a su estructura. El estudio destaca no solo que la positividad de los ensayos fue superior en comparación con muestras de orina, sino que también la obtención de las muestras de pelo fue más sencilla y que la retención de las drogas en esta se da por largos periodos de tiempo (2). Esta investigación fue una de las pioneras en este aspecto, destacando los beneficios de esta modalidad a la hora de realizar cuantificaciones a muestras que no son las clásicas usadas en la clínica.

Es por lo antes mencionado que toma importancia la constante actualización del laboratorio clínico en técnicas para la obtención de dichos resultados, además de las matrices que se trabajan para la recuperación de las hormonas en los pacientes. Hoy en día dicha actualización de métodos se ha llevado a cabo mediante diversos estudios, que cada vez permiten una mejor separación y cuantificación de dichas moléculas de interés clínico, implementando técnicas más modernas. Por lo que el propósito de la presente investigación se basa en buscar nuevas fuentes de muestras para la medición de hormonas para contribuir con un mejor diagnóstico clínico, además el beneficio para el laboratorio y la investigación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Recopilar información acerca del uso de muestras no invasivas como cabello y saliva en la detección de hormonas en seres humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evidenciar la importancia del uso de muestras de cabello y saliva en la detección de hormonas para la población.
2. Revisar información acerca de los métodos y técnicas disponibles para la obtención de muestra y medición hormonal en cabello y saliva.
3. Mostrar los beneficios del uso de muestras no invasivas en la clínica y en la investigación.

METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

1) Términos de búsqueda:

Se realizó una búsqueda con los siguientes términos:

- Hormone, Hair Cortisol, LC-MS cortisol measurement, Salivary cortisol.
- Stress cortisol, Human steroid hormone, Hair cortisol and stress, Salivary cortisol and stress, Endogenous hair hormone.
- Radioimmunoassay, LC-MS hormone measurement, Human hair hormone measurement.
- Quantification hormone human hair, Quantification hormone human saliva, LC-MS human hair measurement.
- Hair cortisol retrospective marker, Salivary hormone biochemical marker, Hair, Saliva.

2) Bases de datos incluidas en la búsqueda:

Se consideraron estas bases de datos debido a la gran cantidad de información que se maneja en ellas y por la naturaleza del estudio, estas fueron: Science Direct, Web of Science, PubMed, Scielo, ElSevier, Nature, Scopus además de la inclusión del motor de búsqueda de Google Scholar. Para la contextualización e inclusión de material fisiológico se consideraron libros presentes en la literatura.

3) Años de publicación:

Para la realización de la presente revisión no se consideró un límite en las fechas de búsqueda con el fin de recabar la mayor cantidad de información posible que cumpla con los criterios de inclusión.

4) Criterios de inclusión

- Estudios que usaron como muestras para la obtención de hormonas cabello y/o saliva humana.
- Estudios que usaron como muestras para la obtención de hormonas cabello y/o saliva animal.
- Estudios que usaron cabello o saliva para la obtención de resultados en detección de hormonas
- Libros de fisiología y endocrinología en cualquier idioma disponible.
- Estudios en cualquier idioma en las bases de datos mencionadas.

5) Criterios de exclusión

- No se incluyeron criterios de exclusión en la presente revisión

MARCO TEÓRICO

1) HORMONAS Y SU IMPORTANCIA EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO.

1.1) Introducción a las hormonas y la endocrinología

La endocrinología es una rama de la medicina que se encarga de estudiar las glándulas de secreción interna del cuerpo humano, no solo en su estructura morfológica, sino también en sus funciones tanto de síntesis como de liberación y control de los metabolitos que produce (1). Estos metabolitos corresponden a las hormonas, mensajeros químicos que fueron definidos en el año 1902 por William Bayliss y Ernest Starling como sustancias químicas producidas por glándulas endocrinas, las cuales a través de vasos sanguíneos de la microcirculación adyacente a ellas pueden liberar a estas moléculas al torrente sanguíneo, una vez alcanzado el órgano diana o target pueden cumplir su función. Dicho órgano posee los receptores adecuados para identificar al metabolito, generando una cascada de señalización que puede producir diversos efectos en dicha células (3). Como ejemplo de glándula se puede nombrar a la hipófisis, la cual ha sido referida como la “glándula maestra”, la cual trabaja en conjunto con el hipotálamo, generando un complejo que es capaz de regular diversas funciones en el ser humano, en base a la secreción de hormonas como: Hormona del crecimiento (GH), Hormona luteinizante (LH), Hormona foliculoestimulante (FSH), entre otras. (4)

Dentro de las funciones de estas moléculas, se destaca la mantención de la homeostasis corporal, basado en el control de diversos ámbitos en el cuerpo humano. Pueden regular el metabolismo basal de las células, permiten controlar la concentración de elementos como fósforo y calcio en el torrente sanguíneo, así como su disponibilidad para los tejidos que los requieran, pueden regular la concentración de glucosa sanguínea como los hace la

insulina, hormona producida por el páncreas (1). Por lo que su adecuada concentración tanto a nivel de la circulación sanguínea como en otros tejidos es sumamente importante para el mantenimiento de todos los procesos en los que participan.

Cabe mencionar que las hormonas poseen una variada composición en lo que estructura y función se refiere. En la Tabla 1 se mencionan algunas hormonas de carácter esteroideal, además se aprecia su clase, donde destacan, por ejemplo, la testosterona como un andrógeno o el cortisol, un fuerte representante de los glucocorticoides producido por la glándula suprarrenal.

Tabla N° 1: Principales hormonas del tipo esteroideas del cuerpo humano. Tomado y adaptado de Petrovic, 2013 (5).

Clase	Compuesto	N° CAS	Fórmula Química
Andrógenos	Androsterona	53-41-8	C ₁₉ H ₃₀ O ₂
	Metil testosterona	58-18-4	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
	Testosterona	58-22-0	C ₁₉ H ₂₈ O ₂
Estrógenos	17β-Estradiol	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂
Glucocorticoides	Cortisol	50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅
	Cortisona	53-06-5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅
	Prednisona	53-03-2	C ₂₁ H ₂₆ O ₅
Progestágenos	Progesterona	53-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

Los procesos que estudia la endocrinología son altamente regulados por parte del organismo, generando una estabilidad que es dependiente de factores tanto externos como la exposición a la luz, la hora del día o la nutrición de cada persona, así como de factores internos como el control neuronal (6).

Las hormonas al igual que otros metabolitos que se encuentran en circulación sanguínea no poseen una concentración a valores fijos a lo largo de la vida o incluso a lo largo del día. Un ejemplo de esto es la hormona cortisol y su regulación a nivel sistémico, la cual es producida por las glándulas suprarrenales, órgano que se encuentran en la región posterior medial del abdomen. Su corteza posee tres capas, una glomerular, una fasciculada y la capa reticular, es en estas últimas dos donde se produce la hormona mencionada. El proceso de secreción de este metabolito y de otros glucocorticoides también producidos por las suprarrenales, comienza con la interacción hipotálamo-hipófisis, en la cual se producen y liberan otras hormonas. La hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), estimula a la hipófisis para que sintetice y libere a la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual viaja a través de la circulación sistémica hasta su órgano diana, que es la corteza de las glándulas suprarrenales. Una vez ahí esta última estimula la producción del cortisol y otros esteroides. (1)

La ACTH al igual que otras hormonas hipofisarias es liberada en pulsos que varían a lo largo del día, siendo de mayor aumento en las primeras horas de la mañana, y mínima en las últimas horas de la tarde, como se aprecia en la Tabla 2, al igual que otros ejemplos como la TSH, la cual tiene una concentración mucho menor en comparación con su contraparte, la Triyodotironina o T3. Cabe destacar que la activación del eje hormonal ACTH también aumenta con la exposición de la persona a niveles de estrés agudo, orgánico o psicológico, llevando a un incremento en las concentraciones de cortisol y ACTH sanguíneas (1). Por lo que dichos valores no solo se mueven por ritmos diarios, sino también, por elementos ajenos al cuerpo humano como lo son las situaciones estresantes.

Tabla N° 2: Ejemplos de hormonas tróficas hipofisarias, hormonas de órganos diana y su concentración en plasma sanguíneo. Tomado y adaptado de Molina, 2014 (6).

Hormona trófica de la hipófisis	Hormona del órgano diana
ACTH (Hora: 8 AM.) <80 pg/mL	Cortisol (Hora: 8AM.) 5-25 µg/dL
GH <5 µg/L	IGF-1 140-400 ng/mL
LH (adulto) Mujer: 5-25 UI/L Hombre: 5-20 UI/L	Estradiol Mujer: 20 -60 pg/mL Hombre: < 50 pg/mL
FSH Mujer: 5-20 UI/L Hombre: 5-20 UI/L	Progesterona Mujer: Pico de la fase lútea > 75 ng/mL Hombre: < 2 ng/mL Testosterona Mujer: < 1 ng/mL Hombre: 3 a 10 ng/mL
TSH 0,4-5 mU/L	Tiroxina 5-12 mg/dL Triyodotironina 70-190 ng/dL

También se hace necesario mencionar que esta variación puede darse por elementos exógenos o ajenos al cuerpo humano, así lo destaca un estudio el cual ha demostrado que la concentración en sangre de las hormonas, como el cortisol y la cortisona, se ve afectado de manera significativa por elementos externos al cuerpo humano como pueden ser agentes tóxicos, como pesticidas o medicamentos de uso periódico como es el caso de los anticonceptivos. Meulenber y colaboradores, en su estudio realizado el año 1987 comparó dos grupos de mujeres, uno control que no consumía ningún medicamento y otro que consumía anticonceptivos orales, específicamente etinilestradiol y desogestrel. En este estudio mediante detección por radioinmunoensayo, se logró determinar que existía un aumento significativo en el cortisol de las muestras, de las muestras de sangre de las pacientes sometidas al estudio que consumían los fármacos antes mencionados. Por otro lado, los niveles de cortisona plasmática en dicho grupo se encontraron disminuidos en comparación con las de grupo control (7).

Debido a lo antes mencionado es que toma importancia la participación del laboratorio en la medición de estos metabolitos, con esto se logra mantener un control periódico de sus concentraciones con el fin de tener una visión más completa de que podría estar ocasionando un cuadro clínico en un paciente.

1.2) Importancia de la medición hormonal clínica.

Como se mencionó anteriormente, un desbalance en la secreción de las hormonas genera una pérdida de la homeostasis corporal, lo cual puede producir ciertos cuadros patológicos que generan malestar y diversas manifestaciones clínicas en los pacientes. Como ejemplos es posible mencionar enfermedades como el hipertiroidismo, el cual se da por un aumento en la producción y secreción de hormonas tiroideas como la triyodotironina (T3) y la tetrayodotironina (T4). Este aumento en su concentración puede darse por diversos motivos, entre los cuales se destaca un aumento en la producción de hormona estimulante de tiroides (TSH), producida en la hipófisis, por alguna neoplasia en dicha glándula o directamente un aumento de tamaño en la tiroides que genere este cuadro. Este incremento de las hormonas tiroideas produce algunas manifestaciones en los pacientes como temblor, pérdida de peso, sudoración, entre otras manifestaciones características de la enfermedad (4). Otro caso puede ser el hipercortisolismo, que como su nombre lo indica, es un incremento en la producción y liberación de cortisol que supera los valores normales o rangos fisiológicos de esta hormona en la sangre, este aumento, al igual que la patología anterior puede darse por diversos motivos tanto a nivel hipofisiario como de la glándula suprarrenal como tal. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son hipertensión, intolerancia a la glucosa, disminución de la lívido en hombres, entre otras (6).

Los problemas endocrinológicos son variados, y estos pueden producir diversos signos o síntomas que demuestran enfermedades, como lo ejemplifica la Tabla 3. Estas alteraciones se pueden dar por un alza o una baja en la producción hormonal o posibles

problemas en la regulación de ese eje en particular. Las causas también son variadas y dilucidarlas se transforma en un problema a la hora de realizar el diagnóstico clínico. En la tabla N° 3 se destacan algunas de las principales enfermedades causadas por el desbalance en estos metabolitos.

Tabla N° 3: Ejemplos de enfermedades endocrinas y su sintomatología clínica: Tomado y adaptado de Valera, 2003 (8).

Enfermedad	Síntomas médicos comunes
Hipertiroidismo (tirotoxicosis)	Temblor, sudoración, pérdida de peso, intolerancia al calor.
Hipotiroidismo	Mixedema, piel seca, intolerancia al frío
Hiperparatiroidismo	Astenia, anorexia, fracturas, cálculos, úlceras pépticas.
Hipoparatiroidismo	Hiperreflexia, espasmos, tetania.
Hipercortisolismo	Aumento de peso, redistribución de la grasa corporal, fatigabilidad.
Insuficiencia suprarrenal	Pérdida de peso, hipotensión, pigmentación de la piel.
Hipoglucemia	Temblor, hambre, sudoración, astenia mareo.

La desregulación hormonal como se mencionó anteriormente desencadena una serie de eventos que pone en riesgo la salud humana, por lo que se hace necesario tener una monitorización constante de estos metabolitos. Esto permite la detección y posible diagnóstico de la causa del cuadro clínico que está cursando dicha persona, permitiéndole al profesional clínico tomar decisiones en beneficio del paciente a la hora de seleccionar el tratamiento para este, con tal de mejorar su condición. Además, es importante mantener un seguimiento de la evolución de este de manera periódica, con el fin de evaluar la respuesta a la terapia que le fue indicada, en caso contrario se deben tomar acciones para mejorarla.

En el seguimiento al igual que en el diagnóstico es donde participa el laboratorio clínico, en la realización de los exámenes que permiten la cuantificación hormonal y entregan esos datos de utilidad para el diagnóstico. Estos exámenes se basan en diversas técnicas como el inmunoensayo de quimioluminiscencia IE-QL o CLIA por sus siglas en inglés, radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmuno análisis ligado a enzimas (ELISA), entre otras (9). Cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas desde el punto de vista práctico, económico, rapidez, precisión, veracidad, entre otros apartados. Estas se encuentran estandarizadas en su procedimiento y promete la entrega de resultados fidedignos y lo más cercanas al valor verdadero posible para dicho método.

También se hace necesario mencionar el uso de estas mediciones en la investigación, con el fin de comprender de mejor manera los procesos fisiológicos y patológicos que ocurren en el ser humano, ya sea en base a estudios realizados en personas como en animales. Estos además buscan implementar nuevas técnicas que permitan mejorar tanto los tiempos de medición, como los posibles interferentes que se puedan encontrar a la hora de la realización de estas. Para en un futuro, poder implementarlas para el bien de la población, generando nuevas oportunidades que permitan a los laboratorios clínicos actualizarse y permitir un avance en las mediciones hormonales.

2) MUESTRAS PARA LA MEDICIÓN HORMONAL

2.1) Muestras en la clínica y la investigación

Una muestra para la realización de un examen se define como una parte representativa de la persona, la cual ha sido destinada a entregar información sobre los sistemas biológicos de cada uno (10). Los tipos de muestra mayormente usada en la clínica, específicamente en la endocrinología son el plasma o suero sanguíneo, dependiendo de que examen se solicite en cada caso o la saliva para algunos tipos particulares (9). Este último es un ejemplo de una muestra de baja invasividad o también conocido como muestra no invasiva. Esta se caracteriza, como su nombre lo indica por representar una mínima o nula invasión al momento de recolectar la muestra, como lo indica la Clínica Universidad de Navarra en su definición para invasividad en su diccionario médico, el cual corresponde a un procedimiento el cual obliga a penetrar o perforar el cuerpo de una persona mediante una incisión en la piel o a través de la introducción de un cuerpo extraño al organismo por accesos no naturales (11). Este concepto nos indica que cualquier muestra que se obtenga para la medición hormonal que involucre una aguja u otro elemento que perfore la piel sea considerado una muestra invasiva, esto incluye a las muestras de sangre que comúnmente se utilizan no solo para este tipo de medición, sino también para otros aspectos tanto en el laboratorio clínico como en la investigación.

El uso de muestras invasivas está completamente estandarizado y aceptado en el mundo científico y en los laboratorios clínicos chilenos, como lo podemos ver en la gran mayoría de manuales de toma de muestra en el país, los cuales nombran a la muestra de sangre como una de las más utilizadas a lo largo del tiempo (9).

Por otro lado, la contraparte de estas muestras comúnmente usadas corresponde a las muestras no invasivas, que como su nombre indica, no tienen la misma forma de obtención. En este caso sería toda aquella muestra que no involucre alguna perforación en el cuerpo

humano, o algún evento traumático en la piel de la persona. Como se mencionó anteriormente este tipo de muestras se ha usado en anteriores investigaciones, específicamente para la medición de opiáceos en ratas (2), en este estudio se declaran algunos conceptos que se vuelven interesantes con respecto a los posibles beneficios que tiene el uso de pelo o cabello en la medición hormonal. Entre estos se destaca la posibilidad de un resultado retrospectivo de la muestra a analizar, ya que aparentemente los componentes medidos se concentran en esta.

2.2) Muestras no invasivas.

Continuando con lo mencionado anteriormente corresponde hablar sobre las muestras no invasivas, dentro de este grupo tenemos varios ejemplos, como la orina, sudor, secreciones nasales, cabello, saliva, entre otros. Para términos de esta revisión se hablará de manera más detallada sobre las últimas dos mencionadas.

2.2.1) Cabello

El cabello forma parte del cuerpo de variadas especies animales, entre ellos mamíferos como los humanos, en estos el cabello o pelo cubre una parte importante de la superficie corporal, incluyendo cabeza (cuero cabelludo), brazos, piernas, abdomen, axilas y rostro, sin embargo, se excluyen algunas partes como las palmas de las manos y las plantas de los pies, los labios, los globos oculares y algunas zonas de los genitales externos. Dentro de sus funciones se destaca la protección que le otorga a la piel sobre algunos elementos externos que podrían dañarla, ayuda a mantener la homeostasis térmica, también ayuda a evitar que los ojos se vean expuestos al sudor producido gracias al actuar de las cejas y las pestañas. Cabe mencionar que también ayuda en la percepción sensorial, ya que permite distinguir ciertas sensaciones cuando algún objeto o elemento externo entra en contacto con este (12, 13).

El cabello humano es muy variable en sus características macroscópicas a lo largo del mundo, sin embargo, este posee algunas características que son comunes, como lo es su composición y estructura. El cabello este compuesto por tubos delgados de células epiteliales completamente queratinizadas y muertas (14)

La generación del cabello se produce en el folículo capilar o folículo piloso, este se divide en 3 compartimentos principales: el infundíbulo, el istmo y el segmento inferior o también llamado folículo inferior. El primero corresponde a la parte superior del folículo el cual parte desde la epidermis (parte superior) hasta el conducto sebáceo, el istmo comienza donde termina el segmento anterior, es decir la abertura del conducto sebáceo y se extiende hasta la protuberancia. Por último, el segmento del folículo inferior se extiende desde la protuberancia hasta la base del folículo o bulbo folicular (15). El bulbo folicular o bulbo del pelo consiste en queratinocitos en constante proliferación, además de la presencia de variados melanocitos productores de pigmentos que le entregan el color al cabello. Estos últimos también forman parte de la matriz capilar, la cual posee células similares a los fibroblastos especializadas (16).

Otro de los elementos importantes a considerar es la papila dérmica, la cual se encuentra dentro del bulbo piloso. Está compuesta de células de origen mesenquimal, y se cree que es uno de los componentes que participa de manera activa en la formación y crecimiento del tallo del pelo, ya que según algunos autores se ha demostrado que posee una gran cantidad de propiedades inductivas (14, 17).

Cada una de las partes del folículo piloso puede observarse en la figura 1, en la parte superior se puede apreciar las partes del pelo como tal, donde se nombra la corteza y la médula. Por otro lado, en la parte inferior se puede ver tanto la porción del bulbo piloso, el cual envuelve a la papila dérmica, también se aprecia la matriz y el sitio donde se encuentran los melanocitos.

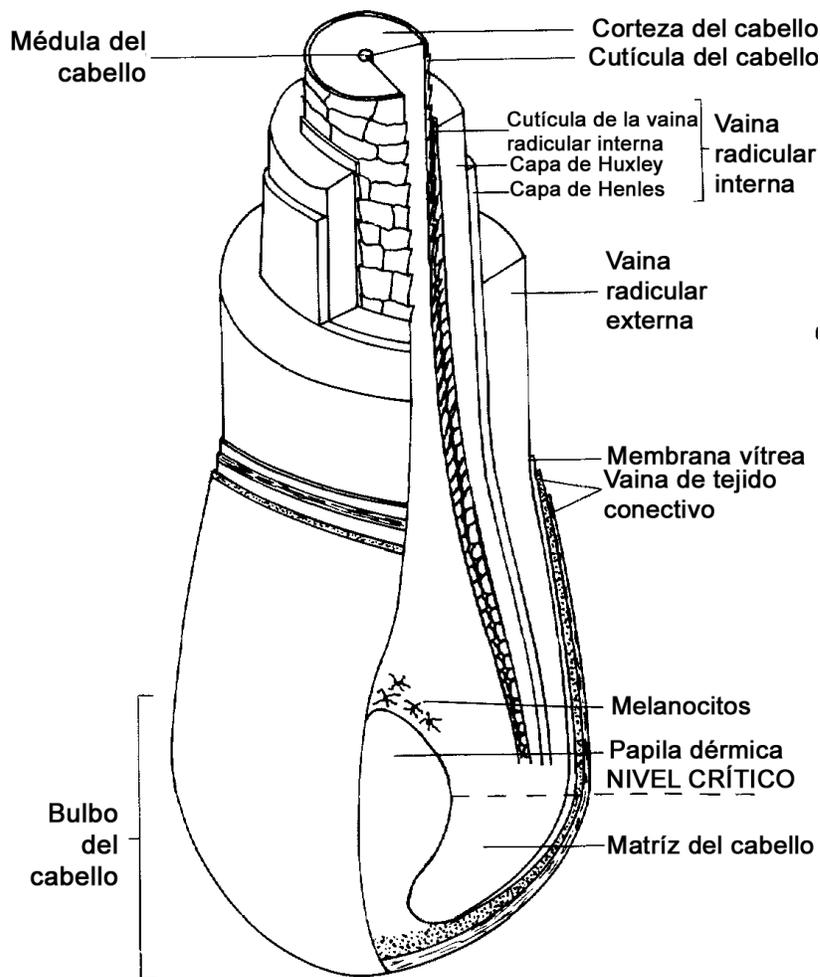


Figura N° 1: Ilustración del folículo piloso seccionado. Se observan las diversas partes del folículo. Tomado y adaptado de Randall 1994 (18)

El ciclo de crecimiento del cabello se divide en 3 partes principalmente, la primera conocida como fase anágena o de crecimiento, una vez alcanza su máxima longitud ocurre una fase de involución llamada catágena, donde se detiene la división celular y la pigmentación. El cabello pasa a transformarse en un elemento completamente queratinizado, con un extremo o “club” que se hincha y se mueve hacia la papila dérmica. El tercer periodo y último corresponde a la fase telógena, también conocida como fase de descanso, donde no

hay crecimiento del cabello ni hay actividad de las células que lo producen. Sin embargo, este periodo no es permanente, ya que en algún punto las células de la papila dérmica, además de los queratinocitos son reactivados para generar un nuevo folículo inferior que crece hacia el folículo superior original (14, 18, 19), cada una de estas fases se puede apreciar en la figura 2, donde se ve las fases, anágena, catágena y telógena, posterior a esta última el comienzo de una nueva fase anágena.

