



03072... 5
04
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

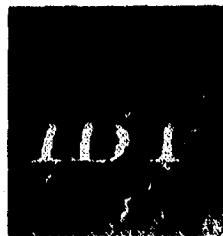
**DESARROLLO DE UNA PRUEBA
DIAGNOSTICA PARA LA DETECCION DE
HIPOTIROIDISMO CONGENITO
EMPLEANDO ANTICUERPOS
MONOCLONALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

CARLOS ANTONIO GONZALEZ JUAREZ



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CUERNAVACA, MOR. DICIEMBRE DE 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de
Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de
Biotecnología/UNAM bajo la dirección del
Dr. Alejandro Alagón Cano.**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar las más sinceras gracias al Dr. Alejandro Alagón Cano, por haber confiado en mí para la realización de este proyecto, que tuvo etapas muy difíciles, pero que me permitieron madurar y reflexionar sobre este camino en el que hoy me encuentro.

Al Dr. Octavio Tonatiuh y al Dr. Antonio Velázquez. Gracias por su aceptación para formar parte de mi comité tutorial durante mi Maestría, y por sus críticas y sugerencias para mejorar cada vez más.

Agradezco al Dr. Jean Louis Charli, Dr. Carlos Arámburo, Dra. Susana López, Dr. Lourival Possani sus críticas y comentarios durante la revisión de mi trabajo de tesis.

A mis compañeros de laboratorio Dra. Rosana Sánchez, Dr. Roberto Stock, Marcos, Ulises y Socorro. Gracias por el apoyo y su amistad que siempre me han brindado incondicionalmente.

A mis excompañeros de laboratorio: Georgina Hdez., Helena, Isabel, Lawrence, Bertha, Jesús Martín Polo, Miguel Angel, Macario, Ernesto, Gabriel, Raúl, Luis Miguel y Liu Keyi. Gracias por su compañía y su amistad en todo momento.

Externo mis agradecimientos al M. en B. René Hernández, M. en B. Georgina Estrada, al Biol. Alejandro Olvera y Felipe Olvera por sus apoyos técnicos durante este proyecto.

Gracias de manera muy especial a la Sra. Silvia Velázquez y a Rosario Colin por su gran apoyo técnico en el mantenimiento y limpieza del material destinado para la producción de anticuerpos monoclonales, que es la parte fundamental en este proyecto.

Agradezco a Angélica Linares, Alejandra Jasso y Beatriz Olvera todo su apoyo administrativo en este proyecto.

Quiero agradecer a CONACyT y DGAPA todo el apoyo recibido como becario durante mis estudios de Maestría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

DESARROLLO DE UNA PRUEBA DIAGNOSTICA PARA LA DETECCION DE HIPOTIROIDISMO CONGENITO EMPLEANDO ANTICUERPOS MONOCLONALES

RESUMEN

El hipotiroidismo congénito (baja producción o ausencia de hormonas tiroideas), una enfermedad que produce retraso mental, se caracteriza por presentar altos niveles de TSH en sangre. Las causas que pueden originarlo son: errores metabólicos o ausencia de tejido tiroideo. Su alta prevalencia entre la población de diversas partes del mundo incluyendo México, ha llevado al establecimiento de programas nacionales de tamizado en niños recién nacidos, que favorecen la detección oportuna de esta enfermedad. La manera más simple y económica de cuantificar TSH en sangre sigue siendo por inmunodiagnóstico.

En este trabajo se desarrolló una prueba diagnóstica para la detección de hipotiroidismo congénito, combinando anticuerpos monoclonales y policlonales anti-TSH. Esta prueba utiliza sustratos colorimétricos para peroxidasa que es el sistema generador de señal. La sensibilidad alcanzada con esta prueba nos permitió descartar a los individuos hipotiroideos de los eutiroideos en un ensayo ciego. La prueba fue validada y resultó ser altamente confiable.

Abreviaturas

ABTS .- 2,2' Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico).

ACh .- Acetilcolina.

ACF .- Adyuvante completo de Freund.

ACTH .- Hormona adrenocorticotrópica (corticotropina).

AIF .- Adyuvante incompleto de Freund.

AMP .- Monofosfato de adenosina.

AMPc .- Monofosfato de adenosina cíclico.

AS .- Albúmina sérica.

ATP .- Trifosfato de adenosina.

BSA .- Albúmina sérica bovina.

°C .- Grados centígrados.

CDR .- Región complementaria del anticuerpo al antígeno.

C_H .- Región constante de la cadena pesada.

C_L .- Región constante de la cadena ligera.

Col. .- Colaboradores.

COOH .- Carboxilo.

C6 .- Anticuerpo monoclonal específico para TSH.

DAB .- 3'3 diaminobenzidina.

DIT .- Diyodotirosina.

DMEM .- Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO .- Dimetil-sulfoxido.

EDTA .- Acido etilendiamino tetracético.

ELISA .- Ensayo inmunoenzimático.

FSH .- Hormona estimulante del folículo.

F12 .- Anticuerpo monoclonal que reconoce TSH y FSH.

g .- Gramos.

GC .- Gonadotropina coriónica.

GN-RH .- Hormona liberadora de gonadotropina

GMPc .- Monofosfato de guanósina cíclico

GTP .- Trifosfato de guanósina.

GDP .- Difosfato de guanósina.

HAT .- Solución selectiva de hipoxantina, aminopterina y timidina.

HA₂T .- Solución HAT con 2 veces la concentración de aminopterina.

HCl .- Acido clorhídrico.

HGPRT .- Enzima hipoxantina-guaninafosforibosil-transferasa.

HRP .- Peroxidasa de rábano.

hs .- Horas.

L-glu .- L-glutamina.

LH .- Hormona luteinizante.

MgSO₄ .- Sulfato de magnesio.

MIT .- Monoyodotirosina.

NaCl .- Cloruro de sodio.

NaOH .- Hidróxido de sodio.

NE .- Norepinefrina.

ng .- Nanogramos.

NH₂ .- Amino.

nm .- Nanómetro.

mg .- Miligramos.

µg .- Microgramos.

ml .- Mililitros.

µl .- Microlitros.

µIU .- Microunidades Internacionales.

OPI .- Solución de oxalacetato, piruvato e insulina.

PBS .- Amortiguador de fosfatos con NaCl

PEG .- Polietilén glicol

PGE .- Prostaglandina E.

pg .- Picogramos.

RPM .- Revoluciones por minuto.

SDS .- Dodecil sulfato de sodio

SFB .- Suero fetal bovino.

TGB .- Globulina que enlaza a las hormonas tiroideas

TK .- Timidina Cinasa.

TRH .- Hormona liberadora de tirotrópina (TSH).

tris/HCl .- Amortiguador tris-hidroxiaminometano con ácido clorhídrico.

TSH .- Hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina.

TSH-mAb 27 .- Anticuerpo monoclonal 27 unido a TSH.

T₄ .- Tiroxina.

T₃ .- Triyodotironina.

V_H .- Región variable de la cadena pesada.
 V_L .- Región variable de la cadena ligera.

- INDICE -

INTRODUCCION	1
1) Anticuerpos Monoclonales.....	1
2) Eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.....	8
3) Hipotiroidismo.....	10
4) Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH).....	17
5) Bioensayos y Radioinmunoensayos.....	21
ANTECEDENTES	24
OBJETIVO GENERAL	28
Objetivos Particulares.....	28
MATERIAL Y METODOS	29
I.- Protocolo de inmunización de ratones donantes para la producción de hibridomas.....	29
II.- Protocolo para la determinación del título de anticuerpos (ELISA).....	30
III.- Protocolo de fusión.....	32
IV.- Protocolo de "slot blot".....	35
V.- Protocolo de revelado con 3'3-diaminobenzidina (DAB).....	38
VI.- Protocolo de clonación por dilución limitada.....	39
VII.- Protocolo de inmunodifusión.....	39
VIII.- Protocolo para la producción de líquido de ascitis.....	40
IX.- Protocolo de congelación y descongelación de células.....	40
X.- Protocolo de purificación de los anticuerpos IgG1 usando proteína A y amortiguadores de alta fuerza iónica.....	42
XI.- Adsorción de anticuerpos policlonales por cromatografía de afinidad.....	43
XII.- Protocolo básico de conjugación de peroxidasa a anticuerpos.....	44
XIII.- Protocolo para la identificación de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales.....	46
XIV.- Protocolo para la cuantificación de TSH en sangre de niños recién nacidos.....	47
XV.- Protocolo del uso de trehalosa en placas como preservador.....	49

RESULTADOS..... 5 1

I) Obtención de hibridomas..... 5 1
II) Isotipos de las cadenas ligeras y pesadas de los monoclonales obtenidos..... 5 5
III) Formato Inicial de la prueba diagnóstica y sus nuevas estrategias..... 5 8
IV) Segunda estrategia como formato final de la prueba diagnóstica..... 6 1
V) Validación del ensayo ciego..... 6 4
VI) Almacenaje de placas conteniendo el monoclonal C6..... 6 8

DISCUSION..... 7 2

REFERENCIAS..... 7 6

APENDICES..... 8 4

Apéndice de amortiguadores..... 8 4
Apéndice de soluciones de bloqueo..... 8 5
Apéndice de cultivo..... 8 5

INTRODUCCION:

El diagnóstico ha sido una herramienta importante en la determinación de enfermedades y ha sido el punto de referencia para el tratamiento de las mismas. El diagnóstico de laboratorio ha venido evolucionando desde las simples observaciones al microscopio y simples pruebas bioquímicas hasta el análisis de ácidos nucleicos con técnicas sofisticadas como hibridación con sondas marcadas, reacción de polimerasa en cadena y patrones de corte con enzimas de restricción (Isada and Blakemore,1993).

Dentro de las pruebas bioquímicas e inmunológicas, el constante avance del conocimiento ha permitido el desarrollo de estuches que permiten hacer diagnósticos específicos y de alta sensibilidad, por lo que son más seguros y confiables tanto para el médico como para el paciente. Muchos de estos estuches diagnósticos deben su especificidad al uso de anticuerpos monoclonales que son la parte fundamental del ensayo (Bayer, 1991).

1) Anticuerpos Monoclonales:

a) Estructura Básica de los anticuerpos

Una de las formas de respuesta del organismo a las partículas extrañas al cuerpo es la respuesta humoral o generación de anticuerpos.

Se ha demostrado que todos los anticuerpos o inmunoglobulinas están formados por 4 cadenas (2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas) lo que constituye la unidad básica; las cadenas están unidas por puentes disulfuros formando una estructura de simetría bilateral (Fig.1)

En cada cadena polipeptídica encontramos dominios de 100-110 residuos de aminoácidos. En los dominios del lado NH_2 terminal de cada cadena existe mucha más variación en la secuencia de aminoácidos que en el resto de la cadena, por lo que esta región se conoce como región variable para distinguirla de la otra relativamente constante (llamada región constante en cada cadena). Las inmunoglobulinas se cortan fácilmente cerca de la mitad de la cadena pesada en una área entre el primer y segundo dominios constantes (C_{H1} y C_{H2}). La papaína (enzima proteolítica), corta hacia el lado amino terminal de los puentes disulfuros que unen ambas

cadenas pesadas, produciendo 3 fragmentos de tamaño similar: 2 fragmentos Fab, los cuales están formados por una cadena ligera completa unida a los dominios V_H y C_H1 de la cadena pesada y un fragmento Fc que tiene la parte carboxiloterminal del anticuerpo. Si la pepsina es usada, el sitio de corte ocurre hacia el lado carboxilo terminal de los puentes disulfuro que unen ambas cadenas pesadas, produciendo un gran fragmento $F(ab)'_2$ que está compuesto de 2 fragmentos Fab, el fragmento Fc que se produce en esta reacción es degradado completamente por la pepsina. La región de la cadena pesada que es susceptible al ataque proteolítico, por ser más flexible y estar más expuesta al medio que los dominios que son más compactos, se le conoce como región de "bisagra".

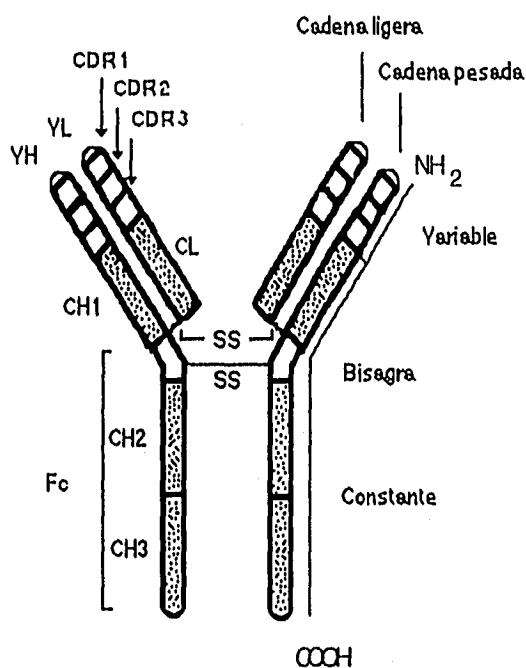


Fig. 1. En este esquema se ilustran los dominios que se encuentran en una molécula de anticuerpo. Los dominios variables de ambas cadenas se ubican hacia el lado amino terminal de la molécula mientras que los dominios constantes hacia al lado carboxilo terminal. Dentro de los dominios variables se encuentran regiones hipervariables que son las zonas de contacto físico con el antígeno, a éstas regiones se les llama CDRs. La ubicación de los sitios de corte para la papaína y para la pepsina en la región de la bisagra ha permitido la manipulación de estos dominios sin afectar sus funciones biológicas (Sandhu, 1992).

Los sitios de enlace al antígeno se asocian con los fragmentos Fab y más específicamente con los dominios V_L y V_H mientras que la mayoría de las actividades biológicas de las inmunoglobulinas (e.g. fijación del complemento) se asocian con el fragmento Fc (Stites and Terr, 1991).

b) Tipos de Respuesta Humoral.

La respuesta inmunológica del organismo puede ser de dos tipos: primaria y secundaria. En la primaria encontramos principalmente anticuerpos IgM de poca afinidad mientras que en la secundaria encontramos anticuerpos IgGs de mayor afinidad que son producto de una respuesta inmune madura. En la respuesta secundaria, encontramos numerosas clonas de linfocitos B que participan en la producción de anticuerpos cada uno con diferentes características de afinidad y especificidad, lo que le da el calificativo de ser policlonal.

Cada clona activada de linfocitos B produce una población homogénea de anticuerpos, pero la secreción de estos es corta debido a la vida media de la célula. Sin embargo, con la técnica de generación de hibridomas desarrollada por Kohler y Milstein en 1975, se puede immortalizar esta producción mediante la fusión de una célula de mieloma que es inmortal, con una célula de linfocito B productor de un solo tipo de anticuerpo, de esta manera se crea el hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal (Fig 2) (McCullough and Spier, 1990).

La fusión entre las células de bazo y las células de mieloma puede hacerse por diversos agentes entre los que se encuentran: virus (Sendai y Epstein-Barr); compuestos químicos como lisolecitina y polietilenglicol, o bien, con medios físicos como la electricidad (electrofusión) y el sonido (fusión electroacústica) (Liddell and Cryer, 1991).

Sin embargo, aún cuando se han desarrollado diversos métodos de fusión, el más empleado es el de polietilenglicol. Después de una fusión no todas las células obtenidas son viables y de interés, debido a las posibles combinaciones que se dan entre las células involucradas (McCullough and Spier, 1990). Por lo que, después de una fusión es necesario seleccionar los hibridomas obtenidos.

El proceso de selección se basa en el bloqueo de la vía principal para guanosina, ésta se bloquea por un antagonista de la enzima folato reductasa, que es la aminopterina (Fig. 3). Sin embargo, la existencia de una vía alterna, en la cual, los nucleótidos hipoxantina y guanina son convertidos a guanosin monofosfato por acción de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa (HGPRT), permite que la síntesis de nucleótidos continúe y se asegure la supervivencia de la célula.

