



## Capítulo 11.2. Protocolo y recogida de muestras de saliva

### Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Material necesario .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Condiciones previas a la prueba.....</b>	<b>3</b>
<b>3.2. Preparación de materiales.....</b>	<b>3</b>
<b>4. Procedimiento día de prueba.....</b>	<b>3</b>
<b>4.1. Instrucciones para obtener la muestra de saliva: .....</b>	<b>3</b>
<b>4.2. Procesamiento de las muestras .....</b>	<b>4</b>
<b>4.3. Transporte de las muestras .....</b>	<b>4</b>
<b>4.4. Almacenamiento de las muestras .....</b>	<b>4</b>
<b>5. Procedimiento post prueba .....</b>	<b>4</b>

## 1. Introducción

Uno de los objetivos planteados en el estudio AGUEDA será investigar los efectos que tiene un programa de ejercicio realizado durante 6 meses en biomarcadores de saliva, así como examinar si los cambios en dichos marcadores median los cambios cerebrales a nivel estructural y funcional. Para ello se realizará la extracción de saliva en la sesión 4 de evaluación (en la que también se realiza la prueba PET; ver Capítulo 17. Análisis de PET). Con este capítulo se quiere garantizar la correcta extracción, procesamiento, envío y almacenamiento central de las muestras de saliva. Si estas muestras no se recogen, procesan, manejan o almacenan correctamente, las extracciones realizadas pueden verse en peligro y considerarse inválidas. Las extracciones de saliva se realizarán en dos puntos temporales: al inicio (T1) y después de los 6 meses de intervención (T6).

La extracción de saliva tendrá lugar en una sala del Hospital Virgen de las Nieves o en el IMUDS, habilitada para tal uso y será llevada a cabo por un investigador/a y/o odontólogo/a asociado del proyecto.

## 2. Material necesario



Tubos BD Falcon de 15 mL de polipirileno



Etiquetas de impresora ZEBRA



Bolígrafos y rotuladores para etiquetado



Eppendorfs de 1.5 mL



Pipeta de 1 mL



Puntas para pipeta



Gradilla 9x9 para eppendorfs



Gradilla para tubos



Centrifugadora



Bata de laboratorio



Congelador -80°C

### 3. Procedimiento previo a la prueba

Los participantes deben cumplir las condiciones previas descritas en el Anexo 2.6. Condiciones\_previas\_Sesión4, las cuales se les entregará de forma física en la sesión 3 y se recordarán por WhatsApp a lo largo de la semana de prueba.

#### 3.2. Preparación de materiales

La persona encargada de la prueba deberá preparar tantos tubos falcon como participantes acudan durante esa mañana a las evaluaciones (preparar alguno de repuesto) y 3 eppendorf por cada participante, en función de la organización y cálculos del equipo investigador. El número de participantes puede variar dependiendo de si la evaluación se realiza el día de sangre o en el PET. Esta persona tendrá que asegurar que todo el material se encuentra disponible para la prueba. Además, esta persona se encargará de imprimir/rotular las etiquetas que se pegarán en los eppendorf del participante en el formato “ID del participante, el momento temporal y el número del eppendorf(1,2 o 3)” con la nomenclatura adecuada (ej. Para pre- intervención 100\_1\_X/ para post-intervención 100\_6\_X). Para ello, utilizará un rotulador permanente y deberá ponerse guantes para evitar poder contaminar cualquier material contenido en el kit del participante.

### 4. Procedimiento día de prueba

La persona encargada de realizar las extracciones de muestras de saliva tendrá habilitada una sala del Hospital Virgen de las Nieves.

1. Antes de la recogida, el investigadxr deberá tener los tubos etiquetados y el material necesario listo en el laboratorio.
2. Los tubos deberán estar colocados en el orden por el que serán utilizados.
3. Cada recogida de saliva requerirá que la persona encargada tenga la Check-list del proyecto AGUEDA, para asegurarnos que se realizan de forma correcta.
4. Será recogido 1 tubo de saliva por participante.
5. El total de saliva recolectado en cada momento temporal será de aproximadamente 3 ml, solo contando con el líquido y no con la espuma.
6. El lugar donde se realizará la recogida de muestra bucal deberá estar limpio y desinfectado después de cada uso.
7. Los contenedores para los restos biológicos deben estar situados en la misma sala para poder tirar los restos y puntillas.

#### 4.1. Instrucciones para obtener la muestra de saliva:

1. Se le pide al sujeto que deje que la saliva se acumule en la boca durante al menos 1 minuto. Luego se le pide al sujeto que babee en el tubo de recolección de 15 ml etiquetado (Falcon, tubo de polipropileno cónico estéril con tapón de rosca plano). Este proceso puede ser repetido varias veces para recolectar grandes volúmenes de saliva (2-5 ml).
2. Alternativamente, la producción de saliva puede ser estimulada por la administración de Una pieza estándar con base de goma sin sabor (1.0 –1.5 g; Wrigley Co., Peoria, IL). Esta pieza de se puede colocar chicle en la boca del sujeto. Se le pide al sujeto que trague cualquier acumuló saliva

e instruyó a masticar el chicle a un ritmo regular. Sobre suficiente acumulación de saliva en la cavidad oral, la saliva se babea hacia el tubo de recogida etiquetado. Este proceso puede repetirse varias veces para recolectar grandes volúmenes de saliva (2-5 ml).

#### 4.2. Procesamiento de las muestras

1. Coloque el falcon con la muestra del participante en una gradilla de plástico y manténgalo a 4°C. Cuando haya un volumen de tubos recogidos, pasarlos por la centrifugadora para diferenciar la muestra de saliva de posibles restos sólidos.

2. Los valores a introducir en la centrifugadora son los siguientes:

RCF → 1600,

Tiempo → 10 minutos,

Temperatura → ambiente o 4°

3. Una vez centrifugada la muestra, el contenido de la misma debe ser repartida en 3 eppendorf. **Cada alícuota tiene que ser de 0.5 mL.** Una vez rellenados los tres eppendorf, guardarlos en la gradilla correspondiente a 4°C.

#### 4.3. Transporte de las muestras

La gradilla con todas las muestras de ese día se transportará mediante el investigadrx a cargo vía metro/coche hasta el IMUDS, manteniendo las muestras lo más aisladas posibles.

#### 4.4. Almacenamiento de las muestras

Las muestras obtenidas del día de recogida se almacenarán en el congelador de -80°C en la gradilla correspondiente.

### 5. Procedimiento post prueba

Una vez finalizado todo el proceso de recogida, transporte y almacenamiento de las muestras nos redirigiremos a la plataforma REDCAP. Dentro de REDCAP seleccionaremos el participante del que deseamos introducir datos y nos dirigiremos a la variable de “*blood and saliva sample*”

A continuación, para confirmar que el/la participante ha completado la prueba de saliva, introduciremos la fecha en el siguiente apartado y **daremos por finalizado el proceso.**

Date of Blood Collection	<input type="text"/> Today D-M-Y
Date of Saliva Collection	<input type="text"/> Today D-M-Y
Was Blood Draw Attempted?	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No
Arrival time of blood to lab	<input type="text"/> Now D-M-Y H:M
Time of the last (Yellow serum) sample carried to freezer (-80)	<input type="text"/> Now D-M-Y H:M
Sample position in box of freezer	<input type="text"/>
Were the data received from the hospital?	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No
How many defrosting cycles?	<input type="text"/>