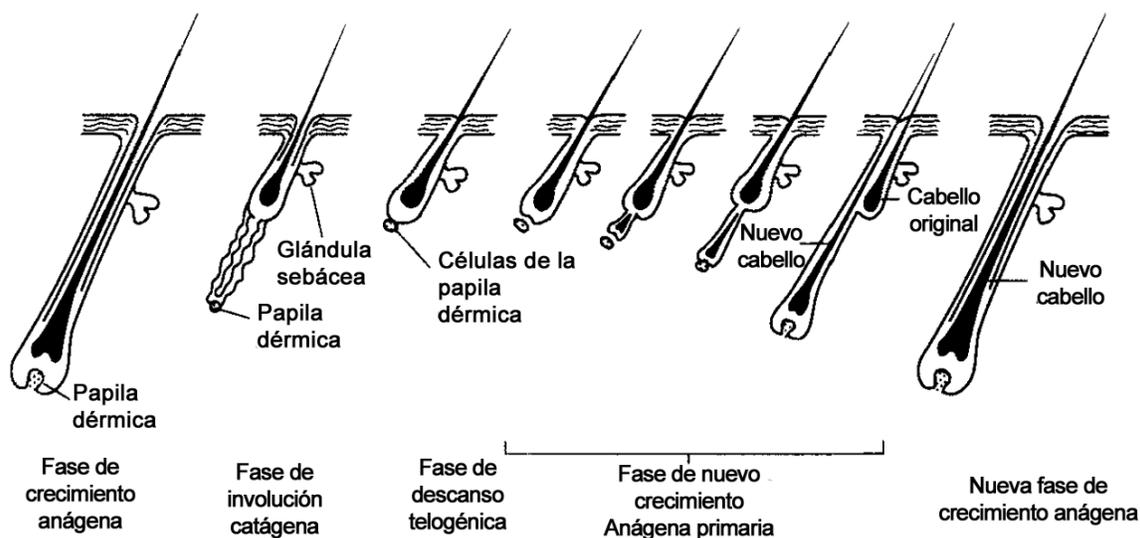


Figura N° 2: Etapas del crecimiento capilar, anágena, catágena y telógena. Tomado y adaptado de Randall, 1994 (18).

Fase anágena: Según algunos autores, esta fase puede llegar a dividirse en seis etapas (14). En las etapas iniciales se produce una proliferación celular de los progenitores foliculares, creciendo en la papila dermal, hacia debajo de la piel y se comienza a diferenciar las partes del cabello. Avanzadas las primeras etapas, los melanocitos de la matriz comienzan a mostrar una actividad de pigmentación y se comienza a producir el nuevo cabello. Finalmente en las últimas etapas se produce la formación del bulbo del pelo rodeando la papila dermal en el tejido subcutáneo (20). Cabe destacar un evento que ocurre en esta instancia, la cual es un incremento en la vascularización perifolicular, dada por la expresión

del factor endotelial de crecimiento vascular. Esta acción genera un aumento en la velocidad de crecimiento del cabello (21).

Fase catágena: También conocida como fase de regresión, es una etapa en la cual la proliferación y producción de los queratinocitos se ve reducida de manera significativa en la matriz, además se observa un término en la formación del tallo del cabello (22), además el compartimiento en donde se desarrolla el cabello reduce su tamaño hasta un 70% para permitir que el siguiente ciclo de crecimiento tenga la estimulación suficiente. Durante esta etapa se genera el “club”, antes mencionado. La papila dérmica se transforma en un grupo de células inactivas cercanas al folículo en regresión. También se da un proceso apoptótico en cada compartimento folicular (23). Este proceso de muerte celular es primordial para el ciclo de crecimiento del cabello.

Fase telógena: Esta última etapa o fase de descanso hay una muy baja cantidad de melanocitos productores de pigmentación, y la papila dérmica se compacta. Se produce un balance entre los estimuladores e inhibidores del crecimiento capilar, lo que genera la factibilidad de la iniciación de un nuevo ciclo (14), este proceso puede generarse de manera natural en base al aumento o disminución fisiológica de dichos compuestos, o puede producirse mediante efectos químicos o mecánicos como lo es la depilación o extracción completa del folículo piloso (24).

Todo lo anterior mencionado explica el crecimiento del cabello en base a su producción en el folículo piloso y cómo se genera el proceso en general, sin embargo, quedan algunas aristas que son interesantes de mencionar, y esto corresponde a la asociación entre el cabello y las hormonas producidas en el cuerpo humano.

Las hormonas cumplen un papel importante en lo que se refiere al crecimiento del cabello, entre ellas podemos mencionar a los estrógenos, glucocorticoides como el cortisol e incluso la hormona del crecimiento producida en la hipófisis. Sin embargo según algunos estudios son los andrógenos los que poseen el mayor impacto en lo que se refiere al crecimiento del cabello como tal (20). Uno de estos andrógenos corresponde a la testosterona,

hormona antes mencionada producida presente tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, su concentración es menor en el último grupo. Este metabolito actúa en la papila dermal, en la cual tiene receptores que la reconocen (25), incrementando el tamaño del folículo en las áreas que son dependientes de los andrógenos sexuales. Esto se da más en zonas como la barba en los hombres (20).

Otra hormona que se puede mencionar es el cortisol, conocida como la “hormona de estrés”, ésta también afecta el crecimiento del cabello como se demostró en un estudio, en el cual se consiguió encontrar cambios en el ciclo del crecimiento del cabello en ratones (26). Por otro lado otros estudios demuestran que tanto los folículos pilosos como las glándulas sebáceas en su conjunto (glándulas pilosebáceas), son órganos endocrinos de importancia tanto en investigación como en la clínica (20). Estos elementos tienen una sensibilidad alta con relación a las hormonas esteroidales como el cortisol y más específicamente del eje hipotálamo - pituitaria (hiófisis) - adrenal o HPA por su sigla (27, 28).

El estudio realizado por Ito y colaboradores en 2005 buscó demostrar el concepto de que dicha unidad pilosebácea es un órgano de importancia clínica. En dicha investigación se utilizaron cultivos de cabello humano y muestras de cabello recortado de personas posterior a un corte estilístico. Luego de la obtención de resultados se pudo establecer la consigna, además de que este órgano no solo se ve afectado por el eje HPA, sino que también es capaz de producir sus propias hormonas además de metabolizarlas. Esto incluye la producción de cortisol y su posterior retroalimentación. Los autores declaran que estos eventos se dan en respuesta a la piel, la cual sería el mediador a la respuesta del estrés periférico. Esto se puede apreciar en la figura número 3 en donde se esquematiza, cómo la producción hormonal dentro del folículo piloso genera su propio “eje HPA”, tanto con los estímulos e inhibiciones del sistema.

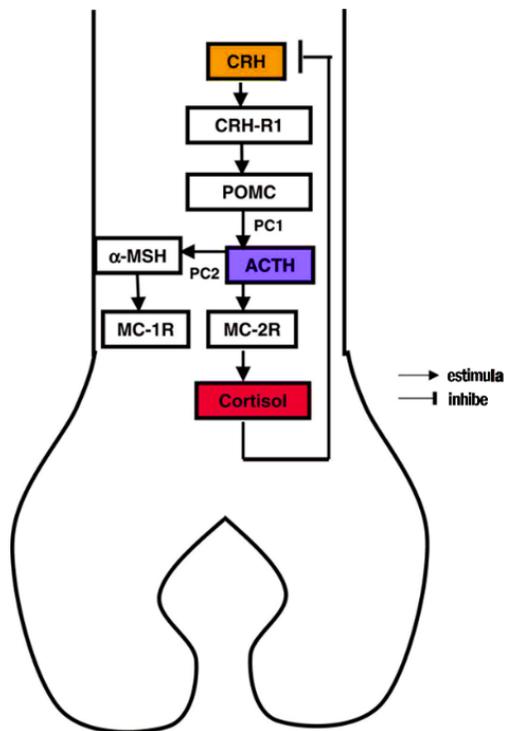


Figura N° 3: Figura esquemática del funcionamiento hormonal dentro del folículo piloso. Tomado y adaptado de Ito, 2005 (28).

Otros estudios han demostrado que el embarazo y su regulación hormonal propia produce cambios en las fases del cabello, manteniendo la fase anágena por más tiempo, sin embargo, posterior al nacimiento muchos folículos entran en las fases catágena y telógena. Se cree que dichas hormonas responsables son la prolactina, el estradiol entre otras (29).

El mecanismo de como las hormonas afectan al cabello es variado, pueden afectar la capacidad de las células de la matriz del pelo para dividirse, pueden cambiar o alterar la capacidad de pigmentación (14). En el caso particular de los andrógenos, al igual que otras hormonas de carácter esteroideo, son capaces de difundir por la membrana plasmática y pueden unirse a receptores específicos, lo que genera la transcripción de algunos genes en particular (30). En la figura 4 se aprecia un esquema en el cual se ve como las hormonas circulantes en la sangre, pueden ingresar al folículo piloso y generar sus efectos en dicha estructura.

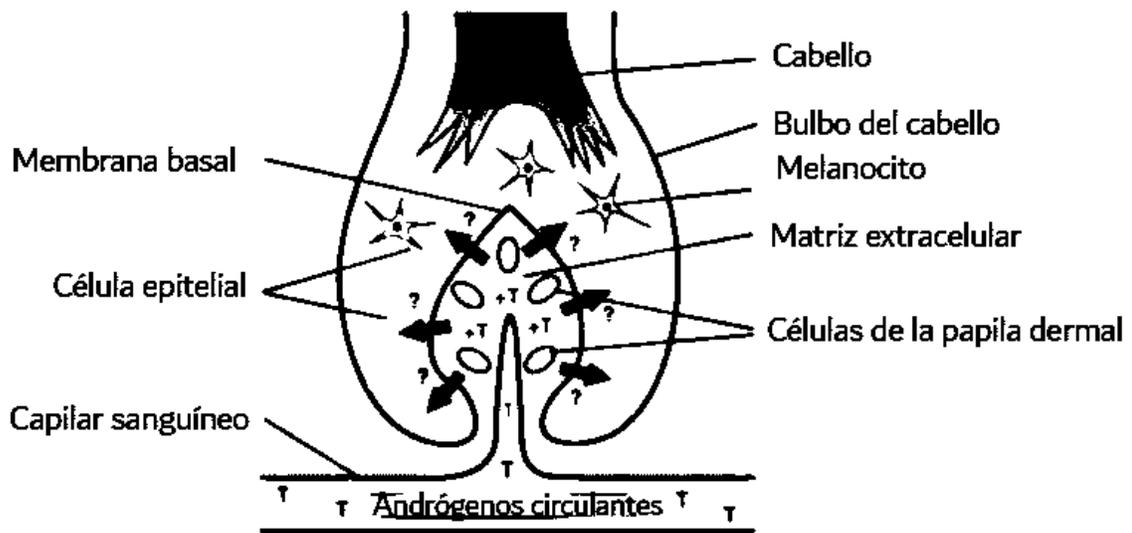


Figura N° 4: Representación del ingreso de las hormonas al cabello. Se aprecian los andrógenos circulatorios en el capilar sanguíneo y como ingresan a las partes del folículo piloso Tomado y adaptado de Randall, 2008 (31).

En resumen, se puede decir que las hormonas participan de manera activa en el desarrollo del folículo piloso, en más de alguna etapa de manera excitadora o inhibidora del ciclo antes mencionado. Esto finalmente nos indica que dichos metabolitos son un “target” importante en esta muestra biológica no invasiva. Como se aprecia en la figura 5, se tiene un esquema resumen de este apartado, en el cual se observan diversas hormonas que participan en el proceso de crecimiento del cabello.

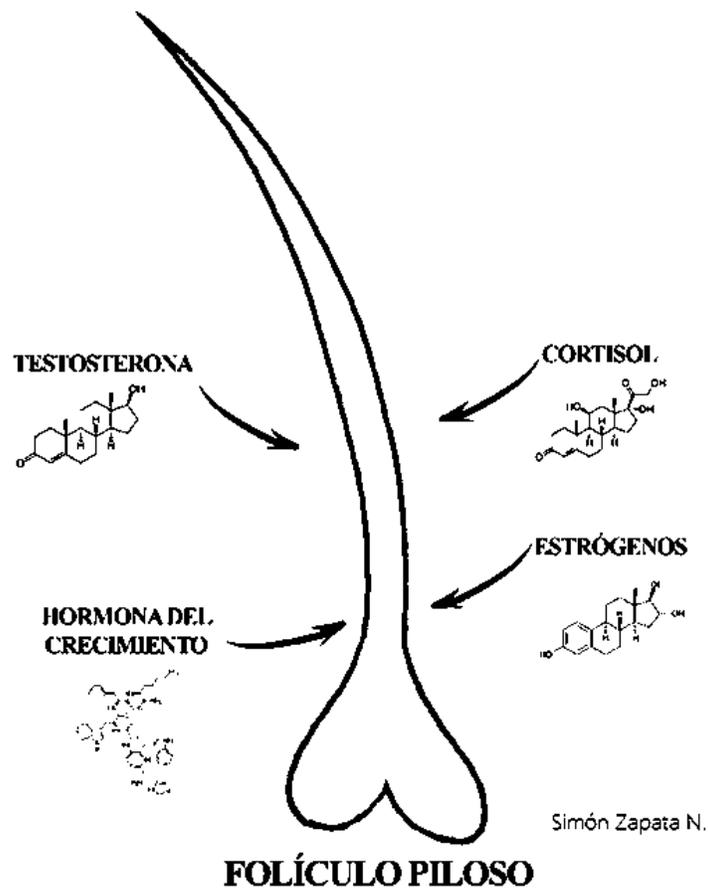


Figura N° 5: Folículo piloso y hormonas que se pueden encontrar en él. En el cual se observa la incorporación de algunas hormonas y su posterior concentración al interior. Elaboración propia.

2.2.2) Saliva

La saliva se conoce como una secreción fisiológica exocrina mucoserosa y de aspecto claro completamente normal en el ser humano y corresponde al fluido más valioso y fundamental por las funciones que realiza, se produce en la cavidad oral y se encarga de humedecer esta zona, considerando las mucosas internas de la boca y los dientes. También se encarga de la salud oral, mantención y preservación de la misma (32).

Anatómicamente la saliva es una mezcla compleja de varias secreciones, provenientes de las glándulas salivales y también del líquido gingival (33). Las glándulas que producen parte de la saliva completa son tres en total, glándula parótida, submandibular y maxilar, las cuales pueden verse en la figura número 6, en la cual se aprecia su ubicación anatómica y tamaño aproximado, además se puede comparar dicha medida con otros elementos de la cavidad oral. Sin embargo hay glándulas llamadas menores que producen parte de esta, como la glándula mucosa labial (34).

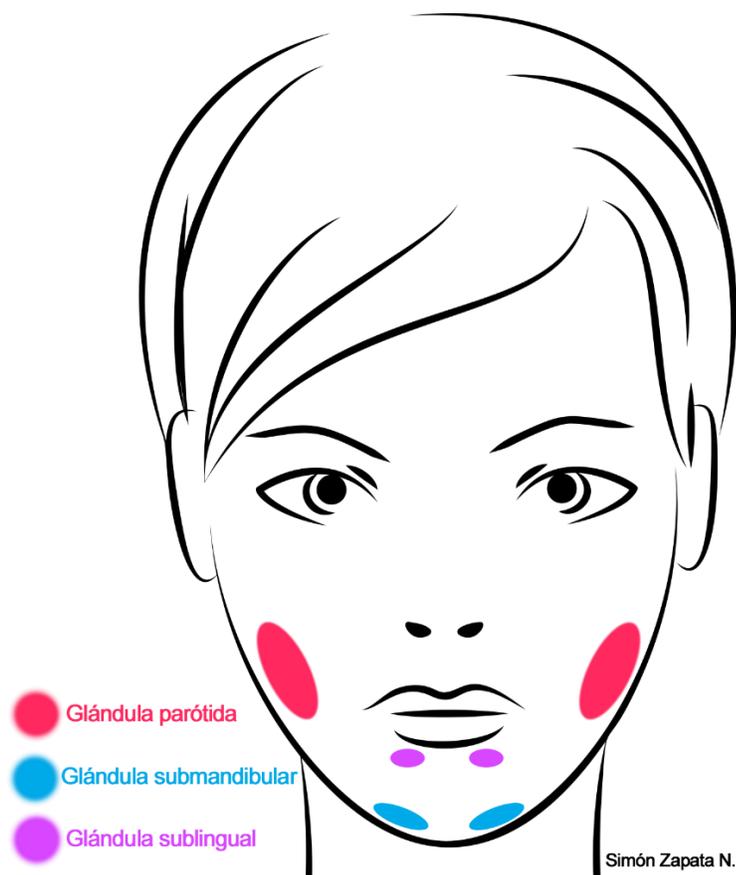


Figura N° 6: Representación de las glándulas mayores. En donde se pueden observar las glándulas parótida, submandibular y maxilar. Elaboración propia.

Estas glándulas mayores componen cerca del 90% de la saliva total, el resto se compone de varios elementos, como el líquido gingival antes mencionado, microorganismos, placa dental y restos de comida. Una persona al día puede producir hasta 1500 mililitros de

saliva y esta, en un 99% se compone de agua, el porcentaje restante lo abarcan algunos sólidos como proteínas y sales en dilución (35). También se encuentran algunos iones y otros compuestos orgánicos, algunos de ellos provienen de la sangre (33). Es esto último hace a la saliva un marcador biológico importante.

Las glándulas salivales están compuestas por tejido especializado y como toda glándula se puede dividir en dos zonas específicas, una ductal y una acinar. En esta última es donde se genera el líquido que compone la saliva y se secreta la mayor cantidad de proteínas. Los aminoácidos pueden ingresar al sistema acinar y se almacenan en gránulos para luego ser liberados (34).

El proceso de secreción salival es dependiente tanto de la irrigación sanguínea en la zona como de la inervación nerviosa, del sistema simpático como el parasimpático (36). En este proceso influyen diversos factores, entre los cuales encontramos la interacción con los alimentos y la lengua (en conjunto con sus receptores), la sensación que entrega el sabor de cada comida y el movimiento de la lengua. Dependiendo de que tipo de comida sea la secreción de una glándula en particular es mayor a la otra, lo que puede cambiar la composición de la saliva (37). También puede afectar la temperatura de la cavidad oral y la temperatura de los alimentos (38).

La saliva ha sido usada para la medición de metabolitos como hormonas esteroideas e inclusive en investigación se ha usado para reemplazar las muestras invasivas como la sangre (39). La manera en la que llegan las hormonas en la saliva está bien descrita en la literatura y en variadas investigaciones. Esta se puede asociar por ejemplo a la secreción de proteínas por parte de las células acinares que componen las glándulas salivales, se hace referencia a las proteínas debido a su similitud estructural con varias hormonas del organismo, esta secreción se da principalmente por exocitosis (38). Las células acinares son estimuladas vía sistema nervioso, en este caso, autónomo. Los gránulos que contienen las proteínas viajan hasta la zona apical de la glándula en la cual son expulsadas (40). También cabe mencionar que otras proteínas llegan a la saliva por otros mecanismos, como transporte vesicular. En la figura 7 se puede observar una representación de cómo las proteínas

sanguíneas pueden ingresar al acino o célula acinar en conjunto con otros elementos como fluidos salivares y proteínas de la misma saliva, esto permite finalmente una concentración de estos elementos en la glándula, los cuales pueden llegar a ser excretados mediante la producción de saliva por parte del organismo.