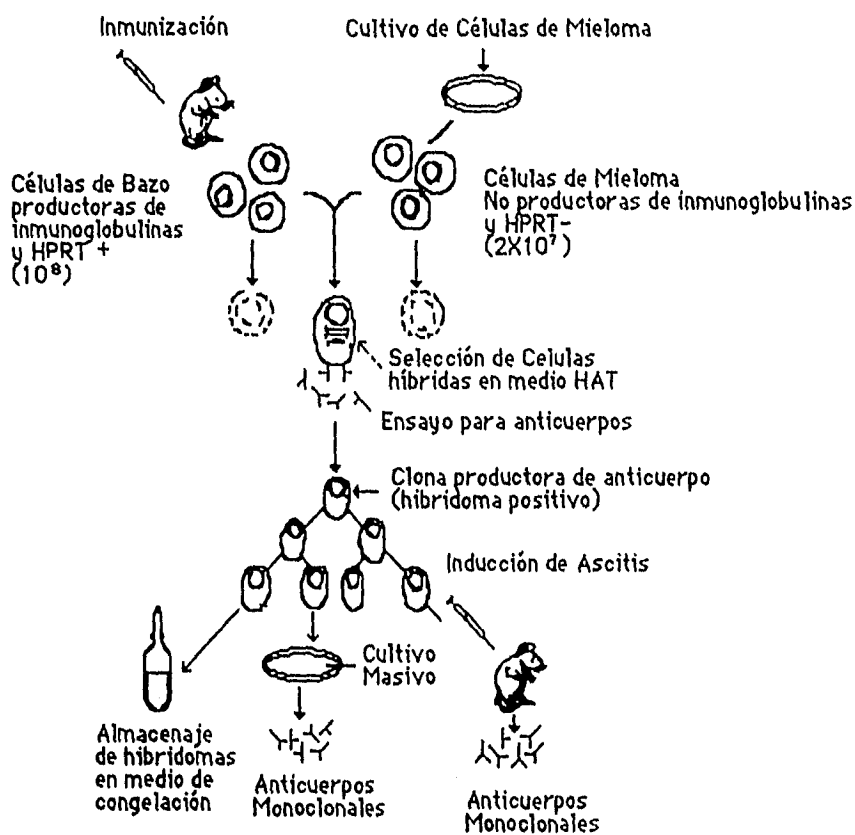


Fig. 2. En el dibujo se muestra como células de mieloma (células inmortales) se pueden fusionar con células de bazo (células productoras de anticuerpos) para producir hibridomas con funciones biológicas de ambas (células inmortales capaces de producir anticuerpos continuamente). Una vez hecha la selección, los hibridomas estables puede usarse: 1) para la producción de ascitis en ratones en los cuales se pueden alcanzar altas concentraciones de 1-10 mg anticuerpos monoclonales/ml de ascitis; 2) almacenaje de clonas para su preservación y 3) producción continua de anticuerpos en condiciones "in vitro". La producción de un anticuerpo monoclonal puede hacerse a partir del cultivo del hibridoma productor en condiciones "in vitro" o de su producción en líquido ascítico (Stites and Terr, 1991).

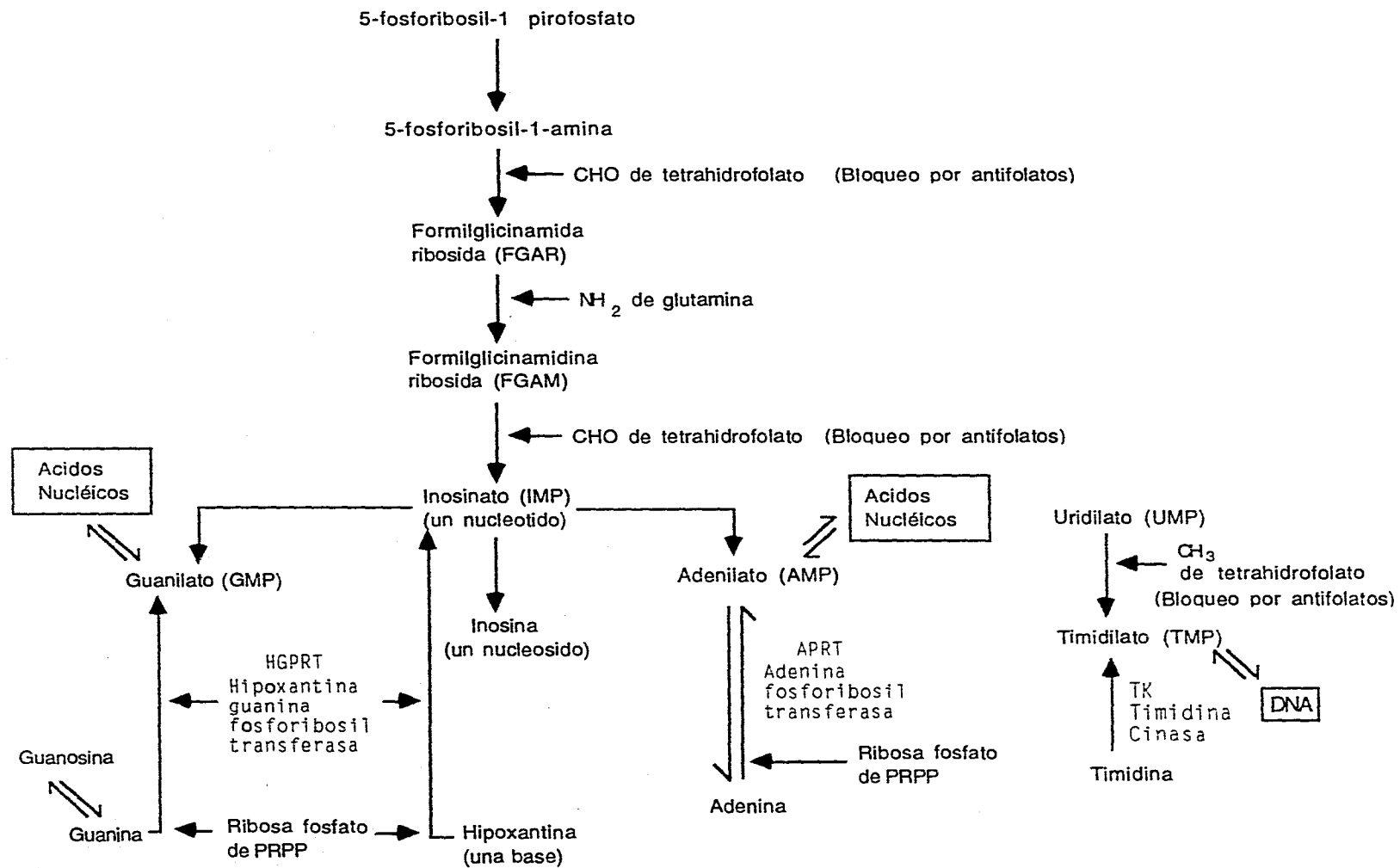


Fig. 3 Ubicación de las enzimas HGPR (hipoxantina guanina fosforibosil transferasa) y TK (timidina kinasa) en la ruta metabólica de la síntesis de ácidos nucleicos (Darnell et al., 1990).

En las células de mieloma usadas para la fusión, la enzima HGPRT está deteriorada junto con la TK (timidina cinasa) enzima importante para la síntesis de bases pirimídicas.

Las células HGPRT⁻ y TK⁻ son incapaces de sobrevivir en medio de cultivo suplementado por hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT), dado que se bloquea las vías principales de síntesis de purinas y pirimidinas. La capacidad de las células HGPRT⁻ y TK⁻ para crecer en medio HAT, sólo está dada por la fusión de éstas con las células de bazo que son HGPRT⁺ y TK⁺, éstas células aportan la información genética para la expresión de ambas enzimas funcionales.

Las células de hibridomas seleccionadas, ahora contienen las dos propiedades más importantes de sus progenitores: la inmortalidad y la actividad productora de anticuerpos, por lo que serán capaces de producir poblaciones homogéneas de anticuerpos, es decir, anticuerpos monoclonales, de forma constante (McCullough and Spier, 1990).

Usos y aplicaciones de los anticuerpos monoclonales:

Los anticuerpos monoclonales tienen un amplio rango de usos en diferentes áreas tanto en plantas como en animales. Las áreas pueden ser divididas en investigación, diagnóstico, profilaxis y terapia (McCullough and Spier, 1990).

La investigación es el área con mayor uso de anticuerpos, los cuales han sido las herramientas para hacer estudios de antígenos, estructura de variaciones antigénicas, análisis e identificación de proteínas de superficie en células que son específicas y pueden usarse como marcadores para identificar subpoblaciones celulares, análisis de neoplasias, etc (McCullough and Spier, 1990).

Por medio de anticuerpos, los biólogos celulares han estudiado antígenos de diferenciación en células del sistema nervioso, e identificado neurotransmisores y receptores. Dentro de los estudios endocrinológicos, también se han hecho anticuerpos monoclonales contra diversas hormonas, con los cuales, se ha obtenido información detallada acerca de la estructura antigénica hormonal y de la influencia de estas hormonas en funciones

fisiológicas (McCullough and Spier, 1990).

El uso de los anticuerpos monoclonales en el diagnóstico, se basa en su capacidad para identificar de forma segura los epítopes presentes en una muestra y los cambios antigénicos que puedan haber ocurrido en ésta. Así se pueden identificar y diagnosticar los patógenos asociados con alguna enfermedad particular, los cambios antigénicos que ocurren durante una neoplasia, los desórdenes fisiológicos y las enfermedades autoinmunes (McCullough and Spier, 1990).

De todas estas aplicaciones, también se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales, no solamente identifican los patógenos o cambios antigénicos en los blancos estableciendo las huellas antigénicas, sino que también son más seguros y rápidos que los anticuerpos policlonales. Esta característica los hacen importantes en el diagnóstico de enfermedades, con lo cual se pueden dar tratamientos más tempranos y oportunos.

Una forma de prevenir una enfermedad, producir un ataque directo al blanco y dar protección a un organismo, es por inmunización pasiva (uso de anticuerpos en un organismo virgen para dar protección). En este aspecto, se ha observado el potencial que tienen algunos anticuerpos monoclonales para dar protección contra virus, bacterias o parásitos; muchos de estos anticuerpos no son capaces de neutralizar al patógeno "in vitro", pero sí de dar protección "in vivo". La forma de acción de estos anticuerpos es ayudando a la opsonización del patógeno para mejorar la fagocitosis y dar muerte al blanco (McCullough and Spier, 1990).

Por otro lado, los anticuerpos monoclonales también pueden conjugarse covalentemente a drogas o toxinas vegetales, lo que permite hacer un ataque más dirigido y específico al blanco que se quiere eliminar. De esta manera se tiene un mejor control de los sitios de acción de las drogas no solamente por el uso de bajas concentraciones, sino porque se disminuye la interferencia de éstas en el metabolismo del organismo que se intenta salvar y le ayuda a mantener la tolerancia a la misma. Ejemplo de ello son las drogas utilizadas en el tratamiento contra algunos tipos de cáncer (McCullough and Spier, 1990).

Actualmente, con el desarrollo de las técnicas de biología molecular e ingeniería genética, los anticuerpos monoclonales murinos pueden emplearse en los tratamientos contra cáncer y leucemias.

Los anticuerpos monoclonales murinos contra cáncer humano aplicados directamente al hombre enfermo para dar inmunoterapias son antigénicos, por lo que, los rechazos y la neutralización por los anticuerpos humanos no se hacen esperar. El conocimiento de la estructura y función de los anticuerpos ha permitido la manipulación de sus dominios y ha llevado a la creación de anticuerpos quiméricos principalmente del tipo murino-humano (regiones variables murinas unidas a regiones constantes humanas que pueden activar mecanismos de acción del complemento ayudando así al paciente). De esta manera se disminuye su antigenicidad y se conservan sus propiedades de reconocimiento y enlace al blanco (Fig. 4). En la "humanización" de los anticuerpos quiméricos únicamente se conservan los CDRs murinos; de esta manera se reduce todavía más la antigenicidad de las regiones variables murinas que son sustituidas por secuencias de aminoácidos humanas (Shandu,1992; Wright et al., 1992).

Otra de las áreas que se ha beneficiado con la manipulación genética de los anticuerpos es la ingeniería de proteínas y la enzimología. La ingeniería genética de los anticuerpos también ha permitido el desarrollo de anticuerpos catalíticos; estos anticuerpos se producen en ratones usando como inmunógeno el estado de transición del sustrato durante una reacción enzimática. A través de la manipulación genética de los "dominios variables catalíticos" de estos anticuerpos, se pueden unir a otras proteínas o con regiones constantes de anticuerpos de otras especies incluso su "humanización" y ahora formar anticuerpos con propiedades catalíticas de reacciones enzimáticas no presentes en la naturaleza propia de una especie (Benkovic, 1992).

2) Eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo

Los sistemas nervioso y endócrino interactúan modulando su función de manera recíproca. Esta interdependencia funcional la podemos observar en la estrecha y constante relación que tiene el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides en todos los vertebrados superiores (Fig. 5) (Li, et al., 1994).

La glándula tiroides como parte de este eje está controlada a tres niveles: a nivel tiroides, de hipófisis e hipotálamo.

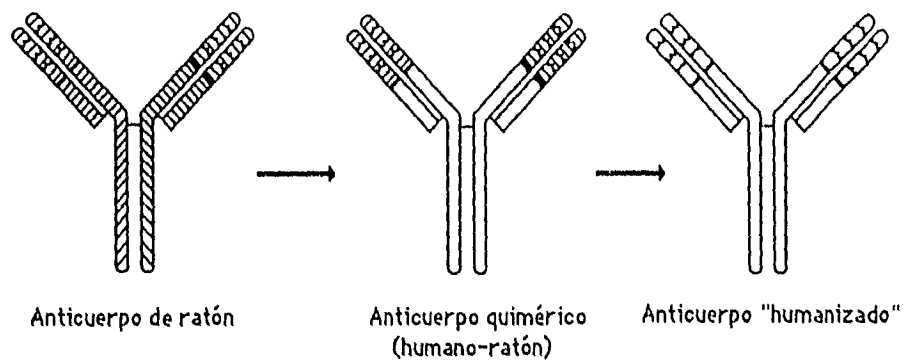


Fig. 4. Las inmunoglobulinas son proteínas globulares que tienen dominios con funciones específicas, lo que ha permitido la manipulación genética de estos en diferentes especies principalmente en ratones, ratas y humanos; facilitando la creación de anticuerpos quiméricos (ratón-humano) que luego podrán ser "humanizados" y utilizados en terapias contra diferentes enfermedades. En la figura se muestra como los anticuerpos quiméricos se forman por la manipulación de los dominios de dos especies diferentes, mientras que los anticuerpos humanizados se forman por la manipulación de los CDRs que son sustituidos en los anticuerpos de la especie huésped por aquéllos que tienen la capacidad de reconocer a un antígeno en particular (Sandhu, 1992).

Cuando los tirotrópos de la pituitaria que secretan la TSH son estimulados por la TRH hipotalámica (Hormona Liberadora de Tirotrófica) se observa que la TRH ejerce efectos rápidos a nivel de secreción y efectos lentos a nivel de síntesis y acumulación de tirotrófica. Cuando la tiroides es estimulada por la hormona pituitaria TSH (Hormona Estimulante de la Tiroides) (Fig. 6) se produce un estímulo rápido en esta glándula (considerando los pasos de síntesis hormonal, secreción o función en general. Fig. 7). Las células que forman la adenohipófisis son también controladas por las hormonas tiroideas T4 y T3 (tiroxina y triiodotironina, respectivamente) (Demeester-Mirkine and Dumont, 1980).

El hipotálamo también inhibe la secreción de TSH por otro péptido que es la somatostatina. Las neuronas que controlan la secreción de TRH son probablemente controladas por centros nervios sensibles a las hormonas tiroideas y a cambios del medio ambiente como son el estrés, el frío, etc.

Diversas causas en alguno(s) de los componentes del eje hipotálamo-hipofisis-tiroidea, pueden producir cambios o ausencia de las concentraciones hormonales normales produciendo un estado patológico en el individuo.

Por lo que, la primera pregunta a contestar es si el paciente es un individuo eutiroides, hipertiroides o hipotiroides. La historia clínica, el examen físico y pruebas sensibles del funcionamiento tiroideo, son los indicadores del estado funcional del paciente en turno.

Con el término de eutiroidismo denominamos a los individuos normales o sanos, con el de hipertiroidismo aquellos que tienen las concentraciones de hormonas tiroideas más altas de lo normal. En este trabajo se hace mayor referencia a los individuos hipotiroideos que son aquellos que tienen niveles bajos de hormonas tiroideas en el suero o sangre.

3) Hipotiroidismo:

El hipotiroidismo es una enfermedad sistémica que se caracteriza por una baja secreción de hormonas tiroideas y puede presentarse a cualquier edad por diversas causas, por lo que puede dividirse en dos tipos:

- I) Hipotiroidismo congénito (cretinismo en el recién nacido)
- II) Hipotiroidismo adquirido (juvenil y adulto)

En ambos casos hay varios mecanismos que pueden dar lugar a una deficiente producción de hormonas tiroideas (Gómez Vargas et al., 1977).

Otra de las clasificaciones que ha sido propuesta, es la adoptada por la Asociación Americana de Tiroides, la cual se basa en la etiología del síndrome. Esta distingue diferentes formas de hipotiroidismo que pueden ser:

- a) H. Primario
- b) H. Secundario
- c) H. Terciario

En el hipotiroidismo primario el origen del desorden está en la tiroides misma, la cual es incapaz de producir adecuadas cantidades de hormonas; las causas pueden ser pérdida o ausencia de tejido tiroideo o defectos bioquímicos en la síntesis de la hormona.

