

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Estandarización de una Técnica de ELISA para la cuantificación de Serotonina
en muestras de orina**

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímico
Farmacéutico

Autor:

Guissela Carolina Enríquez Paladines

Director:

Vivian Alejandra Neira Molina

ORCID:  0000-0002-1615-0746

Cuenca, Ecuador

2024-11-15

Resumen

El presente proyecto de investigación forma parte de un estudio más amplio titulado "Utilidad de la Ludoterapia Cognitivo-Conductual y la Suplementación de Triptófano en la Reducción de la Agresividad en Niños de 3 a 9 Años con Antecedentes de Maltrato Infantil en Casas de Acogimiento Institucional, Cuenca, 2023". En este contexto, se requirió llevar a cabo mediciones de los niveles de serotonina en orina antes, durante y después de un programa de intervención que combina la ludoterapia cognitivo-conductual y una dieta suplementada con triptófano. Dicho programa se implementó en niños de edades comprendidas entre los 3 y 7 años que han sido víctimas de maltrato infantil. Este estudio se basó en la hipótesis de que los niños que han sufrido maltrato infantil tienden a manifestar conductas agresivas debido a la reducción de los niveles de serotonina en su organismo. Se postula que, a través de una dieta enriquecida con triptófano, junto con terapias de juego, es posible regular estos niveles y reducir la agresividad en estos niños. Para alcanzar uno de los objetivos del proyecto principal, fue necesario estandarizar la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para la medición precisa de los niveles de serotonina en muestras de orina. El propósito central de este trabajo de investigación es lograr la estandarización de una técnica de ELISA que permita la medición precisa de los niveles de serotonina en niños. Para alcanzar este objetivo, se llevó a cabo la construcción de una curva de calibración utilizando diluciones de un patrón de serotonina. Además, se verificó la replicabilidad de las mediciones en múltiples ocasiones para asegurar que el método haya sido adecuadamente estandarizado.

Palabras clave del autor: ludoterapia cognitivo-conductual, agresividad infantil, maltrato infantil, triptófano



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The present research project is part of a larger study entitled "Utility of Cognitive-Behavioral Play Therapy and Tryptophan Supplementation in the Reduction of Aggression in Children Aged 3 to 9 Years with a History of Child Abuse in Institutional Foster Care, Cuenca, 2023". In this context, it was required to carry out measurements of serotonin levels in urine before, during and after an intervention program combining cognitive-behavioral play therapy and a diet supplemented with tryptophan. This program was implemented in children aged 3 to 7 years who have been victims of child abuse. This study was based on the hypothesis that children who have suffered child abuse tend to manifest aggressive behaviors due to the reduction of serotonin levels in their organism. It is postulated that, through a diet enriched with tryptophan, together with play therapies, it is possible to regulate these levels and reduce aggressiveness in these children. To achieve one of the objectives of the main project, it was necessary to standardize the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) technique for the accurate measurement of serotonin levels in urine samples. The central purpose of this research work is to achieve the standardization of an ELISA technique that allows the accurate measurement of serotonin levels in children. To achieve this objective, a calibration curve was constructed using dilutions of a serotonin standard. In addition, the replicability of the measurements was verified on multiple occasions to ensure that the method has been adequately standardized.

Author Keywords: cognitive-behavioral play therapy, child aggression, child abuse, tryptophan



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	11
Objetivos	13
1. Marco teórico.....	14
1.1. Serotonina	14
1.1.1. Síntesis	14
1.1.2. Mecanismo de acción	15
1.1.3. Metabolismo.....	16
1.2. Ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	17
1.2.1. Componentes clave	17
1.2.2. Principios básicos	18
1.2.3. Tipos	18
1.2.3.1. ELISA directo	18
1.2.3.2. ELISA indirecto	19
1.2.3.3. ELISA sándwich	19
1.2.3.4. ELISA competitivo	20
1.2.4. Aplicaciones de la técnica ELISA	21
1.3. ELISA competitivo para determinación de serotonina	21
1.4. Curva de calibración	22
1.4.1. Construcción de una curva de calibración	22
1.4.2. Aspectos importantes en el trazado de la curva de calibración	23
1.5. Pruebas estadísticas de relación lineal	23
1.5.1. Coeficiente de correlación lineal.....	23
1.5.2. Coeficiente de determinación (R^2)	25
2. Metodología	26
2.1. Materiales, reactivos y equipos	26
2.3. Preparación de estándares y reactivos	27
2.3.1. Buffer de lavado.....	27
2.3.2. Diluciones estándar.....	27
2.3.3. Preparación de la solución de trabajo del anticuerpo marcado con biotina	27
2.3.4. Preparación de la solución de trabajo del Conjugado (SABC).....	28
2.4. Procedimiento del ensayo.....	28

3. Resultados y discusión.....	29
3.1. Obtención de la curva de calibración	29
3.1.1. Comparación entre la curva estándar experimental y la curva de demostración del protocolo.....	29
3.2. Cálculo de los parámetros estadísticos de relación lineal.	31
3.3. Determinación de la concentración de serotonina en muestras de orina.	32
4. Conclusiones y Recomendaciones.....	34
4.1. Conclusiones	34
4.2. Recomendaciones	34
Referencias.....	35
Anexos.....	38

Índice de figuras

Figura 1	Núcleos de la Rafe en la producción de serotonina.....	14
Figura 2	Biosíntesis de la Serotonina (5-hidroxitriptamina o 5HT)	15
Figura 3	Degradación de la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT)	16
Figura 4	Esquema simplificado de un ensayo ELISA directo.....	18
Figura 5	Esquema simplificado de un ensayo ELISA indirecto	19
Figura 6	Esquema simplificado de un ensayo ELISA sándwich	19
Figura 7	Esquema simplificado de un ensayo ELISA competitivo	20
Figura 8	Esquema simplificado de la técnica de ELISA para la medición de serotonina	22
Figura 9	Diferentes valores del coeficiente de correlación y sus correspondientes diagramas de dispersión	23
Figura 10	Relación lineal y no lineal	24
Figura 11	Serie de diluciones estándar	27
Figura 12	Curva de calibración para la medición de serotonina	29
Figura 13	Curva estándar de demostración	30

Índice de tablas

Tabla 1 Concentración de serotonina en orina.....	32
---	----

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
OMS	Organización Mundial de la Salud
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
5-HT	5-hidroxitriptamina
SNC	Sistema nervioso central
TPH	Triptófano hidroxilasa
DDC	Dopa Decarboxilasa
AADC	Decarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos
MAO	Monoamino oxidasa
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
OPD	<i>o</i> -fenilendiamina
TMB	Tetrametilbenzidina
PNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
AP	Fosfatasa alcalina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
SABC	Estreptavidina

Dedicatoria

Con profunda gratitud y amor, dedico esta tesis a mis seres queridos:

A mi madre, María, y a mi tía, Enma, por su apoyo incondicional y sabios consejos que han sido fundamentales en la construcción de mis sueños; y sin duda alguna, a mi padre, Ángel, que desde el cielo ha sido mi soporte para no desistir. Gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Sus sacrificios y fe en mí me han inspirado a superar cada obstáculo y lograr mis metas.

A mi hijo, Gael, quien es esa luz que ilumina mis días y la fuerza que me motiva a seguir hacia adelante. Que esta dedicatoria te recuerde de que todo lo que hago, lo hago pensando en tu bienestar y en tu futuro.

A mis hermanos, Rosa y Josué, por ser mis mayores alentadores y compañeros de vida. Su constante cariño y palabras de ánimo han sido una luz brillante en los momentos más oscuros.

A mis amigos, quienes han sido como una segunda familia. Su amistad incondicional ha hecho de esta travesía una experiencia más amena y enriquecedora. Gracias por todas esas risas compartidas y cada palabra de aliento.

Finalmente, quiero dedicar este logro para mí misma. Aquella estudiante que no se rindió, que perseveró y trabajó arduamente para alcanzar esta meta. Espero que este logro sirva como ejemplo de nuestra determinación y la capacidad de alcanzar cualquier objetivo que nos propongamos.

Con gratitud y satisfacción, celebro este logro con todos ustedes, consciente de que, sin su influencia y apoyo, esto no habría sido posible.

Guissela

Agradecimiento

Primero quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios por ser mi guía y fortaleza en el trayecto de mi carrera universitaria. A mi querida madre y queridos familiares por todo su amor y apoyo incondicional durante mi formación académica los cuales me han dado la fuerza para seguir adelante.

Mi más sincero agradecimiento de manera especial a las siguientes personas por su valiosa contribución en el desarrollo de este proyecto: a mi directora de tesis, Dra. Vivian Alejandra Neira Molina, por su invaluable apoyo y orientación a lo largo de mi proceso de titulación y a la BQF. Andrea Cabrera por su generosidad de tiempo y su disposición incondicional para el desarrollo de esta investigación. Su experiencia y conocimientos han sido fundamentales para el éxito de mi proyecto.

Por último, agradezco de corazón a mis amigos por brindarme su amistad sincera a lo largo de esta trayectoria, su apoyo incondicional ha hecho una diferencia significativa en mi vida.

A cada uno de ustedes, les agradezco infinitamente por su contribución invaluable y actitud generosa que han tenido un impacto relevante en mi crecimiento y desarrollo.

Guissela

Introducción

Según la (Organización Mundial de la Salud, 2022), el maltrato hacia los niños es un problema de salud pública con alcance global que trae consecuencias muy graves que se mantienen toda la vida. Esta entidad define este término como "cualquier tipo de abuso (o desatención) que afecte al menor que son de menos de 18 años, abarcando cualquier tipo de maltrato físico o emocional, abuso sexual, desatención, negligencia y explotación con fines comerciales u otros que pongan en peligro la salud, el desarrollo o la dignidad del menor o que puedan haber comprometido su supervivencia (que coloquen en riesgo su supervivencia) en el contexto de una relación de responsabilidad (de tutela) confianza o poder." Acorde con los datos, de la OMS, 3 de cada 4 niños de 2 a 4 años reciben castigos físicos o violencia psicológica por parte de los padres o cuidadores generalmente.

En Ecuador, datos previos a la pandemia indican que el 51% de los menores de 1 a 5 años experimentaron maltrato físico y el 47,3% en el mismo grupo etario experimentaron alguna forma de abuso psicológico. No obstante, la situación de violencia en menores de edad aumentó debido a los cambios en los procesos de aprendizaje, la pérdida de empleo y de ingresos económicos en los hogares, lo que agudizó esta problemática a causa de la crisis sanitaria (World Vision Ecuador, 2021).

