

## **MONITOREO DE HORMONAS EN EL CAMPO: METODOS Y APLICACIONES EN ECOLOGIA REPRODUCTIVA HUMANA**

*Claudia R. Valeggia*

**PALABRAS CLAVE:** Hormonas reproductivas, Fertilidad, Métodos de campo

**RESUMEN:** El estudio de la ecología reproductiva humana se ha expandido exponencialmente en la última década. Esto se debe, en parte, a los nuevos avances tecnológicos que permiten el análisis de las muestras biológicas recogidas por medio de métodos simples, poco invasivos y relativamente económicos. Estas características los hacen logísticamente apropiados para el campo y la investigación a mediana y gran escala, aún en zonas geográficas alejadas o aisladas. Se presenta una descripción de los métodos y técnicas que se pueden utilizar para estimar concentraciones hormonales a nivel poblacional. Los métodos y las técnicas de recolección que aquí se describen incluyen muestras de sangre seca sobre papel de filtro, de orina y de saliva. La recolección de muestras biológicas en la investigación científica presenta complejos dilemas éticos. Se enfatiza la necesidad de capacitar a la población local y de transmitir la información adquirida a la comunidad que ha participado en el estudio. *Rev. Arg. Antrop. Biol.* 9(2): 145-164, 2007.

---

Department of Anthropology. University of Pennsylvania. Philadelphia. PA 19104-6398. Estados Unidos de América.

e-mail: [valeggia@sas.upenn.edu](mailto:valeggia@sas.upenn.edu)

Correspondencia a: Dra. Claudia R. Valeggia. Department of Anthropology. University of Pennsylvania. 325 University Museum. 33rd and Spruce Sts. Philadelphia, PA 19104-6398. USA. Tel: 215-746-5162

e-mail: [valeggia@sas.upenn.edu](mailto:valeggia@sas.upenn.edu)

Recibido 27 Enero 2007; aceptado 28 Mayo 2007.

**KEY WORDS:** Reproductive hormones, Fertility, Field techniques

**ABSTRACT:** The study of human reproductive ecology has expanded exponentially in the last decade. This expansion was due in part to the recent technological advances that are making possible the analysis of biological samples collected using simple, minimally invasive, and relatively inexpensive methods. These features make them logistically appropriate for field and population-based research, even in remote or isolated areas. An overview of methods and techniques that could be used for estimating hormonal levels in large-scale population studies were showed in the present study. Sample collection methods and several techniques were reviewed in this paper, which included blood spots and urine, and saliva samples. The collection of biological samples is associated with serious ethical concerns. It was emphasized the need for increasing capacity in local people building, as well as to increase information transfer to the people which participated in such kind of studies. *Rev. Arg. Antrop. Biol.* 9(2): 145-164, 2007.

## INTRODUCCION

El uso de técnicas logísticamente sencillas y relativamente económicas que permiten el monitoreo de la fertilidad humana en diversas poblaciones, ha facilitado la rápida expansión del estudio de la ecología reproductiva humana. Esta disciplina estudia la interacción entre el ambiente (tanto social como físico) y la biología reproductiva en seres humanos (Ellison, 1990; Campbell y Wood, 1994). Para los ecólogos reproductivos, la reproducción es un aspecto de la biología humana que responde, en gran medida, al contexto ecológico en el cual se encuentra el individuo. Esta perspectiva es, por cierto, evolutiva: asume que la fisiología reproductiva humana actual es el producto de la selección natural. De esta manera, la variación en la función reproductiva refleja una respuesta adaptativa a condiciones ecológicas (Ellison, 1990). Por ejemplo, varios estudios han mostrado que, frente a un período de pérdida de peso, ya sea por una incorporación insuficiente de calorías o por un aumento en la actividad física, el organismo femenino responde modificando los niveles de hormonas reproductivas (Ellison, 1994; Valeggia y Ellison, 2001). La variación en los niveles hormonales está directamente relacionada, casi de manera dosis-respuesta, con la magnitud del balance energético negativo. Una ligera pérdida de peso (por ejemplo 2 Kg) está asociada con una disminución en la concentración de progesterona y por ende, con un aumento en la probabilidad de deficiencia lútea (Ellison, 2001). Las pérdidas más importantes o los gastos energéticos mayores, como los que ocurren en períodos de hambruna o en atletas de alto rendimiento, llevan a una respuesta más drástica, con una disminución pronunciada en los niveles de estrógeno en la fase folicular y como consecuencia, a anovulación y a amenorrea.

Estos estudios han permitido entender mejor cómo responde la fisiología reproductiva a cambios en el ambiente, lo que abriría una ventana a nuestro pasado evolutivo, permitiendo entrever cuáles habrían sido los desafíos ambientales a los cuales nuestros antepasados tuvieron que adaptarse. Además de proponer hipótesis en el campo de la biología evolutiva, la ecología reproductiva humana está aportando resultados que pueden ser de gran utilidad para entender los mecanismos que subyacen a la dinámica de poblaciones humanas. A pesar de que la mortalidad y la fecundidad son parámetros que se consideran biológicos por naturaleza (Hill y Hurtado, 1996) no ha sido, sino hasta muy recientemente, que los modelos demográficos han empezado a incorporar fenómenos fisiológicos básicos como la variación en la fertilidad femenina, el manejo de la energía metabólica o el impacto de las enfermedades. Por cierto, la capacidad de desarrollar modelos demográficos en términos de sus causas próximas le agrega solidez al poder explicativo de esos modelos (Valeggia y Ellison, 2002). Para ilustrar este punto, podemos mencionar los estudios que se han realizado para entender la gran variación en el intervalo intergenésico entre diferentes poblaciones, basados en el conocimiento de la fisiología reproductiva post-parto (Valeggia y Ellison, 2004; Holman et al., 2006), la relación entre la variación en el estado socio-económico y la fertilidad (Vitzthum et al., 2002), la variación en el período entre la iniciación de la fertilidad post-parto y la concepción subsiguiente (Ellison et al., 1993) y los efectos de la pérdida temprana del embarazo (Leslie et al., 1993; Holman y Wood, 2001). El desarrollo de técnicas simples y no invasivas para el monitoreo de hormonas ováricas ha facilitado también la incorporación de estos datos en estudios epidemiológicos y de salud pública. La determinación de la concentración de hormonas gonadales ha permitido establecer una asociación entre estas hormonas y el riesgo de cáncer de mama, ovárico y testicular (Eaton et al., 1994; Jasienska et al., 2000). Se ha mostrado que una exposición prolongada a las hormonas ováricas (debido al ciclo ininterrumpido por embarazo y lactancia) aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres (Jasienska et al., 2000; Jasienska y Thune, 2001; ESHRE Capri Workshop Group, 2004).