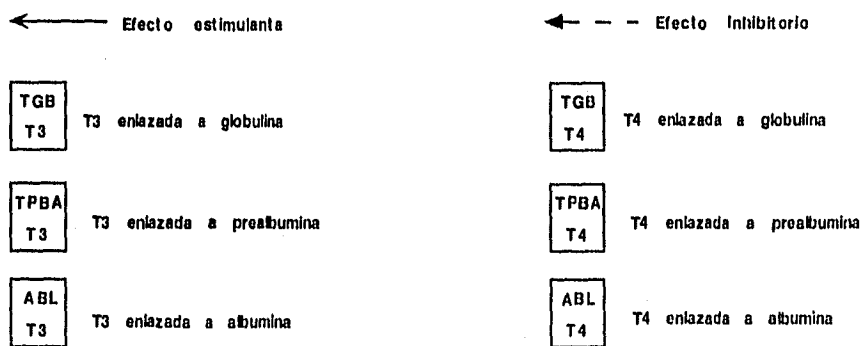
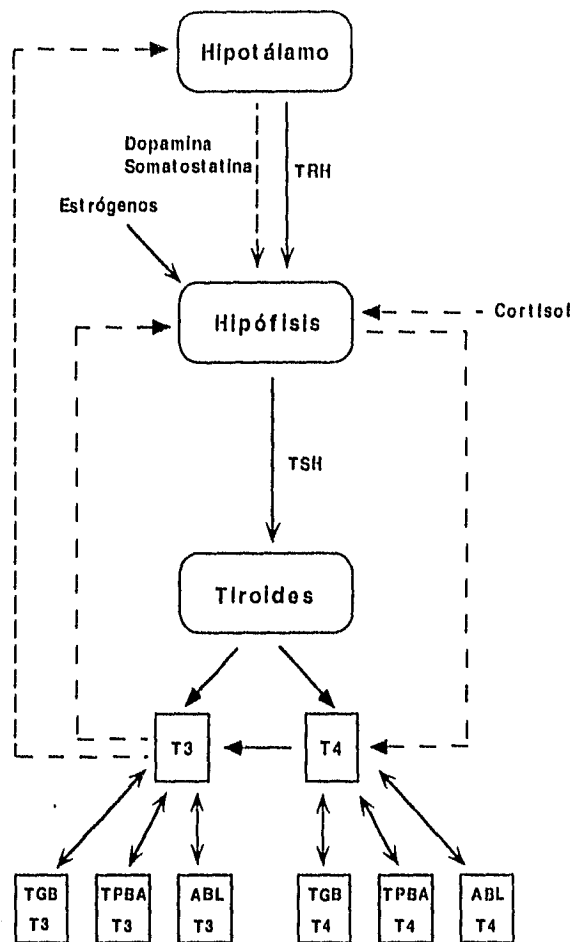


Fig. 5 Eje hipotálamo-Hipófisis-Tiroides.- En esta fig. se observan las interacciones entre los componentes del eje, así como las proteínas que constantemente se unen a las hormonas tiroideas (Li, et.al. 1994)

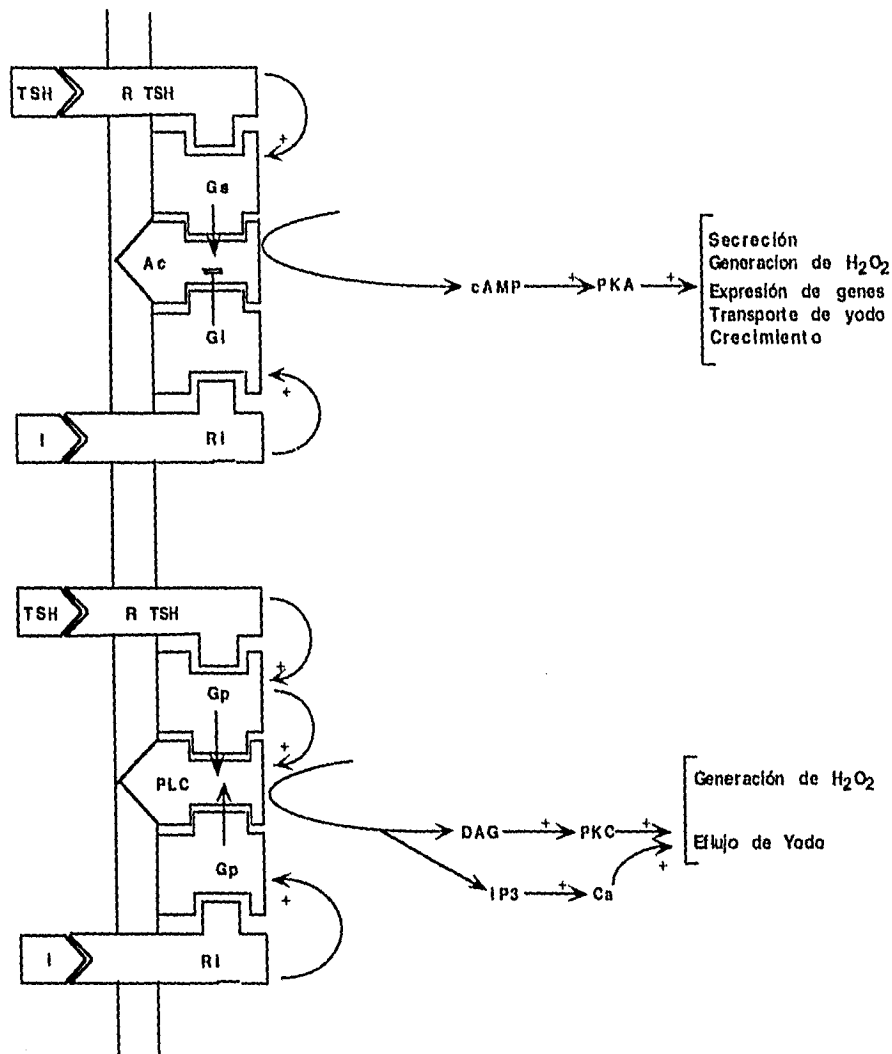


Fig 6. Cascada regulatoria activada por TSH en tirocitos humanos.- En los tirocitos humanos se han observado dos mecanismos de transducción de señales: 1) producción de AMP cíclico por medio de la enzima adenilato ciclasa (Ac) y 2) producción de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) por la enzima fosfolipasa C (PLC) de fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP₂). En ambos casos existe la participación de proteínas G (Gs y Gp), estas son proteínas de transducción que enlazan GTP o GDP para activar o inhibir a las enzimas efectoras (adenilato ciclasa o fosfolipasa C). La producción de estos segundos mensajeros (AMPc, IP₃ y DAG) promueve la activación de otras proteínas cinasas (PKA y PKC) y la liberación de Ca²⁺ que actúan sobre el metabolismo y expresión de genes de la misma célula y por lo tanto, sobre sus funciones, como son: la entrada y salida de yodo, generación de peróxido (H₂O₂), reacciones de oxidación, secreción hormonal, crecimiento, etc. Una disminución de la hormona TSH o la activación de proteínas G inhibitorias (Gi) asociadas a otro tipo de receptores presentes en la membrana pueden inhibir esta cascada de reacciones (Vassart and Dumont, 1992; Berridge, 1993).

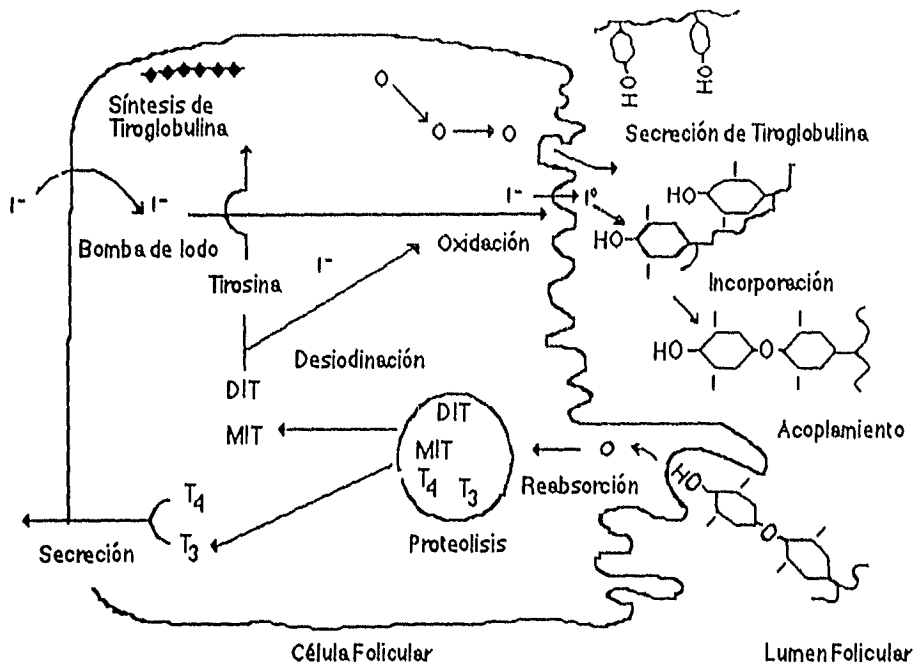


Fig. 7. Síntesis, almacenamiento y secreción de las hormonas tiroideas

Los pasos que intervienen en la síntesis de las hormonas tiroideas y que se ilustran en la figura, son los siguientes: 1) Captación o transporte de yodo (bomba de yodo); 2) Oxidación del yodo (peroxidasa); 3) Organización; 4) Acoplamiento de las mono y diyodotirosinas; 5) Proteólisis de la tiroglobulina (proteasas y peptidasas) y 6) Desyodación de las mono y diyodotirosinas (deshalogenasa).

El transporte del yodo al interior de la célula folicular se realiza a través de un proceso activo llamado "bomba de yodo", que es estimulado por la tirotrópica, probablemente por la inducción de la síntesis de enzimas que aumentan la capacidad de la bomba de yodo. Dentro de la célula folicular, la organización del yodo, es decir, su incorporación al proceso de biosíntesis, es una etapa esencial que se lleva a cabo por un sistema de peroxidasa ya identificado.

La tiroglobulina, proteína que sirve de depósito del material hormonal, tiene un peso molecular de 660 000; está formada por 5 650 aminoácidos, de los cuales 125 corresponden a tirosina. En esos residuos se lleva a cabo la yodación para producir monoyodotirosina (MIT), precursor necesario de la diyodotirosina (DIT). La formación de las yodotironinas (tiroxina y triyodotironina) se realiza mediante la acción de enzimas acopladoras que unen dos diyodotirosinas para formar tiroxina (T₄); o bien, diyodotirosina con monoyodotirosina y producir triyodotironina (T₃). Finalmente, las mono y diyodotirosinas que no fueron acopladas pierden sus átomos de yodo al actuar sobre ellas una enzima deshalogenasa. Los átomos de yodo liberados son reutilizados para la formación de hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas biológicamente activas (T₃ y T₄) son liberadas de la tiroglobulina por un proceso de proteólisis, que se inicia con el estímulo de la tirotrópica. Las microvellosidades del ápice de la célula folicular toman porciones del coloide y lo introducen al interior donde se unen a lisozomas que contienen enzimas proteolíticas. En la forma de coloide es llevado hacia la base de la célula y los productos de la proteólisis son transportados hacia la circulación sanguínea (Gómez Vargas et al., 1977; Goodman y Van Middlesworth, 1980).

En el hipotiroidismo secundario la insuficiencia tiroidea resulta de una ausencia de estimulación por TSH como consecuencia de un enfermedad pituitaria. Las dos causas más frecuentes son adenomas y el síndrome de Sheehan que resulta luego de un proceso trombo embólico en los vasos porta-hipofisiales

El hipotiroidismo terciario es causado por una lesión hipotalámica que induce un insuficiencia de TRH. Las causas más comunes son las lesiones nerviosas (malformaciones), trauma craneal, tumores y síndrome de Sheehan.

El cuadro clínico de este padecimiento puede variar de acuerdo al grado de deficiencia hormonal, mecanismos involucrados en el desorden y edad en la que se presenta esta enfermedad (Tachman and Guthrie, 1984).

I) Hipotiroidismo Congénito

1) Hipotiroidismo en el recién nacido:

La hormona tiroidea desempeña un papel importante en el crecimiento y maduración del organismo, por lo cual su deficiencia en esta etapa produce el síndrome de cretinismo, estado que se caracteriza por retraso psicossomático profundo y permanente. Las causas principales son los errores congénitos de la síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas (Fig. 7 y Tabla I).

En el diagnóstico y manejo del hipotiroidismo es esencial considerar el daño mental residual. Existen datos estructurales y funcionales del papel de la hormona tiroidea en el crecimiento y maduración del sistema nervioso central (Dussault and Ruel, 1987; Moltz and Postellon, 1984); aunque su mecanismo no es bien conocido, parece depender de la síntesis de proteínas y de otros constituyentes del cerebro en desarrollo. El cuadro clínico depende del grado de insuficiencia tiroidea, del tiempo de inicio y de la maduración del proceso.

Aunque los recién nacidos parecen normales, los síntomas más tempranos son inespecíficos: letargía, dificultad para comer, constipación y persistencia de ictericia neonatal; se requieren varias semanas o meses para demostrar el retraso en el crecimiento y en el desarrollo. Sin embargo,

Tabla I

Causas del Hipotiroidismo Congénito (cretinismo)
Disgenesia Tiroidea
Deficiencia de Yodo
Ingestión de Drogas antitiroideas
Errores Enzimáticos: Incapacidad para concentrar Yodo
Incapacidad para organificar Yodo
Incapacidad para acoplar yodotirosinas y formar yodotironinas
Incapacidad para deyodinar yodotironinas
Secreción de yodotironinas anormales en suero

(Gómez-Vargas et al., 1977)

la ausencia en los centros de osificación en la epífisis distal del fémur y proximal de la tibia, sugieren deficiencia de la hormona tiroidea intrauterinamente. Por este motivo, el diagnóstico del hipotiroidismo en el recién nacido es difícil y depende de la perspicacia del médico.

El cuadro completo del hipotiroidismo neonatal se presenta gradualmente; la cabeza es grande con cuello corto, pelo escaso, áspero y fontanelas abiertas. La base de la nariz es ancha y plana, hay labios gruesos con macroglosia, bradicardia, abdomen abultado, a menudo con hernia umbilical, hipotonía muscular generalizada e hiporreflexia osteotendinosa. Un examen radiológico del tórax muestra cardiomegalia, y el del esqueleto, la falta de núcleos de osificación en la rodilla, el cuboide y la columna vertebral (Gómez Vargas et al., 1977).

El hipotiroidismo en el recién nacido debe ser tratado inmediatamente con dosis sustitutivas de hormona tiroidea. El éxito en el tratamiento depende de la edad en que se inicia, el diagnóstico temprano y la continuidad del tratamiento sin interrupción, con lo cual es probable que se produzca un desarrollo normal (Gómez Vargas et al., 1977).

II) Hipotiroidismo Adquirido

2) Hipotiroidismo juvenil:

Este se presenta después de los 2 años de edad durante el crecimiento. En esta etapa el sistema nervioso central se ha desarrollado, por lo que la repercusión en este sistema no es tan grave. En la mayor parte de los casos no existe una causa bien determinada, aunque son numerosos los datos que sugieren que se trata de un cuadro secundario a una tiroiditis de Hashimoto (enfermedad autoinmune, producción de anticuerpos antitiroideos); las otras causas se presentan esporádicamente (Tabla II).

3) Hipotiroidismo en el adulto:

Este padecimiento en el adulto es raro y es 4-7 veces más frecuente en la mujer que en el hombre. Se caracteriza por un principio insidioso y pueden pasar varios años con sintomatología inespecífica y poco aparente (Tachman and Guthrie, 1984). Son varias las causas que pueden dar lugar a una deficiente producción de hormonas tiroideas en el adulto (Tabla II); entre ellas se encuentran las siguientes:

a) Destrucción o sustitución del parénquima tiroideo. En más de la mitad de los casos, la tiroides se atrofia en forma progresiva sin causa aparente. Hallazgos recientes parecen indicar que este hecho pudiera corresponder a una etapa tardía de una tiroiditis de Hashimoto, ya que se ha podido comprobar que esta es la evolución natural de dicho proceso. Además de los niveles elevados de anticuerpos anti-tiroideos, el cuadro puede coincidir con otros padecimientos endócrinos (insuficiencia suprarrenal, diabetes, hipogonadismo) y no endócrinos (anemia perniciosa, artritis reumatoide, lupus eritematoso) todos ellos con un fondo de naturaleza inmunológica.

b) Post-tratamiento. La causa más común de hipotiroidismo es como complicación del tratamiento con yodo radioactivo y quirúrgico del hipertiroidismo.

c) Síntesis o liberación impedida. Además de las drogas antitiroideas habituales, como son los derivados de las tiocarbamidas, se ha atribuido hipotiroidismo a la administración crónica de resorcinol, cobalto, esteroides, yodo, carbonato de litio, etc.

Tabla II

Causas del Hipotiroidismo Adquirido (juvenil y/o del adulto)
1.- Primario
a) Idiopático
b) Postquirúrgico
c) Post-tiroiditis
d) Medicamentos
2.- Secundario
a) Panhipopituitarismo
b) Deficiencia selectiva de TSH
3.- Hipotalámico o terciario

(Gómez Vargas et al., 1977)

d) Ausencia de estímulo hipotálamo-hipofisiario. Puede ser selectivo o múltiple, involucrando el resto de las hormonas hipofisarias. El sitio de lesión puede localizarse en la hipófisis o el hipotálamo, denominándose hipotiroidismo secundario o terciario, respectivamente.

Los efectos de la ausencia de hormonas tiroideas pueden observarse en los diferentes aparatos y sistemas del cuerpo y manifestarse como alteraciones de la piel o alteraciones cardiovasculares, neurológicas, musculoesqueléticas, mentales, hematológicas y genitales, entre otras.

4) Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH):

Por estudios embriológicos, se ha demostrado la presencia de tiroglobulina y la captación de yodo por la tiroides desde las 8-10 semanas de vida intrauterina, mientras que la pituitaria empieza a producir TSH a las 12 semanas y el eje hipotálamo-hipofisis-tiroidea es completamente funcional hasta las 20 semanas (Willi and Moshang, 1991).