Un artículo de revisión sistemática sobre los "Efectos del Maltrato Físico Infantil a Nivel Fisiológico, Psicológico y Social en la Adulthood" manifiesta que a partir del maltrato infantil se desencadenan cambios en la conducta y trastornos mentales, que pueden perjudicar al niño en el tipo de relaciones que mantiene con su entorno (Serrato et al., 2021). Existen diversas sustancias neuroquímicas que están implicadas en la regulación de la conducta agresiva-violenta. Las catecolaminas, la serotonina, el glutamato y el GABA (ácido gamma-aminobutírico) son algunas de estas sustancias neuroquímicas que tienen un papel tan relevante en la regulación de la agresividad. La disminución de la concentración de serotonina favorece la alta frecuencia de las reacciones agresivas, a partir de que se da un incremento de la concentración de serotonina se da una disminución de la agresividad-violencia (Rodríguez & Imaz, 2020).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha establecido como la técnica estándar para medir la serotonina en diversas muestras biológicas, como el suero sanguíneo y la orina, debido a su alta sensibilidad y especificidad en la detección del analito (García, 2018). Por otro lado, aunque el análisis de serotonina en orina mediante la técnica de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) es válido, no es comúnmente utilizado para medir los niveles de serotonina. Por esta razón, el objetivo de este estudio es implementar esta técnica para facilitar la toma de muestras sin la necesidad de una venopunción, lo que

resulta en una forma menos traumática para los niños que sufren maltrato infantil. Además, este método es más económico que la HPLC.

Este proyecto se clasifica como un estudio técnico de pruebas diagnósticas, centrado en la estandarización de la técnica de ELISA para medir serotonina en orina. Su propósito principal es garantizar que las mediciones de serotonina sean precisas y replicables en el marco de una investigación más amplia que se está llevando a cabo.

Objetivos

Objetivo General:

Estandarizar una técnica de ELISA para medir los niveles de serotonina en muestras de orina.

Objetivos Específicos:

- Identificar los procedimientos y estándares en la medición de serotonina mediante ELISA en muestras de orina.
- Construir una curva de calibración precisa utilizando patrones de serotonina y determinar la dilución ideal de las muestras de orina para asegurar mediciones confiables.
- Validar la técnica estandarizada de ELISA a través de la replicación de mediciones en múltiples ocasiones, garantizando su fiabilidad y precisión en la cuantificación de serotonina en muestras de orina.

1. Marco teórico

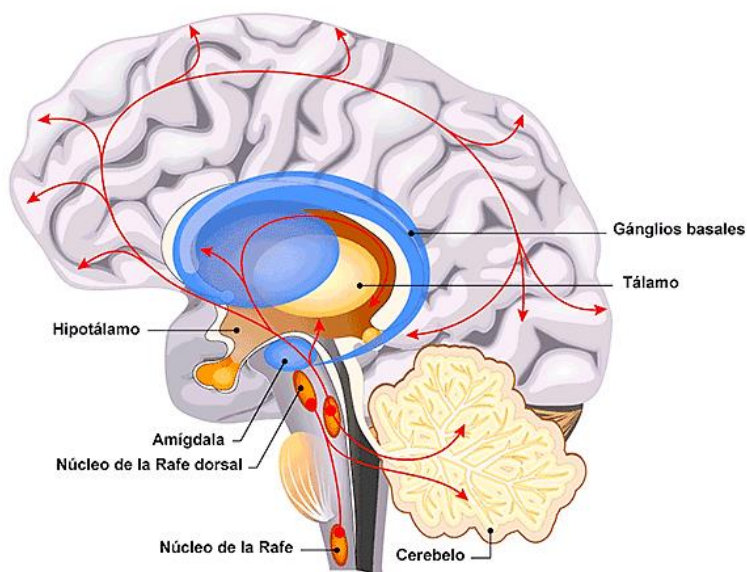
1.1. Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) es una monoamina neurotransmisora que se produce en las neuronas serotoninérgicas presentes en el Sistema Nervioso Central y en las células enterocromafines (células de Kulchitsky) del tubo digestivo de los seres humanos y de los animales. La serotonina se encuentra en grandes cantidades en el tubo digestivo (alrededor del 90%) y el mayor depósito es el de las plaquetas de la sangre circulante (Baumel, 1999).

Su distribución se extiende por todo el cerebro, sin embargo, su concentración en el sistema nervioso central (SNC) representa menos del 5% del contenido total presente en el organismo (Olivier, 2015). Las neuronas de los núcleos de la Rafe son la fuente principal de liberación de 5-HT en el cerebro. Los núcleos de la Rafe es un conjunto de neuronas distribuidas en 9 grupos pares y localizadas a lo largo de toda la longitud del tronco encefálico (Baumel, 1999).

Figura 1

Núcleos de la Rafe en la producción de serotonina



Nota. Tomado de *Núcleos del Rafe, anatomía y función*, por E. Martínez, 2023, Psicoactiva (<https://www.psicoactiva.com/blog/nucleos-de-la-rafe-anatomia-y-funcion/>).

1.1.1. Síntesis de serotonina

El triptófano una vez absorbido mediante los sistemas de transporte propios del enterocito SLC6A19 (membrana apical) y SLC6A10 (membrana basolateral), se destina hacia la circulación sanguínea, en donde dispone de un mecanismo de transporte mediante una proteína transportadora para su incorporación al SNC a través de la barrera hematoencefálica

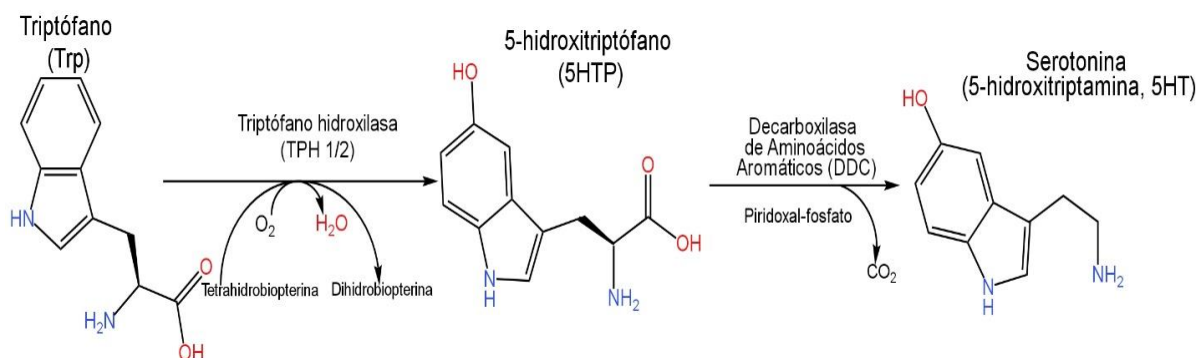
(Cataldo et al., 2014). En las neuronas serotoninérgicas, la 5-HT se sintetiza por una vía de dos etapas a partir del aminoácido esencial triptófano. La reacción comienza con la hidroxilación del L-Triptófano (L-Trp) en el carbono 5 del anillo aromático por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), TPH 1 (neuronal) o TPH 2 (extra neuronal), que requiere de tetrahidrobiopterina como cofactor para formar 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Esta reacción es seguida por la descarboxilación del 5-HTP a 5-HT, cuya enzima implicada es la Dopa Descarboxilasa (DDC), requiriendo piridoxal-fosfato como cofactor (Soria et al., 2008) (Cataldo et al., 2014) (Figura 2).

La serotonina ingerida por vía oral no pasa dentro de las vías serotoninérgicas del Sistema Nervioso Central porque ésta no cruza la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el triptófano y su metabolito 5-hidroxitriptófano (5-HTP), con los cuales la serotonina es sintetizada, cruzan la barrera hematoencefálica (Baumel, 1999).

Una vez sintetizada la serotonina es almacenada en gránulos secretores mediante un transportador de monoamina vesicular (VMAT2) y liberada posteriormente por exocitosis de las neuronas serotoninérgicas al espacio sináptico. La velocidad de síntesis de serotonina está determinada por la concentración de triptófano disponible en el cerebro o sangre, ya que el triptófano hidroxilasa no se satura a la concentración normal de triptófano (Hilal-Dandan & Brunton, 2015).

Figura 2

Biosíntesis de la Serotonina (5-hidroxitriptamina o 5HT)



Nota. Dada la capacidad de la enzima Dopa Descarboxilasa (DDC) de transformar diferentes aminoácidos en sus correspondientes aminas, esta enzima también es llamada de forma más correcta, Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos (AADC). Tomado de “Papel de la serotonina periférica en la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa” (p. 499), por L. Cataldo., et al., 2014, Nutrición Hospitalaria, 30 (3).

1.1.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la serotonina involucra la interacción con los receptores de serotonina presentes en diferentes áreas del SNC. Se han caracterizado 14 subtipos de

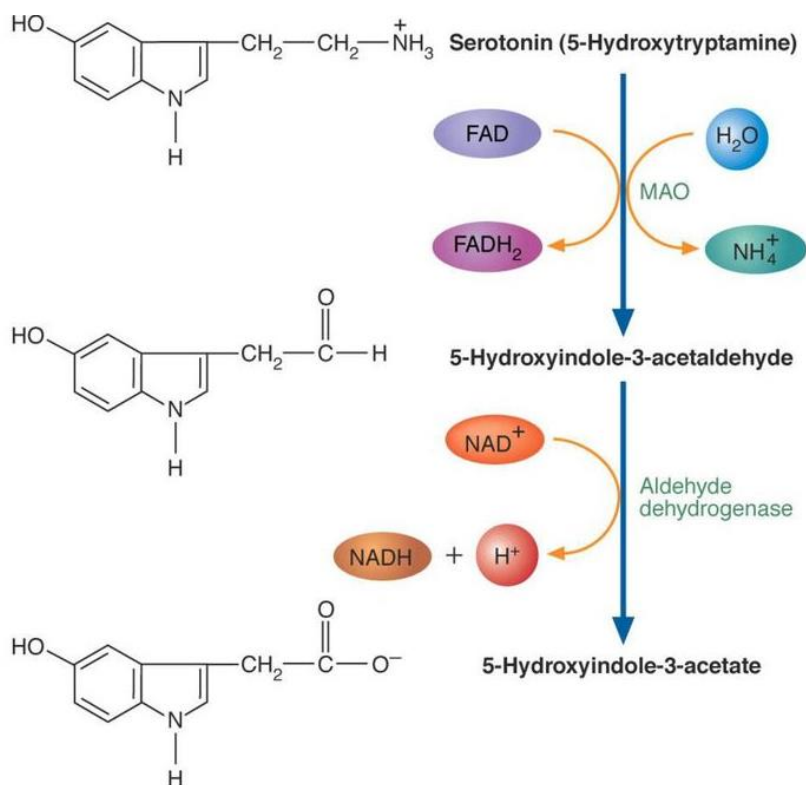
receptores para la 5-HT, los cuales incluyen: 5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 y 7. Cuando la serotonina es liberada en la sinapsis, se une a los receptores de serotonina en las neuronas postsinápticas no serotoninérgicas. El efecto de la serotonina en el cuerpo depende del subtipo de receptor al que se une (Olivier, 2015). Debido a la acción de la 5-HT sobre los diferentes tipos de receptores que tienen efectos tanto inhibitorios como excitatorios, se le ha relacionado con numerosas funciones fisiológicas como la regulación del dolor y la temperatura corporal, la ingesta de líquidos y alimentos, el comportamiento sexual, la memoria, la regulación de los estados de ánimo, tales como: la depresión, la ansiedad y la violencia impulsiva (Soria et al., 2008).