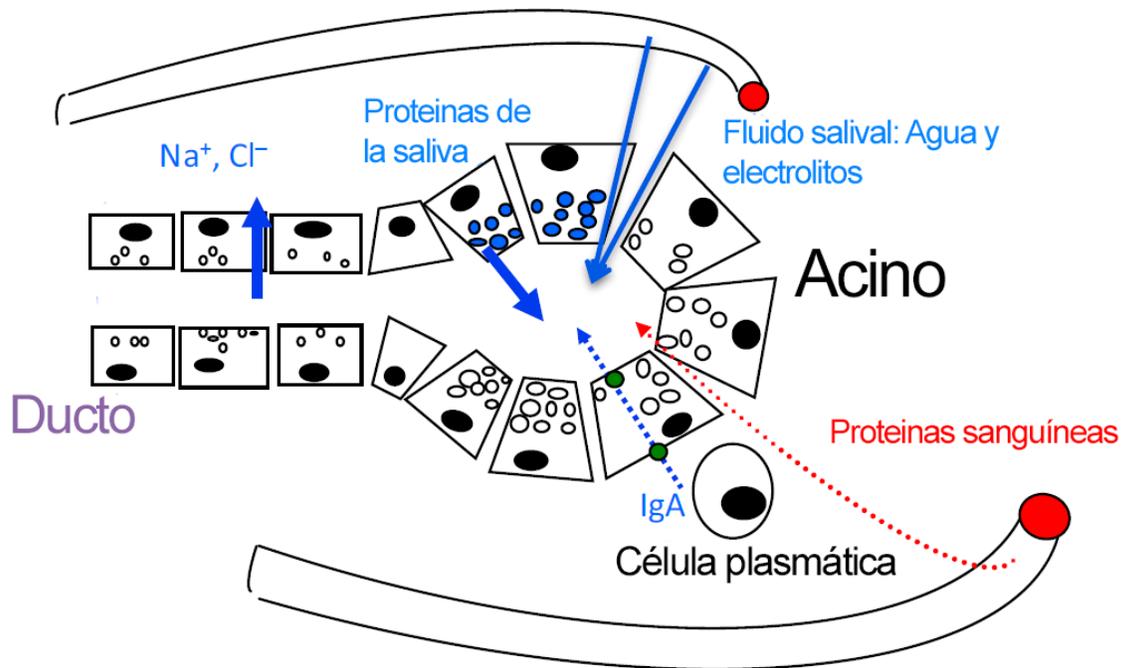


Figura N° 7: Célula acinar y los componentes de la secreción salival. Tomado y adaptado de Proctor, 2016 (38).

Otros elementos categorizados como lipofílicos pueden llegar de manera sencilla a la saliva, ya que por su naturaleza pueden atravesar la membrana plasmática de las células acinares. Es por esto por lo que la saliva se ha considerado como un fluido capaz de entregarnos información acerca de algunas hormonas esteroideas que se detallan en la tabla 3, aquellas que no circulan unidas a proteínas por el plasma (como la albúmina). Además las hormonas de esta naturaleza en comparación con las proteicas son transferidas al acino con mayor rapidez (41).

Retomando el tema de la composición salival, cabe mencionar que estudios como el de Miller y colaboradores en 2010 demostró que hasta un 27% de las proteínas que se pueden encontrar en la saliva, corresponden a un origen hematológico (42), aunque también dicha composición como se mencionó con anterioridad es variable, debido a diversas condiciones. Muchos factores alteran la composición de esta secreción como el ritmo cardiaco, el tamaño de la glándula salival, la edad de la persona, su sexo como también su estado fisiológico y de salud (43). Esto último es posible correlacionarlo a las variaciones que podría presentar la sangre de cada persona, específicamente el plasma, que es donde se mueven las hormonas, dependiendo de la alimentación de cada uno o de su estado general (44).

Es necesario mencionar en investigaciones se ha encontrado que la cantidad de elementos que figuran en la saliva en lo que concentración se refiere, no es equiparable a la concentración del suero. Un ejemplo que se menciona en la literatura es la concentración de IgG, una inmunoglobulina, la cual en saliva posee una concentración 650 veces menor aproximadamente que en la sangre, también se puede mencionar la dehidroepiandrosterona o su sigla DHEAS, la cual es insoluble en lípidos y solo el 1% de lo que hay en el plasma está presente en la saliva (41, 45). Sin embargo, algunos esteroides no conjugados con proteínas como el cortisol, que además es liposoluble, si refleja su concentración plasmática en la saliva (41).

Lo anterior es necesario tenerlo en cuenta a la hora de considerar a los componentes de la saliva como un potencial marcador biológico, ya que requiere una modificación en los valores de corte que se manejan comúnmente en la sangre si se espera considerar el uso de la saliva en las mediciones clínicas y también en el mundo de la investigación.

Dentro de las investigaciones realizadas se ha podido demostrar la presencia de algunas hormonas en la saliva como se enumeran en la tabla número 4, estas han sido cuantificadas con diversos métodos, los cuales han ido evolucionando a lo largo del tiempo.

Tabla N° 4: Hormonas esteroidales encontradas en la saliva. Elaboración propia

Hormonas	Método de detección	Autor	Referencia
Cortisol	RIA	Kirschbaum, 1994	(46)
Progesterona	ELISA	Priya, 2013	(47)
Testosterona	LC-MS/MS	Lood, 2021	(48)

RIA = Radioinmunoensayo

ELISA = Enzyme linked Immunosorbent Assay

LC-MS/MS = Liquid chromatography with Mass spectrometry in tandem

Otras hormonas que se han descrito en saliva son la insulina, la cual se concentra en la sangre vía producción por las células pancreáticas (49) y como otras hormonas, ésta se encuentra en menor concentración en la saliva que en el plasma, además de que también se ve afectada por el consumo de alimentos (50). También se ha demostrado que el glucagón (51), la leptina (52) y la oxitocina (53), pueden encontrarse en la saliva.

Finalmente es posible concluir que al igual que el cabello, las hormonas presentes en la saliva son un biomarcador en potencia, debido a la facilidad de su obtención como muestra y también debido a su fisiología, lo cual nos permite su uso en el ámbito de medición hormonal y también en otras áreas.

3) MÉTODOS DE MEDICIÓN HORMONAL DISPONIBLES PARA SU USO EN SALIVA Y CABELLO.

Una vez comprendida la importancia en lo que respecta la medición hormonal, el término de invasividad y cómo las hormonas pueden llegar hasta la saliva y el cabello, corresponde analizar algunas metodologías para poder cuantificar dichos metabolitos, las cuales han ido variando en el tiempo. Incluso existen algunos kits comerciales que facilitan la medición de estas hormonas y que pueden adquirirse para realizar algún estudio. El propósito del presente capítulo es enumerar y describir algunas de las metodologías que hasta el día de hoy se han implementado principalmente en el ámbito de la investigación.

3.1) Radioinmunoanálisis (RIA)

El RIA es una técnica *in vitro* que permite la cuantificación de diversos metabolitos en varias matrices del cuerpo humano, como la sangre, otros fluidos biológicos como la saliva y otros tejidos como el cabello. Su principio se basa en la unión de un antígeno marcado radioactivamente a un anticuerpo específico para dicho antígeno, con el fin de comparar el efecto inhibitorio que tiene el antígeno o metabolito de interés en esa unión antígeno anticuerpo y relacionarlo en base a concentraciones conocidas de estándares de la molécula que se quiere cuantificar. En otras palabras es una prueba de comparación con una reacción antígeno anticuerpo en las cuales se observa una inhibición de la interacción entre elementos conocidos causada por algo desconocido o no cuantificado, el cual finalmente se compara con estándares y curvas de calibración simples que permiten entregar un resultado (54).

Esta metodología se ha usado a lo largo de los años en diversas matrices, como en un estudio anteriormente mencionado donde se ocupó el RIA para la detección de opioides en pelo de ratas (2), sin embargo, este no se restringe solo al cabello, también ha sido utilizado en saliva como en los estudios de Walker y colaboradores en el año 1978 donde describieron un ensayo para la detección de cortisol en saliva (55). También en un estudio más reciente

llevado a cabo por Gelena Dlugash en el año 2021 donde se cuantificaron 4 hormonas de tipo esterooidal en la saliva, entre ellas el cortisol y la testosterona (56).

Si bien este tipo de ensayo se sigue utilizando en ámbitos de la investigación, es necesario mencionar los riesgos que puede conllevar, según la guía de bioseguridad para laboratorios del ISP en Chile al año 2019 se indica que las radiaciones ionizantes, asociadas al uso de isótopos radioactivos, como los utilizados en los radioinmunoensayos, presentan un alto riesgo para la salud. Además, se indica que los kits comerciales deben ser usados con sus respectivas precauciones como elementos de seguridad adecuados y solo deben ser empleados por personal capacitado (57).

3.2) Enzimoinmuno análisis (EIA)

Esta técnica ampliamente utilizada en el mundo basa sus principios en las reacciones antígeno anticuerpo, al igual que el método anterior mencionado, sin embargo, en esta oportunidad no se usan isótopos radioactivos para la cuantificación de metabolitos, en cambio se prioriza el uso de reacciones enzimáticas en la variante más conocida del EIA, el inmunoanálisis o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA por sus siglas en inglés. Como su nombre lo indica el uso de enzimas ligadas a los reactivos inmunológicos permite esta cuantificación en base a la formación de un compuesto coloreado, el cual está dado por la adición de un cromóforo, un químico que cambia de color como resultado de la interacción con una enzima (58). En la figura 8 se esquematiza los pasos que ocurren en la reacción de un ELISA típico o ELISA directo, en el cual se produce un primer paso, el antígeno (metabolito de interés) es fijado a una fase sólida en base a una incubación pasiva. Posterior a esto se descartan todos los antígenos que no generen o establezcan una unión en el sistema en base a un lavado. Se añaden anticuerpos específicos que son capaces de reconocer a ese antígeno que se fijó a la fase sólida, uniéndose a este. El restante de anticuerpo que no pudo unirse es posteriormente eliminado con un lavado. Finalmente se adiciona un sustrato o cromóforo que al unirse a la enzima ligada al anticuerpo secundario

reacciona con ella generando el producto coloreado el cual es cuantificable y comparado con tablas o curvas de referencia (58).

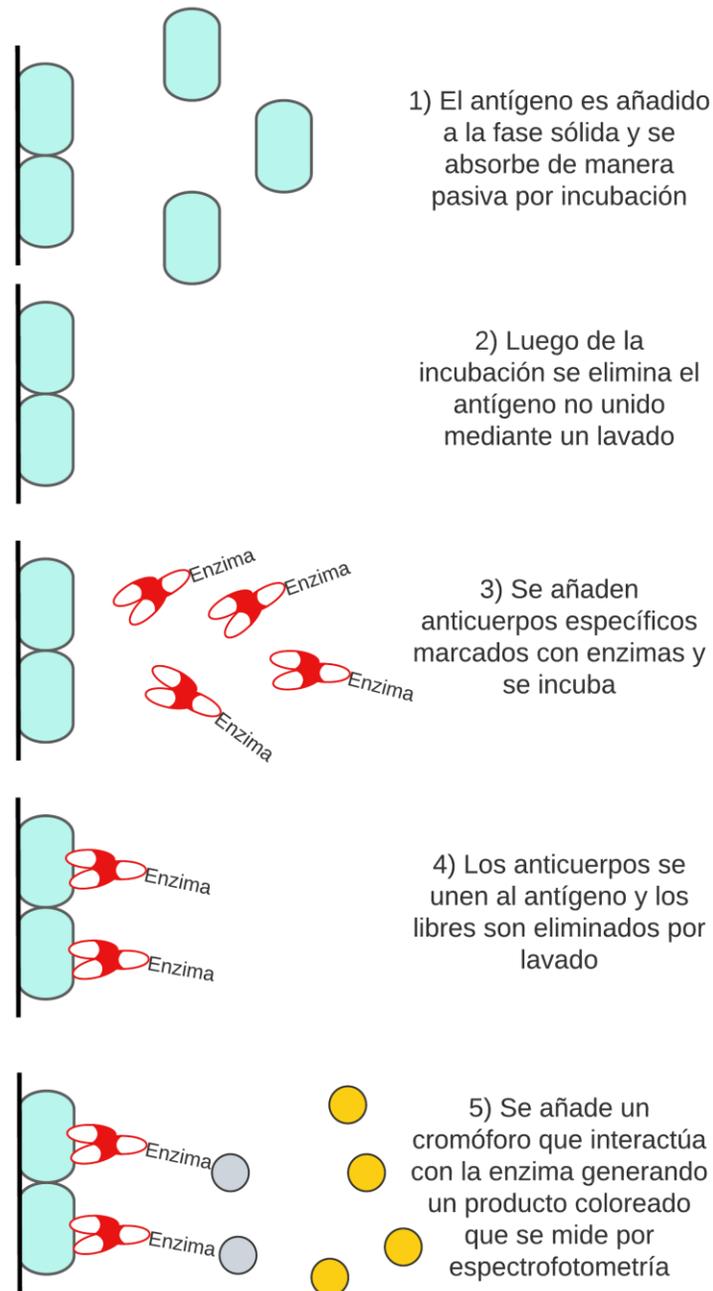


Figura N° 8: Esquema representativo de un ELISA directo. Se observan los pasos a seguir para completar la técnica. Tomado y adaptado de Crowther, 2001 (58)

Otra presentación de EIA es el inmunoensayo asociado a quimioluminiscencia o IE-QL o CLIA por sus siglas en inglés, que usa el mismo principio de unión antígeno anticuerpo, pero en lugar de usar un cromóforo que genera un cambio de color, usa un compuesto que emite luz en un medio específico (59)

Al igual que el RIA, esta metodología es ocupada para las dos matrices no invasivas de importancia en esta revisión, tanto para cabello como saliva. Esto lo demuestran los estudios de Slominski y colaboradores en 2015, donde demostraron que mediante ELISA se podría medir el cortisol en el cabello de niños (60). Un estudio más reciente, del año 2020, realizado por Crisci y colaboradores demostró que es posible cuantificar la hormona antimulleriana (HAM), un marcador de la fertilidad, en el cabello de pacientes femeninas, usando la técnica de ELISA, además estos resultados fueron verificados usando WesternBlot (61).

Por otro lado en estudios como el de Zhu y colaboradores publicado el año 2021, se hizo un análisis comparativo de métodos para la medición de hormonas esteroidales en saliva y determinaron la posibilidad de cuantificar metabolitos como la testosterona y progesterona usando métodos comerciales de kits ELISA (62).

3.3) Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS)

Como el título nos indica, estas son dos técnicas que se asocian entre sí para poder cuantificar los metabolitos de interés. La cromatografía líquida o LC por sus siglas en inglés, es una metodología que permite la separación de moléculas para su posterior cuantificación. El principio de esto se basa en la capacidad de un metabolito o molécula en disolverse en líquidos y en sólidos que tengan la capacidad de interactuar con dicha partícula. Si esta se disuelve en una fase líquida y pasa por una columna de partículas sólidas con las que interactúa, se moverá de manera más lenta que si no interactuara. Esta separación está dada por las diferencias sutiles que existen en las propiedades físicas de cada partícula como la solubilidad, la carga eléctrica, entre otras (63).

En resumen, la fase móvil o líquida fluye a lo largo de la fase sólida o estacionaria generando una separación, cuando la muestra es inyectada a la fase móvil, esta se mueve a lo largo de la columna de separación por la presión interna, permitiendo dicho efecto de segregación. Todo esto es monitoreado por un detector de flujo. Existen variaciones de esta técnica, entre ellas la cromatografía de fase normal, para compuestos no polares por ejemplo, la cromatografía de fase inversa, para aquellas moléculas polares, la cromatografía de intercambio iónico, útil para la medición de componentes que puedan ionizarse, y por último la cromatografía por exclusión de tamaño, donde se separan los componentes dependiendo de su capacidad para ingresar a los poros de la fase estacionaria (64). En la figura 9 se observa una representación básica de una cromatografía, donde se aprecian las principales partes del sistema, la muestra es inyectada a la columna donde se produce la separación gracias a la acción de una bomba que entrega presión al sistema y un inyector que permite la introducción de lo que se quiere separar para que en la etapa final del recorrido un detector analice y almacene los datos obtenidos.

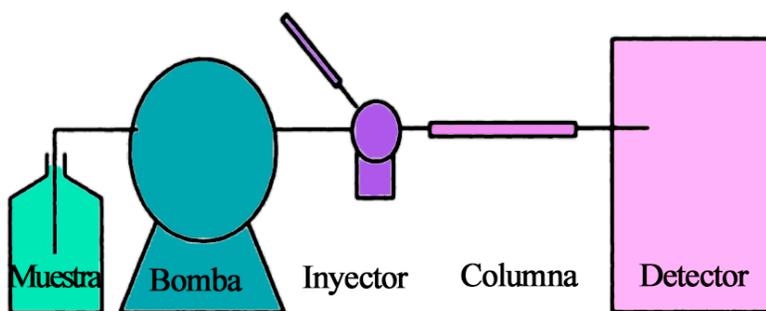


Figura N° 9: Representación esquemática de una cromatografía. En la cual se pueden observar sus principales partes que participan en la separación. Tomado y adaptado de Niessen, 2006 (64)

Finalmente en la práctica, la mayoría de separaciones por cromatografía son por mecanismos mixtos (64).

La espectrometría de masas, por otro lado, es una de las técnicas más importantes usadas hoy en día para cuantificar la concentración de diversos elementos incluso en la categoría de trazas, que se definen como concentraciones muy bajas que no siempre pueden ser medidas por otras metodologías. La espectrometría está basada en las propiedades físicas del núcleo atómico y cualquier elemento que este lo componga, como protones y neutrones, los cuales le otorgan su masa atómica. La relación existente entre esa masa y la carga es utilizada con este fin (65).

En la figura 10 se observa un diagrama básico de la espectrometría de masas, en la cual, de izquierda a derecha, se observan los pasos que sigue la muestra al ser introducida en el equipo. Primero se ioniza (formación del ion) con alguno de los elementos nombrados bajo esa columna. Luego esos iones son separados en base a su relación masa-carga (separación del ion) por ejemplo con un analizador de masas cuadrupolo para finalmente, en la etapa de detección iónica algún elemento capaz puede procesar esa información y transformarlo a datos que pueden ser almacenados por un sistema de información.

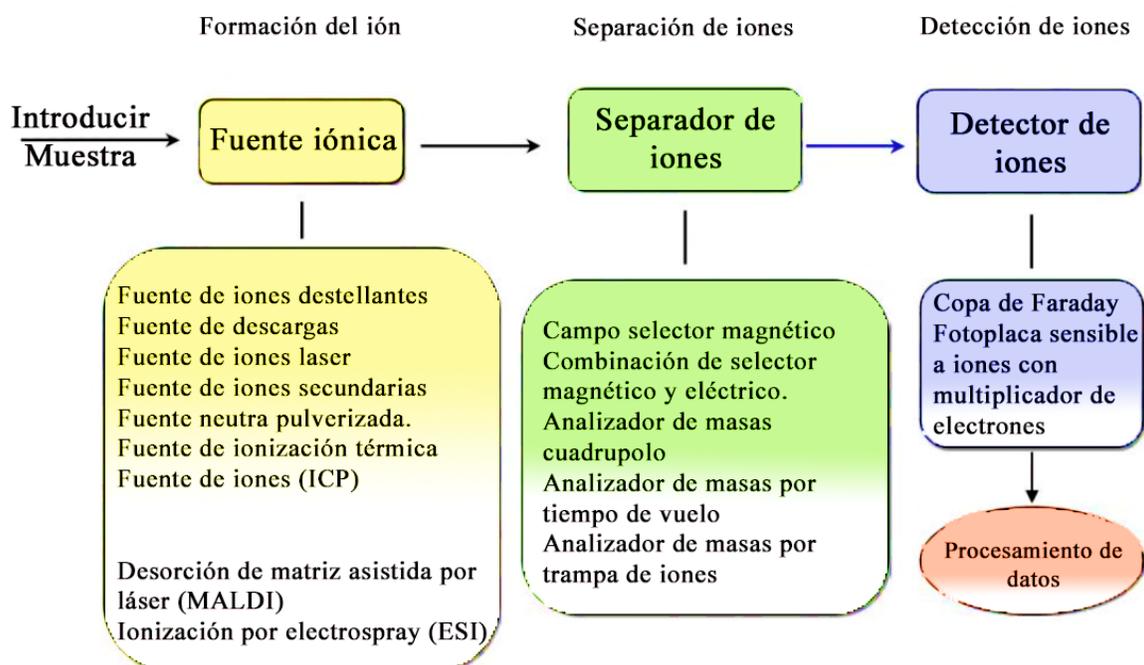


Figura N° 10: Diagrama básico de una espectrometría de masas, que indica los principales pasos de la técnica. Tomado y adaptado de Becker, 2008 (65)

La función de cada una de estas partes es primordial a la hora de establecer la cuantificación, la fuente iónica se encarga principalmente de aportar con la energía suficiente para formar partículas con carga eléctrica, tanto positivas como negativas (66). Por su parte el separador de iones genera precisamente eso, una separación de las moléculas cargadas eléctricamente para que puedan ser leídas por el detector de iones que clasifica estos productos por su relación masa-carga, generando una señal que va al procesador de datos, el cual entrega un espectro de masas, en base a lo anteriormente nombrado (66).

Finalmente, el conjunto de estas dos metodologías, la cromatografía, por un lado, que permite esta separación de elementos y la espectrometría que permite su cuantificación, generan una técnica en conjunto que es altamente útil en lo que es la medición de diversos metabolitos, entre ellos, las hormonas.

Al igual que en las técnicas anteriormente nombradas, este dúo permite la cuantificación hormonal en las dos muestras no invasivas de esta revisión. Eso lo podemos confirmar gracias a estudios como el de Cririmele en el año 2000, donde confirmó la posibilidad de cuantificar algunos corticoesteroides como el cortisol en muestras de cabello humano usando la metodología de LC/MS (67).