En este trabajo se presenta una revisión de los métodos y técnicas para tomar muestras biológicas en poblaciones humanas con el fin de utilizarlas para dosajes hormonales. Se describen tres de las técnicas más utilizadas: muestras de sangre seca sobre papel de filtro, muestras de orina y muestras de saliva. En cada caso son descritas qué hormonas pueden ser analizadas y los métodos de recolección, preservación y transporte de muestras. Finalmente se resumen las ventajas de cada método y los ensayos de laboratorio que se utilizan para analizar las muestras. Aquellos lectores interesados en un análisis introductorio de endocrinología reproductiva pueden consultar el apéndice metodológico del libro de James Wood (1994).

## MÉTODOS Y TÉCNICAS

### Sangre seca sobre papel de filtro

Los bioantropólogos han estado utilizando con éxito muestras de sangre seca para el análisis de hormonas reproductivas desde mediados de los años '90 (Campbell, 1994; Worthman y Stallings, 1994; 1997; Shirtcliff et al., 2000). Los ensayos de dosaje de hormonas que utilizan muestras de sangre seca sobre papel de filtro permiten estimar concentraciones hormonales de una manera muy precisa. La inmensa mayoría de los estudios que han comparado sangre completa con sangre seca sobre papel de filtro han obtenido altas correlaciones para las hormonas analizadas (Worthman y Stallings, 1994; 1997; Shirtcliff et al., 2001a).

Las muestras de sangre seca son ampliamente utilizadas en la investigación clínica y se aplican frecuentemente en la identificación neonatal de enfermedades congénitas, como la fenilcetonuria, hipotiroidismo congénito e hiperplasia adrenal congénita (Carreiro-Lewandowsky, 2002; Clague y Thomas, 2002). Esta técnica se ha utilizado también en estudios epidemiológicos de gran escala para detectar virus de la inmunodeficiencia humana y anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (Lukacs et al., 2005; Luo et al., 2005; Sherman et al., 2005), antígenos de hepatitis B (Mendy et al., 2005), déficit de hierro (Shell-Duncan y McDade, 2004), hormona estimuladora de la tiroides (TSH) (Hofman et al., 2003; 2004) y proteína reactiva C (Shell-Duncan y McDade, 2004; McDade et al., 2004; 2005).

1. *Hormonas a analizar*: Las técnicas de sangre seca pueden ser aplicadas para la determinación de testosterona (T), estradiol (E2), progesterona (P), hormona estimuladora del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), prolactina (PRL) y la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG). Además, esta técnica permite la determinación de otras hormonas que afectan la función reproductiva, como el cortisol (C), la androstenediona (A) y el sulfato de dehidroandrostenediona (DHEA-S).

2. *Recolección de muestras*: Los materiales necesarios para la aplicación de esta técnica son mínimos. Las muestras se recogen sobre un papel de filtro especial (Schleicher & Schuell #903) que puede obtenerse en diferentes formatos (por ejemplo, tarjetas pre-impresas con círculos, tarjetas en blanco, rollos de cinta de papel, etc.). Los dedos anulares o medios de la mano menos hábil son lo que generalmente se utilizan para pinchar y obtener las gotas de sangre. Si la piel de los dedos es muy gruesa o callosa o ha sido puncionada muchas veces, se puede utilizar el lóbulo de la oreja como un sitio alternativo poco doloroso (Shibata et al., 2004). El área elegida es generalmente masajeadá para aumentar el flujo sanguíneo. Después de limpiar la piel con una gasa embebida en alcohol, se punciona el área con una aguja descartable o con una lanceta ajustada a un dispositivo de auto-

retracción. Estos dispositivos son ampliamente utilizados por personas diabéticas que necesitan medir sus niveles de glucosa y por lo tanto, hay una gran variedad de ellos en el mercado. Algunos de los más conocidos son Beckton-Dickinson® ([www.bddiabetes.com](http://www.bddiabetes.com)), PenletPlus® ([www.lifescan.com](http://www.lifescan.com)), Tenderfoot® (<http://www.itcmed.com/tenderfoot.shtml>) y Surgilance® ([www.surgilance.com](http://www.surgilance.com)).

Otra posibilidad es puncionar el dedo de manera manual, pero el dispositivo auto-retractable hace que la experiencia sea controlada y menos dolorosa. Al aplicar el dispositivo, la sangre comienza a fluir y se recomienda descartar la primera gota para evitar una posible contaminación. La siguiente gota se recoge sobre el papel de filtro, teniendo cuidado de evitar contacto entre la piel y el papel. Las gotas de sangre se colocan sobre el papel de filtro de manera de cubrir toda la superficie de los círculos pre-impresos o hasta que cubra un círculo de unos 2,5 cm de diámetro (por lo general, se completan cinco círculos). Se deja airear la muestra a temperatura ambiente, lejos del calor y la luz solar directa. En el campo, conviene cubrir las muestras con mosquitero para evitar el contacto con insectos. Si el ambiente es muy húmedo, se recomienda el uso de un ventilador para asegurar el adecuado secado de la muestra sobre el papel de filtro.

3. *Preservación de la muestra:* Después de que el papel de filtro esté totalmente seco (por lo general, 4 horas en condiciones ambientales normales), se lo puede colocar en cajas de cartón con algún material desecante (gel de sílice). Varios papeles de filtro se pueden guardar en la misma caja, siempre y cuando estén separados entre sí con otros papeles o cartulinas divisoras. Idealmente, las muestras deberían congelarse inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se transporten al laboratorio. En el campo, las muestras pueden guardarse a  $4^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente dos meses, a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}$ ) de dos a ocho semanas y en temperaturas tropicales ( $37^{\circ}\text{C}$ ) por aproximadamente una semana (Worthman y Stallings, 1997).

4. *Transporte de las muestras:* En el caso de que las muestras se recojan en el campo, lejos del laboratorio donde se las analizará, es necesario preparar el envío de las mismas. Si las muestras provienen de un país diferente de donde van a ser analizadas, se deben observar las reglas de transporte de material biológico en ambos países. En la mayoría de los países, las muestras de sangre seca sobre papel de filtro pueden ser enviadas por correo común, sin embalaje particular. Se recomienda no enviarlas en bolsas plásticas herméticas ya que el calor y la humedad acumulada durante el transporte pueden dañar el material. Para protegerlas, se recomienda envolver los papeles de filtro en cartulina y hacer el envío en un sobre grueso de buena calidad. Como estrategia, se aconseja dividir las muestras en dos tandas y enviarlas de manera separada o por distintas compañías de transporte.

5. *Ensayos utilizados:* Sobre las muestras de sangre seca se utilizan tanto el ensayo por fluorometría (FIA) como los radioinmunoensayos (RIA) para analizar

varias de las hormonas reproductivas. Para PRL, FSH, LH y SHBG, Worthman y Stallings (1997) han utilizado una adaptación de preparados disponibles comercialmente para FIA. Para determinar T, E<sub>2</sub>, A, DHEA-S y C se ha trabajado con adaptaciones de métodos comerciales de RIA. Aquellos interesados en detalles de las técnicas que se aplican específicamente a sangre seca sobre filtro pueden consultar el artículo de Worthman y Stallings (1997).