1.1.3. Metabolismo de la serotonina

En el sistema nervioso, la acción de la 5-HT liberada se termina con la captación neuronal mediante un transportador específico para 5-HT (SERT), ubicado en la membrana de las terminaciones axónicas serotoninérgicas. En las neuronas serotoninérgicas del SNC, la vía metabólica primaria de la 5-HT implica la desaminación oxidativa por la monoamino oxidasa (MAO) y la posterior conversión por la aldehído deshidrogenasa del aldehído en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que llega a la circulación sanguínea y se excreta por los riñones (Hilal-Dandan & Brunton, 2015). Además, pequeñas cantidades de serotonina se conjugan con sulfato o ácido glucurónico y se excretan por la orina (Vasudevan et al., 2012).

Figura 3

Degradación de la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT)



Nota. La serotonina se desamina y se oxida para formar 5-hidroxiindol-3-acetaldehído. Esta última molécula se oxida para formar 5-hidroxiindol-3-acetato (5-HIAA). Tomado de *Bioquímica: la base molecular de la vida* (p. 520), por James McKee & Trudy McKee, 2020, McGraw-HillEducation.

1.2. Ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

El estándar de oro para la detección y cuantificación de péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas en muestras biológicas es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas conocido como ELISA. Desde su lanzamiento a principio de la década de 1970, casi todas las disciplinas biológicas utilizan ELISA y se ha convertido en una de las técnicas más empleadas en pruebas clínicas e investigaciones en ciencias biológicas. El método de ELISA funciona mediante la unión de un antígeno o anticuerpo a enzima de ensayo y se basa principalmente en una interacción antígeno-anticuerpo altamente específica (Berthold Technologies, 2022).

1.2.1. Componentes clave

La técnica de ELISA implica varios componentes clave que trabajan juntos para detectar y cuantificar antígenos o anticuerpos en una muestra. A continuación, se describen los principales componentes de una técnica de ELISA:

- **Fase sólida:** Es el soporte de la reacción. Existen diferentes tipos de materiales, entre los más populares son el poliestireno y el polivinilo, que pueden adsorber proteínas mediante interacciones hidrofóbicas (Prieto, 2006).
- **Antígeno o anticuerpo de captura:** Puede ser un antígeno (si se busca detectar anticuerpos) o un anticuerpo (si se busca detectar antígenos). Se inmoviliza en la fase sólida y se une específicamente al analito de interés en la muestra (Prieto, 2006).
- **Conjugados:** Dependiendo del ensayo, se utilizan anticuerpos o antígenos unidos a enzimas. Se emplean diferentes formas de anticuerpos como policlonales, isotipos de inmunoglobulinas purificados (IgG) y anticuerpos monoclonales. Las enzimas más populares son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante (Prieto, 2006).
- **Sustratos:** La acción de la enzima sobre el sustrato genera un producto soluble que sea cuantificable. Generalmente se utilizan sustratos incoloros que cambian a una solución coloreada que se mide por espectrofotometría en unidades de absorbancia a una longitud de onda determinada. Los sustratos para la peroxidasa de rábano picante son una mezcla entre el sustrato específico (H_2O_2) y un cromógeno, que cambia de color al ser oxidado por el O_2 liberado. Los más conocidos son *o*-fenilendiamina (OPD) y tetrametilbenzidina (TMB). Para la fosfatasa alcalina el sustrato más utilizado es el *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) del cual se genera el *o*-nitrofenol de color amarillo (Prieto, 2006).

1.2.2. Principios básicos

El ensayo ELISA, se fundamenta en el uso de una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El marcador enzimático se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Los ensayos se llevan a cabo en un soporte sólido en el que un antígeno o un anticuerpo (de interés o de captura) se adsorben y luego se unen al conjugado enzimático para formar inmunocomplejos. Esta unión se basa en reacciones de enlace competitivos o no competitivos. Se requiere de un paso de lavado para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Se añade el sustrato cromógeno y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato produciendo un color determinado observable a simple vista y cuantificable mediante un espectrofotómetro (Guzmán, 2004).

Hay varias teorías que sustentan la prueba de ELISA: 1) El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; 2) las enzimas tienen alta actividad específica y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite una detección precisa del antígeno o anticuerpo objetivo; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se conserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar (Guzmán, 2004).

1.2.3. Tipos

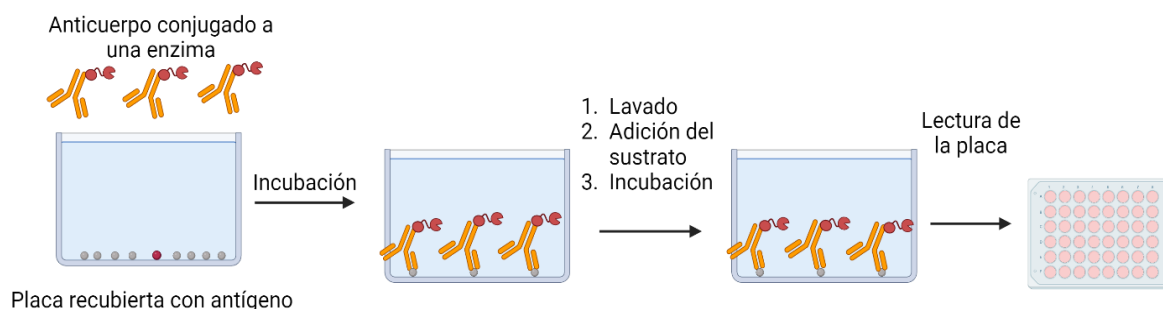
Actualmente existen cuatro variantes de ELISA que permiten la medición cuantitativa o cualitativa de antígeno o anticuerpo, las cuales se detallan a continuación:

1.2.3.1. ELISA directo

La superficie de la placa se recubre directamente con el antígeno de la muestra y se incuba con el conjugado enzimático. Luego en la fase de lavado se elimina el conjugado enzimático no unido del medio. Se agrega el sustrato que produce una señal directamente proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra (León, 2019).

Figura 4

Esquema simplificado de un ensayo ELISA directo



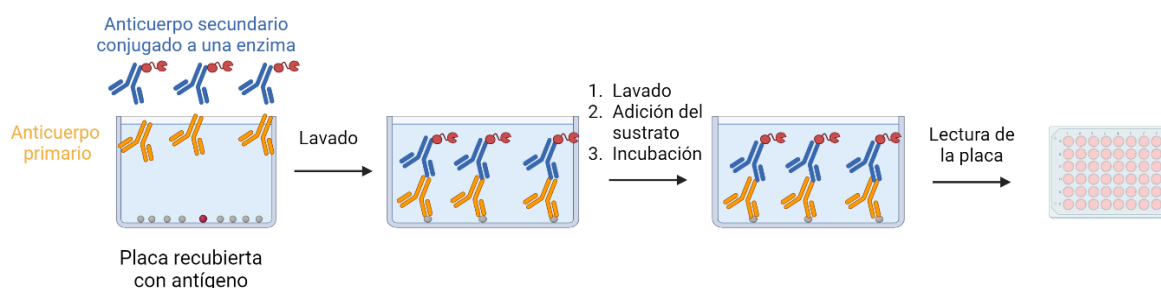
Nota. Tomado de *ELISA: ¿Qué es? ¿En qué consiste? ¿Cuáles son los distintos tipos de este ensayo y en qué se diferencian?*, I. León, 2019, AllScience (<https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>).

1.2.3.2. ELISA indirecto

La superficie de la placa es recubierta con antígeno de la muestra y se añade el anticuerpo primario (Ab_1) lo que permite que reaccione con el antígeno de la superficie de la placa. En la etapa de lavado se elimina cualquier Ab_1 libre, la presencia de anticuerpo unido a antígeno se detecta mediante la adición de un anticuerpo secundario (Ab_2) conjugado con enzima, que se une al anticuerpo primario. Otra etapa de lavado elimina cualquier Ab_2 libre y se añade sustrato que reacciona con la enzima para producir una señal de color detectable o cuantificable (Owen et al., 2020).

Figura 5

Esquema simplificado de un ensayo ELISA indirecto



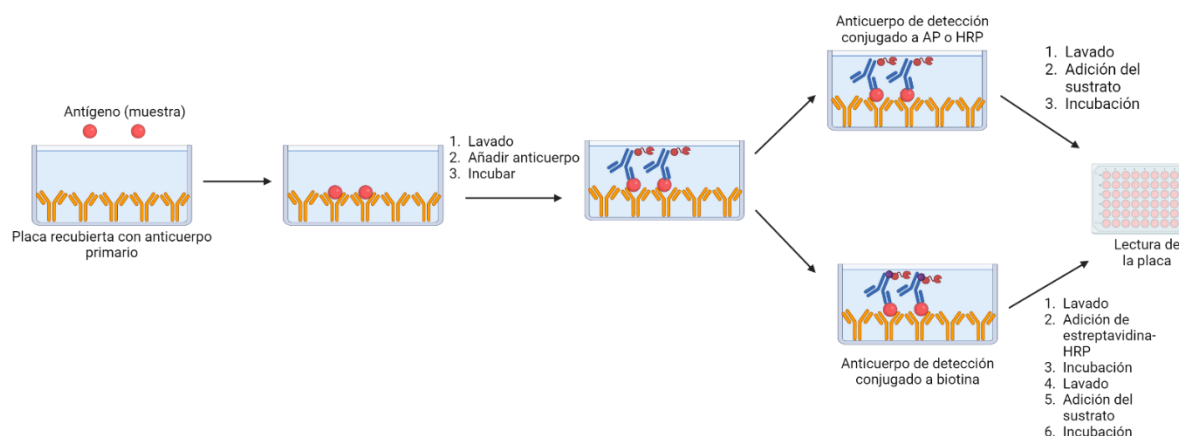
Nota. Tomado de *ELISA: ¿Qué es? ¿En qué consiste? ¿Cuáles son los distintos tipos de este ensayo y en qué se diferencian?*, I. León, 2019, AllScience (<https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>).