La mayor parte de la hormona tiroidea está enlazada por la globulina (TGB). Concentraciones relativamente altas de TGB en la sangre materna favorecen la distribución de ésta hormona en la circulación materna. Existen evidencias que han demostrado que cantidades significativas de hormonas tiroideas pasan a través de la placenta. En fetos hipotiroideos, cantidades significativas de hormonas tiroideas pueden ser transportadas a través de la placenta, lo que explica el que los fetos tengan un desarrollo normal y que la deficiencia se manifieste después del nacimiento (Nathanielsz, 1976; Vulsmán, et.al. 1989; Larsen, 1989; Willi and Moshang, 1991).

Por estudios hechos en mujeres embarazadas se ha logrado conocer las concentraciones de TSH en fetos durante el segundo trimestre de gestación (Tabla III). Se ha observado que a partir del segundo trimestre

Tabla III

Concentración de TSH en el segundo trimestre de gestación con circulación umbilical intacta (Gennser et al., 1975)

	Vena Materna	Arteria Umbilical (varón)	Arteria Umbilical (mujer)	Líquido Amniótico (varón)	Líquido Amniótico (mujer)
hTSH μU/ml	5 ± 0.3 (9)	6 5-7 (2)	9 7-13 (3)	8 7-10 (3)	12 9-15 (2)

se inicia un incremento de T4 libre, T4 total y TGB que se mantiene hasta término del embarazo. Para TSH también hay un incremento que se inicia alrededor de las 18 semanas, para luego mantenerse desde alrededor de las 25 semanas hasta el término (Fig. 8); pero en unos minutos después del nacimiento hay un aumento de TSH de casi 10 veces más, el cual es causado por exposición al frío u otros factores del medio ambiente extrauterino (Nathanielsz, 1976; Yoshida y Col., 1986; Radunovic y Col., 1991).

Los primeros estudios que condujeron al descubrimiento de la TSH, se iniciaron con Niepce y Rogowitsch hacia 1851-1888, quienes observaron, en autopsias hechas a pacientes muertos por cretinismo, ciertas alteraciones de la glándula tiroidea e hiperplasias pituitarias; pero no fue

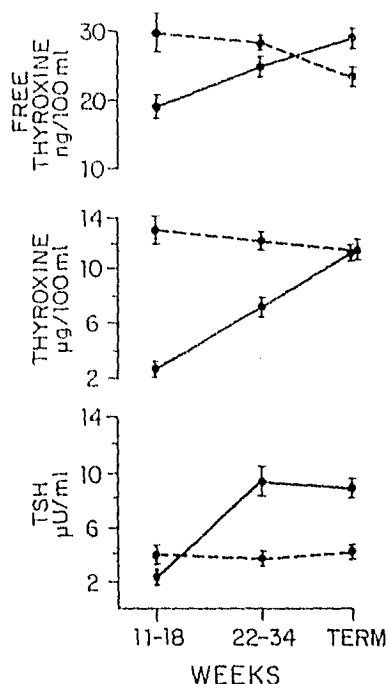


Fig. 8. Concentraciones de T_4 , T_4 libre y TSH en sueros materno (---) y fetal (—) de 11 semanas a término (Nathanielsz, P.W., 1976).

sino hasta a mediados del siglo 20 que se estableció el concepto del eje pituitario-tiroides por Hoskins; entre 1912-1916 Smith y Allen, tomando como modelos experimentales renacuajos de anfibios, observaron atrofia en la tiroides y un lento crecimiento sin metamorfosis si eran hipofisectomizados; en 1922, Smith y Smith, demostraron que la pituitaria secreta una sustancia que mantiene el tamaño de la tiroides en las zorras, ya que la inyección de un extracto crudo de pituitaria bovina podía preservar la tiroides en animales hipofisectomizados. Philip Smith apoyado en sus investigaciones posteriores, amplió más sus observaciones y demostró más tarde que inyecciones de pituitarias de rata o bovinas reparaban parcialmente la funcionalidad de la tiroides en ratas hipofisectomizadas (Magner, 1990).

Sin embargo, el crédito del descubrimiento del factor tirotrópico pituitario se ha otorgado a Max Aron de Estrasburgo y/o a Leo Loeb de St. Louis. Ambos reportaron independientemente, en 1929, que extractos de partes anteriores de pituitaria causaban alargamientos a las glándulas tiroides en cuyos y mostraron estudios histológicos de crecimiento celular y secreción (Magner, 1990).

La purificación de la TSH se inició con los primeros intentos de P. Condliffe y R. Bates en 1957, usando dietilaminoetil celulosa (DEAE celulosa), pero, finalmente, fue hasta 1969 cuando J. Pierce y Liao lograron obtener TSH altamente pura por medio de cromatografía de intercambio iónico y en 1971, ellos mismos, lograron identificar y definir las subunidades alfa y beta de la TSH, y su secuencia de aminoácidos; posteriormente demostraron que la subunidad beta determina la especificidad biológica de este heterodímero (Magner, 1990).

La TSH u Hormona Estimulante de la Tiroides, es una glicoproteína derivada de la pituitaria, de un peso molecular de 28000 - 30000 daltons; está compuesta de dos subunidades conocidas como alfa (α) y beta (β), que tienen un peso molecular de 14.7 y 15.6 Kilodaltons respectivamente. Estas subunidades no están unidas covalentemente. La TSH está químicamente relacionada a otras gonadotropinas pituitarias como son FSH (Hormona Estimulante de los Folículos) y LH (Hormona Luteinizante), y a la CG (Gonadotropina Coriónica) de origen placentario. La TSH es sintetizada por los tirotrópos del lóbulo anterior de la pituitaria y es almacenada en gránulos secretorios, que luego se liberan a la circulación de manera regulada. Así, se une a sus receptores en las células tiroideas y activa la liberación de las hormonas tiroideas (fig. 6 y 7) (Magner, 1990).

Una de las características de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias, es su alto contenido de carbohidratos; en las subunidades alfa y beta de la TSH constituyen el 21% y 12% de su peso respectivamente. Estudios de biosíntesis de TSH en células intactas han demostrado que hay un procesamiento postraducciona que incluye glicosilación y luego combinación de las subunidades libres alfa y beta para formar el dímero de TSH. En cultivos de células de pituitaria se ha observado la existencia de subunidades alfa y beta con diferente peso molecular, luego de hacer la disociación del dímero de TSH; con ayuda de glicosilasas se demostró que las subunidades alfa de diferente tamaño quedan reducidas por la acción de estas enzimas a 11000 daltons, la subunidad beta de TSH en presencia de glicosilasas también presentó el mismo fenómeno: su peso quedó reducido aproximadamente a 13000 daltons. Los diferentes pesos moleculares encontrados en ambas subunidades representan diferentes estados de glicosilación postraducciona y de maduración. A estos diferentes estados de glicosilación se les responsabiliza de la heterogeneidad en la carga de TSH; por técnicas de isoelectroenfoque se ha observado que la molécula de TSH humana presenta varias isoformas dentro de un amplio espectro, que

van desde formas acídicas hasta neutras y alcalinas. Se ha observado que las isoformas de TSH alcalinas y neutras son más inmunogénicas que las acídicas, por lo que son reconocidas tanto por anticuerpos policlonales anti-TSH y anti-subunidad β como por anticuerpos monoclonales anti-TSH y anti-subunidad β (Miyai et al., 1969; Magner, 1990 y Sergi et al., 1990).

Por otro lado, existen también evidencias que las formas alcalinas y neutras son más bioactivas que las formas acídicas en la producción de AMPc y en la estimulación del crecimiento celular en células de tiroides.

Estas evidencias sugieren que los carbohidratos presentes en las hormonas glicoproteicas modulan su actividad biológica, por lo que juegan también un papel importante (Miyai, et al., 1969; Magner, 1990 y Sergi et al., 1990).

5) Bioensayos y Radioinmunoensayos:

Antes de la disponibilidad de las hormonas puras y de la introducción de los radioinmunoensayos, los bioensayos eran ampliamente usados para la estimación de la concentración de una hormona en la sangre; sin embargo, estos eran laboriosos y poco sensibles.

Algunos bioensayos para TSH se basaron en el efecto de ésta hormona sobre la actividad de la glándula tiroides; el bioensayo más simple era la medición del peso de la glándula tiroides, pues se consideraba que una hiper o hipotrofia de la glándula indicaba una hiper o hiposecreción de la hormona relevante; pero posteriormente otro tipo de respuestas fisiológicas fueron consideradas, por ejemplo: 1) la medición de la concentración de TSH y de las hormonas T3 y T4; 2) por medición de la retención o liberación de yodo radioactivo por la glándula tiroides; 3) por un examen histológico de tejido tiroideo; y 4) la producción de AMP cíclico en líneas celulares específicas (Bennett and Whitehead, 1983; Leedman et al., 1992; Mckenzie, 1958a; Mckenzie, 1960b).

Con el desarrollo de los diversos bioensayos para TSH, se hizo necesario establecer un Estándar Internacional para Tirotropina (TSH), y en 1953, con la participación de varios laboratorios en 8 diferentes países, organizados por el Comité de Estandarización Biológica de la Organización

Mundial de la Salud, se estableció la definición de una Unidad Internacional de Actividad como la actividad biológica de 13.5 mg del Estándar Internacional de Tirotropina (Musset and Perry, 1955).

Posteriormente, con el desarrollo de los radioinmunoensayos en los últimos 20 años, se ha ampliado nuestro conocimiento acerca de la fisiología de la tiroides y nos ha permitido hacer un mejor manejo de las enfermedades tiroideas. Los programas de tamizado neonatal para la detección de hipotiroidismo congénito han reducido la incidencia del retraso mental en los países industrializados. Dentro de las pruebas diagnósticas usadas se encuentran principalmente los inmunoensayos para tirotropina (TSH), tiroxina (T_4), triyotironina (T_3), aparte de los exámenes físicos. Otras de las pruebas adicionales son ensayos de tiroglobulina, o hacer un scan tiroideo junto con una fina biopsia. El desarrollo de un ensayo ultrasensible de tirotropina puede llegar a ser la prueba ideal dentro del diagnóstico de enfermedades de la tiroides (Bethune, 1989).

La experiencia clínica ha validado al inmunoensayo de TSH como una prueba fundamental para el diagnóstico de enfermedades de la tiroides, ya que tiene las siguientes ventajas:

1).- La síntesis y secreción de TSH hecha por la parte anterior de la pituitaria está bajo control positivo por la hormona hipotalámica TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina) y bajo control negativo por acción de las hormonas tiroideas. Así, cuando el eje hipotálamo-hipófisis está intacto, el TSH presente en el suero refleja directamente la acción de las hormonas tiroideas sobre las células de la pituitaria. Si asumimos la necesidad de saber la acción de las hormonas tiroideas sobre sus tejidos blancos, TSH refleja razonablemente el estado de la tiroides (Bayer, 1991).

2).- El control negativo que ejercen las hormonas tiroideas sobre la TSH contrarresta las fluctuaciones de estas mismas, mantiene el eutiroidismo y amplifica la respuesta de TSH. Una caída o una alta producción de hormonas tiroideas particularmente tiroxina libre (T_4 libre) se refleja 10 veces más en cambios inversos de la liberación de TSH por la pituitaria (Bayer, 1991).

Por otro lado, la TSH del suero no siempre refleja el estado tiroideo del paciente, principalmente cuando se ha iniciado un tratamiento: el reestablecimiento de la secreción de TSH puede tomar días o semanas para alcanzar el nuevo equilibrio. Por lo que una segunda prueba es la medición

de T_4 libre en suero. La tiroxina juega un papel importante en el control negativo que ejercen las hormonas tiroideas sobre la pituitaria y se correlaciona comparativamente bien con los niveles de TSH periféricos (Bayer, 1991).

En un intento por aminorar los efectos producidos por una deficiente producción de hormonas tiroideas, la aplicación de pruebas diagnósticas para la detección de hipotiroidismo congénito puede hacerse a partir del segundo trimestre de gestación, pero no antes de las 16 semanas porque el volumen de líquido amniótico es todavía pequeño (D'Alton, 1994; Wilde, 1994), o bien, como lo establecen la mayoría de los programas neonatales para la detección de hipotiroidismo congénito, es hacer la toma de muestras de sangre dentro de las primeras horas después del nacimiento. Numerosas estrategias para la identificación de las enfermedades tiroideas han sido desarrolladas, lo que ha permitido en algunos casos el diseño de algoritmos (Bayer, 1991; Willi y Moshang, 1991; Wild, 1994).

ANTECEDENTES:

La glándula tiroides, junto con la hipófisis y el hipotálamo, forman el llamado eje hipotálamo-hipofisis-tiroideo, dentro del cual existe una constante interdependencia funcional de sus componentes, que se inicia desde el desarrollo embrionario y continúan hasta la vida adulta, por lo que las alteraciones funcionales que alguno de sus componentes pueda sufrir, afectan a todo el eje y son la causa de algunas enfermedades.

Por otro lado, luego de la publicación de Kohler y Milstein, en 1975, "Producción continua de anticuerpos de especificidad predefinida", surgieron varios grupos de investigadores interesados en la producción de anticuerpos monoclonales contra TSH y su uso potencial en diagnóstico. Los grupos de Soos y Ridgway están dentro de los primeros grupos que intentaron obtener anticuerpos monoclonales. Soos y Siddle (1982a), luego de 4 fusiones lograron producir y caracterizar 10 anticuerpos monoclonales de los cuales 5 fueron específicos para TSH; estos anticuerpos fueron propuestos para hacer radioinmunoensayos.

Por otro lado Ridgway y cols., también en 1982 lograron la obtención de un anticuerpo monoclonal anti-TSH con una constante de disociación de 4.04×10^{-9} M que fue mayor a la que se obtuvo con el antisero policlonal de ratón durante la inmunización 9.8×10^{-10} M. Esta baja afinidad del anticuerpo limitó su uso a la purificación de TSH y a su empleo en técnicas de inmunohistoquímica como sonda inmunofluorescente.

En un segundo intento Soos y cols. (1984b) obtuvieron 23 anticuerpos monoclonales específicos para TSH en 4 fusiones. El rango de afinidad encontrado fue de 10^{-9} M- 10^{-11} M y la mínima concentración de TSH probada y detectada fue 1 μ IU/ml.

Denyer y cols. (1985) lograron obtener 27 anticuerpos monoclonales a partir de 2 fusiones, de los cuales solamente se caracterizaron 6 anticuerpos y solo 3 de ellos resultaron ser específicos para TSH, con una constante de afinidad en el rango de $5.0 - 23 \times 10^{-10}$ M. Posteriormente consideraron que sus monoclonales podrían tener uso potencial en el diagnóstico clínico.

Benkirane y cols. (1987a), inicialmente produjeron 13 anticuerpos monoclonales de los cuales 4 fueron específicos para TSH, con rango de afinidad que varió de 10^{-9} M - 10^{-11} M; consideraron su uso para

radioinmunoensayos, con una sensibilidad de 0.1 μ IU de TSH/ml, y para inmunohistoquímica.

Más tarde en ese mismo año Benkirane y cols. (1987b), en un segundo intento produjeron 28 anticuerpos monoclonales luego de varias fusiones con un rango de afinidad de 10^{-9} M - 10^{-11} M. Estos anticuerpos fueron empleados para hacer correlaciones de estructura-función, mapeo antigénico de la superficie en la molécula de TSH y sus subunidades. Al mismo tiempo se planteó el uso de monoclonales como una alternativa para conocer la estructura tridimensional de TSH. Estos estudios han revelado la existencia de 12 epítopes distintos en TSH.

Una alternativa utilizada por Benkirane y cols. (1987c), fue la de producir anticuerpos monoclonales inmunizando con el complejo TSH-mAb 27 (uno de los monoclonales anti TSH producidos anteriormente) para bloquear uno de los sitios más inmunogénicos de la molécula de TSH y exponer las regiones débilmente antigénicas. En estas fusiones se obtuvieron anticuerpos monoclonales que reconocen sitios diferentes y complementan a los identificados anteriormente. Sin embargo, aunque se obtuvieron estos tipos de anticuerpos complementarios, únicamente se caracterizó al monoclonal 515 que reconoce al complejo TSH-mAb27 y tiene una afinidad de 8×10^{-9} M que es más alta que la presentada por el mAb27.

Dentro de los grupos japoneses que también han participado con sus aportaciones para el estudio de la TSH, está el grupo de Endo y cols. (1989), que hizo 21 fusiones para la obtención de 33 anticuerpos monoclonales de los cuales 19 fueron específicos para TSH y su constante de afinidad varió de 9.6×10^{-7} M - 5.7×10^{-9} M. Estos anticuerpos fueron utilizados para la elaboración de un mapa antigénico de TSH, para conocer los cambios que sufre al unirse con su receptor, y para conocer los cambios que sufre la concentración de esta hormona durante los diferentes estados fisiológicos y/o patológicos por medio de inmunoensayos.

En 1990, Braun y Charreire produjeron 11 anticuerpos monoclonales de los cuales 5 fueron específicos para TSH su rango de afinidad varió desde 5.3×10^{-8} M - 1.9×10^{-10} M. Los anticuerpos producidos fueron usados como inmunógenos para producir anticuerpos anti-idiotipo y hacer estudios de unión a receptor, y se consideró que podrían tener un uso potencial en diagnóstico clínico.