6. *Ventajas*: La técnica de sangre seca en papel de filtro tiene varias ventajas en comparación con la obtención de muestras de sangre por venipunción: no requiere personal especialmente capacitado, usa sólo un pequeño volumen de sangre, no requiere centrifugación y congelamiento inmediatos y en la mayoría de los países, las muestras pueden enviarse por el sistema de correo común sin envoltorios especiales. Todas estas características reducen el costo y la organización logística de la recolección de muestras. Comparadas con las muestras de saliva, las de sangre seca poseen la gran ventaja de poder guardarse en base sólida, evitándose así las dificultades logísticas de almacenar y enviar tubos frágiles y voluminosos. Además, esta técnica permite la determinación de niveles circulantes de hormonas proteicas tales como PRL, LH y FSH, proteínas transportadoras como SHBG y esteroides conjugados como el E1C que no pueden medirse en saliva (ver: "Muestras de saliva").

### **Muestras de orina**

El dosaje de hormonas en orina para el monitoreo de la función reproductiva se conoce desde hace más de un cuarto de siglo (Stanczyk et al., 1980; Denari et al., 1981). Las muestras de orina resultan ideales para abordar preguntas que requieran una medida integrada de la producción de hormonas reproductivas; es decir, en aquellos casos en los que las fluctuaciones diarias de la hormona oscurecerían los resultados. Esta técnica es particularmente atractiva para aquellos investigadores interesados más en la variación intra- e inter-poblacional que en los ritmos circadianos o pulsátiles de secreción de hormonas.

1. *Hormonas a analizar*: Varios metabolitos de E<sub>2</sub> son excretados en orina, como por ejemplo estrona libre (E<sub>1</sub>), sulfatos de estrona, conjugados de estrona (E<sub>1</sub>Cs) y estrona-1-glucoronida (E<sub>1</sub>G). De estos, E<sub>1</sub>Cs y E<sub>1</sub>G son los más frecuentemente utilizados en estudios de la función ovárica. El principal metabolito urinario de la progesterona, la pregnanediol-3-glucoronida (PdG), ha sido ampliamente aplicado como indicador de la función lútea y de fertilidad. Más conocidos por su aplicación en la práctica obstétrica son los estudios que determinan las concentraciones en orina de la gonadotropina coriónica (hCG). Varios investigadores han hecho uso de estas técnicas a nivel poblacional, para la detección temprana del

embarazo y de la pérdida del mismo (Lasley et al., 1995; Cho et al., 2002; Lohstroh et al., 2005). La determinación de LH en orina es la base de los sistemas comerciales de detección de ovulación (Nielsen et al., 2001) y ha sido utilizada en estudios de fertilidad en la clínica. Las gonadotropinas (LH y FSH) están presentes en la orina y han mostrado ser indicadores confiables de ovulación en estudios a gran escala (Li et al., 2002; Weiss et al., 2004). El cortisol, la llamada “hormona del estrés”, también puede medirse en muestras de orina. Además de su rol en el manejo de la homeostasis fisiológica, se ha mostrado que el cortisol está asociado con los niveles de hormonas sexuales (Nepomnaschy et al., 2004; Lukas et al., 2005) y por ende, puede relacionarse con mecanismos reproductivos.

2. *Recolección de muestras*: Se recomienda el uso de la primera orina de la mañana porque es la que integra la excreción de metabolitos durante la noche y hace que las muestras sean más estandarizadas. Dado que esto puede significar un problema importante para estudios a gran escala, cabe notar que la toma de muestras para estudios de hormonas ováricas puede hacerse a cualquier hora del día. Dependiendo de qué hormona se trate, hay un retraso entre el momento de la secreción de la hormona y el de su excreción en orina. En hormonas gonadales, este retraso es de aproximadamente 24 horas (O'Connor et al., 2003). En los estudios que incorporan esta metodología, los participantes reciben un frasco plástico de recolección y se les solicita que provean una muestra de orina. Ciertos diseños de investigación y ciertas poblaciones permiten que los frascos se entreguen el día anterior, solicitándoles a los participantes que tomen la muestra de la primera orina de la mañana. Los frascos son recogidos más tarde por algún miembro del equipo de investigación (Valeggia y Ellison, 2004). En otras situaciones, se le pide a los participantes que se trasladen a un lugar central (por ejemplo, el centro de salud o centro comunitario) y que provean una muestra de la primera orina del día. Cuando la temperatura ambiente es elevada, la orina debe ser transportada del punto de recolección hasta el lugar de procesamiento en conservadoras de telgopor con hielo o bolsas refrigerantes, particularmente si la recolección de muestras lleva varias horas.

3. *Preservación de la muestra*: Las muestras de orina pueden ser preservadas en forma fluida o seca sobre papel de filtro. La forma fluida es la que se usa si se desea evitar la realización de varios pasos de extracción antes del análisis. Sin embargo, la disponibilidad de freezers, nitrógeno líquido o hielo seco, puede ser muy limitada en el campo. En estas situaciones, la orina puede ser preservada utilizando un método de secado sobre papel de filtro, similar al que se utiliza para las muestras de sangre. Aún si la decisión es la toma de muestras en forma fluida, se recomienda usar el sistema de secado sobre papel de filtro como estrategia en caso de pérdida o daño a las muestras fluidas.

Preservación en forma fluida: La mayoría de las veces, el volumen de orina de cada muestra supera considerablemente la cantidad necesaria para la determinación de hormonas. Esto permite la preservación de varias alícuotas de la misma muestra para mediciones múltiples. Utilizando pipetas, la orina se traspasa a varios tubos de polipropileno debidamente rotulados. Generalmente, dos o tres duplicados de 1ml cada uno son suficientes para la mayoría de los análisis. Se recomienda el congelado inmediato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En situaciones de campo, es importante considerar que conservar las muestras a temperatura ambiente lleva a una pérdida de entre el 2 y el 4% por día en los metabolitos del estrógeno y la progesterona (O'Connor et al., 2003). Las muestras de orina no deberían conservarse a temperatura ambiente por más de dos días. Por otro lado, los metabolitos de hormonas esteroides ( $\text{E}_1\text{C}$  y  $\text{PdG}$ ) pueden generalmente resistir varios ciclos de congelado-descongelado sin una pérdida significativa de niveles hormonales. Por lo tanto, cuando hay un freezer disponible, se recomienda el congelado inmediato de las muestras. Si las muestras no pueden ser congeladas, se recomienda el uso del papel de filtro.

Preservación en papel de filtro: Esta técnica requiere muy pocos materiales y equipo. Usando guantes para prevenir la contaminación, se cortan tiras de aproximadamente 5 cm del rollo de papel de filtro (Schleicher & Schuell #16110). Las tiras se guardan en recipientes herméticos con gel de sílica hasta su uso. Después de etiquetar debidamente el papel de filtro con lápiz, la tira se toma con pinzas y se sumerge en el frasco que contiene la orina hasta que esté completamente embebida (aproximadamente 5 minutos). Las tiras así embebidas en orina se dejan secar a temperatura ambiente, lejos de fuentes directas de calor o luz solar. En ambientes húmedos, se aconseja el uso de un ventilador para acelerar el proceso. Las tiras de papel de filtro no deben guardarse hasta que no estén totalmente secas para prevenir el crecimiento de hongos y bacterias sobre ellas. Una tira de papel de filtro lista para guardar debe sentirse al tacto tan seca como una tira de papel sin usar. Una vez secas, las tiras se pueden guardar en cajas de cartón con gel de sílica a temperatura ambiente o preferiblemente, en una heladera.