1.2.3.3. ELISA sándwich

El anticuerpo primario es inmovilizado en la superficie de la placa y el antígeno de la muestra reacciona con el anticuerpo inmovilizado. Después del lavado, se añade un anticuerpo secundario (de detección) ligado a enzima específico para un epítipo diferente sobre el antígeno permitiendo su reacción con el antígeno. Existe una variante común de este ensayo que utiliza un segundo anticuerpo enlazado a biotina, y a continuación se agrega avidina ligada a enzima. Se requiere de un segundo lavado para eliminar anticuerpo conjugado libre, se añade el sustrato y se mide el producto de reacción coloreado (Owen et al., 2020).

Figura 6

Esquema simplificado de un ensayo ELISA sándwich



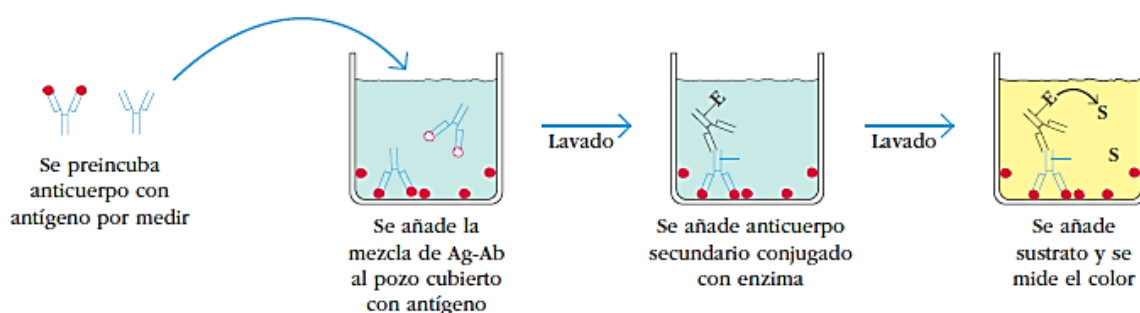
Nota. AP: fosfatasa alcalina, HRP: peroxidasa de rábano picante. Tomado de *ELISA: ¿Qué es? ¿En qué consiste? ¿Cuáles son los distintos tipos de este ensayo y en qué se diferencian?*, I. León, 2019, AllScience (<https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>).

1.2.3.4. ELISA competitivo

En esta variante de ensayo, la presencia y cantidad de un antígeno en una muestra desconocida se determinan por su capacidad de competir con un antígeno de referencia adsorbido en la superficie de la placa. Primero se incuba anticuerpo primario (Ab1) en solución con una muestra que contiene antígeno. La mezcla de antígeno-anticuerpo se añade a los pocillos recubiertos de antígeno. Mientras más antígeno esté presente en la muestra, menos anticuerpo libre estará disponible para unirse al antígeno adsorbido en el pocillo. En la etapa de lavado se elimina el anticuerpo no unido. Se añade un anticuerpo secundario (Ab2) conjugado con enzima específico para el anticuerpo (Ab1) para determinar la cantidad de anticuerpo (Ab1) unido al pocillo. En este tipo de ensayo, cuanto más alta es la concentración de antígeno en la muestra, más baja es la señal de color producida (Owen et al., 2020).

Figura 7

Esquema simplificado de un ensayo ELISA competitivo



Nota. Tomado de *Inmunología de Kuby* (p. 661), por J. Owen et al., 2020, McGraw-HillEducation.

1.2.4. Aplicaciones de la técnica ELISA

El ensayo de ELISA es ampliamente empleado para la medición de biomarcadores por su alta sensibilidad (Murphy et al., 2022). Sus aplicaciones abarcan múltiples campos, incluyendo clínico, industria farmacéutica, medio ambiente, alimentos. A continuación, se describen algunas de las principales aplicaciones de ELISA:

- **Clínico**

ELISA se utiliza en el diagnóstico de enfermedades como, detección de antígenos virales y bacterianos o anticuerpos específicos en el suero de pacientes, medición de niveles de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes y también monitoreo de biomarcadores en enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades renales (Vashits & Luong, 2018).

- **Industria farmacéutica**

Desarrollo de fármacos: Evaluación de la eficacia y seguridad de nuevos medicamentos mediante la medición de analitos biofarmacéuticos. En ensayos clínicos para evaluar respuestas terapéuticas y efectos secundarios mediante el monitoreo de biomarcadores (Vashits & Luong, 2018).

- **Medio ambiente**

Seguimiento de sustancias contaminantes, como productos químicos nocivos (arsénico, mercurio, pesticidas, etc.), toxinas o agentes de guerra biológica (Vashits & Luong, 2018).

- **Alimentos**

Pruebas de adulterantes, toxinas o sustancias nocivas en los alimentos: alérgenos, brotes de *Escherichia coli* O157:H7 y de toxina botulínica, otros patógenos como *Salmonella* y *Campylobacter* (Vashits & Luong, 2018).

1.3. Fundamento de ELISA competitivo para determinación de serotonina

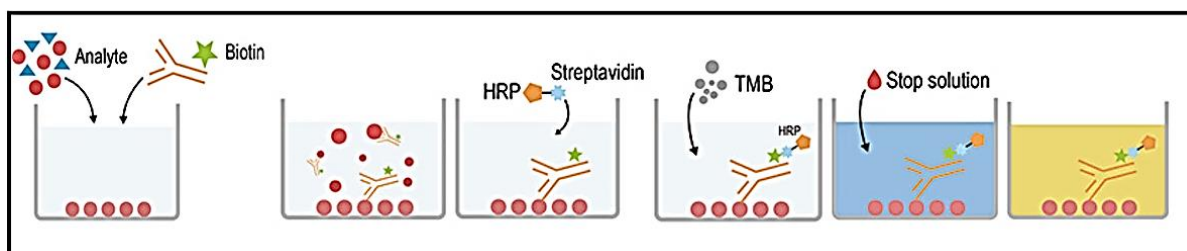
Los pocillos de microtitulación proporcionados han sido recubiertos previamente con el analito de interés. Durante la reacción, el analito en la muestra o estándar compite con una cantidad fija de analito presente en el soporte de fase sólida por los sitios en el anticuerpo de detección biotinilado específicos del analito. En la etapa de lavado, se elimina el anticuerpo de detección unido al analito de la muestra o estándar y exceso de anticuerpo, y se añade peroxidasa de rábano picante (HRP) - estreptavidina (SABC) a cada pocillo de la microplaca y se incuba. Luego se agrega la solución de sustrato TMB (tetrametilbenzidina) a cada pocillo. La reacción enzima-sustrato finaliza añadiendo una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. La absorbancia de la luz

emitida por la solución estándar o muestra es inversamente proporcional a la concentración de serotonina (AssayGenie, 2023).

La biotina es una vitamina del complejo B hidrosoluble con una propiedad importante: tiene una elevada afinidad por la proteína bacteriana (*Streptomyces avidinii*). Esta interacción es estable bajo numerosas condiciones, incluyendo la presencia de solventes tanto orgánicos como inorgánicos, desnaturalizantes, detergentes y extremos de temperatura (Owen et al., 2020).

Figura 8

Esquema simplificado de la técnica de ELISA para la medición de serotonina



Nota. Tomado de *Kit ELISA ST/5-HT (serotonina/5-hidroxitriptamina)*, por Elabscience, 2018, (https://www.elabscience.com/p-st_5_ht_serotonin_5_hydroxytryptamine_elisa_kit-17594.html).

1.4. Curva de calibración

Una curva de calibración es la representación gráfica que permite medir la concentración del analito en una muestra desconocida. Para ello se necesita de un instrumento (espectrofotómetro) que mide la absorbancia de la luz, que es proporcional a la cantidad de analito analizado y un conjunto de disoluciones patrón o estándar que son aquellas que contienen en estado puro y concentraciones conocidas del analito. Con las medidas realizadas a cada una de las disoluciones patrón se genera una gráfica. Las disoluciones que contienen todos los reactivos usados en el análisis, pero sin analito, se llaman blancos. Los blancos miden la respuesta del procedimiento analítico a las impurezas o especies interferentes que existan en los reactivos (Harris, 2016).

1.4.1. Construcción de una curva de calibración

En la construcción de una curva de calibración, primero se preparan muestras conocidas de analito (soluciones patrón) que cubran un intervalo adecuado de concentraciones, y se mide la respuesta del procedimiento analítico a estos patrones. Luego, se traza una gráfica con las absorbancias (eje y) frente a la concentración de analito analizado (eje x). A continuación, se determina la recta que «mejor» se ajusta a los datos (incluido el blanco) que se encuentran dentro del tramo lineal, y se calcula la pendiente y la ordenada en el origen junto con sus

incertidumbres. Finalmente, se estima la concentración del analito en la muestra de interés utilizando la ecuación de la curva o por interpolación (Harris, 2016).

1.4.2. Aspectos importantes en el trazado de la curva de calibración

- Es esencial que las soluciones patrones cubran el intervalo completo de concentraciones para la cuantificación del analito de interés ya que la concentración de las muestras de ensayo se determina por interpolación y no por extrapolación (Goicoechea & Olivieri, 2007).
- Siempre el punto cero o valor del blanco se debe incluir en la curva de calibración. Como se mencionó anteriormente el blanco no contiene ningún analito añadido, solo contiene los mismos reactivos que los otros materiales de ensayo y sujeto al mismo procedimiento analítico. La resta del valor del blanco de cualquier otra señal del instrumento antes de dibujar la gráfica proporciona información errónea sobre las incertidumbres del proceso de calibración (Goicoechea & Olivieri, 2007).

1.5. Pruebas estadísticas de relación lineal

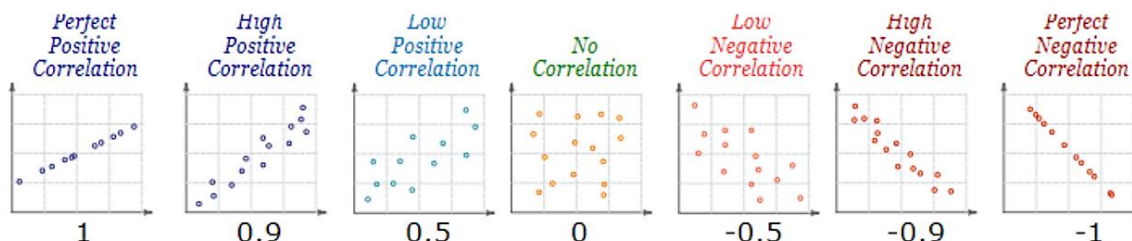
Los coeficientes de correlación lineal y el coeficiente de determinación son medidas estadísticas que se utilizan para describir y cuantificar la relación entre dos variables en un conjunto de datos.