3.3.1) Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Es una técnica muy similar a la anteriormente nombrada, y es ampliamente utilizada tanto en el ámbito de la clínica como la investigación. Su principio es el mismo que la LC/MS, desde el punto de vista de la cromatografía, lo que cambia en esta metodología es la espectrometría, ya que los componentes de esta serán, un sistema de introducción de muestras, la fuente de ionización, un analizador de masas primario (MS1), una cámara de colisión, un analizador secundario de masas (MS2) y finalmente un detector y analizador de datos, tal y como se observa en la figura 11.

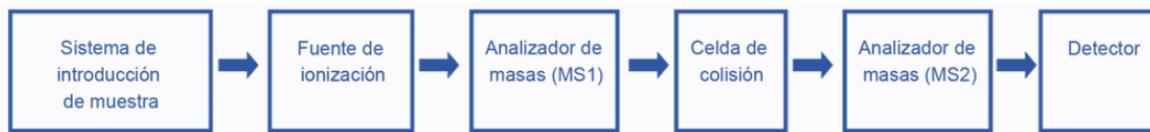


Figura N° 11: Esquemática del proceso de una espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Tomado y adaptado de (68).

En otras palabras, la muestra luego de pasar por el MS1, sus partículas ionizadas son separadas en base a su relación masa-carga, ordenados son pasados por una celda de colisión en donde se fragmentan, para ser analizados por el MS2, para separar las moléculas íntegras de las fraccionadas, formando el espectro de masas. Ambas metodologías, tanto LC-MS como LC-MS/MS siguen el mismo principio, de medición (66, 69).

La cromatografía asociada a MS en tándem es útil en la detección de hormonas tanto en cabello como en saliva. Esto se demuestra en el estudio de Gaudi en 2016 quien, usando esta metodología logró cuantificar diversos tipos de hormonas como, aldosterona, cortisol, cortisona, progesterona, entre otras, tanto en suero, orina, saliva y cabello (70).

También encontramos un estudio más reciente, del año 2022 a cargo de Fariha y colaboradores, en el cual se desarrolló una metodología para la LC/MS/MS en donde se pudo cuantificar el cortisol y la cortisona en saliva (71).

4) METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS NO INVASIVAS Y RESULTADOS OBTENIDOS

En el presente capítulo se hará referencia a los materiales y métodos utilizados por diversos autores en los estudios recopilados en cada una de las metodologías anteriormente nombradas. El enfoque es en base a la recolección de la muestra, tanto del cabello como de la saliva, las condiciones en las cuales fueron recolectadas, el procesamiento de estas y los resultados obtenidos en cada una de las investigaciones.

4.1) ELISA

4.1.1) Cabello

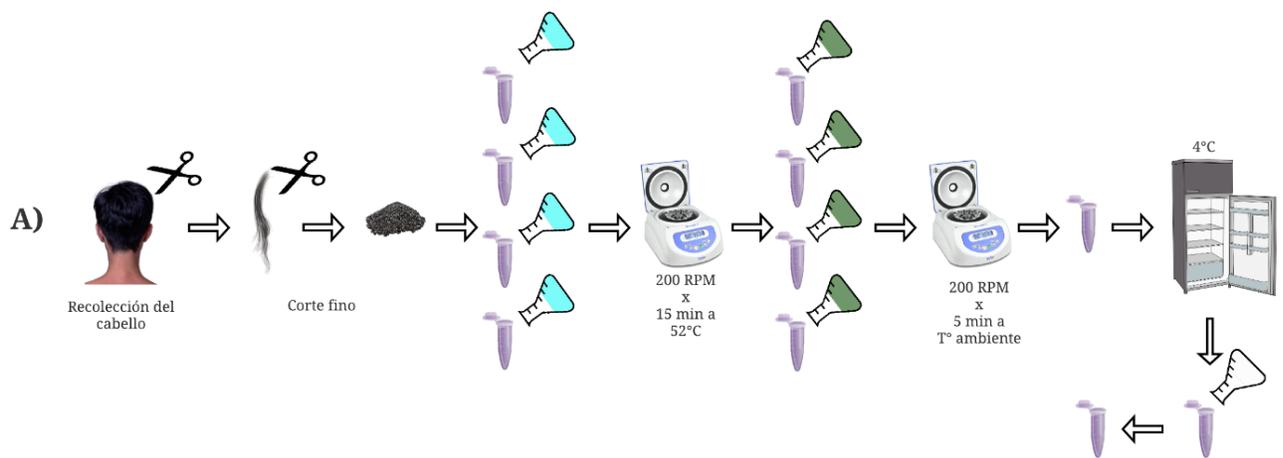
Un estudio publicado el año 2015 por Slominski y colaboradores buscó cuantificar la hormona cortisol en el cabello de niños con la finalidad de estudiar los niveles de estrés crónico al cual están sometidos. Los autores utilizaron dos metodologías, a modo de comparación en las cuales encontramos LC-MS y ELISA (60).

En lo que recolección de la muestra de refiere, los autores eligieron una zona del cuero cabelludo de los niños de la parte posterior de la cabeza, el largo de los cabellos fue de entre 1 a 3 centímetros y el peso mínimo que se usó de estas muestras fue de 100 miligramos, los cuales fueron almacenados a temperatura ambiente, sin embargo, para la técnica de ELISA solo se requirió de 50 mg (60).

El procesamiento del cabello previo a su uso medición se basó en dos métodos similares de extracción hormonal de la muestra. La primera en base a un denominado (Figura N° 12a), en el cual el cabello fue cortado con unas tijeras especiales para dejarlo lo más fino y disgregado posible, en forma de polvo, luego de esto se realizó la extracción, alternando entre el uso del metanol, con 1 ml que se le agregó a este polvo fino y se incubó por 15

minutos a 52° Celsius centrifugando la muestra por ese periodo a 200 revoluciones por minuto (RPM), luego se le agregó 1 ml de acetona y se realizó la misma centrifugación por 5 minutos pero a temperatura ambiente. Cabe mencionar que estas extracciones se realizaron fraccionadas en 4 por cada una de las muestras, es decir, se repitieron los pasos antes mencionados en cuatro ocasiones en tubos diferentes. Finalmente, las 4 extracciones se agruparon y se almacenaron a 4°C para que se evaporara la mayor cantidad de sobrenadante, el restante o parte sólida se resuspendió con buffer fosfato salino (PBS), obteniendo 350 µL de solución para 50 mg de cabello.

Por otro lado, el método de molienda o molido (Figura N° 12b) usó los 50 mg de cabello el cual fue cortado en partes de 0,5 centímetros aproximadamente y posteriormente pulverizado con perlas de zirconio en una centrífuga a 20.000 RPM por 10 minutos, luego se realizó el proceso de extracción con los mismos reactivos anteriores, sin embargo, en esta ocasión se centrifugaron a 10.000 RPM por 10 minutos y cada sobrenadante de las 4 extracciones de cada muestra se guardó en tubos separados, el proceso de evaporación y resuspensión fue idéntico al método anterior, pero con 4 tubos en total para cada muestra.



Simón Zapata N.

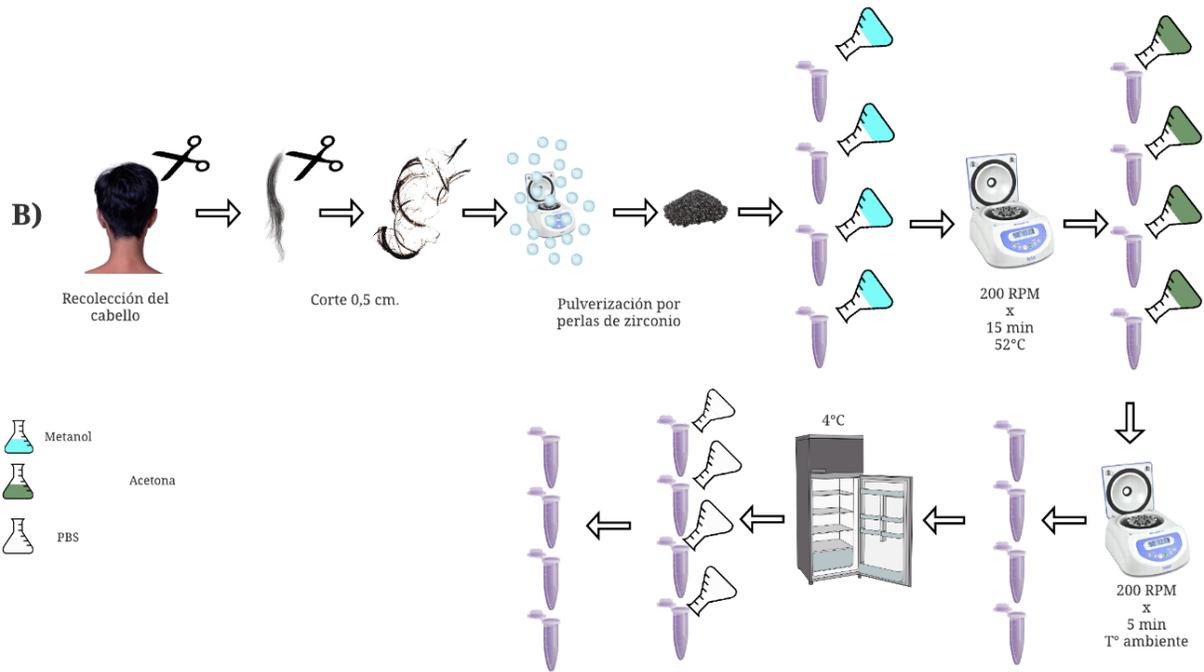


Figura N° 12: Metodología utilizada en el estudio de Slominski. En la letra A) se aprecia el método estándar y en la B) el método de molido. Elaboración propia.

Una vez finalizado el procesamiento de la muestra, los autores mencionan que la medición de cortisol se realizó mediante el uso de un kit comercial hecho para la medición salival de cortisol el cual fue usado tal y como lo indica el fabricante de la empresa ALPCO Diagnostics (60). Según la página de quien provee este kit nos dice que el principio del test

se basa en el inmunoanálisis ligado a enzimas y que como reactivos utiliza anticuerpos anti-cortisol de origen animal, específicamente de conejo. El procedimiento para la cuantificación usa la muestra a analizar, un calibrador y un control, todas estas se realizan en duplicado, los cuales se leen con un espectrofotómetro de microplacas de ELISA a 450 nanómetros (72). Es necesario mencionar que dentro de la información entregada por el fabricante existen limitaciones que nos dicen que este kit fue diseñado para su uso exclusivo en saliva (72), sin embargo, los investigadores hicieron uso del mismo para la medición de cortisol en cabello (60).

Pasando ahora a los resultados obtenidos en esta cuantificación, se obtuvo que el mejor rendimiento se alcanzó con el método estándar en la mayor parte de las muestras, además la media obtenida de cortisol por el método de ELISA fue de 172,2 ng/ml. Además, los autores destacan el uso de controles en lo que corresponde a la medición, uno positivo, otro de valor bajo y uno de valor alto, los cuales se lograron cuantificar de manera correcta y los resultados obtenidos fueron aceptados (60).

Otro estudio publicado Tisdale y colaboradores en el año 2019 también usó la metodología de ELISA para la cuantificación hormonal en cabello, sin embargo, la población de interés en este caso correspondía a cabello arqueológico, es decir, personas adultas momificadas de una región de Egipto (73). Los autores destacan que la metodología de extracción hormonal del cabello ya había sido realizada con anterioridad, específicamente por Webb y col. en 2010 (74), En esta ocasión se usó para la detección de tres hormonas en específico, cortisol, estradiol y testosterona. El paso a paso de la preparación de las muestras fue el siguiente.

El cabello se cortó en segmentos de un centímetro de longitud y cada muestra debía pesar más de 10 mg. Estas se pusieron en recipientes de vidrio y se picaron con tijeras para reducir aún más su tamaño, al recipiente se le añadió un mililitro de metanol con la finalidad de extraer las hormonas. Cada muestra se incubó a 50°C y se centrifugaron a 100 RPM por un periodo de 16 horas. Pasado este tiempo se recuperó el sobrenadante, el cual se dejó evaporar a 40°C hasta obtener un residuo, el cual se resuspendió en 250 microlitros de PBS

a pH 8, todos y cada uno de estos pasos se puede apreciar de mejor manera en la figura 13. Posteriormente se realizó la cuantificación con kits comerciales, como el estudio anterior siendo el fabricante, en este caso DiaMetra (73).

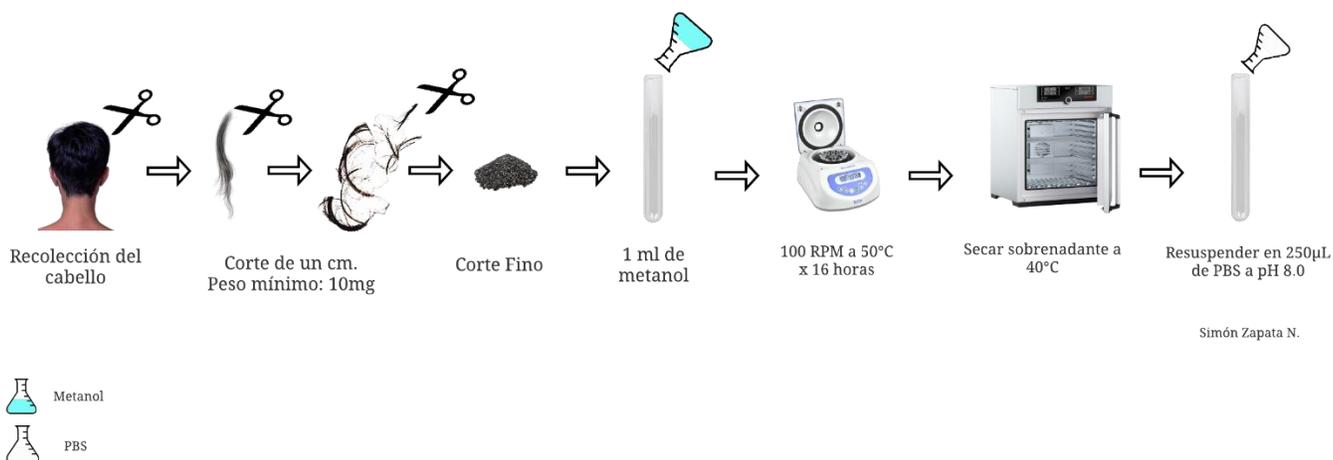


Figura N° 13: Metodología utilizada en el estudio de Tisdale. En la cual se aprecia el paso a paso con relación a la obtención de la muestra y su tratamiento. Elaboración propia.

El creador del kit en su página web nos dice que este tipo de ensayo es un ELISA competitivo, lo cual aplica para las tres hormonas en medición, además, nos entrega información relevante como la sensibilidad, la cual es de 0,12 ng/ml en el caso de la medición del cortisol (75), 3,28 ng/ml en la testosterona (76) y 0,5 pg/ml en el caso del estradiol (73). Cabe mencionar que al igual que el estudio anteriormente mencionado, el kit es para uso en saliva y no en cabello, sin embargo, los autores lo utilizaron de igual forma.

Dentro de la página del fabricante también se encuentra el inserto para el uso del kit, en este caso el de cortisol. Cuenta con estándares de cortisol para la construcción de una curva de calibración y la posterior cuantificación de la muestra, también cuenta con PBS, un conjugado de cortisol, la microplaca para la realización de la reacción de ELISA, sustrato y una solución de detención. El procedimiento, tal y como se ve en la figura 14, consiste en preparar los estándares (7 en total) que van desde 0 ng/ml hasta 100 ng/ml de cortisol. También se debe preparar el conjugado diluyendo 10 µL en un ml de tampón de incubación. Para preparación de la muestra se recomienda usar tubos de vidrio y centrifugar por 15

minutos a 3000 RPM. Se deja por una hora a una temperatura de -20°C , se vuelve a centrifugar al igual que en el paso anterior.

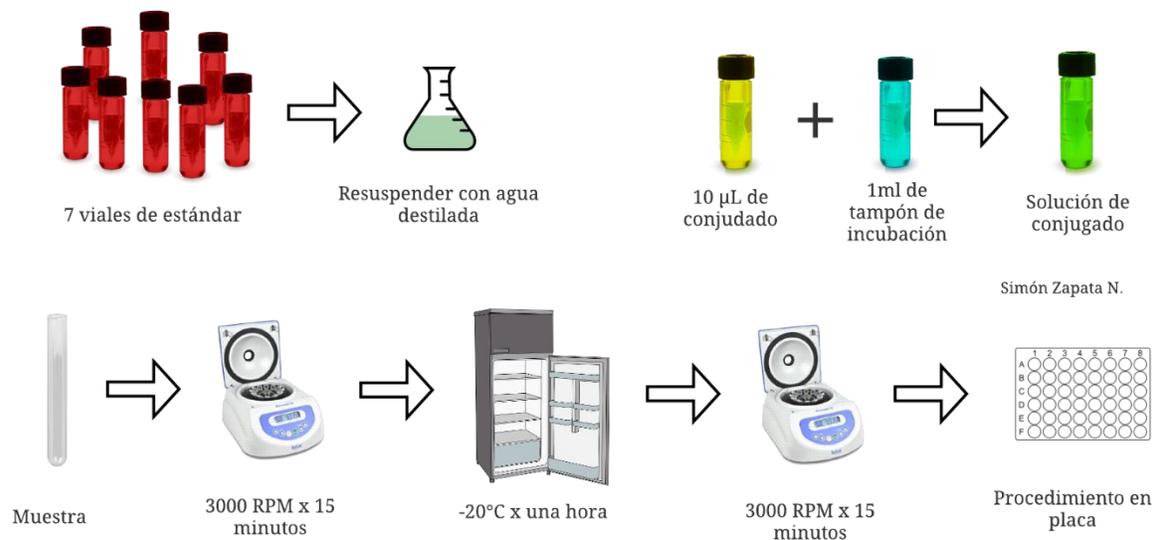


Figura N° 14: Metodología recomendada por DiaMetra. En la que se detalla los pasos a seguir con respecto a la preparación de reactivos y la muestra. Elaboración propia.

Posteriormente se deben mezclar los componentes en la microplaca de reacción tal y como se ve en la tabla 5, con esos volúmenes y tiempos. Finalmente, la microplaca debe leerse en un espectrofotómetro a 450 nm.

Tabla N° 5: Procedimiento para ELISA en saliva según DiaMetra. Tomada y adaptada de DiaMetra, 2022 (77).

Reactivo	Estándar	Muestras	Blanco
Estándares (7 viales)	25 µL	-	-
Muestra	-	25 µL	-
Solución de conjugado	200 µL	200 µL	-
Incubar una hora a 37°C Retirar la mezcla de reacción y lavar 2 veces cada pocillo con 0,3 ml de agua destilada			
Sustrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a T° ambiente (22-28°C) Protegido de la luz			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar con cuidado y leer absorbancia a 450 nm frente al blanco			

Pasando ahora a los resultados obtenidos por los investigadores, se tiene una media de $393,61 \pm 62,24$ ng de cortisol /g de cabello en los hombres momificados y el valor para las mujeres fue de $239 \pm 31,18$ ng/g. Por el lado del estradiol se obtuvo un valor promedio para los adultos momificados masculinos y femeninos de $48,38 \pm 11,53$ pg/g y de $132,62 \pm 81,68$ respectivamente, además, los autores destacan que no obtuvieron diferencias significativas en los valores del cabello obtenidos más cerca del cuero cabelludo con relación al cabello más distal. Finalmente, la testosterona tuvo un valor medio de $21,14 \pm 2,77$ ng/g en hombres y de $7,57 \pm 3,26$ ng/g para mujeres (73).

4.1.2) Saliva

Se realizó un estudio en el año 2019 en el cual Ugur y colaboradores buscaron cuantificar la hormona asprosin, una hormona proteica que regula la homeostasis de la glucosa (78) en un total de 116 participantes con diversas categorías de peso y de IMC, tanto en saliva como en sangre mediante ELISA (79).

La metodología utilizada fue seleccionar a los participantes en base a las directrices de clasificación de peso corporal de Canadá, dentro de los cuales 8 se encontraban en el rango de bajopeso, 44 normopeso, 19 sobrepeso, 10 con obesidad tipo I, 13 tipo II y 22 tipo III. A cada uno se le tomó una muestra de sangre venosa y 2 ml de saliva (79), esta última en base a un estudio publicado por Aydin y colaboradores en el año 2005, en el cual los participantes recibieron la orden de tener un ayuno nocturno (a excepción de agua), no fumar ni beber alcohol antes de la recolección de saliva. Dichas muestras fueron recolectadas por el kit de recolección de saliva Salivette de la empresa Sarstedt de Alemania después de enjuagar con agua la boca de cada participante (80).

El procesamiento de la saliva fue inmediatamente después de la recolección y consistió en centrifugarla por 15 minutos a 400 RPM para eliminar las impurezas que pudieran estar presentes en la muestra, el sobrenadante se dividió en 3 alícuotas y se almacenó a -70°C (80) tal y como se aprecia en la figura 15.

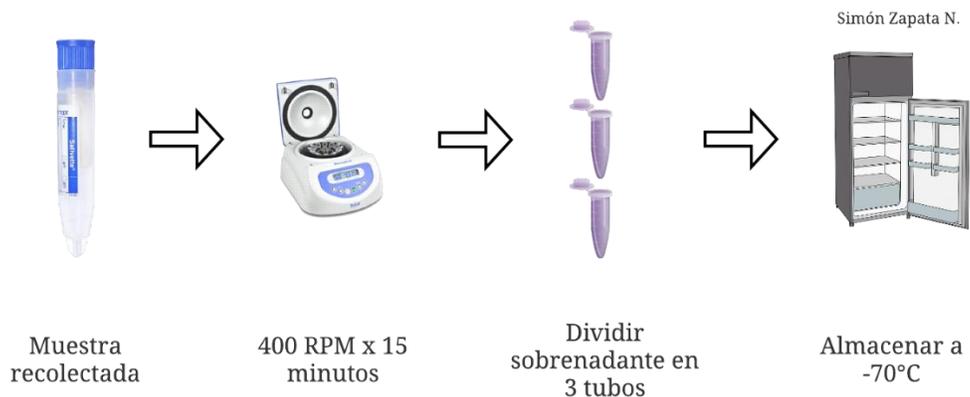


Figura N° 15: Metodología usada por Aydin y Ugur. En la que se aprecian los pasos a seguir con la muestra de saliva. Elaboración propia.