4. *Transporte de las muestras*: Como se ha mencionado para las muestras de sangre seca, se deben consultar las regulaciones locales de transporte de material biológico. Si las muestras se deben enviar por correo aéreo internacional, el envoltorio debe seguir las reglas de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA, [www.iata.org/whatwedo/dangerous\\_goods](http://www.iata.org/whatwedo/dangerous_goods)).

Si en las muestras de orina se medirán hormonas esteroides ( $\text{E}_1\text{C}$ ,  $\text{PdG}$ ,  $\text{T}$ , cortisol), no es necesario incluir hielo seco en el envoltorio para mantenerlas congeladas, sino que es suficiente envolver las muestras en bolsas herméticas dentro de una caja de telgopor. Las muestras de orina secas sobre papel de filtro pueden ser transportadas por correo común, sin envoltorios especiales. Se recomienda

poner las muestras entre hojas de cartulina y en un sobre de alta calidad para su envío.

5. *Ensayos utilizados*: Inicialmente, el dosaje de metabolitos de las hormonas ováricas en orina ( $E_1C$ ,  $E_1G$  y PdG) se realizaba por radioinmunoensayo (RIA) (Stanczyk et al., 1980; Denari et al., 1981) o fluoroinmunoensayo (FIA) (Barnard y Kohen, 1998). Recientemente, el uso de enzimainmunoensayo (EIAs) ha crecido substancialmente gracias a su simplicidad (no se necesita preparar la muestra), su seguridad (no involucra radioisótopos) y su costo relativamente bajo (O'Connor et al., 2003). Los EIAs han sido recientemente modificados y validados para estudios poblacionales y los protocolos están disponibles para aquellos interesados (O'Connor et al., 2003). Las concentraciones de metabolitos hormonales en orina varían, tanto dentro como entre individuos, debido a la diferencia en el grado de hidratación de los participantes. Los individuos más hidratados tienen concentraciones menores de metabolitos por unidad de volumen de orina que los individuos más deshidratados. Estas diferencias deben corregirse dividiendo la concentración de metabolitos hormonales por la concentración de creatinina en la muestra, la que se mide para cada muestra individual (Taussky, 1954; Munro et al., 1991). Las muestras de orina en papel de filtro deben reconstituirse antes de ser analizadas. Para obtener información sobre técnicas específicas de reconstitución se recomienda leer los trabajos de Campbell (1994), Shideler et al. (1995) y Knott (2005).

6. *Ventajas*: La recolección de muestras de orina tiene varias ventajas logísticas. El procedimiento es indoloro y menos invasivo que la toma de muestras de sangre, lo que facilita la aceptación de los participantes y la recolección frecuente de muestras por períodos largos. Aún en lugares remotos, la mayoría de las personas está acostumbrada a entregar una muestra de orina, ya que esto es de rutina en los exámenes médicos. Esto facilita considerablemente la explicación de los objetivos del estudio y del proceso de obtención del consentimiento informado de los participantes. Dada su facilidad, la toma de muestras de orina puede ser también el método mejor aceptado para la recolección de datos en lactantes, niños y ancianos. Además, las muestras pueden ser tomadas por personal no capacitado o por los mismos participantes (en contraste con la toma de muestras de sangre). Finalmente, comparado con el manejo de muestras de sangre, las muestras de orina traen aparejados menos riesgos de transmisión de enfermedades infecciosas.

### **Muestras de saliva**

La medición de hormonas reproductivas en saliva para estudios clínicos comenzó hace más de 35 años (Walker et al., 1980; 1981; Metcalf et al., 1984; Sufi et al.,

1985). La presencia de hormonas en la saliva resulta de la difusión pasiva de componentes del plasma a través del epitelio de la glándula salivar hacia la cavidad de la boca. La mayoría de las hormonas esteroides circulantes está ligada a proteínas específicas (por ejemplo, SHBG) o a proteínas no específicas como la albúmina. Los complejos hormona-proteína no se difunden fácilmente a través del epitelio de la glándula salivar. Consecuentemente, las muestras de saliva reflejan mayoritariamente niveles de hormonas libres, biológicamente activas (Ferguson, 1984).

1. *Hormonas a analizar*: Las muestras de saliva pueden ser utilizadas para medir  $E_1$ ,  $E_2$ , estriol ( $E_3$ ), P y T (Ellison et al., 1986; 1989; Ellison, 1993; Ellison y Panter-Brick, 1996; Jasienska y Thune, 2001; Lukas et al., 2004; Bribiescas, 2005). El cortisol (Gozansky et al., 2005) también puede ser medido confiablemente en saliva y asociado a variables reproductivas (Groschl et al., 2000).

2. *Recolección de muestras*: La recolección de muestras de saliva en adultos es relativamente simple. Se solicita a los participantes que enjuaguen su boca, que descarten el agua de enjuague y que saliven en un tubo de poliestireno. El enjuague bucal es esencial para prevenir la contaminación severa de la muestra con comida, sangre, fluido gingival y tejidos bucales (Ellison, 1988; 1993). Esto es particularmente importante en estudios de campo de poblaciones cuya higiene bucal es deficiente. Kivlighan y colaboradores (2005) han mostrado que, a pesar de que el sangrado por micro-heridas de la boca tiene un impacto sobre los niveles de hormonas reproductivas, el efecto es pasajero y fácilmente resuelto, enjuagando la boca y esperando unos minutos antes de tomar la muestra. Generalmente les lleva a los participantes entre 2 y 15 minutos proveer una muestra de saliva sin estimulación. El uso de estimulantes de la salivación se recomienda para aumentar el flujo de saliva y facilitar la recolección en casos de boca seca. Varios estudios han informado el uso de diferentes productos que contienen ácido cítrico (Lipson y Ellison, 1989), cristales de jugo (Talge et al., 2005), cera y goma de mascar azucarada y no azucarada (Lipson y Ellison, 1989). Todo estimulante que se use debe ser evaluado por su posible reacción cruzada con las hormonas a estudiar (Ellison, 1988; Lipson y Ellison, 1989). El desarrollo reciente de kits para RIA disponibles comercialmente, facilita la recolección de volúmenes pequeños de saliva por muestra por ejemplo, 25  $\mu$ l y 100  $\mu$ l de saliva para la medición de cortisol y testosterona, respectivamente (Diagnostic System Laboratories, [www.dslabs.com](http://www.dslabs.com)). Si las muestras van a ser analizadas para varias hormonas, se recomienda la toma de 2 o 3 ml de muestra. Los protocolos de recolección de muestras tienen que modificarse si la investigación involucra lactantes y niños. Para la toma de muestras de saliva en niños muy pequeños se han utilizado micropipetas descartables, hisopos de algodón que absorban saliva (Kirschbaum y Hellhammer, 1994; Schmidt, 1997; Herrington et al., 2004; Talge et al., 2005) y chupetes médicos modificados (Groschl et al., 2003). La

saliva recolectada con micropipetas se transfiere fácilmente a tubos de poliestireno. Si se usan hisopos de algodón, la punta embebida se coloca en una jeringa sin aguja y usando el émbolo de la jeringa, la saliva fluye dentro de los tubos. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de métodos que usen algodón como base de absorción interfiere con la medición de las hormonas (Shirtcliff et al., 2001b; Groschl et al., 2003). Varios estudios de campo han mostrado que ciertas tradiciones culturales pueden tener un impacto sobre la medición de hormonas reproductivas. Por ejemplo, el mascado de hojas de coca en ciertas poblaciones andinas puede producir valores de P falsos, similares a los valores de la fase lútea (Vitzthum et al., 1993).