1.5.1. Coeficiente de correlación lineal

Es una medida de asociación entre dos variables numéricas que evalúa específicamente la tendencia (creciente o decreciente) de los datos. Se considera que dos variables están asociadas cuando una variable proporciona información acerca de la otra mostrando así una tendencia creciente o decreciente. Por el contrario, lo que ocurre cuando no existe asociación, el aumento o disminución de una variable no influye sobre el comportamiento de la otra variable. La correlación nos permite medir el signo y la tendencia entre dos variables. En la figura 9 se observa los diferentes valores que puede tener el coeficiente de correlación y sus diagramas de dispersión correspondientes (Ferrero, 2020).

Figura 9

Diferentes valores del coeficiente de correlación y sus correspondientes diagramas de dispersión



Nota. Tomado de *¿Qué es la correlación estadística y cómo interpretarla?*, por R. Ferrero, 2020, Máxima Formación (<https://www.maximaformacion.es/blog-dat/que-es-la-correlacion-estadistica-y-como-interpretarla/>).

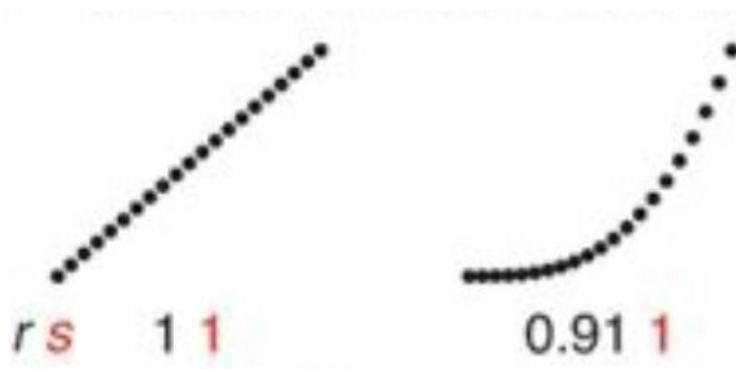
Interpretación

1. El signo nos indica la dirección de la relación:
 - Un valor positivo indica una relación directa o positiva.
 - Un valor negativo indica una relación indirecta, inversa o negativa.
 - Un valor nulo indica que no existe relación entre ambas variables (Ferrero, 2020).
2. La magnitud nos indica la fuerza de la relación, cuyo valor comprende entre -1 a 1. Cuanto más cercano sea el valor a los extremos del intervalo (-1 o 1) más fuerte será la tendencia de las variables, dicho de otra manera, será menor la dispersión que existe en los puntos alrededor de dicha tendencia. Cuanto más cerca del cero es el coeficiente de correlación, más débil será la tendencia, es decir, habrá más dispersión entre los puntos. Entonces si la correlación vale 1 o -1 significa que la correlación es perfecta, por el contrario si vale 0 significa que la variables no están correlacionadas (Ferrero, 2020).

Existen dos coeficientes de correlación más utilizados, el coeficiente correlación lineal de Pearson que sirve para cuantificar tendencias lineales, y el coeficiente de correlación de Spearman que se utiliza para tendencias crecientes o decrecientes, no necesariamente lineales pero sí monótonas (las variables tienden a moverse en la misma dirección pero no a un ritmo constante) (Ferrero, 2020) (Figura 10).

Figura 10

Relación lineal y no lineal



Nota. r: coeficiente de Pearson, s: coeficiente de Spearman. Cuando la relación es lineal, ambos coeficientes coinciden (valen 1), pero cuando la relación no es lineal, el coeficiente de Spearman representa mejor la relación entre ambas variables. Tomado de *¿Qué es la correlación estadística y cómo interpretarla?*, por R. Ferrero, 2020, Máxima Formación

(<https://www.maximaformacion.es/blog-dat/que-es-la-correlacion-estadistica-y-como-interpretarla/>).

1.5.2. Coeficiente de determinación (R^2)

El coeficiente de correlación indica el porcentaje de la variación de una variable que se debe a la variación de la otra y viceversa. Es decir, es la proporción de la variabilidad en la variable dependiente (y) que es explicada por la variabilidad en la variable independiente (x). Su valor varía entre 0 y 1. Un valor de R^2 cercano a 1 indica que un mayor porcentaje de la variabilidad en la variable dependiente es explicado por la variable independiente. En el modelo de regresión, esto significa que los puntos de los datos estarán más cerca de la línea de regresión ajustada. Por el contrario, cuando el valor de R^2 es cercano a 0, indica que la variable independiente explica muy poca variabilidad en la variable dependiente y, por lo tanto, en el modelo de regresión, los puntos de los datos estarán más alejados de la línea de regresión ajustada (Gestión de Operaciones, 2015).

2. Metodología

Este estudio se centra en las pruebas diagnósticas para lograr la estandarización de un método diagnóstico. En este proyecto de investigación, se llevó a cabo la estandarización de una técnica de ELISA competitivo para la cuantificación de serotonina, que implicó el uso de muestras biológicas, específicamente de orina. Durante la fase de estandarización, no se emplearon muestras de pacientes; en su lugar, se utilizaron patrones de laboratorio para construir una curva de calibración. Una vez completada la curva de calibración, se procedió a realizar pruebas en muestras biológicas específicamente en orina. Para obtener acceso a estas muestras, se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores legales de los niños participantes y se contó con la aprobación del estudio por parte del Comité Ética de Investigación en seres humanos de la Universidad de Cuenca (Código del proyecto: 2023-003ECEX-IE y dictamen de aprobación CEISH-UC-2023-476). Estos permisos fueron solicitados en el marco del proyecto principal titulado “Utilidad de la Ludoterapia Cognitivo-Conductual y la Suplementación de Triptófano en la reducción de la agresividad en niños de 3 a 9 años con antecedentes de maltrato infantil en casas de acogimiento institucional, Cuenca 2023”.

Los parámetros de estudio que se evaluaron se describen a continuación:

- **Concentración de Serotonina:** Representa la cantidad de serotonina presente en las muestras de orina medidas a 450nm.
- **Curva de Calibración:** Representa la relación entre las concentraciones conocidas de serotonina (patrones de laboratorio) y las respuestas medidas por la técnica de ELISA. Cada punto en la curva representa una concentración conocida de serotonina y su respectiva respuesta medida.
- **Dilución de las Muestras:** Indica la proporción o factor de dilución aplicado a las muestras de orina antes de la medición mediante ELISA. Esto es crucial para asegurar mediciones confiables dentro del rango de calibración.
- **Replicabilidad:** Se refiere a la capacidad de repetir las mediciones de serotonina en una misma muestra en múltiples ocasiones. Esta variable evalúa la precisión de la técnica de ELISA.

2.1. Materiales, reactivos y equipos

Véase en el anexo A.

2.2. Preparación de la muestra

Las muestras de orina se recibieron en horas de la mañana y, según lo establecido en el protocolo, se procedió de la siguiente manera: se centrifugaron las muestras de orina a 1200

r.p.m. durante 20 minutos (2-8°C), se recogió el sobrenadante e inmediatamente se realizó el ensayo.

2.3. Preparación de estándares y reactivos

De acuerdo con el protocolo establecido para la técnica de ELISA competitivo, se procedió a realizar lo siguiente: en primera instancia, se dejaron todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de usarlos.

2.3.1. Buffer de lavado.

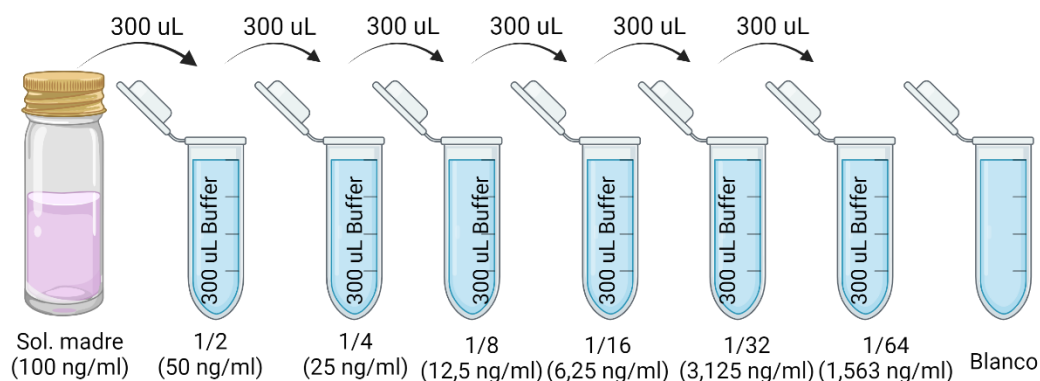
Se diluyó 15 ml del buffer concentrado de lavado en 375 ml de agua destilada.

2.3.2. Diluciones estándar

Se añadió 1 ml del buffer de dilución de la muestra en el tubo estándar liofilizado (solución madre), se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos y se mezcló bien. Se etiquetaron 7 tubos Eppendorf con 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y el blanco, respectivamente. Se introdujeron 300 µl del buffer de dilución de la muestra en cada tubo; posteriormente, se añadieron 300 µl de la solución madre en el primer tubo y se mezcló bien. Luego, se transfirieron 300 µl del primer tubo al segundo tubo, y así sucesivamente. Como blanco se utilizó el buffer de dilución de la muestra.

Figura 11

Serie de diluciones estándar



Nota. Es preferible utilizar las soluciones estándar dentro de las 2 horas posteriores a su preparación.

2.3.3. Preparación de la solución de trabajo del anticuerpo marcado con biotina

Se calculó el volumen total de la solución de trabajo: 50 µl/pocillo x cantidad de pocillos. Adicionalmente se colocó de 100-200 µl más del volumen total. Se diluyó el anticuerpo marcado con biotina en el buffer de dilución del anticuerpo a una proporción de 1:100 y se mezcló bien.

2.3.4. Preparación de la solución de trabajo del Conjugado (SABC)

Se calculó el volumen total de la solución de trabajo: $100 \mu\text{l/pocillo} \times \text{cantidad de pocillos}$. Adicionalmente se colocó de 100-200 μl más del volumen total. Se diluyó el SABC en el buffer de dilución SABC a una proporción de 1:100 y se mezcló bien.