Ugur y los demás autores del estudio de 2019 cuantificaron la asprosina mediante un kit comercial ELISA Kit Shanghai sunredbio (SRB) de la empresa Sunred Technology Co. Ltd., el cual cuenta con un rango de medición de 1 a 300 ng/ml y una sensibilidad de 0,756 ng/ml como se destaca en el estudio (79). También se nombra que el lavado de las placas fue realizado con un equipo automático denominado BioTek ELX 50 y la absorbancia se midió con Chromate, Microplate Reader P4300 (79).

Dentro de los resultados, los autores obtuvieron que los niveles de asprosina en el grupo control fueron de $14,0 \pm 3,75$ ng/mL y $23,86 \pm 2,22$ ng/mL en suero y saliva respectivamente, además se detectaron niveles muy bajos de la hormona en sujetos con IMC de bajopeso y, conforme aumentaba el IMC, los valores de la misma aumentaban también (79), tal y como se observa en la figura 16 donde se encuentran los promedios de los valores hormonales obtenidos en el estudio en base a la clasificación de los participantes.

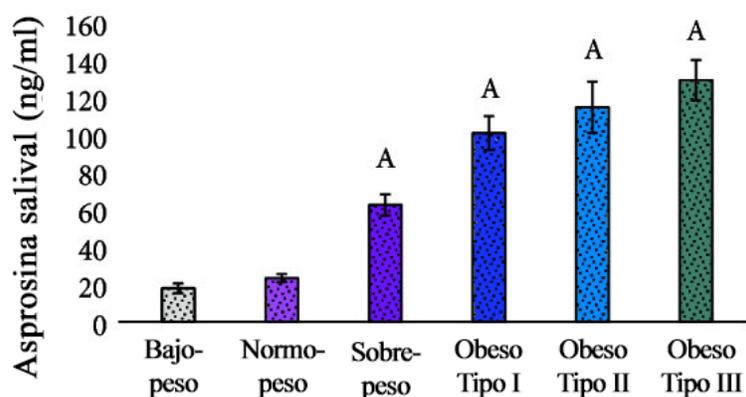


Figura N° 16: Comparación entre los niveles de asprosin e IMC en el estudio de Ugur y col. Tomada y adaptada de Ugur, 2019 (79).

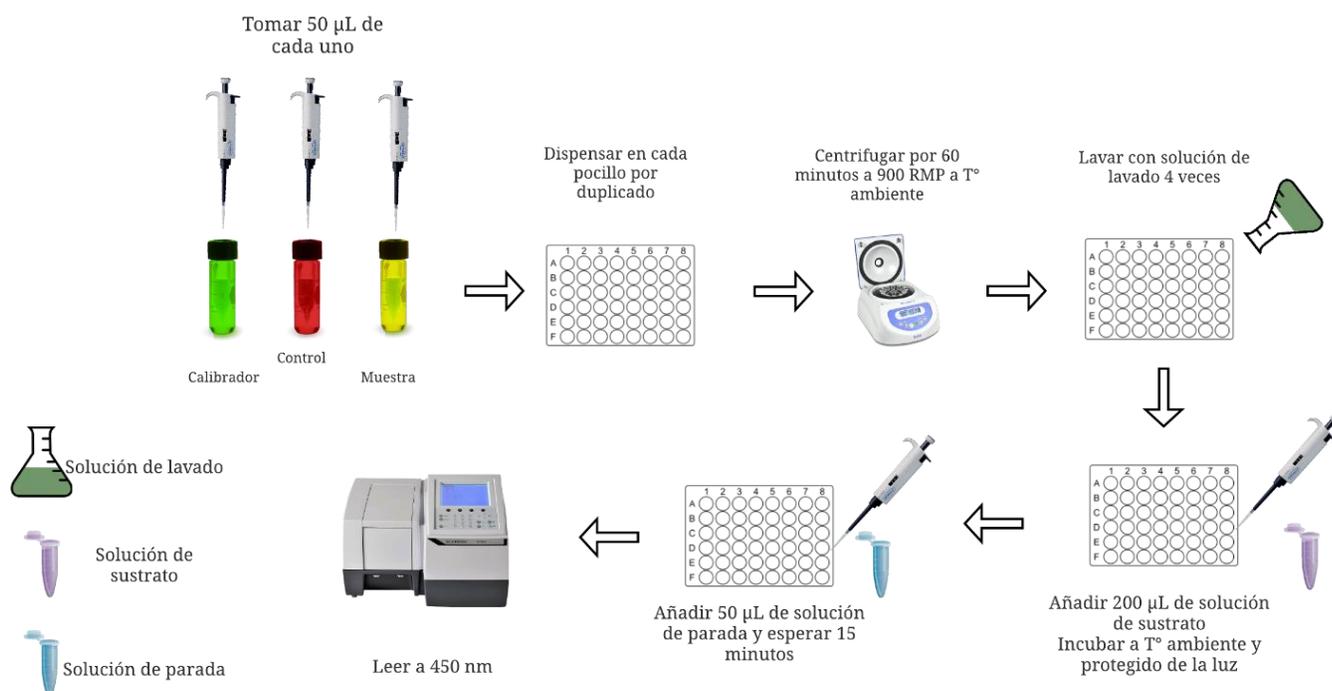
Otro estudio publicado el año 2021 por Krahel y colaboradores buscó cuantificar diversos marcadores de estrés en la saliva de niños con trastorno por déficit atencional e hiperactividad (TDAH), entre estos marcadores, el cortisol. La población en estudio fue de 60 en total, 50 niños y 10 niñas diagnosticados con TDAH (81).

Los autores destacan que todos los participantes del estudio se sometieron a un procedimiento en un consultorio dental para evitar cualquier sesgo que pudiera afectar el flujo salival durante el examen, todas y cada una de las muestras fue tomada entre las 9:00 y 10:00 am, posterior a la ingestión de comida en el desayuno y con aseo dental. Se recolectó saliva no estimulada por 15 minutos en total entregando indicaciones a los participantes de que escupieran en los recipientes estériles que los investigadores les entregaron. La primera porción de saliva se recolectó en un tubo separado y el resto en un tubo estéril. Inmediatamente después se selló el recipiente y se centrifugó, el sobrenadante se congeló primero a -20°C y luego a -80°C (81). Los autores no destacan el tiempo ni la velocidad del centrifugado en el estudio.

El cortisol salival se cuantificó mediante un kit comercial disponible denominado ELISA Kit DES6611 de la empresa Demeditec Diagnostics GmbH, de Alemania (81). En la página web del fabricante podemos encontrar el inserto del kit, el cual nos dice que el ensayo

tiene un rango de trabajo de 0,1 – 30 ng/ml y una sensibilidad de 0,019 ng/ml, además que está basado en un tipo de ELISA competitivo. Los reactivos provistos por el kit son 6 calibradores, un control bajo y un control alto, conjugado de enzima, sustrato en solución, solución de parada y solución de lavado (82). El fabricante recomienda que las muestras sean obtenidas en tubos de polipropileno (PP) y no usar tubos de recolección como el de Salivette (82).

El procedimiento, tal y como se aprecia en la figura 17, consta de dispensar 50 μ L de cada calibrador, control y muestra en duplicado en cada pocillo de reacción, luego agregar 50 μ L del conjugado de enzima. Incubar 60 minutos en una centrífuga de microplacas a 900 RPM a temperatura ambiente. Se deben vaciar los pocillos y luego lavar cuatro veces con solución de lavado (300 μ L cada vez). Se añaden 200 μ L de sustrato en solución y se incuba a temperatura ambiente, 30 minutos protegido de la luz. Finalmente se añaden 50 μ L de solución de parada y se determina la absorbancia a 450 nm 15 minutos después de agregar el último reactivo (82).



Simón Zapata N.

Figura N° 17: Metodología del kit ELISA DES6611 de la empresa Demeditec Diagnostics. Elaboración propia.

Los resultados obtenidos por los autores indicarían que, por parte del cortisol, no habría una elevación significativa entre niños control y niños con TDAH, siendo el promedio para niños sanos de $5,5 \pm 6,6$ ng/ml y de $5,5 \pm 4$ ng/ml en niños diagnosticados con TDAH. Sin embargo, el cortisol si tuvo una asociación con el IMC de los participantes y el tamaño de la cadera, siendo mayor en el grupo TDAH.

4.2) RIA

4.2.1) Cabello

El radioinmunoensayo en la actualidad no es un método ampliamente utilizado como los demás, sin embargo, algunos investigadores siguen utilizándolo, como en el caso de Calamari y colaboradores, que en el año 2020 publicaron un estudio en el cual, mediante RIA analizaron el cabello en búsqueda de testosterona en 24 perros machos de raza Caniche de los cuales 4 estaban castrados, además se incluyeron 4 hembras (83).

Las muestras fueron obtenidas de 3 regiones del cuerpo diferentes, cabeza, torso y extremidades, las cuales fueron cortadas con tijeras o cortadoras de pelo y almacenados en una bolsa de papel a temperatura ambiente. Los autores destacan que utilizaron la metodología propuesta por Baumgartner y colaboradores del año 1979 (2) y Yang y colaboradores del año 1998 (84), sin embargo, realizaron algunas modificaciones al protocolo establecido (83). Tal y como se ve en la figura 18 los autores picaron el pelo de los perros finamente con tijeras hasta un peso aproximado de 50 mg, a los cuales se les añadió 3 ml de metanol. El tubo se agitó por un minuto y se dejó reposar 48 horas a temperatura ambiente. Luego se volvió a agitar por un minuto y se pasó el contenido a un tubo de vidrio, lo dejaron a 42°C con aire seco en el ambiente para poder evaporar el líquido en su totalidad para posteriormente resuspender el contenido en 0,5 ml de solución buffer con gelatina que luego se agitó en un vortex. Cada muestra se traspasó a 2 tubos (0,25 ml en cada uno), una fue almacenada refrigerada y otra congelada por tres días (83).

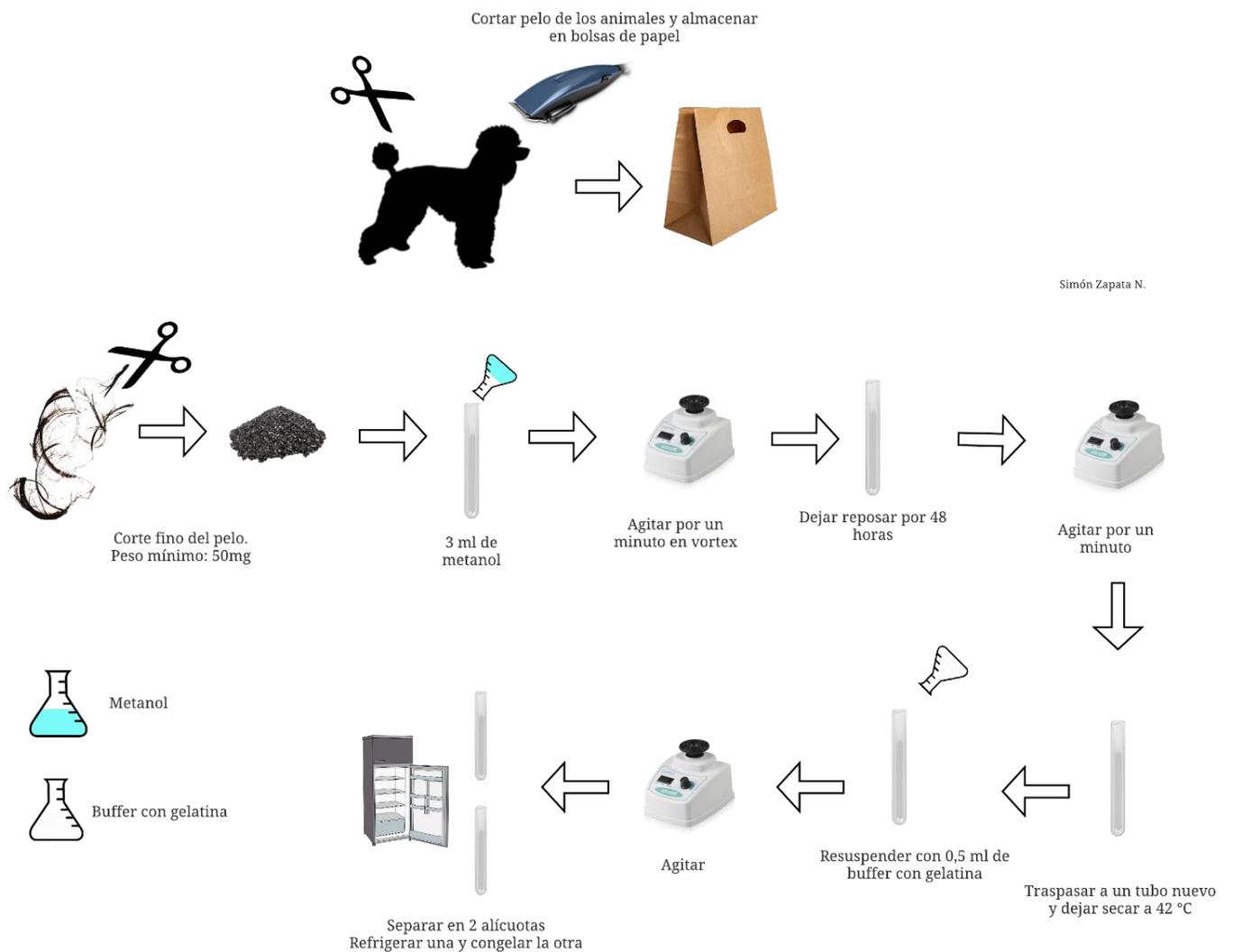


Figura N° 18: Metodología utilizada en el estudio de Calamari y colaboradores. En la cual se aprecian los pasos seguidos por los investigadores, desde la obtención del pelo en los perros hasta y almacenamiento Elaboración propia.

Para la medición de testosterona en el pelo de los animales se utilizó un kit comercial de RIA de fase sólida de la empresa Siemens Medical Solutions Diagnostics, específicamente el COAT-A-COUNT, donde los autores destacan que los niveles mínimos detectables de la hormona son de 2,62 ng/dL en el interensayo y de 10 ng/dL en el intraensayo (83).

Pasando a los resultados obtenidos por los investigadores, los cuales se encuentran en la tabla 5, concluyeron que los machos sin castrar y las hembras no tenían una diferencia significativa en los valores obtenidos, sin embargo, los machos castrados no mostraron valores significativamente diferentes con las hembras del estudio (83).

Tabla N° 6: Resultados obtenidos por Calamari y colaboradores. En la cual se aprecia la diferencia entre la sangre y el pelo en la medición de testosterona en perros. Tomada y adaptada de Calamari, 2020. (83)

	Testosterona (ng/ml)	Testosterona (ng/g)
Matriz	Sangre	Pelo
Machos sin castrar	1,34 ± 0,30 (0,16–4,49)	7,26 ± 1,71 (1,50-29,40)
Machos castrados	0,16 ± 0,14 (0,02–0,58)	3,26 ± 0,94 (0,68–4,91)
Hembras	0,11 ± 0,01 (0,10–0,18)	2,20 ± 0,63 (1,00–4,53)

El fabricante del kit en su página web no ofrece el instructivo del producto, por lo que el paso a paso de cómo se lleva a cabo la técnica, no se puede describir, además en el estudio no se menciona dicha metodología.

4.2.2) Saliva

El año 2020 fue publicado un estudio realizado por Bakker-Huvenaars y colaboradores en el cual se analizó la relación entre la oxitocina, cortisol y testosterona salival en 114 adolescentes con trastornos del espectro autista (TEA), trastorno negativista desafiante (TND) y trastornos de la conducta (TC) con la agresividad o rasgos insensibles de cada participante, en comparación con individuos con desarrollo típico (IDT) (85).

Los autores destacan que la saliva de cada participante fue recolectada sin el uso de estimulantes, además, que no debían comer, beber, fumar o cepillarse los dientes al menos una hora antes de la recolección. El volumen de cada muestra fue de 6 ml y se recolectó en tubos de ensayo plásticos y transparentes, los cuales fueron almacenados inmediatamente a menos 20°C (85). La medición de cada hormona se realizó por RIA, sin embargo, el procedimiento no fue igual para cada una de ellas. La oxitocina se cuantificó en base a lo descrito por Althaus y colaboradores en el año 2016 (86), por otro lado, el cortisol y la testosterona se midieron por una metodología diseñada por los autores del estudio en base a lo dicho por MacKenzie y colaboradores en 1990 (87).

Althaus y sus colaboradores nos describen que su procedimiento del RIA para la medición de la oxitocina, primero debieron separar la oxitocina de las proteínas de unión, añadiendo 300 de HCl al 0,5 M y usando un cartucho de purificación y extracción Oasis HLB, luego de la extracción los cartuchos fueron puestos en metanol al 100% y luego se evaporó dicho compuesto para finalmente ser resuspendido en tampón fosfato (86), tal y como se aprecia en la figura 19.

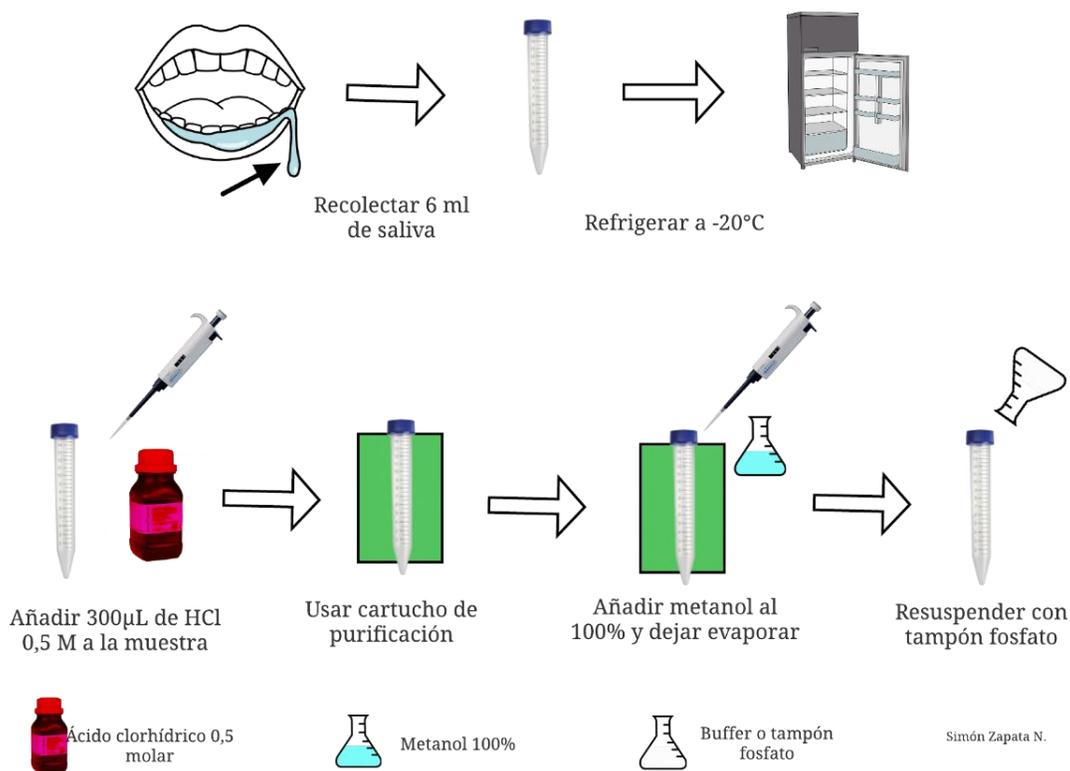


Figura N° 19: Metodología utilizada en el estudio de Bakker-Huvenaars y colaboradores. Desde la obtención de la saliva hasta el tratamiento usado en el estudio de Althaus y col. Elaboración propia.

El RIA del estudio, como se ve en la figura 20, se basa en el uso de un anticuerpo policlonal de conejo (diluido 1:160.000), específicamente 50 µL, los cuales fueron añadidos a 100 µL de muestra que posteriormente se incubaron a 4°C por 72 horas. Posteriormente se le añadió 25 µL de oxitocina marcada con el isótopo radioactivo I₁₂₅ y se incubó a la misma temperatura por 24 horas más. Luego, la oxitocina unida al anticuerpo y la libre fueron separadas mediante el uso de un segundo anticuerpo que contenía 10% de IgG de origen ovino anti-conejo y 0,01% de IgG de conejo con una proteína transportadora en solución de polietilenglicol. Finalmente, se le midió a cada muestra su reactividad con un contador gamma automático. Los autores destacan que la sensibilidad analítica de este ensayo fue de 1,5 pmol/L (86). Cabe mencionar que esta metodología fue desarrollada en muestras de sangre, sin embargo, Bakker-Huvenaars y colaboradores lo utilizaron para la medición en saliva.