Existen otros grupos japoneses cuyas investigaciones con monoclonales se han enfocado más al estudio de los receptores de TSH y a

la generación de señales de transducción (Kawakami et al., 1993); otros a estudios de los mecanismos de regulación de la biosíntesis de TSH y secreción (Nakamura et al., 1993); o de la estructura y regulación del gen de TSH (Miyoshi, 1994; Miyai, 1994).

En general, la producción de anticuerpos monoclonales por todos los grupos antes citados se ha dirigido hacia 3 objetivos principalmente:

1) Hacer estudios básicos de regulación, estructura y biosíntesis de TSH, estudios de unión a receptores y generación de señales de transducción; algunos de los anticuerpos obtenidos se han empleado en ensayos diagnósticos o como sondas en inmunohistoquímica.

2) Construir un mapa antigénico de la TSH.

3) Construir un mapa de estructura tridimensional de la TSH.

Los estudios hechos por Soos, Benkirane y el grupo japonés de Endo Yuichi son los únicos que lograron identificar varios epítopes reconocidos por sus respectivos anticuerpos monoclonales.

Dentro de las alternativas para lograr obtener nuevos anticuerpos monoclonales contra ésta u otras proteínas, y que a la vez permitan establecer si los sitios de reconocimiento por estos anticuerpos (1) se encuentran en la superficie de la molécula o en su interior, (2) si reconocen una secuencia primaria o una estructura conformacional y (3) si este sitio de reconocimiento se encuentra en una subunidad o se forma por interacción de más de una subunidad, está el empleo de pequeñas secuencias peptídicas específicas de la proteína de interés. La producción de anticuerpos monoclonales por esta vía ha permitido la obtención de anticuerpos más específicos, lo que permite la identificación de una proteína en particular con respecto a aquéllas con las que puede tener una alta homología. Esta alternativa fue considerada y hecha por Bidar y cols. (1991) con gran éxito, ya que lograron la obtención de 51 monoclonales anti-subunidad β de TSH, luego de emplear pequeñas secuencias pépticas de esta subunidad como antígenos para inducir una respuesta.

Sin embargo, debemos tener en cuenta que los anticuerpos específicos que reconocen sitios en el interior de la proteína no pueden ser utilizados para su aplicación en inmunoensayos de diagnóstico pero sí para lograr información acerca de la topología de la molécula de interés.

Finalmente, debemos recordar que la respuesta humoral depende de ciertos factores entre los que se encuentran los siguientes:

- 1) Proceso de inmunización.
- 2) Dosis del antígeno.
- 3) Inmunogenicidad del antígeno.
- 4) Capacidad de la respuesta humoral del animal.

En el caso de anticuerpos monoclonales, otro factor determinante es la estabilidad de los hibridomas que los producen.

DESARROLLO DE UNA PRUEBA DIAGNOSTICA PARA LA DETECCION DE HIPOTIROIDISMO CONGENITO EMPLEANDO ANTICUERPOS MONOCLONALES

OBJETIVO GENERAL

Montar un inmunoensayo para la detección de Hipotiroidismo Congénito

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) humana.
- 2) Seleccionar, clonar y expandir los hibridomas de interés.
- 3) Purificar y caracterizar los anticuerpos monoclonales.
- 4) Producir anticuerpos policlonales de conejo anti hCG (Gonadotropina Coriónica humana) y anti TSH (Hormona Estimulante de la Tiroides humana).
- 5) Montar el ensayo de detección de hTSH utilizando estándares.
- 6) Montar ensayos de detección de hTSH con muestras reales.
- 7) Validar el ensayo diagnóstico.

MATERIAL Y METODOS

I.- Protocolo de inmunización de ratones donadores para la producción de hibridomas

1.- Se reconstituyó cada frasco de TSH (113 μg)[Lab. Porton] en 550 μl de 0.9% de NaCl estéril y se hicieron alícuotas de 100 μl , de esta manera se tuvo una concentración de hormona de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los frascos con las hormonas reconstituídas y separados en alícuotas, al igual que las hormonas liofilizadas se guardaron a -20°C .

2.- Se utilizaron ratones Balb/C de 9 semanas de nacidos. En promedio el período de inmunización duró de 5-6 meses.

3.- Una de estas alícuotas de TSH, se mezcló con Adyuvante Completo de Freund (ACF), en una proporción de volumen de 1:1 se agitaron vigorosamente el hasta formar una suspensión homogénea. Los 200 μl resultantes se inyectaron por vía intraperitoneal. El ACF se utilizó únicamente en la primera inmunización, las inmunizaciones posteriores se hicieron de la misma manera pero con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF).

4.- Las inyecciones se repitieron a las 2, 6 y 10 semanas después de hacer la primera inmunización (semana cero "0").

5.- La determinación del título de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados se hizo a las 7 semanas después de hacer la primera inmunización. Los sueros fueron obtenidos por sangrados de pequeños cortes que se hicieron en la cola.

6.- Si el título de los anticuerpos era bajo (< 25000); se volvieron a repetir las inmunizaciones por espacio de otras 3-4 semanas. En este caso la determinación del título de anticuerpos se hizo a los 5-7 días después de haber hecho cada inmunización adicional.

7.- Tres o cuatro días antes de la fusión, se hizo una última inmunización con 20 μg de TSH/100 μl en 0.9% de NaCl por vía intravenosa.

II.- Protocolo para la determinación del título de anticuerpos (ELISA)

1.- Adsorción del antígeno al soporte. Como soporte se utilizaron placas de 96 pozos. Se preparó una solución de TSH (4 µg/ml) en 0.05-0.1 M de amortiguador carbonato/bicarbonato pH 9.6 a 4°C. Se colocaron 50 µl de esta solución en cada pozo (200 ng de hormona/pozo), y se dejó incubando toda la noche a 4°C.

2.- Se lavaron los pozos 3 veces, 5 min c/u, con una solución de PBS conteniendo 0.05% de Tween 20 en agitación constante. Cada lavado se hizo con 350 µl por pozo de esta solución.

3.- Se bloquearon los pozos con una solución de 0.5% de gelatina/0.2% de Tween 20 disueltos en PBS. Se colocaron 350 µl/pozo y se dejaron incubar 2 h a 37°C.

4.- Se lavaron los pozos como en el paso 2.

5.- Se hicieron diluciones seriadas 1:2 de los sueros con PBS (las diluciones se hicieron partiendo de 1:1000 hasta 1:64000). Se colocaron 100 µl de cada dilución/pozo y se dejaron incubar 1 h a 37°C.

6.- Se lavaron los pozos como en el paso 2.

7.- Se incubaron los pozos con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados a peroxidasa. Se adicionaron 100µl/pozo y se incubaron 1 h a 37°C. (Nota: Este segundo anticuerpo se usó a una dilución de 1:7000).

8.- Se lavaron los pozos como en el paso 2.

9.- Se reveló la reacción adicionando el sustrato ABTS.

Preparación de solución reveladora con ABTS para ELISA

1.- Se preparó un amortiguador de ácido cítrico 50 mM y se ajustó el pH a 4.0 con 10 N de NaOH. Esta solución es estable por 1 mes a 4°C.

2.- Se prepararon las siguientes soluciones concentradas:

a) 40 mM de ABTS (se disolvió el ABTS en agua y se protegió de la luz). Esta solución es estable por 6 meses a 4°C.

b) 500 mM de H₂O₂ (50 µl de una solución comercial de H₂O₂ al 30% se adicionaron a 750 µl de agua desionizada). Esta solución es estable por 1 mes a 4°C.

c) 10% SDS (para parar la reacción).

3.- Preparación de la solución de revelado:

Por cada 5 ml de amortiguador de ácido cítrico se adicionaron 25 µl de la solución concentrada de ABTS y 20 µl de la solución concentrada de H₂O₂.

Se colocaron 100 µl/pozo y se dejó reaccionar 30 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción se adicionó un volumen igual de 5% SDS, se dejó incubar de 3 a 5 min y luego se leyó la absorbancia de 410 a 415 nm.

III.- Protocolo de Fusión

a).- Obtención de células de bazo de ratones inmunizados

1.- Se extrajo el bazo de ratones inmunizados en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar empleando material de cirugía estéril.

2.- Se colocó el bazo con ayuda de unas pinzas en una caja Petri estéril y se lavó rápidamente con Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) frío.

3.- Se rompió el bazo y se disgregó el tejido celular. Se resuspendió el tejido celular del bazo en un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de medio DMEM frío.

4.- Se dejó sedimentar los grumos a 4°C por 5 minutos.

5.- Luego se pasó el sobrenadante a un tubo cónico de 50 ml.

6.- Se centrifugó a 2000 RPM/5 min y se descartó el sobrenadante.

7.- Se agregó el amortiguador de lisis a la pastilla celular, para eliminar eritrocitos.

8.- Se mezcló suavemente por 1 minuto.

9.- Se diluyó con 25 ml de medio DMEM frío.

10.- Se centrifugó a 2000 RPM/5 min y se descartó el sobrenadante.

11.- Se resuspendió en 10 ml de medio DMEM frío.

12.- Se contaron las células (10^8 células/bazo aproximadamente).

13.- Se conservaron las células del bazo en frío y luego se transferieron al tubo con células de mieloma (como se menciona en el siguiente inciso), una vez que habían sido contadas para la fusión.

b) Obtención de las células de mieloma

1.- Se cultivaron células de mieloma cepa P3-X63-Ag8.653 en medio DMEM conteniendo 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). Las células de mieloma se colectaron por centrifugación 10 minutos a 500 rpm y luego se lavaron con medio DMEM (temperatura ambiente).

2.- Se colectaron 25×10^5 células en 10 ml y se mezclaron con las células de bazo previamente obtenidas. La proporción de células de bazo por células de mieloma es de 4:1.

3.- Se centrifugaron 5 min a 1000 RPM/min. Se aspiró el sobrenadante y se colocaron 300 μ l de medio DMEM fresco.

c) Fusión

1.- Se adicionaron 1.5 ml de Polietilenglicol (PEG) 4000 al 50%, en un lapso de 30 segundos a 37°C y se agitaron suavemente con la punta de la pipeta.

2.- Se dejaron en reposo 90 segundos a 37°C (y en la segunda fusión a temperatura ambiente), y se agitaron suavemente con la punta ocasionalmente.

3.- Se diluyeron con 7.5 ml de DMEM a 37°C lentamente, en un lapso de 3 minutos.

4.- Se adicionaron 20 ml de medio DMEM (37°C) en un lapso de 60 segundos y se dejó reposar de 5 a 10 minutos.

5.- Se agregaron 30 ml de medio preparado con DMEM y 20% de Suero Fetal Bovino (SFB).

6.- Se centrifugaron a 1000 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se descartó el sobrenadante.

7.- Las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM complementado con 20% SFB, Oxalacetato-Piruvato-Insulina (OPI), Glutamina (L-glu).

8.- Se prepararon 50 ml con 10×10^6 linfocitos (para 5 placas, 10 ml/placa). Se colocaron 200 μ l/pozo (2×10^6 células/placa, 20000 células/pozo).

9.- El resto de células producto de la fusión se aforó a 20 ml con el mismo medio antes descrito (para 2 placas). Se colocaron 200 μ l/pozo.

10.- 24 h después de incubar las células, se agregaron 100 μ l/pozo de medio DMEM, 20% SFB, OPI, L-glu y HA₂T (Histidina-Aminopterina-Timidina). La concentración de aminopterina es 2X debido al volumen inicial puesto en cada pozo.

Este protocolo fue también empleado para la segunda fusión excepto que el producto de fusión se repartió en 3 placas.

IV.- Protocolo de "slot blot"

1.- Se preparó cada una de las hormonas (TSH, LH, FSH, CG) y AS a una concentración de 50 ng/ μ l (aproximadamente 15 ng/slot) en PBS y se adicionaron 40 μ g/ml de azul de bromofenol. Recordemos, que las hormonas liofilizadas se reconstituyeron en 0.9% de NaCl estéril y las diluciones se hicieron con PBS.

2.- Con ayuda de un "Phastgel sample" del PhastSystem (Pharmacia), se marcaron en relieve los pozos sobre Parafilm presionando con una goma. Los pozos en relieve sirvieron para poner y tomar las muestras; para evitar contaminación se hicieron pozos nuevos para cada tipo de hormona.

3.- Por otro lado, se colocó un filtro de nitrocelulosa sobre un filtro de papel Whatman que estaba sobre capas de papel absorbente.

4.- Las muestras se colocaron de una manera uniforme en los pozos de papel parafilm. La aplicación de las muestras sobre la nitrocelulosa se hizo con un aplicador del PhastSystem que es un peine con 12 dientes, lo que permitió la aplicación simultánea de varias muestras (cada diente tiene una capacidad de 0.3 μ l).

Forma de aplicación: 1) Se introdujeron los dientes del peine en los pozos para tomar las muestras. 2) La aplicación de las muestras sobre la nitrocelulosa se hizo con una ligera presión. 3) Se hizo una aplicación de una hormona diferente cada vez, colocando una debajo de la otra y procurando formar 12 hileras con diferentes hormonas, la presencia del azul de bromofenol ayudó a ubicar la posición de las muestras y a un mejor alineamiento de las mismas. 4) Se utilizó un aplicador diferente para cada hormona (Fig. 1).

5.- Una vez colocadas las muestras se dejó que la nitrocelulosa se secase a temperatura ambiente. Con lápiz se marcó la orientación de las muestras. Se dejaron equilibrar las tiras en una solución amortiguadora de PBS y 0.05% de Tween 20 por 10 min en agitación constante y temperatura ambiente.

Fabricación de tiras: La formación de hileras con diferentes hormonas permitió hacer cortes entre ellas y formar pequeñas tiras que llevaban los 4 tipos diferentes de hormonas necesarias para seleccionar los anticuerpos específicos contra TSH de aquellos que daban reacción cruzada con alguna

otra de las glicoproteínas que se emplearon.

6.- Para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó la solución de Blotto/Tween compuesta por 5% de leche en polvo descremada, 0.2% de Tween 20 y 0.02% de azida de sodio disueltos en PBS. Se incubaron 2 h a temperatura ambiente y agitación constante.

7.- Se lavaron las tiras 3 veces 5 min cada vez con amortiguador PBS y 0.05% Tween 20, a temperatura ambiente y agitación constante.

8.- Las tiras se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 min, y se colocaron entre 2 filtros de papel Whatman y se guardaron dentro de una caja de Petri sellada con parafilm y cubierta con papel aluminio a -20°C .

9.- Antes de utilizar las tiras se dejaron a temperatura ambiente en la caja por 20 minutos, luego se equilibraron por 10 minutos en una solución amortiguadora de PBS y 0.05% de Tween 20 en agitación constante.

10.- Para hacer el tamizado se tomaron 100 μl de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas y se colocaron en pozos de placas de ELISA, se les adicionaron 100 μl de PBS y, luego, se introdujeron las tiras, procurando que el lado de la nitrocelulosa donde se aplicaron las muestras no quedara orientado hacia las paredes del pozo. Se tapó la placa y se dejó incubando 1 h a temperatura ambiente, en agitación constante.

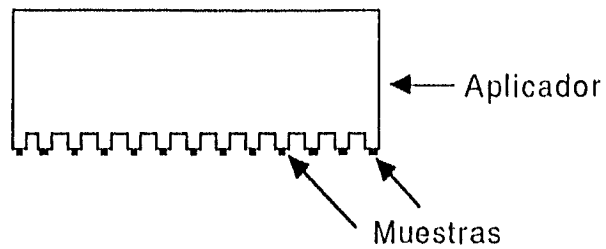
11.- Con vacío, se absorbieron todos los sobrenadantes y se lavaron las tiras con una solución amortiguadora PBS y 0.05% Tween 20. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos c/u a temperatura ambiente y agitación constante.

12.- Ahí mismo se hizo la incubación con el segundo anticuerpo (conjugado de peroxidasa anti ratón). Se colocaron 200 μl /pozo, se tapó la placa y se dejó incubando 1 h a temperatura ambiente y agitación constante.

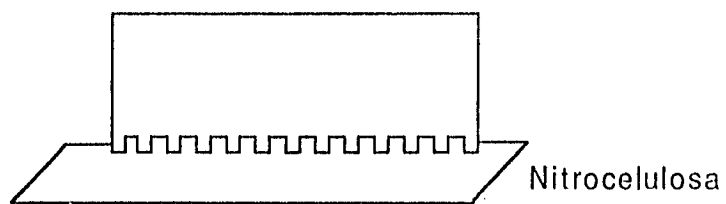
13.- Se lavaron las tiras como en el paso 11.

14.- Se cambiaron las tiras a los pozos de otra placa destinada únicamente para el revelado con 3'3-Diaminobenzidina (DAB), sin alterar el orden de las tiras y por lo tanto de los sobrenadantes que se probaron. La manipulación de las tiras se hizo con ayuda de unas pinzas.