2.4. Procedimiento del ensayo

Antes de comenzar con el procedimiento, se equilibró el sustrato TMB durante al menos 30 minutos a 37°C . El protocolo recomienda trazar una curva estándar para cada ensayo.

Lavado Manual

Llenar completamente cada pocillo con 350 μl del buffer de lavado y dejar remojar durante 1 a 2 minutos. Luego, desechar el contenido de la placa y colocarla sobre papel absorbente. Repetir este procedimiento el número designado de veces.

1. Se colocaron los pocillos estándar, de muestras y de control (blanco) en la placa y luego se registraron sus posiciones. Las mediciones de cada estándar y muestra se realizaron por duplicado. Antes de agregar las soluciones estándar, las muestras y el blanco en los pocillos, se lavó la placa 2 veces.
2. Se añadieron 50 μl de estándares, muestras y blanco a cada pocillo. Inmediatamente se añadieron 50 μl de la solución de trabajo del anticuerpo marcado con biotina a cada pocillo. Después de cubrir los pocillos con el sellador de placas provisto, se golpeó suavemente para asegurar una mezcla completa. La placa se incubó durante 45 minutos a 37°C .

Nota: Las soluciones se agregan al fondo del pocillo, evitar tocar las paredes del pocillo y formar espuma.

3. En la etapa de lavado, se repitió el proceso 3 veces según las instrucciones.
4. Se añadieron 100 μl de la solución de trabajo del conjugado SABC a cada pocillo. Luego, se cubrieron los pocillos con un nuevo sellador de placas y se incubaron durante 30 minutos a 37°C .
5. En la etapa de lavado, se repitió el proceso 5 veces según las instrucciones.
6. Se añadieron 90 μl de sustrato TMB a cada pocillo. Los pocillos se cubrieron con un nuevo sellador de placas y se incubaron de 10-20 minutos en la oscuridad a 37°C .
7. Se añadieron 50 μl de la solución de parada a cada pocillo. Los pocillos se volverán amarillos inmediatamente.

Nota: El orden de adición de la solución de parada debe ser el mismo que el de la solución de sustrato.

8. Se determinó la absorbancia (densidad óptica) de cada pocillo simultáneamente utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

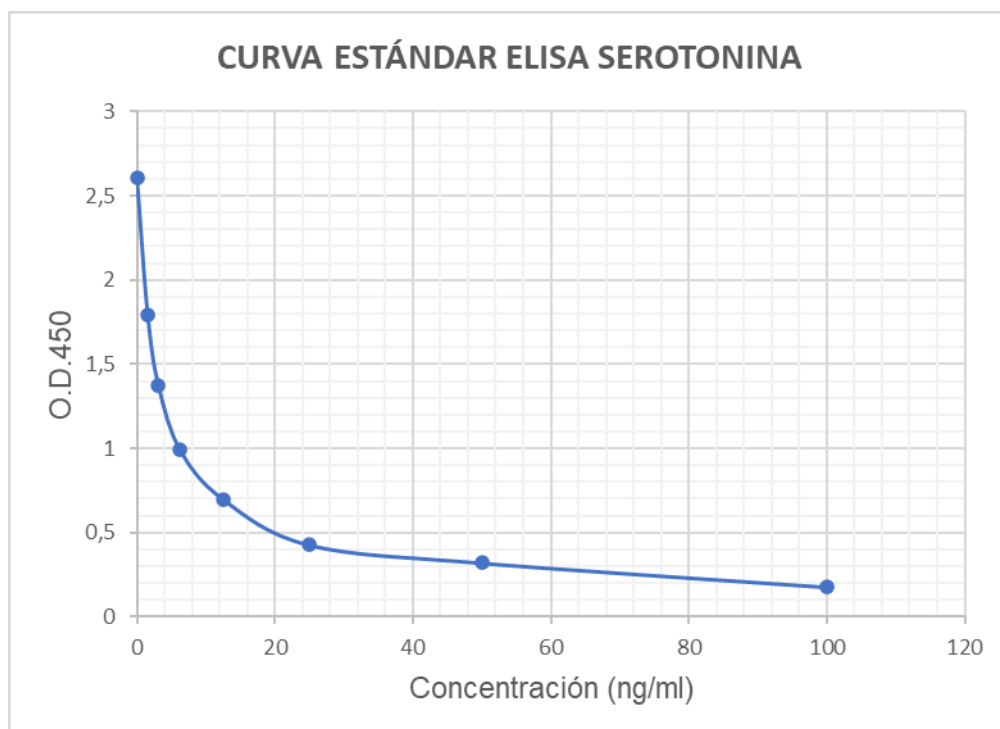
3. Resultados y discusión

3.1. Obtención de la curva de calibración

Después de preparar una serie de diluciones conocidas de la muestra estándar y medir sus respectivas absorbancias por duplicado a una longitud de onda de 450 nm utilizando un espectrofotómetro. Las condiciones experimentales incluyeron temperatura de reactivos, temperatura y tiempo de incubación. Inicialmente, se realizó un ensayo piloto con el fin de observar si las diluciones estándar demostraban una relación inversamente proporcional con la absorbancia, lo cual se pudo comprobar (Anexo B). Los datos obtenidos (Anexo C y Anexo D) se utilizaron para trazar la curva estándar experimental, en la cual el O.D.450 de cada solución estándar se representa en el eje y frente a la concentración respectiva de las soluciones estándar en el eje x.

Figura 12

Curva estándar de ELISA serotonina



Nota. OD: densidad óptica. Imagen creada por el autor.

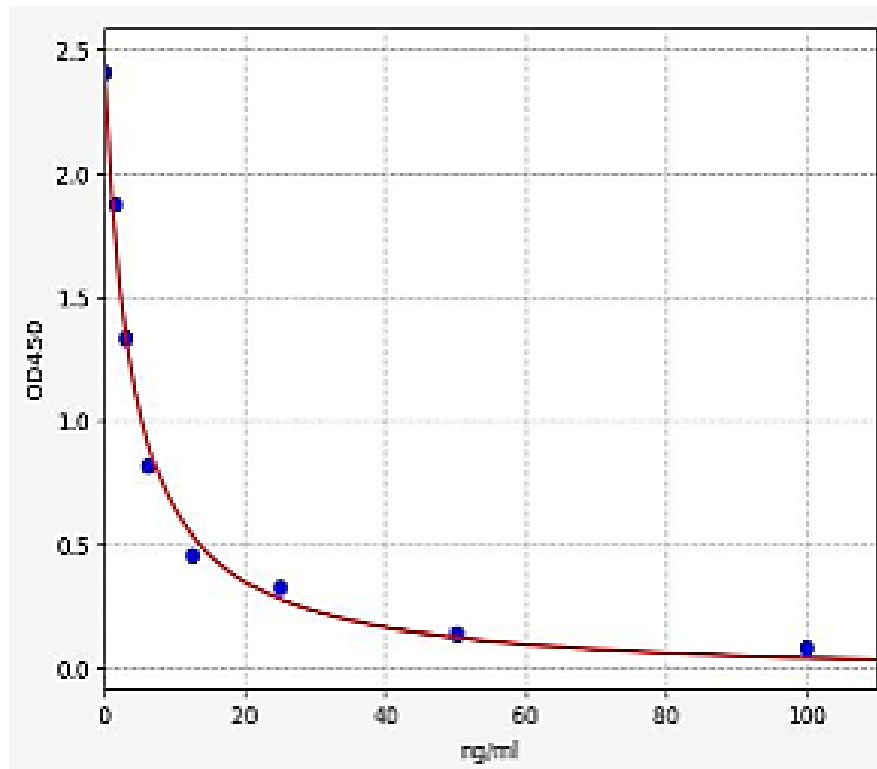
3.1.1. Comparación entre la curva estándar experimental y la curva de demostración del protocolo.

La comparación de estas curvas es crucial para evaluar la precisión y la fiabilidad de la técnica empleada, así como para identificar posibles discrepancias que puedan afectar a los resultados. La curva de demostración del protocolo se presenta como una guía para la interpretación de los datos experimentales. Esta curva se basa en resultados previos obtenidos bajo condiciones estandarizadas.

Uno de los criterios para comparar las dos curvas es la inspección visual de sus similitudes y diferencias. Según lo descrito en el protocolo, la curva de demostración se muestra de la siguiente manera:

Figura 13

Curva guía del estándar comercial



Nota. Tomado de Serotonin ELISA Kit, por Assay Genie, 2023, (<https://www.assaygenie.com/serotonin-elisa-kit/>).

Tras la inspección visual de las dos curvas, se observaron varias similitudes en cuanto a la distribución de las absorbancias experimentales, las cuales fueron similares a las absorbancias teóricas en el gráfico. Además, ambas curvas no muestran una tendencia lineal entre las absorbancias y sus concentraciones. Si así fuera, los datos seguirían una línea recta; es decir, un incremento constante en la variable independiente (la concentración) resultaría en un incremento constante en la variable dependiente (absorbancia). En cambio, ambas curvas siguen una tendencia monótona, que se refiere a una relación entre dos variables en la que una de las variables siempre aumenta o siempre disminuye a medida que la otra variable cambia. Por lo tanto, la tendencia representada en ambas curvas es monótona decreciente: a medida que la concentración (variable independiente) aumenta, la absorbancia (variable dependiente) disminuye.

Otro criterio que se incluye es la sensibilidad analítica, que se calcula de la siguiente manera:

$$\gamma = \frac{m}{S_s} \quad (1)$$

Donde m es la pendiente de la curva de calibración y S_s , es la desviación estándar de las absorbancias a una concentración dada.

Para calcular la pendiente (m) de una función potencial, dado que la ecuación de la curva (Anexo E) se expresa de la siguiente manera: $y = 2,5599x^{-0,553}$, se debe transformar la función potencial en una función lineal utilizando una transformación logarítmica.

$$\log(y) = \log(2,5599x^{-0,553})$$

$$\log(y) = \log(2,5599) + \log(x^{-0,553})$$

$$\log(y) = \log(2,5599) + (-0,553) \log(x) \rightarrow y = mx + b$$

Teniendo como valor de m igual a -0,553 y una desviación estándar de las absorbancias medidas igual a 0,595 (Anexo F), al reemplazar en la fórmula (1) se obtiene:

$$\gamma = \frac{0,553}{0,595} = 0,930$$

Comparando este valor con el valor establecido en el protocolo (0,938 ng/ml) (Anexo G), observamos que son valores muy similares, lo que sugiere que las curvas son semejantes entre sí.