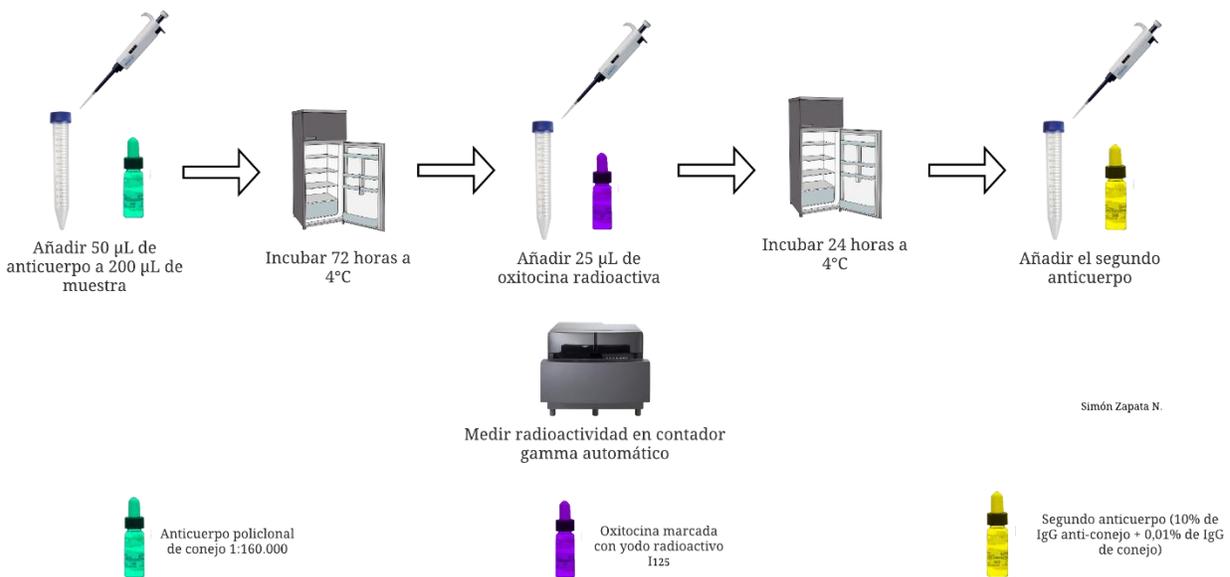


Figura N° 20: Metodología utilizada en el estudio de Althaus y colaboradores. Se destacan los componentes utilizados en el RIA Elaboración propia.

Pasando a los resultados del estudio realizado en 2020, los autores destacan que los niveles de oxitocina de los grupos de adolescentes TDA, TC y TND fueron significativamente más bajos que en el grupo IDT. Por parte del cortisol no hubo mayores diferencias, sin embargo, los individuos del grupo TND y TC obtuvo un valor significativamente más alto que los del grupo TDA (85).

4.3) Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas

4.3.1) Cabello

El año 2020 fue publicado un estudio en la revista *Psiconeuroendocrinología* por Kruijff y sus colaboradores, en el cual buscaron medir el cortisol del cabello de niños sanos mediante el uso de LC-MS en tándem o LC-MS/MS, con el fin de establecer intervalos de referencia para esta población. Para este fin los investigadores formaron tres grandes grupos de participantes, el primero estaba formado por recién nacidos cuyas madres declararon no

consumir drogas psicotrópicas durante el embarazo, el segundo por bebés de seis semanas, hijos e hijas de madres con alguna enfermedad mental, participantes de un estudio anterior. Finalmente, el último grupo consideró niños sanos desde 0 hasta 18 años. Cabe mencionar que fueron excluidos del estudio aquellos participantes que hayan consumido glucocorticoides u otro medicamento similar (88).

Con lo que respecta a la muestra, tal y como se aprecia en la figura 21, esta fue recolectada desde la parte posterior de la cabeza, cortada con tijeras quirúrgicas, lo más cercano al cuero cabelludo posible. Estos se almacenaron en bolsas de papel a temperatura ambiente y se marcó cual extremo era el más proximal a la cabeza. Para niños mayores de 4 años, los investigadores usaron los 3 centímetros más proximales de la muestra, para menores de 4 años como recién nacidos o aquellos que no tuvieran los 3 centímetros de longitud en el cabello se usó a lo menos un centímetro de muestra (88).

Cada muestra se pasó a tubos de vidrio y se pesó en miligramos, luego se lavaron con isopropanol apto para LC-MS a temperatura ambiente y se dejó secar por 48 horas. Luego, el cortisol fue extraído con 1,5 mL de metanol apto para LC-MS por 18 horas a 25°C, al metanol se le añadió cortisol-d3 deuterado que luego se extrajo mediante una extracción de fase sólida (88). Los investigadores destacan que se basaron en la metodología de LC-MS/MS descrita por Noppe y colaboradores en 2015 (89).

Este último estudio mencionado logró cuantificar cortisol, cortisona, DHEAS, y 17 hidroxiprogesterona o 17OHP. Para esto, utilizaron una separación por cromatografía de ultra rendimiento o UPLC usando una columna con gradiente de agua y metanol de la empresa Waters®, se utilizó un ritmo de 250 µL/min (89).

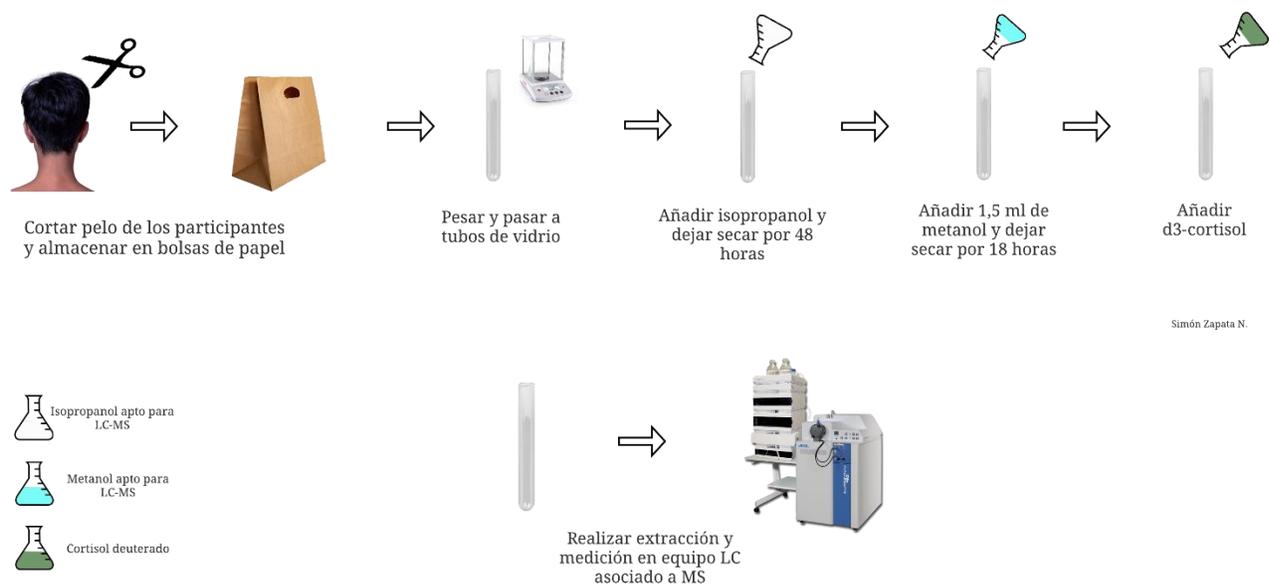


Figura N° 21: Metodología utilizada en el estudio de Kruijff y colaboradores. Se destacan los pasos realizados por los investigadores hasta la medición por espectrometría de masas basado en el estudio de Noppe y col. Elaboración propia.

Finalmente, los resultados obtenidos por el estudio de 2020 determinaron que un total de 625 niños entre 0 y 18 años se establecieron en intervalos por edad, ya que el objetivo del estudio era generar rangos de referencia para el cortisol, con este método. Un ejemplo es el rango al nacer que en el percentil 50 entrega un resultado de 162,4 pg/mg, en cambio a los 3 meses de edad se ve una caída brusca de ese valor a tan solo 20,5 pg/mg. (88)

Otro estudio del año 2019 realizado por Gao y colaboradores determinó, mediante LC-MS las hormonas tiroideas en cabello humano con el fin de investigar el fenómeno de “burnout” o agotamiento, una forma de cansancio emocional que tiene como consecuencia la disminución del desempeño en diversas actividades. Se estudió en diferentes grados a un total de 208 participantes con una media de edad de $41,5 \pm 11,5$ años (90). Los autores destacan que las muestras de cabello fueron obtenidas desde el vértice posterior de la cabeza, y cada una de ellas debió pesar a lo menos 10 mg, priorizando obtener el segmento más proximal a la cabeza, específicamente los primeros tres centímetros, para poder obtener información de las hormonas de hasta tres meses antes de la recolección. Cada muestra se

lavó con 2,5 ml isopropanol en agitación por 3 minutos a temperatura ambiente y se dejó evaporar en campana por 12 horas. Se recortó el cabello y se pesó un total de 7,5 mg por cada uno de los participantes, se le agregó 20 μ L de patrón interno más 1,8 ml de metanol y se dejó incubar por 18 horas a temperatura ambiente. Del sobrenadante se tomó 1,6 ml a un tubo nuevo y se dejó evaporar a 50°C y luego se resuspendió en 120 μ L de una solución de metanol y agua 1:1 (90). El paso a paso del tratamiento del cabello se puede observar en la figura 22.

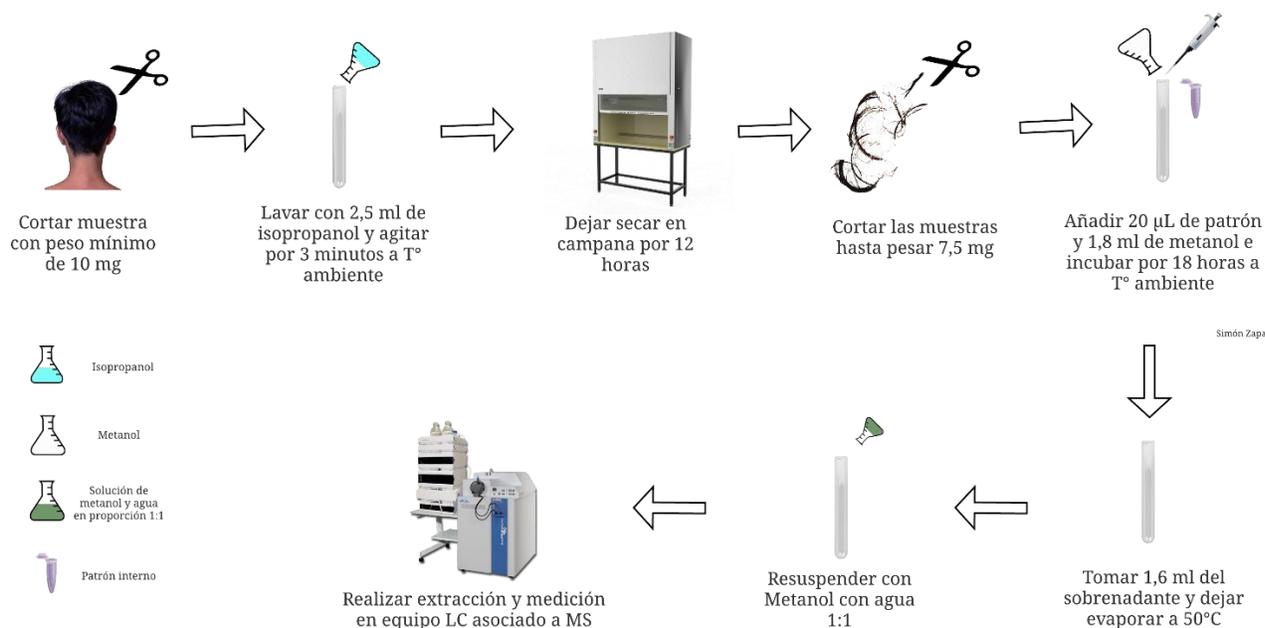


Figura N° 22: Metodología utilizada en el estudio de Gao y colaboradores. Se muestran los pasos realizados por los investigadores hasta la medición por espectrometría de masas. Elaboración propia.

Con respecto a la medición se utilizó el sistema de Shimadzu Nexera XR para la cromatografía y un AB Sciex QTRAP 6500 para la espectrometría de masas, el cual destacan, posee una fuente de ionización de electropulverización o ESI, basado en un estudio anterior, realizado por el mismo autor (90).

Es necesario mencionar que en este estudio se incluyó una prueba de la optimización del método de extracción con isopropanol, en el cual se analizaron 5 muestras, de las cuales,

posterior al lavado con dicho compuesto se tomó una alícuota y se analizó en búsqueda de hormonas tiroideas, obteniendo como resultado un valor bajo el rango detectable por la técnica, lo que indica que no se extrajeron hormonas en el lavado (90).

También estandarizaron el tiempo de incubación con metanol al medir la concentración de hormonas con diversos tiempos, 2,5; 5; 10; 18; 24 y 48 horas, obteniendo que posterior a las 18 horas el incremento de la concentración hormonal era intermitente (90).

Con lo que respecta a los resultados los autores obtuvieron un rango de 0,034 a 0,355 pg/mg en caso de la hormona triyodotironina o T3 y de 0,030 a 0,712 pg/mg para la tiroxina o T4, lo cual se asemeja en magnitud a los resultados de medición hormonal libre en el plasma (90). Aquellos participantes con un alto grado de agotamiento exhibieron mayores concentraciones de T4 en el cabello a diferencia de aquellos con menor grado, además, la proporción de T3/T4 fue más baja en pacientes con alto grado de burnout.

4.3.2) Saliva

En 2018 Xiaoguang Li y colaboradores realizaron un estudio que buscó la determinación de estrógenos en saliva humana, específicamente estrona, estradiol y estriol mediante la metodología de LC-MS. Para este fin se recolectaron muestras de 23 hombres sanos entre 22 y 68 años, 68 mujeres premenopáusicas de entre 18 a 46 años y 33 mujeres menopáusicas de 54 a 73 años (91). Tal y como se ve en la figura 23, los investigadores recolectaron cuatro muestras por cada participante con un intervalo de 5 horas aproximadamente entre cada una, agrupándolas y congelándolas a -20°C previo al análisis. La saliva se descongeló y pasó por un proceso previo a la separación y medición por LC-MS, 250 µL de cada muestra se mezcló con 50 µL de solución de trabajo IS y 250 µL de agua. Se cargó la mezcla en placas de extracción de la marca Waters previamente acondicionadas, luego se lavó tres veces con metanol al 40% y se le agregó 75 µL de metanol al 100%, luego 75 µL de agua y se mezcló previo a la determinación final (91). El procedimiento se repitió igual para los calibradores y estándares correspondientes.

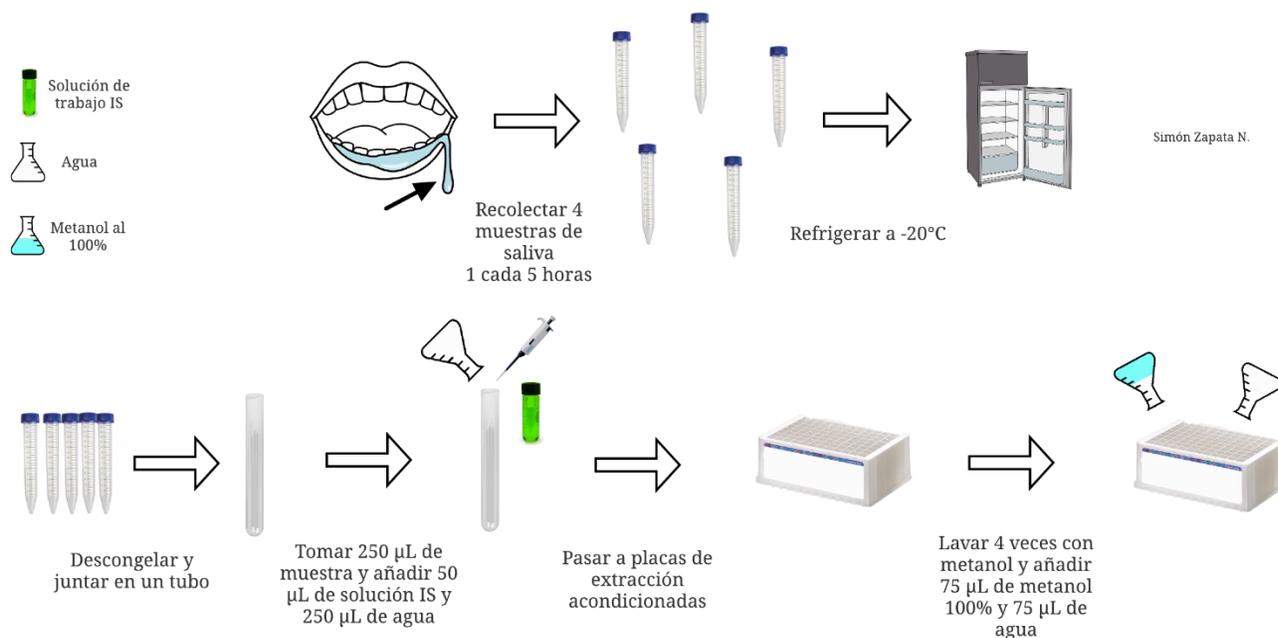


Figura N° 23: Metodología utilizada en el estudio de Li y colaboradores. Se observa el tratamiento a la muestra de saliva previo a la medición de estrógenos por LC-MS. Elaboración propia.

La cromatografía se realizó con un sistema de la marca Columbia, específicamente el Shimadzu Prominent UFLC-XR, con una fase móvil de amonio. La espectrometría de masas se utilizó el AB Sciex 5000 QTRAP de la marca Foster City, el cual cuenta con un sistema de ESI (91).

Los investigadores registraron diversos resultados, entre los cuales se destaca la optimización de la cromatografía con diversas fases móviles, la optimización de la espectrometría, con el fin de tener la mejor sensibilidad posible. También se evaluó el efecto del lavado y la eficiencia de la solución de trabajo, todo esto para saber si las condiciones del ensayo eran las óptimas antes de analizar las muestras reales de los y las participantes (91). Se destaca que la sensibilidad de esta técnica es de 1 pg/ml y que permite la detección simultánea de los tres estrógenos en saliva. Un ejemplo de los valores de estrógenos

obtenidos para mujeres post menopáusicas con una extracción de fase sólida fue de 1,1 a 5,5 pg/ml. Por otro lado, para los hombres del estudio fue de 1,1 a 4,1 pg/ml (91).

Otro estudio realizado el año 2021 por Han y colaboradores buscó la detección de DHAS, progesterona y testosterona en saliva de 88 participantes humanos en total, 41 mujeres y 47 hombres de entre 18 y 30 años, mediante el uso de LC-MS (92). Para este fin a los sujetos se les pidió la recolección de dos muestras de saliva a cada uno, con dos semanas de diferencia entre ambas, la saliva debía ser no estimulada y los participantes no debían comer ni beber por 60 minutos previos a la recolección y no cepillarse los dientes hasta 2 horas antes. Una vez recolectadas las muestras se congelaron a -80°C hasta su uso, estas se descongelaron y se centrifugaron a 6500 g por dos minutos. De esto se tomó un mililitro y se mezcló con un estándar interno, específicamente con 10 μL para ser agitadas en vortex por 10 segundos. Luego las muestras se mezclaron con 1,0 ml de una mezcla 50/50 de hexano con acetato de etilo para incubarlas por 30 minutos a temperatura ambiente en constante rotación y se centrifugaron por 3 minutos a 9000g. Luego se pasó 1,5 ml de la fase superior a otro tubo y de lo restante se extrajo la fase inferior. Ambas fases superiores, de las dos muestras de cada participante se evaporó a 40°C y se resuspendió con 50 μL de acetonitrilo con 50 μL de solución de derivación para incubar cada una a 37°C por una hora. Finalmente cada muestra se evaporó con gas de nitrógeno y se resuspendió con 25 μL de acetonitrilo para ser cuantificados por LC-MS (92). El paso a paso se puede observar de mejor manera en la figura 24.

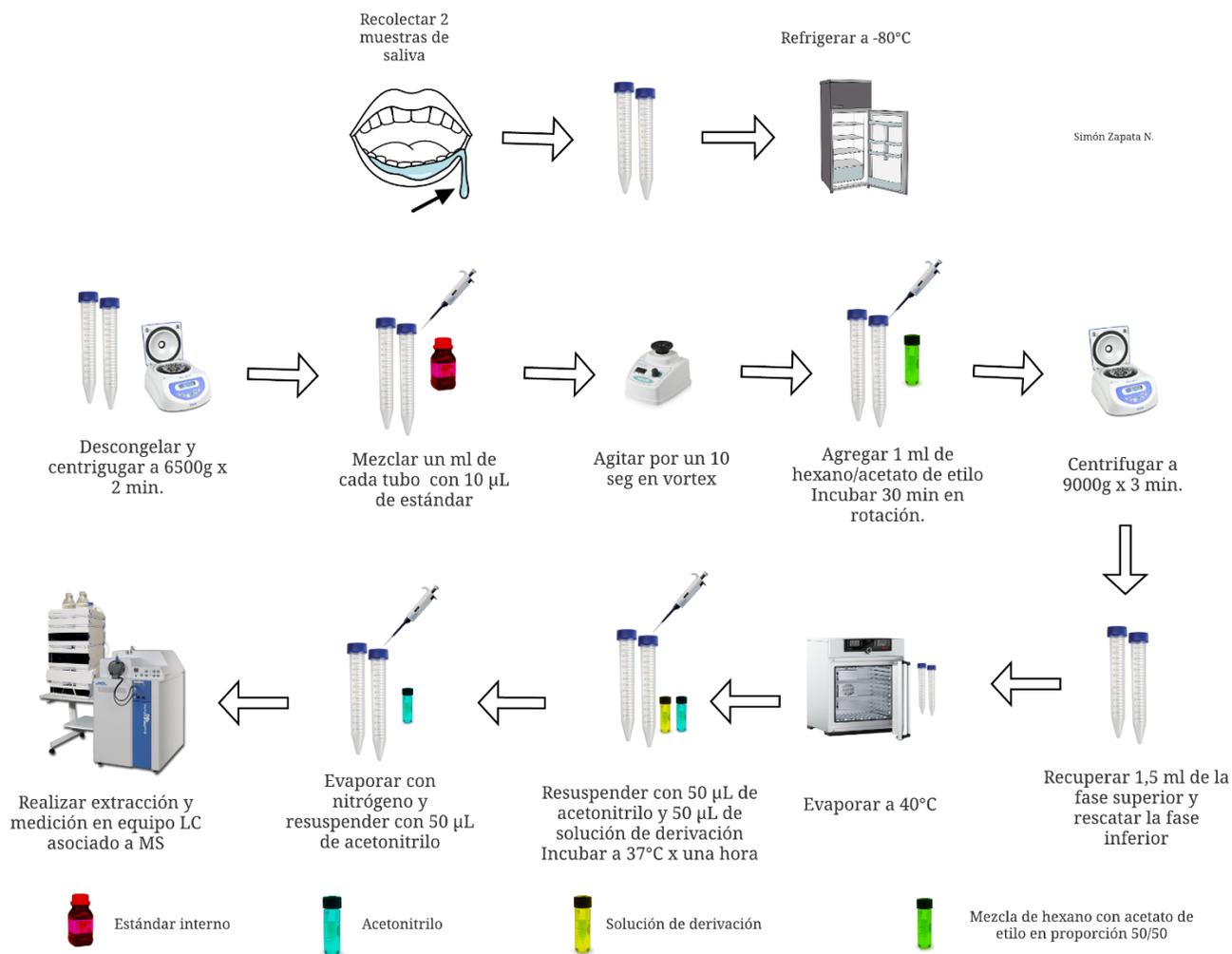


Figura N° 24: Metodología utilizada en el estudio de Han y colaboradores. Se observa el paso a paso del tratamiento de cada muestra. Elaboración propia.