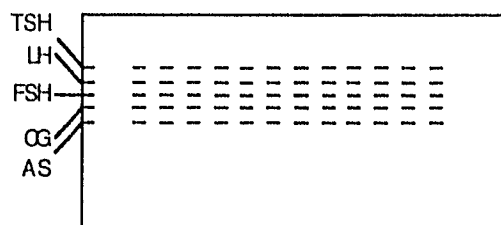
1) Cargado de las muestras en el aplicador



2) Colocación de las muestras sobre filtros de nitrocelulosa



3) Alineamiento de las diferentes hormonas



4) Corte de las tiras

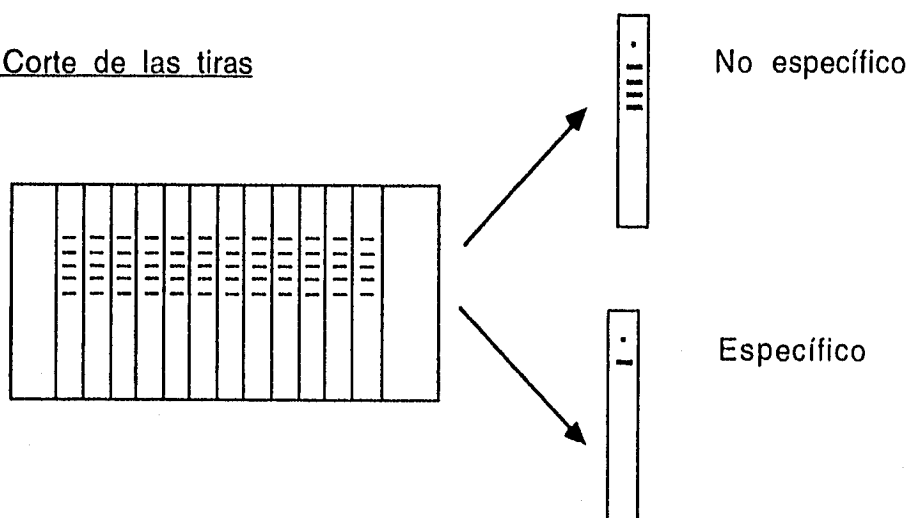


Fig. 1.- Formación de tiras para "Slot blot"

V.- Protocolo de revelado con 3'3-Diaminobenzidina (DAB)

1.- Se preparó un amortiguador de 50 mM de Tris/HCl pH 7.5.

2.- Se hizo una solución de Co-Ni al 1% (Se pesaron 0.25 g de CoCl_2 y 0.25 g de NiCl_2 , se disolvieron por separado cada uno en 5 ml de agua desionizada. Ya disueltos se mezclaron ambas sales y se aforaron a 25 ml, esta solución es estable por un año a 4°C en un frasco ambar).

3.- Se preparó una solución de H_2O_2 al 1%. (Se mezclaron 970 μl de agua desionizada y 33 μl de la solución comercial de H_2O_2).

4.- El orden de adición de los reactivos fue de la siguiente manera:

Por cada 5 ml de amortiguador 50 mM Tris/HCl pH 7.5.

a) Se adicionaron 3 mg de 3'3-Diaminobenzidina. (Se usaron guantes para su manejo).

b) Se agregaron 150 μl de la solución de Co-Ni 1%.

c) Se agitó invirtiendo constantemente el tubo hasta disolverlo completamente.

d) Se adicionaron 25 μl de la solución de H_2O_2 1%.

5.- El tiempo de revelado estuvo en función de la intensidad de la señal que uno deseara; normalmente entre 5-20 min.

6.- Se lavaron las membranas 3 veces, 5 minutos cada vez con 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 y luego una vez con agua desionizada.

7.- Se dejaron secar las membranas sobre un filtro a temperatura ambiente.

VI.- Protocolo de clonación por dilución limitada

1.- Se tomaron de cada pozo que resultó positivo, células en crecimiento y se hizo una dilución para obtener una densidad de 2000 células/ml.

2.- Luego se hizo una dilución de la muestra para obtener una densidad de 336 células en un volumen de 4 ml.

3.- Se tomaron 2 ml de la dilución anterior y se adicionaron 500 μ l de medio de cultivo para dar un volumen final de 2.5 ml y se repartieron en 24 pozos; la densidad por pozo fue de 7 células/pozo.

4.- Se tomaron 1.71 ml de la dilución del punto 2, se adicionaron 3.3 ml de medio de cultivo y se repartieron en 48 pozos; la densidad fue de 3 células/pozo.

5.- A los 285 μ l restantes de la dilución del punto 2 se le adicionaron 2.2 ml de medio de cultivo y se repartieron en 24 pozos; la densidad fue de 1 célula/pozo.

VII.- Protocolo de inmunodifusión

1.- Se preparó un gel de 1% de agarosa en Tris/HCl pH 7.2 de 2-3 mm de grosor sobre un acetato o caja de Petri desechable.

2.- Con ayuda de un horador se hizo un pozo central y luego se hicieron de 3-4 pozos alrededor de éste; en el pozo central se colocó la muestra y en los pozos de la periferia los antisueros anti-inmunoglobulinas de ratón. La distancia del centro del pozo de la muestra al centro de cada pozo de antisuero fue de 7.5 mm.

3.- Se hicieron las diluciones correspondientes de los antisueros siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

4.- Se hicieron de 3 aplicaciones de 10 μ l de la muestra y 5 aplicaciones de 5 μ l de antisueros.

5.- Se dejaron incubando a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante toda la noche.

6.- A las 24 h siguientes se observó la formación del precipitado.

VIII.- Protocolo para la producción de líquido de ascitis

1.- Se inyectaron en ratones, por vía intraperitoneal, 200-500 μ l de Pristano y se dejaron transcurrir 10-15 días antes del siguiente paso.

2.- Se inyectaron, intraperitonealmente, a los ratones tratados con pristano, $1-5 \times 10^6$ células de hibridomas viables contenidos en un volumen de 500 μ l de medio de cultivo.

3.- Se dejaron transcurrir nuevamente 10-15 días hasta que fue visible un aumento de volumen peritoneal en los ratones.

4.- Se limpió la parte ventral del ratón con etanol 70% y dentro de una campana de flujo laminar se hizo la extracción del líquido ascítico. La obtención del líquido ascítico se hizo por punción de la cavidad intraperitoneal con agujas G18X1 $\frac{1}{2}$ mm, se dejó drenar por sí solo el líquido ascítico y se colectó en tubos estériles de 15 ml. Normalmente, en el líquido ascítico hay células de hibridoma, por lo que, luego de terminar la colecta se centrifugó 5 minutos a 500 RPM.

5.- Se extrajeron los sobrenadantes que contenían los anticuerpos y se colocaron en tubos que luego se guardaron a -70°C . La pastilla de células obtenida algunas veces se utilizó para cultivar "in vitro" o se desechó.

6.- Si la pastilla de células obtenida viene acompañada de algunos eritrocitos, estos pueden ser lisados por un tratamiento con amortiguador de lisis (0.83% de cloruro de amonio en 10 mM Tris/HCl).

IX.- Protocolo de congelación y descongelación de células

1.- El medio de congelación se preparó de la siguiente manera: 40% Suero Fetal Bovino (SFB); 10% DMSO en medio DMEM (se disolvió primero el DMSO en el medio DMEM y se esterilizó por filtración, luego se adicionó al filtrado el SFB). Este medio fue alicuoteado y guardado a -20°C .

2.- Se colectaron en tubos estériles de 15 o 50 ml los sobrenadantes y células de las cajas de cultivo. Se determinó la densidad celular y se centrifugó a 500 RPM durante 5 minutos.

3.- Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos estériles y guardados a -20°C . Las pastillas de células obtenidas fueron resuspendidas con medio de congelación; el volumen necesario estuvo dado en base a la densidad celular previamente determinada; la densidad de células para congelar fue de 9×10^6 células/ml/vial.

4.- Los frascos de células para congelar se envolvieron en una(s) toalla(s) de algodón para formar una cubierta de aproximadamente 1 cm de espesor y se guardaron temporalmente a -70°C durante 24 hs, luego de las cuales se transfirieron a los contenedores de nitrógeno líquido.

NOTA: El tiempo entre la resuspensión de células en el medio de congelación y la colocación de los frascos a -70°C debe ser lo más corto posible.

5.- Para descongelar el frasco con células congeladas, se limpió con etanol 70% y se colocó dentro de un baño a 56°C durante un tiempo no mayor de 1 minuto; se sumergió únicamente la parte del tubo que contiene el medio de congelación y luego se limpió con etanol 70%.

6.- Dentro de una campana de flujo laminar se abrió el frasco y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 50 ml, se adicionó medio DMEM a temperatura ambiente para lavar las células y diluir el DMSO, por centrifugación por 5 minutos a 500 RPM.

7.- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en medio de cultivo DMEM conteniendo 15% SFB, OPI y L-Glu a temperatura ambiente, se sembraron en cajas y se dejaron incubando a 37°C .

X.- Protocolo de purificación de los anticuerpos IgG1 usando proteína A y amortiguadores de alta fuerza iónica.

1.- Se ajustó la concentración de NaCl en la preparación cruda de los anticuerpos (suero, sobrenadante de cultivo o ascitis) a 3.3 M. Se adicionó 1/10 de volumen de 1M de Tris/HCl pH 8.9. Se checó el pH.

2.- Se pasó la solución de anticuerpos a través de la columna de proteína A previamente equilibrada con el amortiguador anterior. La proteína A acoplada a Sefarosa tiene capacidad de 5 mg de IgG1/ml de resina. La velocidad de flujo para el cargado fue de 10-15 ml/h, el tamaño de las fracciones colectadas durante el cargado fue de 50 gotas/tubo.

Nota: Los sobrenadantes de cultivo tienen de 20-50 μ g/ml de anticuerpo monoclonal, y los ascitis entre 1 y 10 mg/ml.

3.- Se lavó la columna con 10 volúmenes de 3M NaCl y 50 mM de Tris/HCl pH 8.9 a una velocidad de flujo de 50-60 ml/h; el tamaño de las fracciones que se colectaron fue de 40 gotas/tubo.

4.- Se lavó la columna con 10 volúmenes de 3M NaCl y 10 mM de Tris/HCl pH 8.9 a una velocidad de flujo de 50-60 ml/h, el tamaño de las fracciones colectadas fue de 40 gotas/tubo.

5.- La elución de la columna se hizo con 10 volúmenes de amortiguador de citratos 100 mM pH 6.0 a una velocidad de flujo de 50-60 ml/h. Se colectaron fracciones de 20 gotas/tubo (aproximadamente 1 ml/tubo); cada tubo de colección contenía 200 μ l de 1M Tris/HCl pH 8.0. Se agitó suavemente cada uno de los tubos para que las fracciones colectadas tuvieran pH de 7.

6.- La absorbancia se leyó a 280 nm. (La determinación de la concentración de anticuerpo purificado se hizo considerando que 1 DO= 0.714 mg/ml).

7.- La columna se equilibró con 100 mM Tris/HCl pH 8.9, conteniendo 0.02% de azida de sodio, y se guardó en refrigeración.

8.- Los anticuerpos purificados fueron concentrados por medio de un sistema de ultrafiltración de Amicon y luego dializados contra PBS, conteniendo 0,02% de azida de sodio, toda la noche a 4°C.

9.- Los anticuerpos concentrados y dializados fueron guardados en refrigeración hasta su uso posterior.

XI.- Adsorción de anticuerpos policlonales por cromatografía de afinidad

1.- Se hidrataron 1.5 g de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) con 1 mM de HCl.

2.- La resina se dividió en 2 partes equitativas para hacer 2 columnas, a una de las cuales se le pegó suero humano y a la otra gonadotropina coriónica humana (CGh).

3.- Al término del acoplamiento, se empacaron 2 columnas pequeñas de 2 ml c/u.

4.- El suero de conejo obtenido se pasó a través de ambas columnas, primero por la columna con suero humano y luego por la columna con CGh. (Este paso puede desarrollarse conectando ambas columnas entre sí).

5.- La muestra de suero (3 ml) se diluyó con un volumen de 100 mM de Tris/HCl pH 7.5. La velocidad de flujo que se utilizó durante el cargado fue de 15 ml/h. El tamaño de las fracciones colectadas durante el cargado fue de 100 gotas/tubo.

6.- El lavado de la columna se hizo con 100 mM de Tris/HCl pH 7.5, conteniendo 300 mM de NaCl, a una velocidad de flujo de 60 a 100 ml/h. El tamaño de las fracciones colectadas en este paso fue de 100 gotas/tubo. (El volumen de la solución de lavado fue de 75-100 ml).

7.- La elución se hizo con 100 mM de ácido acético a una velocidad de flujo de 100 ml/h y el tamaño de las fracciones colectadas fue de 20 gotas/tubo. Cada tubo contenía 500 μ l de 1 M Tris/HCl pH 8.0 para neutralizar el pH de las fracciones. (El volumen de la solución de elución fue de 25-30 ml).

8.- Se leyó absorbancia a 280 nm.

9.- Se dializaron los anticuerpos adsorvidos contra un amortiguador 100 mM fosfatos pH 8.0 conteniendo 1 mM de EDTA (este paso se hizo para tener a los anticuerpos en medio libre de grupos amino para poder hacer la reacción de conjugado por medio del 2-iminotiolano) y luego se concentraron. La determinación de la concentración de los anticuerpos purificados se obtuvo considerando que 1 DO= 0.714 mg/ml.

XII.- Protocolo básico de conjugación de peroxidasa a anticuerpos

1).- El anticuerpo a conjugar debe estar mínimo a una concentración de 1mg/ml en amortiguador 100 mM fosfatos pH 6.8. En caso de no ser así se deberá concentrar y dializar en el amortiguador antes mencionado.

2).- Se disolvieron 10 mg de peroxidasa en 1 ml de amortiguador 100 mM carbonatos pH 9.2.

3).- Se disolvieron 2-4 mg de periodato de sodio en 1 ml de agua (esta solución tiene una concentración de 16-18 mM de periodato de sodio). Esta solución se usó inmediatamente luego de su preparación (*esta solución es sensible a la luz*).

4).- En un tubo con tapa se mezcló 250 μ l de la solución de periodato de sodio con 250 μ l de la solución de peroxidasa, se incubó 2 hr a temperatura ambiente en la oscuridad y se dejó agitando sobre un oscilador.

NOTA: Hubo un cambio físico de coloración en la reacción. La solución de peroxidasa es café o ambar y cuando se puso a reaccionar con el periodato se tornó color verde (*oxidación reversible del grupo hemo de la peroxidasa*).

5).- Se recortó la punta de una pipeta pasteur para hacer una minicolumna, se tapó la punta con un parafilm y se colocó un poco de fibra de vidrio siliconizada, se colocó dentro de la minicolumna 1 mg/ml de anticuerpo del paso 1 y 500 μ l de la solución de peroxidasa oxidada con periodato de sodio del paso 4. Se adicionaron 250-300 mg de Sephadex G-25 a la mezcla de anticuerpo-peroxidasa. Se incubaron 3 hr a temperatura ambiente en oscuridad. (*La presencia del Sephadex en la mezcla de reacción disminuyó el volumen de agua e incrementó la concentración del anticuerpo y la peroxidasa. Esto mejora el proceso de conjugación*). Existe en este paso otro cambio de coloración la reacción vira de verde a café o ambar nuevamente.

6).-Se lavó la columna con 750 μ l amortiguador carbonatos pH 9.2 para eluir el conjugado.

7).- Se preparó una solución fresca de 5 mg/ml de borohidruro de sodio en 0.1 N de NaOH y se adicionó inmediatamente 38 μ l de esta solución a la mezcla de anticuerpo-peroxidasa colectada en el paso anterior, se

dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

8).-Se preparó nuevamente otra solución de borohidruro de sodio a la misma concentración y se adicionaron 112 μ l de esta mezcla a la reacción anticuerpo-peroxidasa, se incubaron 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El borohidruro de sodio estabiliza las bases de Schiff entre la enzima y los anticuerpos.

9).- El conjugado se dializó contra un amortiguador de 50 mM Tris/HCl pH 7.2, 150 mM de NaCl y 1 mM de EDTA.

10).- Se checó la formación del conjugado en un gel, se determinó el título de actividad del conjugado y se midió actividad de peroxidasa.

a).- El título de actividad del anticuerpo se midió por ELISA y por "slot blot".

b).- Las unidades de actividad del conjugado, se determinaron por los deltas de absorbancia producidos por 1 μ l de conjugado en 1 ml de solución, la reacción se monitoreó durante los primeros 5 minutos a temperatura ambiente. Para hacer los cálculos correspondientes, se consideró que 1 unidad de actividad de peroxidasa produce 32.4 unidades de absorbancia a 415 nm.

XIII.- Protocolo para la identificación de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales

1) Se incubaron 50 μ l de TSH recombinante/pozo de una solución de TSHr 5 μ g/ml en 100 mM amortiguador carbonatos pH 9.6. El tiempo de incubación fué de toda la noche a 4° C.

2) Se lavaron los pozos 3 veces con 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 150 mM NaCl, 40 mM MgSO₄ y 0.05% Tween 20.

3) Se bloquearon los pozos con 300 μ l/pozo de 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 0.5% de gelatina y 0.2% Tween durante 2 h a 37° C.

4) Se lavaron los pozos igual que 2.

5) Se incubaron 50 μ l/pozo del monoclonal de interés a una concentración de 5 μ g/ml en 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 500 mM NaCl, 0.1 mg/ml de gelatina y 0.05% Tween 20. El tiempo de incubación fue de 1 h a 37° C.

6) Se lavaron los pozos igual que 2.

7) Se incubaron 50 μ l/pozo de anticuerpos policlonales de conejo anti-cadena lambda (λ) y kappa (κ) de ratón durante 1 h a 37° C. Estos anticuerpos son comerciales y se usaron como lo indica el fabricante.

8) Se lavaron los pozos igual que 2.