3. *Preservación de muestras*: Las muestras de hormonas esteroides en saliva se pueden conservar de manera segura a temperatura ambiente si se les agrega un biocida para prevenir la contaminación y el crecimiento bacteriano (Ellison, 1988). Los tubos de recolección se pueden pre-tratar con azida sódica al 0,1% de manera de preservar la saliva (Ellison, 1988; Lipson y Ellison, 1989). Se colocan aproximadamente 50 µl de la solución de azida sódica con una pipeta en el fondo de los tubos y se deja evaporar a temperatura ambiente. Dado que la azida sódica es tóxica, cuando hay niños involucrados (como participantes o testigos de la toma de muestra) se recomienda agregar el biocida después de que la muestra haya sido tomada y entregada al ayudante de campo. Se recomienda el congelado de las muestras a -20°C, o sino, las muestras pueden ser conservadas a temperatura ambiente por varias semanas, pero siempre se aconseja guardarlas en el lugar más fresco posible. Una vez en el laboratorio, las muestras deben ser congeladas.

4. *Transporte de las muestras*: Las muestras de saliva se pueden transportar sin refrigeración. Los tubos deben colocarse en una bolsa plástica sellable y empaquetados con suficiente material absorbente y de amortiguación para prevenir la ruptura de los tubos. Para la mayoría de los países, las muestras de saliva se consideran material de diagnóstico y su envío debe seguir las normas locales de transporte de estas sustancias.

5. *Ensayos utilizados*: Los ensayos más utilizados para muestras de saliva son los RIA (por ejemplo, los kits para muestras de saliva de Diagnostic Systems Laboratories). Sin embargo, existen kits para inmunoensayos fluorescentes (DELFIAs) y EIAs, dependiendo de la hormona a analizar ([www.dslabs.com](http://www.dslabs.com)).

6. *Ventajas*: Las muestras de saliva han sido las elegidas para muchos estudios a gran escala. De los métodos descritos en este trabajo, es el menos invasivo: es indoloro y la mayoría de los participantes no requiere privacidad para tomar la muestra. Esto facilita la recolección frecuente de muestras por períodos largos (por ejemplo, estudios longitudinales). Las muestras de saliva han sido exitosamente utilizadas en estudios que involucran participantes de una gama variada de edades, inclusive bebés prematuros (Herrington et al., 2004), niños (Groschl et al., 2003;

Ahnert et al., 2004; Gutteling et al., 2004; Azurmendi et al., 2005) y ancianos (Steptoe et al., 2005; Wright et al., 2005). En los estudios que involucran la participación de adultos, se les puede solicitar a los mismos participantes la toma y conservación de varias muestras. Además, las hormonas reproductivas esteroides son muy estables a temperatura ambiente, lo que facilita enormemente la toma de muestras en áreas remotas sin acceso a freezers ni refrigeradores.

## CONSIDERACIONES FINALES

Las técnicas de recolección de muestras aquí descritas nos permiten el muestreo de diferentes poblaciones en un amplio rango de contextos ecológicos. Los resultados de varios estudios en diferentes poblaciones del mundo indican que la variación en los niveles de hormonas reproductivas es enorme, tanto entre poblaciones como dentro de las poblaciones y hasta en una misma mujer (Ellison, 1990; Ellison et al., 1993; 2002; Valeggia y Ellison, 2004). Esta variación refleja uno de los puntos de atención más claros en el campo de la ecología reproductiva humana. ¿Por qué algunas mujeres, en ciertos contextos ecológicos, tienen pérdidas de embarazo más frecuentemente que en otros? (Holman y Wood, 2001) ¿Hay diferencias en los niveles de testosterona en poblaciones con diferentes patrones de subsistencia? (Bribiescas, 2005) ¿Puede la variación en las tasas de fecundidad ser explicada por variaciones en la disponibilidad de recursos y por ende, en la disponibilidad de energía metabólica? (Valeggia y Ellison, 2002) El estudio de los niveles hormonales y su asociación con la fecundidad y la salud reproductiva puede aportar valiosos datos a los modelos que utilizamos para explicar la repuesta de la biología reproductiva humana a diferentes ambientes y sus consecuencias.

La toma de muestras biológicas merece una extensa discusión de los aspectos éticos que trae aparejados. A pesar de que una elaboración detallada va más allá del objetivo de este trabajo, mencionaré brevemente tres preocupaciones éticas relacionadas: 1) el proceso de consentimiento informado, 2) el manejo de los problemas que el estudio acarrea para los participantes del estudio y 3) desigualdad de poderes que se genera cuando se trabaja con poblaciones vulnerables (Boerma et al., 2001).

1) El proceso de consentimiento informado es fundamental en toda investigación que involucre la participación de personas (Kahn, 2005). Esto es así tanto para las ciencias biomédicas como para las ciencias sociales y para aquellas disciplinas que se sitúan en la interfase entre las ciencias sociales y naturales (por ejemplo, la antropología biológica). Este proceso comienza idealmente en el momento mismo del diseño de la investigación y se desarrolla a lo largo y más allá de la culminación de la misma (Creed-Kanashiro et al., 2005). Los candidatos poten-

ciales del estudio deben entender los objetivos de la investigación, los métodos a los que se los expondrá para la toma de datos, el destino y procesamiento de los mismos y los costos y beneficios de participar en el estudio propuesto. También es muy importante destacar el carácter voluntario de la participación y hacer explícita la forma en que se protegerá la confidencialidad de la información obtenida. En el caso de niños, de mujeres embarazadas y de comunidades indígenas, se deben tomar recaudos especiales para proteger su participación en la investigación. En el caso de los niños y dependiendo de las normas culturales de la población a estudiar, se requiere el consentimiento de los padres o tutores (Stinson, 2005). Aquellos interesados en la conducción ética de investigaciones en antropología biológica, pueden leer el libro editado por Trudy Turner (2005).