Los investigadores destacan que el proceso de cuantificación fue realizado en un espectrómetro de masas Sciex API 2000™ con sistema de ESI.

Dentro de lo que son los resultados se obtuvieron rangos de referencia para hombres y mujeres, por ejemplo, para la testosterona en hombres el rango fue de 0,07 a 0,087 ng/ml y en mujeres <0,03 ng/ml. Por otro lado, la progesterona en hombres fue de 0,032 a 0,089 ng/ml y en mujeres en etapa de preovulación de 0,02 a 0,045 ng/ml y en esta de ovulación de 0,037 a 0,063 ng/ml.

Las metodologías han ido variando conforme pasan los años, el RIA se ha dejado de lado en investigaciones con seres humanos debido a su alta peligrosidad para quien realiza la técnica debido al uso de radioisótopos. Por su parte los EIA tienen una gran ventaja debido a la posibilidad de la adquisición de kits comerciales que facilitan las mediciones y con ello la estandarización de las técnicas, a diferencia de los métodos más modernos como la LC-MS, ya que cada investigador basa su manera de tratar las muestras y cuantificar las hormonas en otros estudios realizados con anterioridad o con base a sus propios principios, variando en la mayoría de los casos las cantidades y los reactivos utilizados. En la figura 25 se aprecia una representación de la evolución con respecto a los primeros ensayos realizados, principalmente por RIA y como han ido evolucionando hacia las metodologías que hoy predominan, como lo es la LC-MS, donde hay algunos autores que la destacan como la metodología “gold standard” para estas mediciones (93).

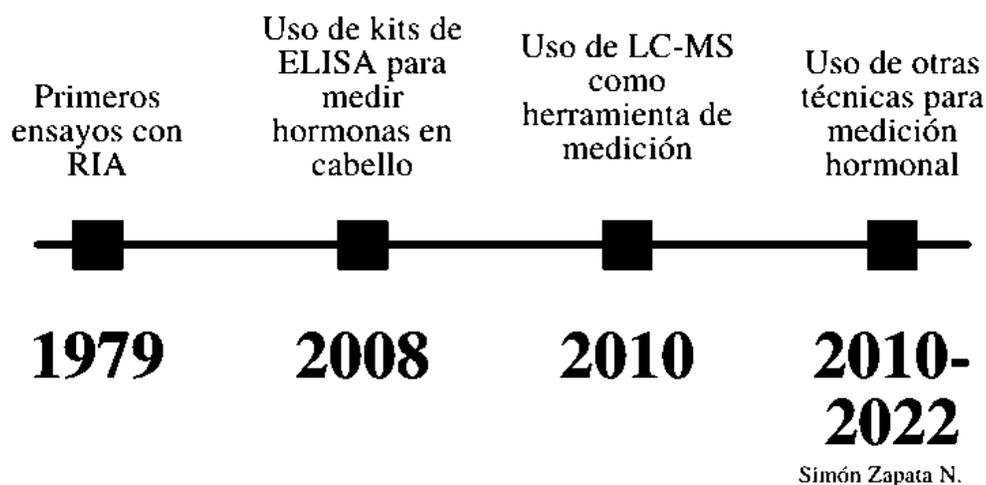


Figura N° 25: Representación evolutiva de las metodologías para medición hormonal. En la que se aprecian algunos hitos importantes en el paso de los años con respecto a las muestras no invasivas. *Los años utilizados corresponden a estudios puntuales obtenidos en la presente revisión, no indican el comienzo del uso para cierta metodología con ese año en particular.* Elaboración propia.

5) BENEFICIOS DEL USO DE MUESTRAS NO INVASIVAS

5.1) Muestras libre de estrés.

Múltiples estudios a la fecha se han dedicado a estudiar el estrés en la población, debido a todos los efectos que este produce en los seres humanos, posibilitando incluso el desarrollo de depresión, debido a cambios en el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal o HPA por sus siglas, modulado principalmente por la hormona cortisol, la llamada molécula del estrés (94). Investigadores han realizados pruebas para poder comparar las diferentes muestras usadas en los estudios, como suero, cabello, saliva, orina entre otras, con el fin de poder dilucidar si su uso realmente ofrece una alternativa libre de estrés, en lo que respecta a la toma de muestra (95).

Okamura y sus colaboradores en el año 2014 desarrollaron un estudio en el cual se seleccionó a 50 recién nacidos con el fin de medir el cortisol en tres muestras principales, suero, saliva y orina. Los resultados obtenidos por los investigadores destacan que los valores de la hormona que se obtienen del suero tienen una correlación lineal con un grupo en particular de recién nacidos, específicamente en aquellos de los cuales la muestra fue obtenida gracias a un catéter arterial permanente previamente colocado, es decir, los niveles de cortisol entre la muestra arterial y salival no tenían mayores diferencias. A diferencia del otro grupo, del cual el suero fue obtenido por una punción venosa, donde los resultados no tenían una correlación lineal, siendo mayor en la muestra sanguínea. Los investigadores concluyeron que el dolor del procedimiento invasivo, en lo que respecta a la introducción de la aguja en la piel del niño puede inducir una alteración en los niveles de cortisol plasmático, no así en las muestras no invasivas como la saliva (95). Lo que se puede apreciar en la figura 26, la cual esquematiza cómo los niveles de cortisol se elevan al momento de la punción, alterando el eje HPA e induciendo a errores en la medición real cuando se usan muestras invasivas.

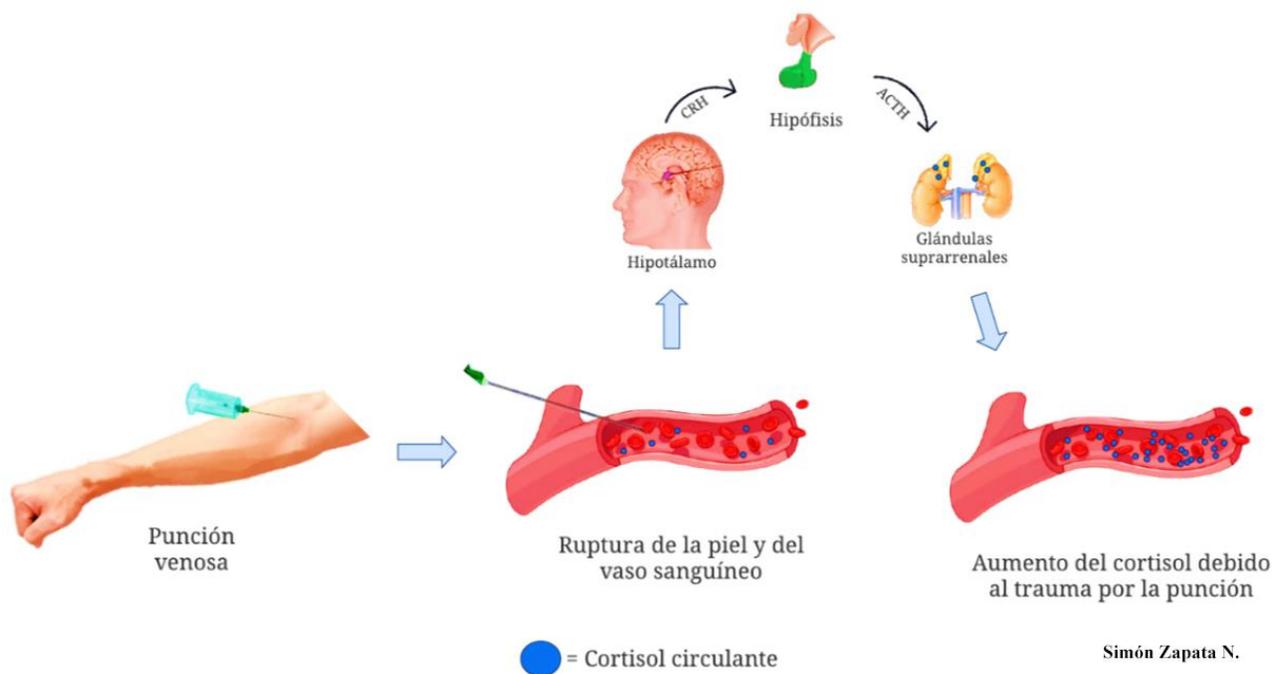


Figura N° 26: Mecanismo de aumento del cortisol debido a una punción venosa. En la cual se puede apreciar como una ruptura de la piel y el vaso sanguíneo puede aumentar la actividad del eje HPA y con ello la cantidad de cortisol circulante. CRH = Hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa – ACTH = Hormona adrenocorticotropa. Elaboración propia.

Otro estudio, más antiguo, del año 1993 elaborado por Meeran y colaboradores realizó una prueba en la cual se midió el cortisol y la adrenocorticotropina (ACTH) por una venopunción en nueve voluntarios, de los cuales seis mostraron un aumento en los niveles de ACTH dentro de los primeros 90 segundos, y el cortisol, por otro lado, comenzó a aumentar a los cuatro minutos, generando una alteración en la medición y como los autores destacan, puede llegar a ser una medida engañosa en este tipo de hormonas las cuales se pueden alterar fácilmente por estímulos externos que aumentan temporalmente los niveles de estrés en las personas (96).

Por lo anteriormente mencionado es que se ha buscado el uso de este tipo de muestras no invasivas para la medición de las hormonas como el cortisol. Un estudio de Fowler y

colaboradores en 2019 buscó establecer una relación entre los niveles de cortisol y el tamaño de la amígdala derecha en niños después de una situación controlada de exposición al estrés (97). 42 niños fueron parte de esta investigación y a cada uno se le tomó un total de 7 muestras de saliva para este efecto, las cuales fueron analizadas vía ELISA con posterioridad (97). La cantidad de muestras no es menor, por lo que de haber realizado las mediciones por punción venosa podría haber ocurrido una alteración en los valores obtenidos y con ello llegar a conclusiones incorrectas.

Otros autores en sus investigaciones también han preferido el uso de muestras libres de estrés, como se puede apreciar en la tabla número 6, donde se recopilan algunos estudios realizados en los últimos 5 años, en los cuales se cuantificaron algunas hormonas como el cortisol con el uso de saliva y/o cabello, además, se destaca en la columna 6 la cantidad de muestras que se le solicitó a cada participante, las cuales, en algunos casos superan las cuatro por cada uno.

Tabla N° 7: Recopilación de estudios con muestras no invasivas. En la cual se aprecian datos importantes como la metodología utilizada, tipo de muestra y cantidad de ellas, junto con la(s) hormona(s) que se cuantificaron en cada uno. Elaboración propia

Autor - Año	Método utilizado	Hormona(s) medida(s)	Participantes	Tipo de muestra	N° de muestras solicitadas	Referencia
Stern y col. - 2022	LC/MS-MS	Cortisol Progesterona Testosterona	155	Saliva y cabello	5 de saliva 2 de cabello	(98)
Surviliéné y col. - 2022	ELISA	Cortisol Estradiol Testosterona	71	Saliva y plasma	1 de saliva 1 de plasma	(99)
Fels y col. - 2019	ELISA	Cortisol DHEA	71	Saliva y plasma	1 de saliva 1 de plasma	(100)
Jeon y col. - 2022	ELISA	Cortisol	20	Saliva	5 de saliva	(101)
Robertson y col. - 2020	S/I	Cortisol DHEA Testosterona	68	Cabello	1 de cabello	(101)
Hong y col. - 2021	LC/MS-MS IE-QL	Cortisol	84	Saliva y cabello	8 de saliva 1 de cabello	(102)
Perry y col. - 2022	IE-QL	Cortisol	180	Cabello	1 de cabello	(103)

LC-MS/MS = Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem.

ELISA = Enzimoimmunoanálisis de adsorción

IE-QL = Inmunoensayo de quimioluminiscencia

S/I = Sin información

DHEA = Dehidroepiandrosterona

En conclusión, para este apartado se puede decir que el uso de muestras no invasivas permite obtener valores más exactos con respecto a las hormonas del estrés, ya que su uso no altera los valores como si lo hacen las muestras de sangre.

5.2) Retrospectividad en la medición hormonal

Como se describió en el capítulo dos, el cabello presenta la característica de ser susceptible a las hormonas circulantes en la sangre, tanto para su desarrollo como su crecimiento, a esto se le debe sumar otra característica, la cual es la concentración de las hormonas en la estructura del folículo como tal, es decir, los metabolitos que ingresan al cabello por difusión pasiva o que son creadas por la propia matriz se mantienen a lo largo del tiempo (12, 104). Esto ha sido de completa utilidad para diversos estudios realizados en la actualidad en el cual los investigadores aprovechan esta característica para realizar mediciones de hormonas y obtener resultados sobre los valores en los cuales osciló dicho marcador previamente. Se ha llegado a la conclusión de que el cabello, en promedio crece alrededor de un centímetro por mes, en personas sanas, esto quiere decir que un centímetro de cabello puede reflejar un mes de mediciones de alguna hormona en particular (105). A modo de ejemplo se puede decir que, si el cabello de una persona midiera exactamente 4 centímetros, como se ve en la figura 27, se podría obtener información de manera retrospectiva, de los últimos cuatro meses sobre alguna hormona u otro metabolito medible, solo con un puñado de cabellos de ese tamaño.



Simón Zapata N.

Figura N° 27: Representación de la longitud de cabello y la retrospectividad hormonal. En la cual se observa una regla con 4 centímetros que representan cuatro meses de hormonas concentradas en esa longitud. M = Meses. Elaboración propia.

Todo esto ha generado diversos modelos de estudios en los cuales se aprovecha esta característica. Por ejemplo, un estudio realizado en 2021 por Damen y colaboradores, analizó el cortisol a largo plazo de niños y adolescentes con síndrome de Prader-Willi, un trastorno hipotalámico en el cual se puede desarrollar una insuficiencia suprarrenal central inducida por estrés, en el cual participaron un total de 41 personas y se utilizaron muestras de cabello de los tres centímetros más proximales al cuero cabelludo, con el fin de obtener información acerca de los últimos tres meses en lo que respecta a la concentración de cortisol capilar, esto permitió dilucidar que los niveles de cortisol a largo plazo era normal en la mayoría de niños analizados (106).

Oresta y colaboradores en abril de 2021 desarrollaron un estudio similar al anterior, donde también se usaron los tres centímetros más proximales del cabello para la medición de cortisol en adultos para obtener resultados con respecto a los últimos tres meses previos a la medición, sin embargo, la cohorte fue mucho más grande, en total participaron 1166 personas, con la finalidad de establecer si algún trauma infantil o exposición a la adversidad podría haber desregulado el eje HPA y con ello la producción hormonal de cortisol a lo largo del tiempo. Se llegó a la conclusión de que no habían asociaciones entre la infancia y los niveles de la hormona en la adultez (107).

Otra forma de aprovechar esta característica del cabello es en la medición a largo plazo de las hormonas cuando la toma de muestra en el pasado se vuelve difícil o prácticamente imposible, como podría ser en una medición intrauterina del feto. Kapoor y sus colaboradores desarrollaron un estudio en el cual se realizó una medición de cortisol y testosterona en 22 crías de monos Rhesus con el fin de saber si la exposición materna a situaciones de estrés afectaba la concentración de estas hormonas en las crías. Los investigadores obtuvieron el pelo 2 a 4 días después del parto y lo analizaron por LC-MS/MS, obteniendo como resultados que los niveles de ambas hormonas eran más bajas en aquellas crías de madres expuestas a situaciones de estrés (108).

Otro ejemplo de lo antes mencionado es en el estudio de Tisdale y colaboradores del año 2019 el cual fue descrito en el capítulo anterior, en el cual se cuantificaron hormonas del

cabello de momias de Egipto, los autores destacan que el cabello es un recurso muy valioso en lo que es la investigación bioarqueológica, en esta ocasión 10 individuos momificados fueron estudiados para poder obtener información que desde los huesos no podría extraerse. Los autores concluyeron que las hormonas reproductivas como la testosterona y el estradiol se conservan de buena forma en el cabello arqueológico (73), dando a entender así que este tipo de muestras permite no solo obtener información del pasado cercano (últimos meses), sino que también volver aún más en el tiempo, a aquellas épocas en las cuales no se podían cuantificar las hormonas como hoy en día y que para hacerlo actualmente, no se puede contar con las matrices comunes como la sangre ya que el desgaste del tiempo impide su uso.

En la tabla 7 se aprecian algunos estudios realizados en el último tiempo que usaron el cabello como forma de medición a largo plazo en donde se aprecia en la columna 4 la cantidad de meses y, por ende, centímetros de cabello analizado.

Tabla N° 8: Recopilación de estudios de cortisol en retrospectiva del cabello. En la cual se aprecian datos importantes como la metodología utilizada y la cantidad de meses que fueron cuantificados hacia el pasado. Elaboración propia

Autor - Año	Metodología	Cantidad de participantes	Meses en retrospectiva	Referencia
Jahns y col. - 2022	LC-MS/MS	1321	1	(109)
King y col. - 2022	IE-QL	85	5	(110)
Marcil y col. - 2022	IE-QL	372	3	(111)
Sopp y col. - 2021	S/I	371	2	(112)
Levhar y col. - 2022	ELISA	217	3	(113)
van der Valk y col. 2021	LC-MS/MS	1604	3	(114)
Rajcani y col. - 2021	IE-QL	693	3	(115)

6) ESTADO DEL ARTE EN CHILE

Al igual que en otras partes del mundo, se han realizado estudios en Chile con respecto al uso de cabello y saliva en la medición hormonal, a diferencia de otros países, la cantidad de estudios realizados no es tan abundante ni tan seguido en el tiempo.

Dentro de los ejemplos que podemos encontrar tenemos a un estudio que se mencionó anteriormente, del año 2015 realizado por Garrido y colaboradores, en el cual realizaron una medición de cortisol salival nocturno en participantes de Santiago de Chile, en total participaron 75 voluntarios todos mayores de edad. La metodología elegida por los autores fue la electro quimioluminiscencia (93), una técnica que no fue incluida en esta revisión, pero que basa sus principios en un tipo de inmunoensayo, en el cual se usan anticuerpos que forman un complejo con el antígeno a medir y se fijan a la base con electromagnetismo, para poder formar un complejo luminiscente que es medible posteriormente (116). Este estudio permitió establecer un límite de corte para el cortisol salival nocturno de 0,31 µg/dL, además compararon dicho valor con algunos voluntarios diagnosticados con síndrome de Cushing, donde todos y cada uno de ellos presentaron valores por sobre el límite de corte. Esta investigación también permitió establecer diferencias entre los valores obtenidos por los autores y los valores que aparecían en la literatura (93).

Otro estudio realizado en 2017 por Aichele y colaboradores analizó la testosterona salival entre jugadores de futbol sub-17, entre los cuales se incluyeron a 75 jóvenes en total de entre 15 a 17 años de Chile, entre los cuales se encontraron jugadores de la selección chilena sub-17, cadetes de futbol y escolares que no participan de manera activa en dicho deporte. La metodología utilizada fue ELISA, específicamente usando un kit comercial disponible en el mercado. Los autores llegaron a la conclusión, gracias a este estudio, que los niveles de testosterona obtenidos en jugadores de futbol de la selección son menores en comparación a los otros dos grupos (117).

Por último, mencionar un estudio más reciente, del año 2020 realizado por Aravena y colaboradores en el cual participaron pacientes de la clínica odontológica de la universidad

Austral de Chile, a los cuales se le realizó una medición de cortisol salival mediante la técnica de ELISA, con la finalidad de establecer si los efectos de la música podrían influir en los niveles de ansiedad en pacientes que se someten a una extracción dental. Gracias a este estudio y el uso de estas muestras libres de estrés los investigadores llegaron a la conclusión de que el uso de algunas frecuencias musicales disminuye los niveles de cortisol en las personas, ayudándolas en una operación dental (118).