9) Se incubaron 50 μ l/pozo de HRP-anti-Igs de conejo durante 1 h a 37° C. El conjugado se usó a una dilución de 1:2000 en 50 mM de Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 500 mM NaCl, 0.1 mg de gelatina/ml y 0.05% Tween 20.

10) Se lavaron los pozos igual que 2.

11) Se reveló con ABTS 15 min (50 μ l/pozo) y luego se paró la reacción con 50 μ l/pozo de 5% SDS. Se leyó a 410 nm.

XIV.- Protocolo para la cuantificación de TSH en sangre de niños recién nacidos

I.- Adsorción del anticuerpo de captura a las placas (Maxisorp, Nunc).

1.- Se usaron placas de 96 pozos, a los cuales se les aplicaron 100 μ l /pozo de una solución de anticuerpos monoclonales C6 (5 μ g/ml) en 100 mM amortiguador carbonatos pH 9.6 a 4 °C, durante toda la noche.

II.- Bloqueo de las placas.

2.- Se hicieron 3 lavados de 200 μ l/pozo cada vez con amortiguador Tris/NaCl/MgSO₄/Tween 20 (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 40 mM MgSO₄ y 0.05% Tween 20).

3.- Se bloquearon con 200 μ l/pozo de una solución de 0.5% de gelatina y 0.2% de Tween 20 en 50 mM Tris/HCl pH 8.0, durante 2 horas a temperatura ambiente.

III.- Elución y captura de TSH.

4.- Lavados igual que 2.

5.- Se pusieron, 100 μ l/pozo de amortiguador Tris/Gelatina/NaCl/Tween (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mg de gelatina/ml, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20), y luego se colocaron los círculos de papel conteniendo la muestra y los estándares. Se dejaron eluyendo y capturando durante 16 horas a temperatura ambiente en agitación.

Al término de la elución se retiraron los papelitos y el sobrenadante de los pozos.

IV.- Pegado del anticuerpo policlonal de conejo anti-TSH.

6.- Lavados igual que 2.

7.- Se agregaron 100 μ l/pozo de un dilución de suero anti-TSH1:5000 en amortiguador Tris/Gelatina/NaCl/Tween 20; se dejaron incubando 1 h a temperatura ambiente.

V.- Pegado del conjugado peroxidasa anti-inmunoglobulina de conejo.

8.- Lavados igual que 2.

9.- Se adicionaron 100 μ l/pozo de conjugado diluido 1:2000 en amortiguador Tris/Gelatina/NaCl/Tween 20; se dejaron incubando 1 h a temperatura ambiente.

VI.- Revelado.

10.- Lavados igual que 2.

11.- Se agregaron 100 μ l/pozo de ABTS en 50 mM ácido cítrico pH 4.0 y se dejaron incubando 30 min a temperatura.

12.- Se agregaron 100 μ l/pozo de SDS al 5% para detener la reacción.

13.- Se leyeron las absorbancias a 415 nm.

Nota: Las μ IU de TSH/ml de los estándares utilizados son las siguientes:
A= 0.1; B= 11.4; C= 28.4; D= 56.8; E= 113.6; F(QCI)= 40-60; G(QCII)= >80 y
H(QCIII)= <30.

XV.- Protocolo del uso de trehalosa en placas como preservador

1.- Se prepararon placas con el monoclonal C6 (5 µg de C6/ml). Se colocaron 100 µl/pozo y se incubaron toda la noche a 4°C.

2.- Se hicieron 3 lavados con 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 150 mM NaCl, 40 mM MgSO₄ y 0.05% Tween 20. Se usaron de 200 µl/pozo.

3.- Luego se bloquearon con 0.5% gelatina y 0.2% Tween 20 contenidos en 50 mM de Tris/HCl pH 8.0. Se incubaron 2 h a 37°C.

4.- Lavados igual que 2.

5.- Se colocaron 100 µl/pozo de una solución de trehalosa 20 mg/ml en 5 mM Tris/HCl pH 8.0 y se dejaron secar a 37°C. Luego se envolvieron con plástico autoadherible y se guardaron a temperatura ambiente.

6.- Se probó la efectividad de estas placas a los 20 días. Antes de usarse estas, se lavaron 1 vez con el amortiguador de lavado usado en el paso 2.

7.- Para probar la efectividad de las placas con trehalosa se prepararon placas nuevas (sin trehalosa) que sirvieron como control positivo. En ambas placas (trehalosa y control positivo) se usaron los estándares de la Cía. IEM Diagnostika. La elución de los estándares se hizo durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación en 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 500 mM NaCl, 0,1 mg de gelatina/ml y 0.05% de Tween 20. Se colocaron 100 µl/pozo.

8.- Lavados igual que 2.

9.- Los pozos se incubaron con el suero de conejo anti-TSH a una dilución de 1:5000 en 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 500 mM NaCl, 0.1 mg de gelatina/ml y 0.05% de Tween 20. La incubación fue de 1 h a temperatura ambiente sin agitación y se colocaron 100 µl/pozo.

10.- Lavados igual que 2.

11.- El conjugado HRP-anti-conejo (100µl/pozo) se usó 1:2000 en 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 500 mM NaCl, 0,1 mg de gelatina/ml y 0.05% de Tween 20. La incubación fue de 1 h a temperatura ambiente sin agitación.

12.- Lavados igual que 2.

13.- Se reveló con 100 μ l/pozo de ABTS 30 min a temperatura ambiente y luego se paró la reacción con 100 μ l/pozo de 5% SDS. Se leyó la absorbancia a 415 nm.

NOTA:

En ambas placas (trehalosa y control positivo) se probaron al mismo tiempo otras diferentes condiciones de elución y de captura de los estándares:

En los pozos de las columnas 1 y 2 de cada placa la elución de los estándares, la incubación con el suero anti-TSH (1:5000) y la incubación del conjugado HRP-anti-conejo se hizo por separado (como se venía haciendo rutinariamente).

En los pozos de las columnas 4 y 5 de cada placa la elución de los estándares se hizo poniendo en el amortiguador de elución el suero anti-TSH (1:5000) y luego se incubó por separado el conjugado HRP-anti-conejo.

En los pozos de las columnas 7 y 8 de cada placa la elución de los estándares se hizo poniendo en el amortiguador de elución el suero anti-TSH (1:5000) y el conjugado HRP-anti-conejo (1:2000) simultáneamente.

Los volúmenes en cada caso fueron de 100 μ l/pozo.

Las μ IU de TSH/ml de los estándares utilizados son las siguientes:
A= 0.1; B= 11.4; C= 28.4; D= 56.8; E= 113.6; F(QCI)= 40-60; G(QCII)= >80 y H(QCIII)= <30.

RESULTADOS:

1) Obtención de hibridomas.

Cuando los ratones inmunizados con TSH comercial alcanzaron títulos altos de anticuerpos (definidos por el método de fijación del anticuerpo) se llevaron a cabo las fusiones.

Para hacer el tamizado de los hibridomas se desarrolló la técnica de "slot blot". En el diseño del slot blot empleado aquí, se utilizaron simultáneamente las 4 hormonas de interés en una superficie muy pequeña de membrana que cortada en forma de tira facilitó su manipulación. Las concentraciones de hormona de 15 ng por slot fueron suficientes para observar una buena señal y poder hacer la selección; además se usaron volúmenes pequeños de sobrenadante de cultivo para hacer el ensayo, lo que permitió hacer un tamizado masivo de manera fácil, sencilla y rápida a los hibridomas en crecimiento. El criterio de selección de los hibridomas se hizo de la siguiente manera: 1) recordemos que tenemos en cada tira la presencia de las 4 glicoproteínas de interés; 2) cada una de estas hormonas está formada por 2 subunidades; una subunidad alfa (α) que es idéntica en todas y una subunidad beta (β) que presenta diferencias y que es particular de cada una de ellas; por lo que es común la obtención de anticuerpos tanto específicos como anticuerpos que dan reacción cruzada aunque se hayan hecho inmunizaciones con una hormona pura; 3) en base a lo anterior se seleccionaron inicialmente, aquellos anticuerpos que únicamente reconocieron a TSH en las tiras empleadas (Fig. 1) y en segundo término, aquellos anticuerpos que reconocieron a TSH con mayor afinidad y con un ligero reconocimiento por alguna de las otras hormonas presentes (Fig. 2).

Se realizaron 2 fusiones y se obtuvieron 2 hibridomas estables productores de anticuerpos, uno(C6) específico para TSH y otro(F12) que reconoce TSH y FSH. Los registros generales de cada fusión se muestran en las Tablas I y II respectivamente.

En la primera fusión se hizo una modificación al protocolo básico, el producto de fusión se repartió en 7 placas (5 de las cuales se llevaron a una densidad de 20000 células/pozo con el objeto de obtener 1 hibridoma/pozo y de reducir la competencia, mientras que en las otras 2 placas se repartió el resto de la fusión, considerando tener aproximadamente una densidad de 6×10^6 células/pozo). En la segunda fusión el producto de la fusión se repartió en 3 placas (como lo sugiere el protocolo básico).

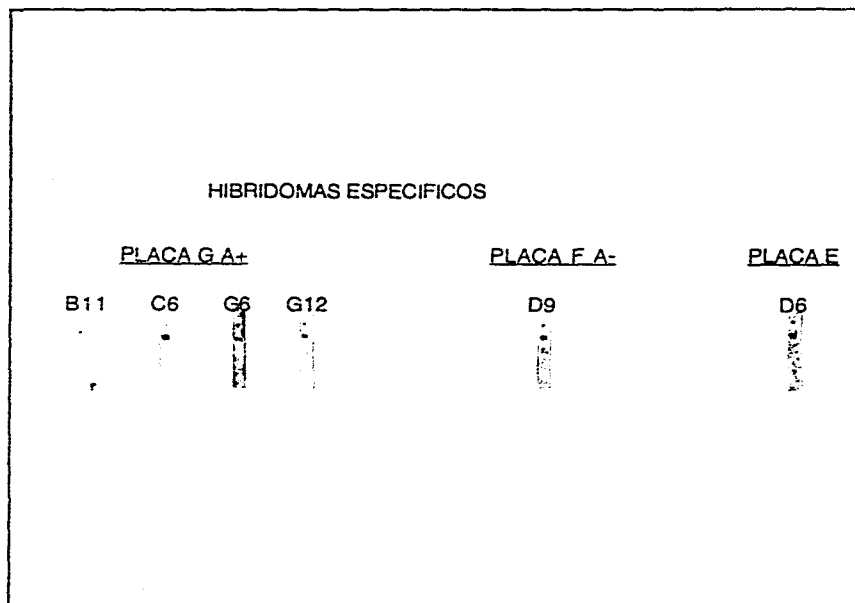


Fig. 1

En esta fotografía se muestra la señal producida por los anticuerpos monoclonales específicos en las tiras que se diseñaron para hacer el tamizado discriminativo. En la fotografía se señalan las placas y los pozos de donde crecieron y se aislaron los hibridomas que produjeron esos anticuerpos específicos. De estos hibridomas solamente C6 se mantuvo estable. GA+ (placa con células alimentadoras); FA- (placa sin células alimentadoras).

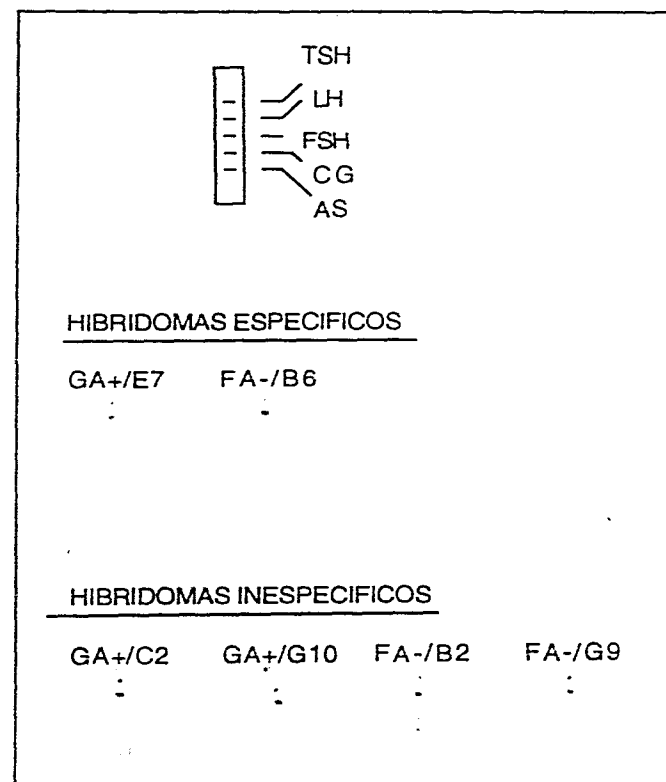


Fig. 2

En esta fotografía se muestran las señales producidas por los anticuerpos, tanto específicos como aquellos que dan reacción cruzada con alguna de las otras hormonas presentes en las tiras. (ver el esquema superior de la foto para identificar las diferentes hormonas con las que hay reconocimiento). GA+ (placa G con células alimentadoras); FA- (placa F sin células alimentadoras). E7;B6; C2; G10; B2 y G9 son los pozos donde crecieron y se aislaron estos anticuerpos.

REGISTROS GENERALES DE LA PRIMERA FUSION

Núm. de "colonias" o conglomerados	Placas sembradas							Total de pozos con crecimiento	%
	A	B	C	D	E	FA	GA		
1	3	4	6	3	6	12	23	57/156	36.5
2	2	2	2	1	1	4	8	20/156	12.8
3			2			5	14	21/156	13
4		1				4	10	15/156	9.6
5									
6	2	2		2	1	10	9	26/156	16.7
Dispersas	6			1	8	1	1	17/156	10.9
Núm. de pozos con Crecimiento/placa	13	9	10	7	16	36	65	156/672	23.2

Tabla 1.- En esta fusión se plaquearon 672 pozos; solamente en 156 pozos se observó crecimiento, lo que representa el 23.2%. La observación periódica de estos pozos con crecimiento permitió conocer el núm. de "colonias" o conglomerados de células que en ellos crecían y considerar si el anticuerpo presente en el sobrenadante de cultivo era producido por 1, 2 o más de ellos, lo que podría sugerir si se trataba de 1, 2 o más diferentes tipos de anticuerpos presentes en el medio. Dentro de los 156 pozos considerados como el 100%, aproximadamente el 37% de ellos presentaban una sola "colonia", mientras que el porcentaje de pozos con 2 o más "colonias" varió del 9 al 16%. El híbrido C6 fue obtenido a partir de la placa GA y su pozo de origen tuvo 1 sola "colonia". Posteriormente fue clonado y sus clones fueron identificadas como híbridomas productores de Inmunoglobulinas IgG₁.

REGISTROS GENERALES DE LA SEGUNDA FUSION

Núm. de "colonias" o conglomerados	Placas sembradas			Total de pozos con crecimiento	%
	1	2	3		
1	18	22	10	50/87	57.5
2	5	8	1	14/87	16.1
3		2		2/87	2.3
4					
5		2		2/87	2.3
6		3	3	6/87	6.9
Dispersas	6	3	4	13/87	14.9
Núm. de pozos con Crecimiento/placa	29	40	18	87/288	30.2

Tabla II.- En la segunda fusión se plaquearon 288 pozos y en 87 de ellos se observó crecimiento celular, lo que representó el 30.2%. En estos 87 pozos, considerados como el 100%, se encontró que pozos con una sola "colonia" también se encontraban en un alto porcentaje (58%), mientras que el resto de los pozos con crecimiento presentaban 2 o más "colonias". El hibridoma F12 fue obtenido a partir de la placa 1 y su pozo de origen tuvo 1 sola "colonia", este hibridoma fue expandido y clonado, sus clonas fueron identificadas como hibridomas productores de inmunoglobulinas IgG₁.

En la primera fusión observamos crecimiento en 156 pozos (23.2%) de los 672 sembrados. Se seleccionaron 8 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos para TSH y 4 hibridomas productores de anticuerpos que daban reacción cruzada con algunas de las otras hormonas empleadas (FSH, LH, GC). Todos se clonaron y se expandieron (ver Tabla I).

En la segunda fusión se observó un crecimiento en 87 pozos de los 288 sembrados, lo que representa un crecimiento del 30.2%. En esta fusión se seleccionaron 19 hibridomas productores de anticuerpos anti-TSH y 5 hibridomas productores de anticuerpos que reconocen algunas de las otras hormonas glicoproteicas (ver Tabla II).

En ambos casos las primeras pruebas de tamizado se empezaron a hacer entre los 8 y 10 días después de haberse hecho la fusión; los pozos que resultaban seleccionados periódicamente se volvían a monitorear mientras se expandían o clonaban. Sin embargo, se observó una pérdida de la producción de los anticuerpos en 34 de los 36 hibridomas seleccionados; solamente se conservó en dos de ellos que aún permanecen estables: uno (C6) específico para TSH y otro (F12) que reconoce TSH y FSH. En este último la TSH se reconoció con mayor afinidad que la FSH. Estos hibridomas fueron expandidos y clonados, las clonas obtenidas fueron inyectadas en ratones para producir ascítis; inóculos de 7×10^5 a 5×10^6 células fueron suficientes para obtener buenos resultados.

II) Isotipos de las cadenas ligeras y pesadas de los monoclonales obtenidos.