2) La introducción de la toma de muestras biológicas en un estudio antropológico puede aumentar el porcentaje de personas que deciden no participar. Asimismo, puede comprometer la participación de personas de esa población en futuros estudios, ya que se les está solicitando un esfuerzo adicional (Weinstein y Willis, 2001). Este problema debe ser anticipado llevando a cabo estudios piloto en una muestra pequeña de la población elegida y evaluando la tasa de respuesta a las técnicas de recolección de datos. Los problemas del participante pueden reducirse también, si los potenciales participantes ven un claro beneficio de salud al proveer la muestra. En el caso particular de estudios que involucran poblaciones rurales o alejadas, el equipo de investigación debería incluir agentes de salud capacitados que puedan proveer educación para la salud y ayudar a los participantes a contactar a los servicios públicos de salud. La devolución rápida de los resultados del estudio también facilita futuros intentos de recolección de datos en la misma población. Muchas veces, las muestras biológicas se toman de tal manera que algunos resultados preliminares que conllevan un valor aplicado, pueden estar disponibles rápidamente. Por ejemplo, la observación visual de una muestra de orina permite al ayudante de campo detectar posibles problemas de salud (la orina sanguinolenta, muy oscura o no transparente puede indicar infecciones). De esta manera, el ayudante de campo puede indicar al participante o a su familia, cuáles son los contactos necesarios en el sector de salud pública para evaluar el posible problema.

3) Para estudios que se realizan en zonas rurales o remotas, existen problemas éticos relacionados con la desigualdad de tecnología entre la población de estudio y el centro de investigación donde se realizan los análisis. En muchos de estos casos, las determinaciones hormonales se obtienen a cientos o miles de kilómetros de donde se obtuvieron las muestras, lo cual provoca una obvia preocupación en el campo de la ética. Un protocolo de investigación bien diseñado debería incluir una transferencia de información rápida y eficiente, especialmente si existen aplicaciones directas para la salud (Boerma et al., 2001; Hurtado y Salzano, 2004). Los

agentes de salud pública y los líderes comunitarios deberían tener fácil acceso a aquellos resultados que pueden potencialmente ayudar a mejorar la calidad de vida de la población.

Nuestros estudios en ecología reproductiva en la provincia de Formosa (Argentina) (Valeggia y Ellison, 1998; 2001; 2002; 2003; 2004; Valeggia et al., 2002) han tenido y tienen un fuerte impacto en las comunidades aborígenes donde trabajamos. Nuestros protocolos han incluido diferentes maneras de diseminar los resultados de las investigaciones, dependiendo del nivel de alfabetización de la población bajo estudio. Por ejemplo, preparamos informes preliminares y finales escritos en español para agentes del Ministerio de Desarrollo Humano de la Provincia de Formosa y una versión de estos informes, presentada en reuniones comunitarias. También utilizamos la transmisión por radio local tanto en español como en idioma Toba, de los resultados y recomendaciones para la salud. Los participantes han siempre demostrado interés en los resultados de las investigaciones que se llevan a cabo en sus comunidades y frecuentemente aportan comentarios valiosos, que ayudan a que futuros estudios en la comunidad sean intelectualmente más robustos y logísticamente más sencillos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Analía Berinstein, Eduardo Fernandez Duque, Norberto Lanza, Pablo Nuñez y a dos revisores anónimos por sus valiosos comentarios y sugerencias. Este trabajo resume parte de mi investigación en endocrinología reproductiva de campo. Las siguientes instituciones han financiado mis estudios y por lo tanto, han hecho posible este trabajo de revisión: el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), el NICHD, la Fundación Nestlé, la National Geographic Foundation, la Wenner-Gren Foundation, la L. S. B. Leakey Foundation, el Centro para Estudios Latinoamericanos David Rockefeller y la Universidad de Pennsylvania. Extiendo mi agradecimiento a las comunidades Toba de Namqom y de Sombrero Negro y a las comunidades Wichí de Pozo de Maza (Provincia de Formosa) por su hospitalidad y paciencia.

## **BIBLIOGRAFIA CITADA**

- Ahnert L, Gunnar MR, Lamb ME y Barthel M (2004) Transition to child care: associations with infant-mother attachment, infant negative emotion, and cortisol elevations. *Child. Devel.* 75:639-650.
- Azurmendi A, Braza F, Sorozabal A, García A, Braza P, Carreras MR, Muñoz JM,

- Cardas J y Sanchez-Martin JR (2005) Cognitive abilities, androgen levels, and body mass index in 5-year-old children. *Horm. Behav.* 48:187-195.
- Barnard G y Kohen F (1998) Monitoring ovarian function by the simultaneous time-resolved fluorescence immunoassay of two urinary steroid metabolites. *Clin. Chem.* 44:1520-1528.
- Boerma JT, Holt E y Black R (2001) Measurement of biomarkers in surveys in developing countries: opportunities and problems. *Pop. Dev. Rev.* 27:303-314.
- Bribiescas RG (2005) Age-related differences in serum gonadotropin (FSH and LH), salivary testosterone, and 17-B estradiol levels among Ache Amerindian males of Paraguay. *Am. J. Phys. Anthropol.* 127:114-121.
- Campbell KL (1994) Blood, urine, saliva and dip-sticks: experiences in Africa, New Guinea, and Boston. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 709:312-330.
- Campbell KL y Wood JW (1994) Introduction: What is human reproductive ecology, and why should we care about studying it? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 709:1-8.
- Carreiro-Lewandowsky E (2002) Newborn screening: an overview. *Clin. Lab. Sci.* 115:229-238.
- Cho S-I, Goldman MB, Ryan LM, Chen C, Damokosh AI, Christiani DC, Lasley BL, O'Connor JF, Wilcox AJ y Xu X (2002) Reliability of serial urine HCG as a biomarker to detect early pregnancy loss. *Hum. Reprod.* 17:1060-1066.
- Clague A y Thomas A (2002) Neonatal biochemical screening for disease. *Clin. Chim. Acta* 315:99-110.
- Creed-Kanashiro H, Ore B, Scurrah M, Gil A y Penny A (2005) Conducting research in developing countries: experiences of the informed consent process from community studies in Peru. *J. Nutr.* 135:925-928.
- Denari JH, Farinati Z, Casas PR y Oliva A (1981) Determination of ovarian function using first morning urine steroid assays. *Obstet. Gynecol.* 58:5-9.
- Eaton SB, Pike MC, Short RV, Lee NC, Trussel J, Hatcher RA, Wood JW, Worthman CM, Jones NGB, Konner MJ, Hill KR, Bailey R y Hurtado AM (1994) Women's reproductive cancers in evolutionary context. *Quart. Rev. Biol.* 69:354-367.
- Ellison PT (1988) Human salivary steroids: methodological considerations and applications in Physical Anthropology. *Ybk. Phys. Anthropol.* 31:115-142.
- Ellison PT (1990) Human ovarian function and reproductive ecology: new hypotheses. *Am. Anthropol.* 92:933-952.
- Ellison PT (1993) Measurements of salivary progesterone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 694:161-176.
- Ellison PT (1994) Advances in human reproductive ecology. *Ann. Rev. Anthropol.* 23:225-275.
- Ellison PT (2001) *On Fertile Ground: A Natural History of Human Reproduction.* Cambridge, Harvard University Press.