Si bien la cantidad de estudios realizados en el último tiempo no es tan amplia como en otras materias, está la posibilidad de usar este tipo de muestra para poder aprovechar los beneficios que pueden otorgar, como los mencionados en el capítulo anterior. Dependerá de cada investigador que quiera realizar una medición hormonal a una gran cohorte considerar que existe esta factibilidad de las muestras no invasivas, que a su vez son fáciles de obtener y de conservar si se siguen los lineamientos establecidos en otras investigaciones.

CONCLUSIONES

La medición hormonal entrega información valiosa sobre el estado de salud de una persona, desde la posibilidad de diagnosticar una enfermedad, hasta saber su exposición a situaciones adversas en base al cambio en la concentración de estos metabolitos.

Debido a su fisiología, tanto el cabello como la saliva ofrecen la posibilidad de cuantificar hormonas a partir de estas muestras, ya que gracias a la circulación sanguínea y la estructura tanto del folículo piloso como de las glándulas salivales se dan las condiciones para que estos metabolitos puedan concentrarse y por ende medirse por diversos métodos.

Dentro de los métodos disponibles hoy en día los investigadores han demostrado una preferencia por los EIA y por la LC-MS, debido a la cantidad de estudios publicados. Los RIA han sido dejados de lado debido a su peligrosidad con respecto al uso de radioisótopos. Existen otras metodologías que si bien, no están tan masificadas como las anteriormente nombradas, están disponibles para su uso

El paso a paso que cada investigador utiliza al momento de tratar las muestras y cuantificar las hormonas es muy variable, desde la temperatura de conservación, las revoluciones de la centrífuga o el tiempo de extracción son diferentes en cada estudio, siendo más demoroso en la muestra de cabello dado el tiempo requerido para extraer los metabolitos de la matriz. Algunos investigadores se basan en autores de años anteriores y otros crean una metodología para este fin. Por lo que la posibilidad de estandarizar alguna técnica para su uso en, por ejemplo, un hospital, podría ser un desafío.

Las muestras no invasivas presentan beneficios que no entrega otras muestras como la sangre, como su fácil obtención, ser libres de estrés y entregar resultados retrospectivos. La suma de estas características permite abrir nuevos horizontes para los investigadores sobre todo con respecto a los estudios de hormonas relacionadas con el estrés.

Las investigaciones realizadas en Chile en esta materia existen y pueden ser aplicables a la población sin ningún problema, tal y como lo demuestran los estudios recopilados. Por lo que el uso de estas muestras en el país no es algo inalcanzable.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alicia DDC. Endocrinología clínica. 4 ed. S.A. EEMM, editor. Cuauhtémoc2012.
2. Baumgartner AM, Jones PF, Baumgartner WA, Black CT. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J Nucl Med.* 1979;20(7):748-52.
3. Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of Physiology.* 1902;28(5):325-53.
4. Jameson JL. *Harrison's endocrinology.* 1 ed2017.
5. Petrovic M, Perez S, Barcelo D. *Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle : Occurrence and Transformation in the Environment.* Oxford, NETHERLANDS, THE: Elsevier Science & Technology; 2013.
6. Molina PE. *Fisiología Endócrina.* 4º ed2014.
7. Meulenberg PMM, Ross HA, Swinkels LMJW, Benraad TJ. The effect of oral contraceptives on plasma-free and salivary cortisol and cortisone. *Clinica Chimica Acta.* 1987;165(2):379-85.
8. Valera Bestard B, Soria Dorado MA, Piédrola Maroto G, Hidalgo Tenorio MC. Manifestaciones psiquiátricas secundarias a las principales enfermedades endocrinológicas. *Anales de Medicina Interna.* 2003;20:50-6.
9. T. RED, L. JV, G. NW. LABORATORIO DE HORMONAS: ASPECTOS PRÁCTICOS. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2015;26(6):776-87.
10. Péres BLR. *Manual de toma de muestras exámenes de laboratorio clinico hospital Guillermo Grant Benavente Concepcion.* 4 ed. Concepción2019.
11. Navarra CUd. *Diccionario médico - Invasivo 2021* [Available from: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/invasivo>].
12. Cooper GAA. Chapter 1 - Anatomy and Physiology of Hair, and Principles for its Collection. In: Kintz P, Salomone A, Vincenti M, editors. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology.* Boston: Academic Press; 2015. p. 1-22.
13. Buffoli B, Rinaldi F, Labanca M, Sorbellini E, Trink A, Guanziroli E, et al. The human hair: from anatomy to physiology. *International Journal of Dermatology.* 2014;53(3):331-41.

14. Randall V, Botchkareva N. The Biology of Hair Growth. 2009. p. 3-35.
15. Martel JL, Miao JH, Badri T. Anatomy, Hair Follicle. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
16. Nutbrown M, Randall VA. Differences between connective tissue-epithelial junctions in human skin and the anagen hair follicle. *J Invest Dermatol.* 1995;104(1):90-4.
17. Jahoda CA, Horne KA, Oliver RF. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature.* 1984;311(5986):560-2.
18. Randall VA. Androgens and human hair growth. *Clinical Endocrinology.* 1994;40(4):439-57.
19. Chase HB. Growth of the Hair. *Physiological Reviews.* 1954;34(1):113-26.
20. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med.* 1999;341(7):491-7.
21. Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest.* 2001;107(4):409-17.
22. Kligman AM. The human hair cycle. *J Invest Dermatol.* 1959;33:307-16.
23. Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, Botchkarev VA, Gilchrist BA. SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *Faseb j.* 2001;15(3):645-58.
24. Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol.* 2001;117(1):3-15.
25. Kaufman KD. Androgen metabolism as it affects hair growth in androgenetic alopecia. *Dermatol Clin.* 1996;14(4):697-711.
26. Roloff B, Fechner K, Slominski A, Furkert J, Botchkarev VA, Bulfone-Paus S, et al. Hair cycle-dependent expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptors in murine skin. *Faseb j.* 1998;12(3):287-97.
27. Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol.* 2001;116(5):793-800.

28. Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, et al. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and synthesize cortisol. *The FASEB Journal*. 2005;19(10):1332-4.
29. Lynfield YL. Effect of pregnancy on the human hair cycle. *J Invest Dermatol*. 1960;35:323-7.
30. Handelsman DJ. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2021, MDText.com, Inc.; 2000.
31. Randall VA. Androgens and hair growth. *Dermatologic Therapy*. 2008;21(5):314-28.
32. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2001;85(2):162-9.
33. Lamy E, Mau M. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *Journal of Proteomics*. 2012;75(14):4251-8.
34. Kaufman E, Lamster IB. The Diagnostic Applications of Saliva— A Review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2002;13(2):197-212.
35. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*. 2002;8(3):117-29.
36. Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res*. 1987;66(2):387-97.
37. Lee VM, Linden RW. An olfactory-submandibular salivary reflex in humans. *Exp Physiol*. 1992;77(1):221-4.
38. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):11-25.
39. de Almeida EA, Di Mascio P, Harumi T, Spence DW, Moscovitch A, Hardeland R, et al. Measurement of melatonin in body fluids: standards, protocols and procedures. *Childs Nerv Syst*. 2011;27(6):879-91.
40. Segawa A, Loffredo F, Puxeddu R, Yamashina S, Testa Riva F, Riva A. Cell biology of human salivary secretion. *Eur J Morphol*. 2000;38(4):237-41.
41. Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem*. 1983;29(10):1752-6.

42. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* 2010;4(1):171-89.
43. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol.* 2007;52(12):1114-35.
44. Zolotukhin S. Metabolic hormones in saliva: origins and functions. *Oral diseases.* 2013;19(3):219-29.
45. Grönblad EA. Concentration of immunoglobulins in human whole saliva: effect of physiological stimulation. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(2):87-95.
46. Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: Recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology.* 1994;19(4):313-33.
47. Priya B, Mustafa MD, Guleria K, Vaid NB, Banerjee BD, Ahmed RS. Salivary progesterone as a biochemical marker to predict early preterm birth in asymptomatic high-risk women. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 2013;120(8):1003-11.
48. Lood Y, Aardal E, Ahlner J, Ärlemalm A, Carlsson B, Ekman B, et al. Determination of testosterone in serum and saliva by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: An accurate and sensitive method applied on clinical and forensic samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2021;195:113823.
49. Fekete Z, Korec R, Feketeova E, Murty VL, Piotrowski J, Slomiany A, et al. Salivary and plasma insulin levels in man. *Biochem Mol Biol Int.* 1993;30(4):623-9.
50. Messenger B, Clifford MN, Morgan LM. Glucose-dependent insulintropic polypeptide and insulin-like immunoreactivity in saliva following sham-fed and swallowed meals. *J Endocrinol.* 2003;177(3):407-12.
51. Pérez-Castillo A, Blázquez E. Synthesis and release of glucagon by human salivary glands. *Diabetologia.* 1980;19(2):123-9.
52. De Matteis R, Puxeddu R, Riva A, Cinti S. Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *J Anat.* 2002;201(5):363-70.
53. Carter CS, Pournajafi-Nazarloo H, Kramer KM, Ziegler TE, White-Traut R, Bello D, et al. Oxytocin: behavioral associations and potential as a salivary biomarker. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:312-22.

54. Yalow RS. Radioimmunoassay. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1980;9(1):327-45.
55. Walker RF, Riad-Fahmy D, Read GF. Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. *Clinical Chemistry*. 1978;24(9):1460-3.
56. Dlugash G, Schultheiss OC. Suitability of saliva stimulants for valid assessment of steroid hormones via radioimmunoassay. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;127:105175.
57. Flores Reyes Roberto GAH, Jiménez Salgado Manuel, Parra Rivas Bárbara, Ramírez Muñoz Verónica, Scappaticcio Berdón Angélica. GUÍA DE BIOSEGURIDAD PARA LABORATORIOS CLÍNICOS 2019:[98 p.]. Available from: <https://n9.cl/3rovt>.
58. Crowther JR. *The ELISA guidebook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2001.
59. Biolabs C. CLIA Based Kits Development 2022 [Available from: <https://acortar.link/lxj2Vk>].
60. Slominski R, Rovnaghi CR, Anand KJS. Methodological Considerations for Hair Cortisol Measurements in Children. *Therapeutic drug monitoring*. 2015;37(6):812-20.
61. Crisci AK, Ring B, Sawarkar S, Cabello Y, Garcia-Calvo L, Hebles Duvison M, et al. QUANTITATIVE DETECTION OF BIOLOGICALLY RELEVANT ANTI-MULLERIAN HORMONE (AMH) AND PROGESTERONE IN HUMAN HAIR SAMPLES. *Fertility and Sterility*. 2020;114(3):e531.
62. Zhu C, Yuan C, Ren Q, Wei F, Yu S, Sun X, et al. Comparative analysis of the effects of collection methods on salivary steroids. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):352.
63. Bird IM. *High performance liquid chromatography: principles and clinical applications*. *BMJ (Clinical research ed)*. 1989;299(6702):783-7.
64. Niessen WMA. *Liquid chromatography-mass spectrometry*: CRC press; 2006.
65. Becker S. *Inorganic mass spectrometry: principles and applications*: John Wiley & Sons; 2008.
66. Spitzer AR, Chace D. Proteomics- and metabolomics-based neonatal diagnostics in assessing and managing the critically ill neonate. *Clin Perinatol*. 2008;35(4):695-716, vi.
67. Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Goullé JP, Ludes B. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography–ionspray mass spectrometry. *Forensic Science International*. 2000;107(1):381-8.

68. Fernández Lainez C. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. 2019.
69. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clinical Biochemistry*. 2005;38(4):296-309.
70. Gaudl A, Kratzsch J, Bae YJ, Kiess W, Thiery J, Ceglarek U. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair. *Journal of Chromatography A*. 2016;1464:64-71.
71. Fariha R, Jabrah M, Hill C, Spooner A, Deshpande P, Tripathi A. Simultaneous detection of salivary cortisol and cortisone using an automated high-throughput sample preparation method for LC-MS/MS. *SLAS Technology*. 2022.
72. ALPCO. Cortisol (Saliva) ELISA 2018 [6.0:[Available from: <https://n9.cl/ky3hm>].
73. Tisdale E, Williams L, Schultz JJ, Wheeler SM. Detection of cortisol, estradiol, and testosterone in archaeological human hair from the Dakhleh Oasis, Egypt. *Journal of Archaeological Science: Reports*. 2019;27:101968.
74. Webb E, Thomson S, Nelson A, White C, Koren G, Rieder M, et al. Assessing individual systemic stress through cortisol analysis of archaeological hair. *Journal of Archaeological Science*. 2010;37(4):807-12.
75. DiaMetra. Cortisol ELISA saliva 2022 [Available from: <https://diametra.com/product/cortisol-saliva-elisa/>].
76. DiaMetra. Testosterone Saliva ELISA 2022 [Available from: <https://diametra.com/product/test-test/>].
77. DiaMetra. CORTISOL SALIVA ELISA2022. Available from: <https://diametra.com/wp-content/uploads/2019/09/DKO020-Cortisol-Saliva-CE-IFU-3.pdf>.
78. Romere C, Duerrschmid C, Bournat J, Constable P, Jain M, Xia F, et al. Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell*. 2016;165(3):566-79.
79. Ugur K, Aydin S. Saliva and Blood Asprosin Hormone Concentration Associated with Obesity. *International journal of endocrinology*. 2019;2019:2521096-.
80. Aydin S, Halifeoglu İ, Ozercan İH, Erman F, Kilic N, Aydin S, et al. A comparison of leptin and ghrelin levels in plasma and saliva of young healthy subjects. *Peptides*. 2005;26(4):647-52.

81. Krahel A, Paszynska E, Slopian A, Gawriolek M, Otulakowska-Skrzynska J, Rzatowski S, et al. Stress/Immune Biomarkers in Saliva among Children with ADHD Status. *International journal of environmental research and public health*. 2021;18(2):769.
82. Demeditec. Cortisol free in Saliva ELISA2022. Available from: <https://n9.cl/cu7pm>.
83. Calamari CV, Viau P, Nichi M, Martins GS, Sobral G, Manguiera Dias JH, et al. Hair as an alternative noninvasive matrix: sources of variation in testosterone levels. *Domestic Animal Endocrinology*. 2020;72:106477.
84. Yang HZ, Lan J, Meng YJ, Wan XJ, Han DW. A preliminary study of steroid reproductive hormones in human hair. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1998;67(5):447-50.
85. Bakker-Huvenaars MJ, Greven CU, Herpers P, Wieggers E, Jansen A, van der Steen R, et al. Saliva oxytocin, cortisol, and testosterone levels in adolescent boys with autism spectrum disorder, oppositional defiant disorder/conduct disorder and typically developing individuals. *European Neuropsychopharmacology*. 2020;30:87-101.
86. Althaus M, Groen Y, A.Wijers A, Noltes H, Tucha O, Sweep FC, et al. Do blood plasma levels of oxytocin moderate the effect of nasally administered oxytocin on social orienting in high-functioning male adults with autism spectrum disorder? *Psychopharmacology*. 2016;233(14):2737-51.
87. MacKenzie MA, Hoefnagels WH, Jansen RW, Benraad TJ, Kloppenborg PW. The influence of glycyrrhetic acid on plasma cortisol and cortisone in healthy young volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(6):1637-43.
88. de Kruijff I, Noppe G, Kieviet N, Choenni V, Lambregtse-van den Berg MP, Begijn DGA, et al. LC-MS/MS-based reference intervals for hair cortisol in healthy children. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;112:104539.
89. Noppe G, de Rijke YB, Dorst K, van den Akker ELT, van Rossum EFC. LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clinical Endocrinology*. 2015;83(2):162-6.
90. Gao W, Penz M, Wekenborg M, Walther A, Kirschbaum C. Determination of thyroid hormones in human hair with online SPE LC–MS/MS: Analytical protocol and application in study of burnout. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;106:129-37.

91. Li X, Li S, Kellermann G. Simultaneous determination of three estrogens in human saliva without derivatization or liquid-liquid extraction for routine testing via miniaturized solid phase extraction with LC-MS/MS detection. *Talanta*. 2018;178:464-72.
92. Han L, Wemm SE, Shen L, Spink DC, Wulfert E, Cao ZT. Noninvasive detection of human dehydroepiandrosterone, progesterone and testosterone using LC-MS/MS revealed effects of birth control pills/devices and body weight on ovulatory prediction. *Journal of Chromatography B*. 2021;1174:122716.
93. Garrido M, Romero C, Cid M, Araya AV. Detección de cortisol salival nocturno en una muestra de sujetos de Santiago de Chile, mediante la técnica de electroquimioluminiscencia. *Rev Chil Endocrinol Diabetes*. 2015;8(3):102-7.
94. Wu Y, Li S, Hu K, Yang J. Evidence of the moderating role of hair cortisol and hair cortisone in the relationship between work stress and depression symptoms among Chinese fishermen. *Journal of Affective Disorders*. 2021;294:868-75.
95. Okamura H, Kinoshita M, Saito H, Kanda H, Iwata S, Maeno Y, et al. Noninvasive surrogate markers for plasma cortisol in newborn infants: utility of urine and saliva samples and caution for venipuncture blood samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(10):E2020-4.
96. Meeran K, Hattersley A, Mould G, Bloom SR. Venepuncture causes rapid rise in plasma ACTH. *Br J Clin Pract*. 1993;47(5):246-7.
97. Fowler CH, Bogdan R, Gaffrey MS. Stress-induced cortisol response is associated with right amygdala volume in early childhood. *Neurobiology of Stress*. 2021;14:100329.
98. Stern J, Arslan RC, Penke L. Stability and validity of steroid hormones in hair and saliva across two ovulatory cycles. *Comprehensive Psychoneuroendocrinology*. 2022;9:100114.
99. Survilienė V, Rukšėnas O, Pomeroy PP, Moss SEW, Bennett KA. Evaluating suitability of saliva to measure steroid concentrations in grey seal pups. *General and Comparative Endocrinology*. 2022;326:114070.
100. Fels M, Rauterberg S, Schwennen C, Ligges U, Herbrandt S, Kemper N, et al. Cortisol/dehydroepiandrosterone ratio in saliva: Endocrine biomarker for chronic stress in pigs? *Livestock Science*. 2019;222:21-4.

101. Jeon K, Oh J-S. Study on quantification of stress according to sound pressure level of road noise: Case of salivary cortisol and heart rate. *Applied Acoustics*. 2022;192:108695.
102. Hong J, Kapoor A, DaWalt LS, Maltman N, Kim B, Berry-Kravis EM, et al. Stress and genetics influence hair cortisol in FMR1 premutation carrier mothers of children with fragile X syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;129:105266.
103. Perry NB, Donzella B, Troy MF, Barnes AJ. Mother and child hair cortisol during the COVID-19 pandemic: Associations among physiological stress, pandemic-related behaviors, and child emotional-behavioral health. *Psychoneuroendocrinology*. 2022;137:105656.
104. Henderson GL. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science International*. 1993;63(1):19-29.
105. Manenschijn L, Koper JW, Lamberts SWJ, van Rossum EFC. Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids*. 2011;76(10):1032-6.
106. Damen L, Donze SH, Grootjen LN, Hokken-Koelega ACS. Long-term cortisol levels in hair of children and adolescents with Prader-Willi Syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;132:105335.
107. Oresta S, Vinkers CH, van Rossum EFC, Penninx BWJH, Nawijn L. How childhood trauma and recent adverse events are related to hair cortisol levels in a large adult cohort. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;126:105150.
108. Kapoor A, Lubach GR, Ziegler TE, Coe CL. Hormone levels in neonatal hair reflect prior maternal stress exposure during pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;66:111-7.
109. Jahns CC, Poulain T, Vogel M, Kiess W. Association between hair cortisol concentration and behavioral difficulties in children and adolescents. *Psychoneuroendocrinology*. 2022;142:105795.
110. King LS, Humphreys KL, Cole DA, Gotlib IH. Hair cortisol concentration across the peripartum period: Documenting changes and associations with depressive symptoms and recent adversity. *Comprehensive Psychoneuroendocrinology*. 2022;9:100102.
111. Marciel M-J, Cyr S, Marin M-F, Rosa C, Tardif J-C, Guay S, et al. Hair cortisol change at COVID-19 pandemic onset predicts burnout among health personnel. *Psychoneuroendocrinology*. 2022;138:105645.

112. Sopp MR, Michael T, Lass-Hennemann J, Haim-Nachum S, Lommen MJJ. Longitudinal associations between hair cortisol, PTSD symptoms, and sleep disturbances in a sample of firefighters with duty-related trauma exposure. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;134:105449.
113. Levhar M, Schonblum A, Arnon L, Michael Y, Sheelo LS, Eisner M, et al. Residential greenness and hair cortisol levels during the first trimester of pregnancy. *Environmental Research*. 2022;204:112378.
114. van der Valk ES, van der Voorn B, Iyer AM, Mohseni M, Leenen PJM, Dik WA, et al. Hair cortisol, obesity and the immune system: Results from a 3 year longitudinal study. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;134:105422.
115. Rajcani J, Vytykacova S, Solarikova P, Brezina I. Stress and hair cortisol concentrations in nurses during the first wave of the COVID-19 pandemic. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;129:105245.
116. Poveda Paredes FX. Estudio comparativo de los métodos: Electro Quimioluminiscencia, e Inmunofluorescencia. Para la determinación de Troponina Cardíaca como ayuda diagnóstica en el Infarto Agudo de Miocardio. 2016.
117. Aichele Paschen MI, Stock Cristi C, Vega Contador FB. Diferencias en los niveles de testosterona en saliva y maduración biológica entre jugadores de fútbol sub 17 de diferentes niveles competitivos. 2017.
118. Aravena PC, Almonacid C, Mancilla MI. Effect of music at 432 Hz and 440 Hz on dental anxiety and salivary cortisol levels in patients undergoing tooth extraction: a randomized clinical trial. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2020;28:e20190601-e.