3.2. Cálculo de los parámetros estadísticos de relación lineal.

Luego de la construcción de la curva de calibración, se determinaron los coeficientes de correlación lineal y de determinación (R^2), los cuales indican la calidad del ajuste lineal, con el propósito de evaluar la precisión de la técnica.

El coeficiente de correlación de Pearson (r) se calcula utilizando la siguiente fórmula (Anexo H):

$$r = \frac{\sum[(X_i - \bar{x})(Y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{x})^2 \sum(Y_i - \bar{y})^2}}$$

$$r = \frac{-97,631}{\sqrt{(7707,144)(2,122)}} = -0,7634$$

El coeficiente de correlación de Spearman (s) se calcula utilizando la siguiente fórmula (Anexo I):

$$s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

$$s = 1 - \frac{6 * 112}{7(7^2 - 1)} = -1$$

El coeficiente de correlación de Pearson igual a -0,7634 indica que existe un grado de asociación fuerte entre las variables de concentración y absorbancia e inversa. Esto significa que a medida que la concentración (ng/ml) aumenta, la absorbancia disminuye y esta relación

es relativamente fuerte. Mientras que el coeficiente de Spearman igual a -1 indica una relación perfecta monotónica decreciente entre las dos variables. Esto significa que las variables se mueven en la misma dirección, pero no a un ritmo constante como ocurre en una relación lineal.

El coeficiente de determinación (R^2) se calcula de la siguiente manera (Anexo J):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Donde y_i son los valores observados, $\bar{y}$ es el promedio de los valores observados y $\hat{y}_i$ son los valores predichos.

$$R^2 = 1 - \frac{0,052}{2,122} = 0,9757$$

Un R^2 igual a 0,9757 indica que el 97,57% de la varianza en la absorbancia se explica por la variación en la concentración. Este valor sugiere que las predicciones basadas en esta curva de calibración serán bastante precisas, ya que solo el 2,43% de la variabilidad en los datos no está explicada por el modelo de regresión. Por lo tanto, indica un ajuste muy bueno, sugiriendo que la curva de calibración es altamente precisa y confiable para predecir concentraciones basadas en absorbancias medidas.

3.3. Determinación de la concentración de serotonina en muestras de orina.

Se obtuvo una curva de calibración exitosa que sirvió como base para la medición de serotonina en orina. Se midieron por duplicado las absorbancias de las muestras de orina que no requirieron de un factor de dilución y se determinó su concentración mediante la interpolación en la curva, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 1

Concentración de serotonina en orina

Nº muestra	Absorbancia	Promedio	Concentración (ng/ml)
1	0,536	0,523	20,557
	0,510		
2	0,606	0,602	16,943
	0,597		
3	0,942	0,969	6,750
	0,995		
4	0,632	0,570	18,416
	0,507		
5	1,201	1,116	5,238

6	1,031	0,510	21,179
	0,551		
7	0,468	0,838	9,524
	0,845		
	0,831		

Para evaluar la precisión de las absorbancias medidas, se calcula en términos de repetibilidad. La repetibilidad se puede evaluar calculando la desviación estándar de las diferencias entre las mediciones repetidas para cada muestra o el coeficiente de variación. Se obtuvo una desviación estándar de las diferencias de 0,0461 (Anexo K). Además, con este valor se determina el coeficiente de variación, cuyo valor obtenido es 6,29%, el cual, comparado con el valor establecido en el protocolo es menor a 8% en intraensayo, demostrando que las mediciones son precisas y repetibles dentro de los límites aceptable establecidos.

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1. Conclusiones

El propósito de este trabajo de investigación fue estandarizar una técnica de ELISA competitivo para la medición de serotonina en orina. Para lograr este objetivo, se siguió meticulosamente el procedimiento de ensayo establecido en el protocolo para construir una curva de calibración a partir de las diluciones de un patrón de serotonina. Esta curva relaciona las variables de concentración y absorbancia de los estándares, en el eje x y eje y, respectivamente. Se construyó una curva de calibración que se comparó con la curva de demostración del protocolo mediante una inspección visual y comparación de valores de sensibilidad, encontrándose similitudes en ellas. Además, se calcularon parámetros estadísticos de relación lineal que sugieren que existe una fuerte relación inversa entre las variables, pero no necesariamente lineal, ya que ambas variables se mueven en la misma dirección, pero no a un ritmo constante. El coeficiente de determinación (R^2) obtenido demuestra que la curva de calibración es muy precisa y confiable para estimar concentraciones basadas en absorbancias medidas. Por lo tanto, se procedió a cuantificar los niveles de serotonina en muestras de orina, haciendo mediciones por duplicado con el fin de evaluar la replicabilidad y precisión de la técnica, y se determinó que las mediciones de absorbancia en las muestras son precisas y repetibles, garantizando la fiabilidad de la técnica para determinar las concentraciones de serotonina en orina. No hay un valor estandarizado de serotonina en orina en los laboratorios, ya que dicha molécula depende directamente de las condiciones del paciente en el momento de la toma de la muestra.

Por lo tanto, se concluye que la estandarización de la técnica de ELISA implementada proporciona un método confiable para la medición de serotonina en orina, siendo útil para el estudio exploratorio del que parte esta estandarización. Además, debido a la facilidad y forma menos traumática que ofrece para la toma de muestras, es especialmente beneficiosa para los niños en condición de maltrato infantil que participaron en el proyecto de investigación.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda implementar la técnica de ELISA para la medición rutinaria de serotonina en orina en centros de atención infantil, debido a su confiabilidad y método menos invasivo.
- Se recomienda desarrollar y probar nuevos métodos de estandarización de la técnica de ELISA para reducir aún más la variabilidad entre ensayos y mejorar la precisión de la técnica.
- Se sugiere realizar estudios adicionales para investigar la variabilidad de los niveles de serotonina en orina en diferentes condiciones clínicas y en diferentes momentos del día para mejorar la interpretación de los resultados.

Referencias

- AssayGenie. (2023). *Serotonin ELISA Kit*. Assay Genie.
<https://www.assaygenie.com/serotonin-elisa-kit/>
- Baumel, S. (1999). *Serotonin*. McGraw-Hill Education.
- Berthold Technologies. (2022). *La guía esencial para la automatización y lectura de ELISA*.
- Cataldo, L., Cortés, V., Galgani, J., Olmos, P., & Santos, J. (2014). *Papel de la serotonina periférica en la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa*. 30(3), 498-508.
<https://doi.org/10.3305/nh.2014.30.3.7531>
- Ferrero, R. (2020). *¿Qué es la correlación estadística y cómo interpretarla?* Máxima Formación. <https://www.maximaformacion.es/blog-dat/que-es-la-correlacion-estadistica-y-como-interpretarla/>
- Gestión de Operaciones. (2015, junio 22). *Cómo se relaciona el Coeficiente de Correlación de Pearson (r) y el Coeficiente de Determinación r Cuadrado (r²)*. *Blog sobre la Gestión e Investigación de Operaciones con tutoriales y ejercicios resueltos*.
<https://www.gestiondeoperaciones.net/estadistica/como-se-relaciona-el-coeficiente-de-correlacion-de-pearson-r-y-el-coeficiente-de-determinacion-r-cuadrado-r2/>
- Goicoechea, H., & Olivieri, A. (2007). *La Calibración en Química Analítica*. Universidad Nacional del Litoral.
- Guzmán, E. (2004). *Las pruebas de Elisa*. 140(3), 48-49.
- Harris, D. (2016). *Análisis químico cuantitativo* (6.ª ed.). Editorial Reverté, S. A.
- Hilal-Dandan, R., & Brunton, L. L. (2015). 5-hidroxitriptamina (serotonina) y dopamina. En *Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica*, 2e. McGraw-Hill Education. accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1119642993
- León, I. (2019). *ELISA: ¿Qué es? ¿En qué consiste? ¿Cuáles son los distintos tipos de este ensayo y en qué se diferencian?* AllScience. <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>

- Murphy, K., Weaver, C., & Berg, L. (2022). *Janeway's Immunobiology* (10.^a ed.). W.W. Norton & Company.
- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753, 2-18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031>
- Organización Mundial de la Salud. (2022, septiembre 19). *Maltrato infantil*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/child-maltreatment>
- Owen, J., Punt, J., & Stranford, S. (2020). *Inmunología de Kuby* (8.^a ed.). McGraw-HillEducation.
- Prieto, S. J. G. (2006). *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rodríguez, L., & Imaz, C. (2020). *Violencia y agresividad en la adolescencia*. Sociedad Española de Medicina de la Adolescencia. https://www.cursopsiquiatriasema.com/wp-content/uploads/2020/05/305-326_TEMA-13_MOD-7.pdf
- Serrato, X., Rodríguez, P., & Pinzón, D. (2021, agosto 28). *Revisión Sistemática Sobre los Efectos del Maltrato Físico Infantil a Nivel Fisiológico, Psicológico y Social en la Adulthood*. Universidad Cooperativa de Colombia. <https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/e071e012-b540-4800-840b-f8c38f872cbc/content>
- Soria, C., Pérez, M., Flores, M., & Fera, A. (2008). *Papel de la serotonina en la conducta agresiva*. 9(6), 480-489.
- Thode, J. (2023, enero 12). *Lots of sensitivities, or: How do analytical, diagnostical, and functional sensitivity differ?* Lösungsfabrik. <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/method-validation/sensitivities>
- Vashits, S., & Luong, J. (2018). *Handbook of Immunoassay Technologies* (1.^a ed.). <https://shop.elsevier.com/books/handbook-of-immunoassay-technologies/vashist/978-0-12-811762-0>

Vasudevan, D. M., Sreekumari, S., & Vaidyanathan, K. (2012). *Texto de Bioquímica* (6.^a ed.).

Editorial Cuélla Ayala.

World Vision Ecuador. (2021, junio 2). *Diagnóstico de los derechos de niñas, niños y adolescentes en Ecuador*. World Vision Ecuador.