- Ellison PT y Panter-Brick C (1996) Salivary testosterone levels among Tamang and Kami males of central Nepal. *Hum. Biol.* 68:955-965.
- Ellison PT, Lipson SF y Meredith M (1989) Salivary testosterone levels in males from the Ituri Forest, Zaire. *J. Hum. Biol.* 1:21-24.
- Ellison PT, Peacock NR y Lager C (1986) Salivary progesterone and luteal function in two low-fertility populations of Northeast Zaire. *Hum. Biol.* 58:473-483.
- Ellison PT, Bribiescas RG, Bentley GR, Campbell BC, Lipson SF, Panter-Brick C y Hill K (2002) Population variation in age-related decline in male salivary testosterone. *Hum. Reprod.* 17:3251-3253.
- Ellison PT, Lipson SF, O'Rourke MT, Bentley GR, Harrigan AM, Panter-Brick C y Vitzthum VJ (1993) Population variation in ovarian function. *Lancet* 342:433-434.
- ESHRE Capri Workshop Group (2004) Hormones and breast cancer. *Hum. Reprod. Update* 10:281-293.
- Ferguson DB (1984) *Steroid Hormones in Saliva*. Basel, Karger.
- Gozansky WS, Lynn JS, Laudenslager ML y Kohrt WM (2005) Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Clin. Endocrin.* 63:336-341.
- Groschl M, Rauh M y Dorr H-G (2003) Circadian rhythm of salivary cortisol, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, and progesterone in healthy children. *Clin. Chem.* 49:1688-1691.
- Groschl M, Rauh M, Schmid P y Dorr H-G (2000) Relationship between salivary progesterone 17-hydroxyprogesterone, and cortisol levels throughout the normal menstrual cycle of healthy postmenarcheal girls. *Fert. Ster.* 76:615-617.
- Gutteling BM, de Weerth C y Buitelaar JK (2004) Maternal prenatal stress and 4-6 year old children's salivary cortisol concentrations pre- and post-vaccination. *Stress* 7:257-260.
- Herrington CJ, Olomu IN y Geller SM (2004) Salivary cortisol as indicators of pain in preterm infants: a pilot study. *Clin. Nurs. Res.* 13:53-68.
- Hill KR y Hurtado AM (1996) *Ache Life History: The Ecology and Demography of a Foraging People*. New York, Aldine de Gruyter.
- Hofman LF, Foley TP, Henry JJ y Naylor EW (2003) Assays for thyroid-stimulating hormone using dried blood spotted filter paper specimens to screen for hypothyroidism in older children and adults. *J. Med. Screen.* 10:5-10.
- Hofman LF, Foley TP, Henry JJ y Naylor EW (2004) The use of filter paper-dried blood spots for thyroid-antibody screening in adults. *J. Lab. Clin. Med.* 144:307-312.
- Holman DJ y Wood JW (2001) Pregnancy loss and fecundability in women. En Ellison PT (ed): *Reproductive Ecology and Human Evolution*. New York, Aldine

- de Gruyter, pp.15-38.
- Holman DJ, Grimes MA, Achterberg JT, Brindle E y O'Connor KA (2006) Distribution of postpartum amenorrhea in rural Bangladeshi women. *Am. J. Phys. Anthropol.* 129:609-619.
- Hurtado AM y Salzano FM (2004) *Lost Paradises and the Ethics of Research and Publication*. New York, Oxford University Press.
- Jasienska G y Thune I (2001) Lifestyle, hormones, and risk, of breast cancer. *Br. Med. J.* 322:586-587.
- Jasienska G, Thune I y Ellison PT (2000) Energetic factors, ovarian steroids and the risk of breast cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 9:231-239.
- Kahn J (2005) Informed consent in the context of communities. *J. Nutr.* 135:918-920.
- Kirschbaum C y Hellhammer DH (1994) Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroend.* 19:313-333.
- Kivlighan KT, Granger DA y Schwartz EB (2005) Blood contamination and the measurement of salivary progesterone and estradiol. *Horm. Behav.* 47(3):367-370.
- Knott C (2005) Radioimmunoassay of estrone conjugates from urine dried on filter paper. *Am. J. Prim.* 67:121-135.
- Lasley BL, Lohstroh P, Kuo A, Gold EB, Eskenazi B, Samuels SJ, Stewart DR y Overstreet JW (1995) Laboratory methods for evaluating early pregnancy loss in an industry-based population. *Am. J. Ind. Med.* 28:771-781.
- Leslie PW, Campbell KL y Little MA (1993) Pregnancy loss in nomadic and settled women in Turkana, Kenya: A prospective study. *Hum. Biol.* 65:237-254.
- Li H, Chen J, Overstreet JW, Nakajima ST y Lasley BL (2002) Urinary follicle-stimulating hormone peak as a biomarker for estimating the day of ovulation. *Fert. Ster.* 77:961-966.
- Lipson SF y Ellison PT (1989) Development of protocols for the application of salivary steroid analyses to field conditions. *Am. J. Hum. Biol.* 1:249-255.
- Lohstroh PN, Overstreet JW, Stewart DR, Nakajima ST, Cragun JR, Boyers SP y Lasley BL (2005) Secretion and excretion of human chorionic gonadotropin during early pregnancy. *Fert. Ster.* 83:1000-1011.
- Lukas WD, Campbell BC y Campbell KL (2005) Urinary cortisol and muscle mass in Turkana men. *Am. J. Hum. Biol.* 17:489-495.
- Lukas WD, Campbell BC y Ellison PT (2004) Testosterone, aging, and body composition in men from Harare, Zimbabwe. *Am. J. Hum. Biol.* 16:704-712.
- Lukacs Z, Dietrich A, Ganschow R, Kohlschutter A y Kruithof R (2005) Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots-a feasibility study using a multi-analyte immunoassay. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43:141-145.
- Luo W, Yang H, Rathbun K, Pau C-P y Ou C-Y (2005) Detection of human

- immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 43:1851-1857.
- McDade TW, Burhop J y Dohnal J (2004) High-sensitivity enzyme immunoassay for C-reactive protein in dried blood spots. *Clin. Chem.* 50:652-654.
- McDade TW, Leonard WR, Burhop J, Reyes-García V, Vadez V, Huanca T y Godoy RA (2005) Predictors of C-reactive protein in Tsimane' 2 to 15 year-olds in lowland Bolivia. *Am. J. Phys. Anthropol.* 128:906-913.
- Mendy M, Kirk GD, van der Sande M, Jeng-Barry A, Lesi OA, Hainaut P, Sam O, McConkey S y Whittle H (2005) Hepatitis B surface antigenaemia and alpha-fetoprotein detection from dried blood spots: applications to field-based studies and to clinical care in hepatitis B virus endemic areas. *J. Viral Hepat.* 12:642-647.
- Metcalf MG, Evans JJ y Mackenzie JA (1984) Indices of ovulation: comparison of plasma and salivary levels of progesterone with urinary pregnanediol. *J. Endocrinol.* 100:75-80.
- Munro CJ, Stabenfeldt GH, Cragun JR, Addiego LA, Overstreet JW y Lasley BL (1991) Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Clin. Chem.* 37:838-844.
- Nepomnaschy PA, Welch K, McConnell D, Strassmann BI y England BG (2004) Stress and female reproductive function: A study of daily variations in cortisol, gonadotrophins, and gonadal steroids in a rural Mayan population. *Am. J. Hum. Biol.* 16:523-532.
- Nielsen MS, Barton SD, Hatasaka HH y Stanford JB (2001) Comparison of several one-step home urinary luteinizing hormone detection test kits to OvuQuick® Fert. *Ster.* 76:384-387.
- O'Connor KA, Brindle E, Holman DJ, Klein NA, Soules MR, Campbell KL, Kohen F, Munro CJ, Shofer JB, Lasley BL y Wood JW (2003) Urinary estrone conjugate and Pregnanediol 3-Glucuronide enzyme immunoassays for population research. *Clin. Chem.* 49:1139-1148.
- Schmidt NA (1997) Salivary cortisol testing in children. *Issues Compr. Pediatr. Nurs.* 20:183-190.
- Shell-Duncan B y McDade T (2004) Use of combined measures from capillary blood to assess iron deficiency in rural Kenyan children. *J. Nutr.* 134:384-387.
- Sherman G, Stevens G, Jones S, Horsfield P y Stevens W (2005) Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. *J. Acq. Imm. Def. Synd.* 38:615-617.
- Shibata S, Kishi Y, Murashige N y Kami M (2004) The lower pole of the earlobe is an alternative site for painless blood sampling in the self-assessment of blood glucose concentrations. *Int. Med. (Japan)* 43:787-791.

- Shideler SE, Munro CJ, Johl HK, Taylor HW y Lasley B (1995) Urine and fecal sample collection on filter paper for ovarian hormone evaluations. *Am. J. Primat.* 37:305-316.
- Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz EB, Curran MJ, Booth A y Overman WH (2000) Assessing estradiol in biobehavioral studies using saliva and blood spots: simple radioimmunoassay protocols, reliability, and comparative validity. *Horm. Behav.* 38:137-147.
- Shirtcliff EA, Reavis R, Overman WH y Granger DA (2001a) Measurement of gonadal hormones in dried blood spots versus serum: verification of menstrual cycle phase. *Horm. Behav.* 39:258-266.
- Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E y Curran MJ (2001b) Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocr.* 26:165-173.
- Stanczyk FZ, Miyakawa I y Goebelsmann U (1980) Direct radioimmunoassay of urinary estrogen and pregnanediol glucuronides during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 137:443-450.
- Stephoe A, Kunz-Ebrecht SR, Wright C y Feldman PJ (2005) Socioeconomic position and cardiovascular and neuroendocrine responses following cognitive challenge in old age. *Biol. Psych.* 69:149-166.
- Stinson S (2005) Ethical issues in human biology, behavioral research, and research with children. En Turner T (ed): *Biological Anthropology and Ethics: From Repatriation to Genetic Identity*. New York, State University of New York Press, pp.139-148.
- Sufi SB, Donaldson A, Gandy SC, Jeffcoate SL, Chearskul S, Goh H, Hazra D, Romero C y Wang HZ (1985) Multicenter evaluation of assays for estradiol and progesterone in saliva. *Clin. Chem.* 31:101-103.
- Talge NM, Donzella B, Kryzer EM, Gierens A y Gunnar MR (2005) It's not that bad: Error introduced by oral stimulants in salivary cortisol research. *Dev. Psychobiol.* 47:369-376.
- Tausky HH (1954) A microcolorimetric determination of creatinine in urine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.* 208:853-861.
- Turner T (2005) *Biological Anthropology and Ethics: From Repatriation to Genetic Identity*. New York, State University of New York Press.
- Valeggia C y Ellison PT (1998) Nursing patterns, maternal energetics, and postpartum fertility among Tobas of Formosa, Argentina. *Am. J. Phys. Anthropol. Suppl.* 26:54.
- Valeggia C y Ellison PT (2001) Lactation, energetics, and postpartum fecundity. En Ellison PT (ed): *Reproductive Ecology and Human Evolution*. New York, Aldine de Gruyter, pp.85-106.

- Valeggia C y Ellison PT (2002) Energetics, fecundity, and human life history. En Rodgers J y HP Koehler (eds.): *Biodemography of Fertility*. Kluwer Academic Publishers, pp.87-103.
- Valeggia C y Ellison PT (2003) Impact of breastfeeding on anthropometric changes in women of an indigenous population in transition in Formosa, Argentina. *Am. J. Hum. Biol.* 15:717-724.
- Valeggia C y Ellison PT (2004) Lactational amenorrhea in well nourished Toba women of Formosa, Argentina. *J. Biosoc. Sci.* 36:573-595.
- Valeggia C, Faulkner KM y Ellison PT (2002) Crecimiento en lactantes de una comunidad Toba de Formosa. *Arch. Arg. Ped.* 100:24-35.
- Vitzthum VJ, von Dornum M y Ellison PT (1993) Effect of coca-leaf chewing on salivary progesterone assays. *Am. J. Phys. Anthropol.* 92:539-544.
- Vitzthum VJ, Bentley GR, Spielvogel H, Caceres E, Thornburg J, Jones L, Shore S, Hodges KR y Chatterton RT (2002) Salivary progesterone levels and rate of ovulation are significantly lower in poorer than in better-off urban-dwelling Bolivian women. *Hum. Reprod.* 17:1906-1913.
- Walker S, Mustafa A, Walker RF y Riad-Fahmy D (1981) The role of salivary progesterone in studies of infertile women. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 88:1009-1015.
- Walker RF, Wilson DW, Read GF y Riad-Fahmy D (1980) Assessment of testicular function by the radioimmunoassay of testosterone in saliva. *Int. J. Androl.* 3:105-120.
- Weinstein M y Willis RJ (2001) Stretching social surveys to include bioindicators: Possibilities for the health and retirement study, experience from the Taiwan study of the elderly. En National Research Council (ed.): *Cells and Surveys: Should Biological Measures be Included in Social Science Research?* Washington, DC, National Academy Press, pp.250-275.
- Weiss G, Skurnick JH, Goldsmith LT, Santoro NF y Park SJ (2004) Menopause and hypothalamic-pituitary sensitivity to estrogen. *JAMA* 292:2991-2996.
- Wood JW (1994) *Dynamics of Human Reproduction: Biology, Biometry, Demography*. New York, Aldine de Gruyter.
- Worthman C y Stallings JF (1994) Measurement of gonadotropins in dried spots. *Clin. Chem.* 40:448-453.
- Worthman C y Stallings JF (1997) Hormone measures in finger-prick blood spot samples: new field methods for reproductive endocrinology. *Am. J. Phys. Anthropol.* 104:1-21.
- Wright CE, Kunz-Ebrecht SR, Iliffe S, Foese O y Steptoe A (2005) Physiological correlates of cognitive functioning in an elderly population. *Psychoneuroendocrin.* 30:826-838.