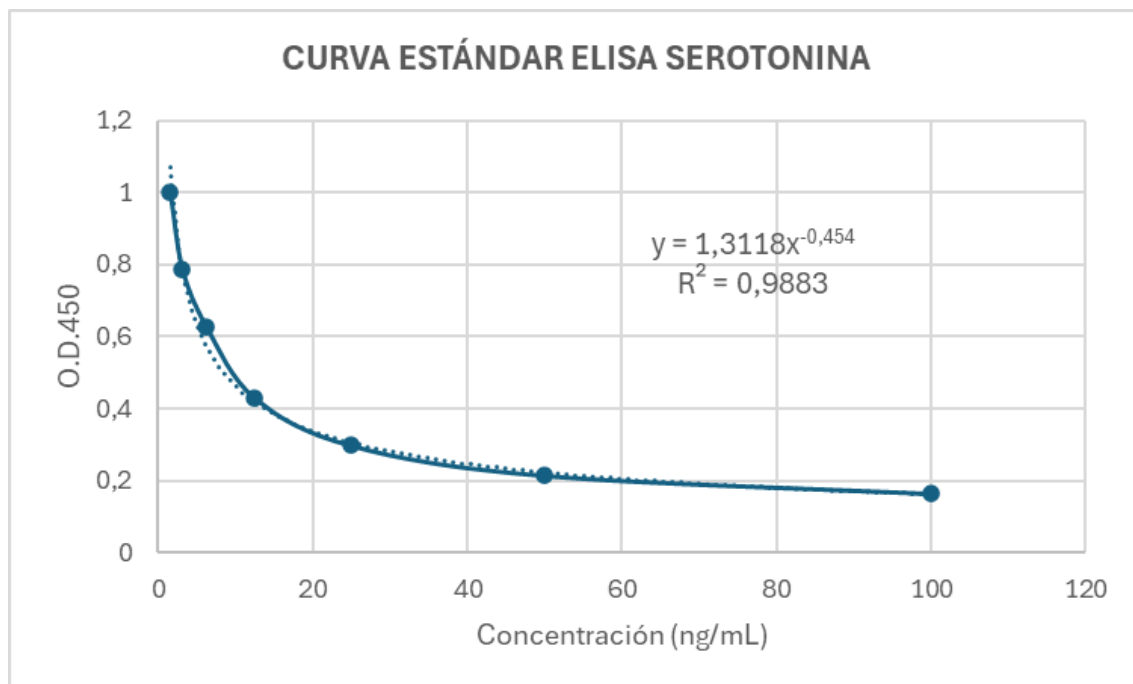
<https://worldvisionamericalatina.org/ec/sala-de-prensa/world-vision-presento-un-analisis-de-la-situacion-de-ni%C3%B1as-y-adolescentes-en-ecuador-antes-y-post-pandemia>

Anexos

Anexo A. Materiales, reactivos y equipos

Materiales	Reactivos	Equipos
Tubos Eppendorf 1,5 ml	Microplaca ELISA	Centrífuga HETTICH Rotofix 32 A
Tubos Falcón 10 ml	Estándar liofilizado (100 ng)	Agitador vórtex Science Med MX-S
Pipetas automáticas 20-200 μl, 100-1000μl	Buffer de dilución de la muestra	Estufa universal Mettler SN 55
Puntas desechables	Anticuerpo marcado con Biotina (concentrado)	Lector de ELISA Mindray MR-96A
Agua destilada	Buffer de dilución del anticuerpo	
Papel absorbente	Conjugado HRP-Estreptavidina (SABC)	
Sellador de placas	Buffer de dilución SABC	
	Sustrato TMB	
	Buffer de lavado	
	Solución de parada	

Anexo B. Curva estándar obtenida del ensayo piloto.



Anexo C. Valores obtenidos de las absorbancias de los estándares y las muestras de orina a una longitud de onda de 450 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 2.610 B	9 0.419	17 1.031	25 0.587	33 0.311	B 0.000						
B	2 0.862	10 0.434	18 0.551	26 0.632	34 0.488							
C	3 0.727	11 0.292	19 0.468	27 0.507	35 0.469							
D	4 0.309	12 0.347	20 0.942	28 0.535	36 0.433							
E	5 0.441	13 0.131	21 0.995	29 0.510	37 0.441							
F	6 0.962	14 0.171	22 0.845	30 0.611	38 0.720							
G	7 0.696	15 0.292	23 0.831	31 0.635	39 0.718							
H	8 0.700	16 1.201	24 0.606	32 0.333	40 0.000							

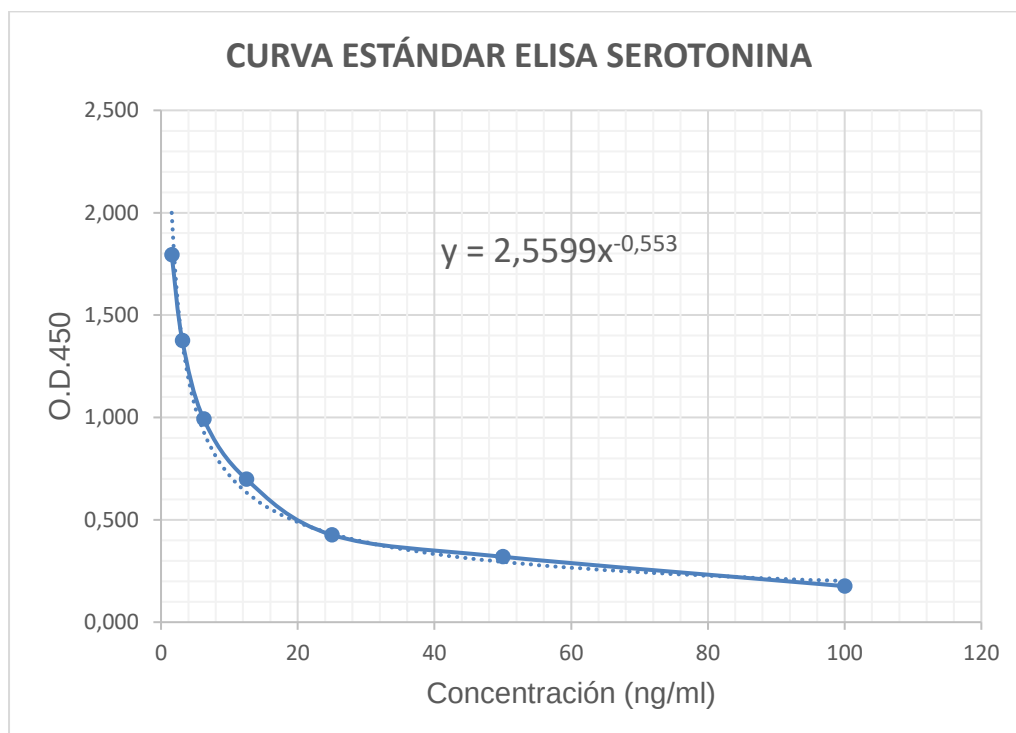
Estándares: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
Muestras: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40

Anexo D. Valores obtenidos de las absorbancias de los estándares a una longitud de onda de 450 nm.

CONCENTRACIÓN (ng/ml)	DILUCIÓN	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABS PROMEDIO
1,563	S1 (1/64)	1,862	1,727	1,795
3,125	S2 (1/32)	1,309	1,441	1,375
6,25	S3 (1/16)	0,992		0,992
12,5	S4 (1/8)	0,696	0,700	0,698
25	S5 (1/4)	0,419	0,434	0,427
50	S6 (1/2)	0,292	0,347	0,320
100	S7 (SOL. MADRE)	0,181	0,171	0,176

Nota. En la dilución 1/16 no se pudo realizar la medición en duplicado por falta de reactivo.

Anexo E. Ecuación de la línea de tendencia de la curva estándar.



Anexo F. Desviación estándar de las absorbancias medidas de cada patrón.

CONCENTRACIÓN (ng/ml)	ABSORBANCIA
1,563	1,795
3,125	1,375
6,25	0,992
12,5	0,698
25	0,427
50	0,320
100	0,176
S_s	0,595

Anexo G. Sensibilidad de la técnica de ELISA competitivo para medición de serotonina.**Aliases:**

ST ELISA Kit, 5-HT ELISA Kit, Serotonin ELISA Kit, 5-Hydroxytryptamine ELISA Kit

Uniprot:

Not Available

Detection method:

Competitive, Antigen Coated

Sample Type:

Serum, Plasma, and other biological fluids

Reactivity:

Universal

Range:

1.563-100ng/mL

Sensitivity:

0.938ng/mL

Anexo H. Datos para el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson.

X_i (concentración)	Y_i (absorbancia)	$X_i - \bar{x}$	$Y_i - \bar{y}$	$(X_i - \bar{x})(Y_i - \bar{y})$	$(X_i - \bar{x})^2$	$(Y_i - \bar{y})^2$
1,563	1,795	-26,785	0,969	-25,943	717,452	0,938
3,125	1,375	-25,223	0,549	-13,849	636,214	0,301
6,25	0,992	-22,098	0,166	-3,670	488,334	0,028
12,5	0,698	-15,848	-0,128	2,027	251,168	0,016
25	0,427	-3,348	-0,399	1,337	11,211	0,160
50	0,320	21,652	-0,506	-10,965	468,797	0,256
100	0,176	71,652	-0,650	-46,568	5133,968	0,422
$\bar{X} = 28,348$	$\bar{y} = 0,826$			$\Sigma = -97,631$	$\Sigma = 7707,144$	$\Sigma = 2,122$

Anexo I. Datos para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman.

X_i (concentración)	Clasificación X	Y_i (absorbancia)	Clasificación Y	d_i	d_i^2
1,563	1	1,795	7	-6	36
3,125	2	1,375	6	-4	16
6,25	3	0,992	5	-2	4
12,5	4	0,698	4	0	0
25	5	0,427	3	2	4
50	6	0,320	2	4	16
100	7	0,176	1	6	36
					$\Sigma = 112$

Anexo J. Datos para el cálculo del coeficiente de determinación (R^2).

Concentración (ng/ml)	Y_i (absorbancia)	$\hat{y}_i$	$(Y_i - \bar{y})^2$	$(Y_i - \hat{y}_i)^2$
1,563	1,795	2,000	0,938	0,042
3,125	1,375	1,363	0,301	0,000
6,25	0,992	0,929	0,028	0,004
12,5	0,698	0,633	0,016	0,004
25	0,427	0,432	0,160	0,000
50	0,320	0,294	0,256	0,001
100	0,176	0,201	0,422	0,001
	$\bar{y} = 0,826$		$\Sigma = 2,122$	$\Sigma = 0,052$

Anexo K. Desviación estándar de las diferencias entre mediciones repetidas.

N° muestras	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Promedio	d_i	d_i'
1	0,536	0,510	0,523	0,013	-0,013
2	0,606	0,597	0,6015	0,0045	-0,004
3	0,942	0,995	0,9685	-0,0265	0,027
4	0,632	0,507	0,5695	0,0625	-0,063
5	1,201	1,031	1,116	0,085	-0,085
6	0,551	0,468	0,5095	0,0415	-0,042
7	0,845	0,831	0,838	0,007	-0,007
			$\bar{x} = 0,7323$	0,013794	0,014
					S=0,0461