Por pruebas de inmunodifusión se identificó que tanto en sobrenadantes de cultivo como en líquido ascítico estos anticuerpos (C6 y F12) son inmunoglobulinas de tipo IgG₁. Por ELISA se identificó que la cadena ligera para ambos era del tipo K (kappa).

La purificación de sendos anticuerpos se hizo a partir de líquido ascítico de ratón por medio de cromatografía de afinidad, utilizando una columna de proteína A acoplada a sefarosa junto con amortiguadores conteniendo una concentración elevada de sal para hacer el pegado; para hacer la elución se usó amortiguador de citratos pH 6.0 (Fig 3A y 3B) y por medio de la técnica de slot blot se pudo monitorear la actividad del anticuerpo antes y después de la purificación. Posteriormente para determinar si estos anticuerpos monoclonales reconocen el mismo sitio o

Cromatograma de la purificación del anticuerpo monoclonal C6 por Proteína A acoplada a Sefarosa a partir de líquido ascítico

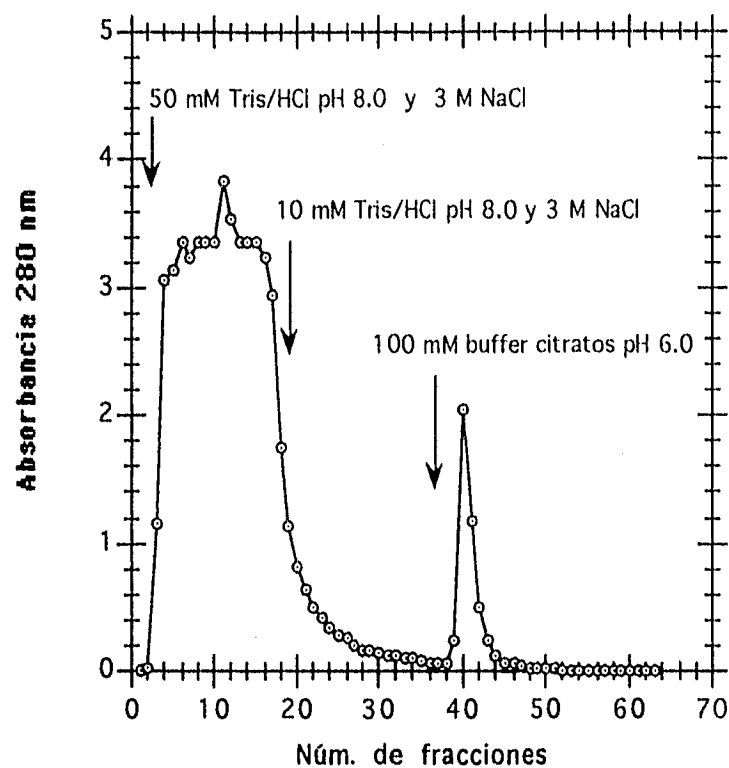


Fig. 3A. Purificación del anticuerpo monoclonal C6 por proteína A, a partir de 1 ml de líquido ascítico. Cada ml de ascitis utilizado contenía aproximadamente 5-6 mg de anticuerpo monoclonal C6. Las interacciones no iónicas e hidrofóbicas entre el fragmento Fc de las IgG₁ y la proteína A se favorecieron por la presencia de alta concentración de sal en los amortiguadores de cargado y lavado (3 M NaCl), mientras que la elución del anticuerpo pegado a la columna con 100 mM de amortiguador de citratos pH 6.0 permitió mantener la funcionalidad después de la purificación.

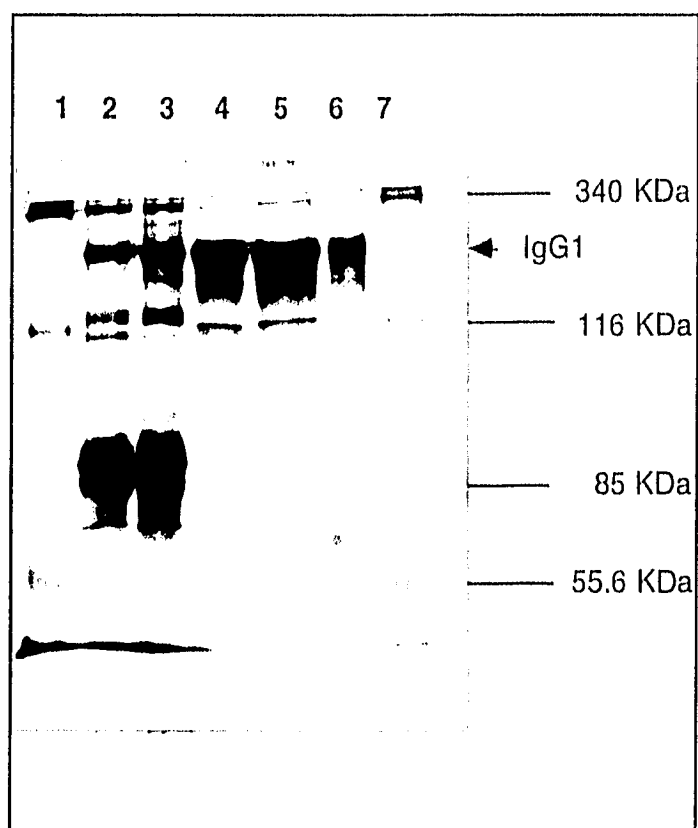


FIG 3B. Análisis electroforético en un gel no reductor de acrilamida 7.5 % en presencia de SDS, de los anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad. En el carril 1y 7 se muestran los marcadores de peso molecular, el carril 2 líquido ascético de GA/C6/F3 diluido 1:100, en el carril 3 líquido ascético de 1/F12/F1 diluido 1:100, en el carril 4 IgG₁ de GA/C6/F3, en el carril 5 IgG₁ de 1/F12/F1(ambos purificados por proteína A acoplada a Sepharosa CL-4B alta sal), en el carril 6 IgG₁ de GA/C6/F3 purificado por proteína A acoplada a Sepharosa CL-4B en condiciones baja sal.

uno muy cercano en la molécula de TSH, se hicieron ensayos de competencia. Para lo cual, se marcó uno de los anticuerpos, (C6) con peroxidasa (Nakane and Kawaoi, 1974) y se determinó que ambos anticuerpos reconocen sitios diferentes en la molécula de TSH (Fig 4).

III) Formato Inicial de la prueba diagnóstica y sus nuevas estrategias.

Inicialmente se había considerado utilizar ambos anticuerpos monoclonales para la prueba diagnóstica. Recordemos que se trata de un ELISA tipo sandwich; este formato consiste en pegar un anticuerpo monoclonal (anticuerpo de captura) a la placa y el empleo de un anticuerpo conjugado a peroxidasa (anticuerpo revelador) que reconoce un sitio diferente en el antígeno (Fig. 5A). Sin embargo, los resultados obtenidos hicieron que se reconsiderara este formato por las siguientes razones:

- a).- Por medio de repetidas clonaciones y subclonaciones se observó que F12 era un hibridoma poco estable.
- b).- El hibridoma F12 es muy sensible a pasos de congelación y descongelación (cuando se descongelaban frascos con clonas de F12 productoras de anticuerpos una semana o un mes después de congelar no mostraban crecimiento).
- c).- Se había observado que F12 tiene poca actividad como anticuerpo, no solamente en sobrenadante de cultivo o en líquido ascítico, sino sobre todo, en el purificado por proteína A y concentrado.
- d).- Aunque se hicieron otras fusiones posteriormente no se logró obtener otros hibridomas estables de interés.

Por otra parte, es importante mencionar que el diagnóstico basado en la prueba de ELISA tipo sandwich usando 2 anticuerpos monoclonales es un formato patentado, por lo que, para evitar infringir los derechos de esta patente se buscaron otras estrategias.

Todo esto indicó que únicamente podríamos contar con el monoclonal C6 para nuestros ensayos. Por tanto, en base a nuestros resultados y al material disponible, el diseño de la prueba diagnóstica se cambió con respecto a los anticuerpos a utilizar en el ensayo, pero conservando el formato ELISA tipo sandwich.

Ensayo de competencia entre los anticuerpos monoclonales C6 y F12 (se usó el conjugado HRP-C6)

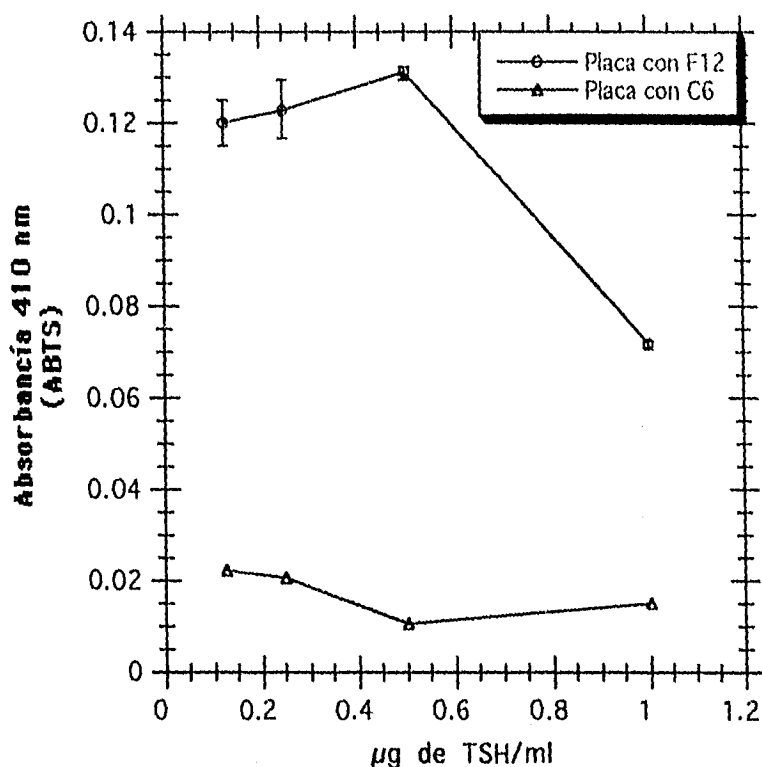
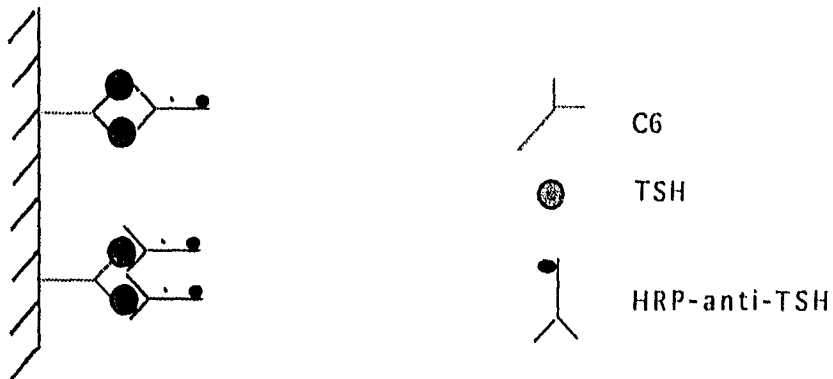
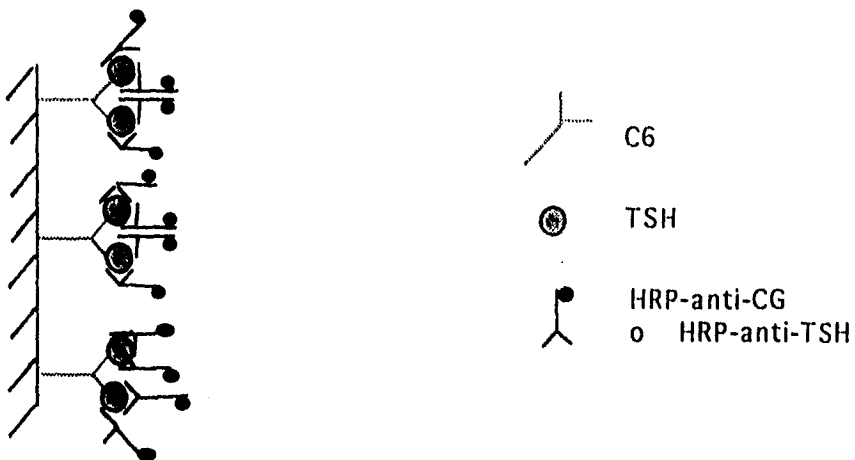


Fig. 4. En este ensayo se pegaron por separado y en pozos diferentes los anticuerpos monoclonales F12 y C6. Por otro lado se hizo el conjugado C6-peroxidasa, que luego se incubó con diferentes concentraciones de TSH durante 4 hs a 37°C; se adicionaron 100 µl de cada concentración de esta mezcla en los pozos previamente preparados con los monoclonales y se incubaron 1 h a 37°C. Los resultados revelaron que cuando F12 es el anticuerpo de captura, existe un pegado del complejo TSH-C6-peroxidasa al soporte, y por lo tanto hay generación de señal cuando se agrega el sustrato de peroxidasa (ABTS); por el contrario, cuando C6 es el anticuerpo de captura no hay pegado del complejo TSH-C6-peroxidasa y no hay generación de señal. Esto es debido a que los anticuerpos C6 del conjugado (que está en solución junto con la hormona) reconocen y se pegan a epítopes de una gran número de moléculas de TSH, por lo que, se saturan los sitios de reconocimiento en la hormona y cuando se adicionan al pozo no son capaces de pegarse al soporte. En este ensayo se concluye que C6 y F12 tienen diferentes sitios de reconocimiento en TSH. Existe una baja señal cuando usamos F12 en el soporte, debido a que este hibridoma F12 tiene poca afinidad por TSH (como se confirmó posteriormente).

A) Formato inicial (monoclonal-monoclonal)



B) Formato de la primera estrategia (monoclonal-policlonal)



C) Formato de la segunda estrategia (monoclonal-policlonal-policlonal)

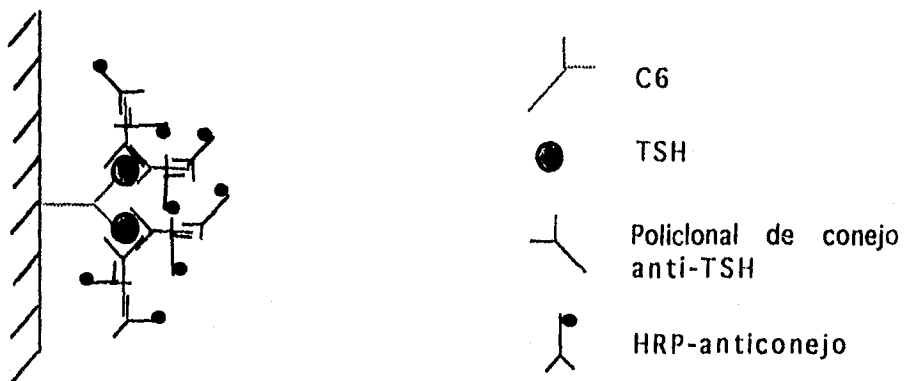


Fig. 5. Diferentes estrategias para la prueba diagnóstica consideradas en este proyecto

Para ello, se propusieron las siguientes estrategias:

En la primera estrategia se inmovilizó el monoclonal C6 a la placa, luego se incubó con TSH y el revelado se hizo con anticuerpos policlonales de conejo anti-CG conjugados con peroxidasa (HRP) (Fig. 5B y Fig. 6). El uso de este conjugado fué considerado por el hecho de que la subunidad alfa (α) presente tanto en la CG como en TSH es idéntica, por lo que, estos anticuerpos también reconocen a TSH (comprobado experimentalmente).

Para la segunda estrategia se pegó C6 a la placa, se incubó con TSH y luego se utilizó para el revelado primero el suero total de conejo anti-TSH y segundo el conjugado de peroxidasa anti-inmunoglobulinas de conejo (Fig. 5C). En este caso se usó el suero de conejo anti-TSH por no contar con suficiente hormona TSH para la purificación de tales anticuerpos.

Ambas estrategias fueron exploradas y los resultados se mencionan a continuación:

En la Fig. 7 se observan las curvas de sensibilidad obtenidas en ambas estrategias. En la gráfica, observamos que hay una baja señal para la primera estrategia. Esto, debido a la baja afinidad que tienen los anticuerpos policlonales anti-subunidad alfa (α) de CG por TSH (título de 1:150 para TSH y 1:16000 para CG). Mientras que para la segunda estrategia se observa una mayor señal. Aquí consideramos que el suero de conejo anti-TSH por tener un título mayor de 1:128,000 nos permitió la detección de pequeñas cantidades de TSH cuando se usó junto con el conjugado de peroxidasa anti-inmunoglobulinas de conejo. La baja señal obtenida con la primera estrategia fue una limitante, como también lo fue contar con anticuerpos policlonales anti-TSH sin purificar, con los cuales, pensamos que esta señal podría mejorarse considerablemente. Sin embargo, una mejor aplicación de la afinidad de estos anticuerpos policlonales anti-TSH sin purificar fue demostrada en la segunda estrategia; razón por la cual se decidió continuar de esta forma.

IV) Segunda estrategia como formato final de la prueba diagnóstica.

Por los resultados obtenidos se decidió optar finalmente por la segunda estrategia para continuar con el desarrollo de la prueba diagnóstica. Por lo

Cromatograma de la purificación
de anticuerpos policlonales de conejo
anti-gonadotropina coriónica humana

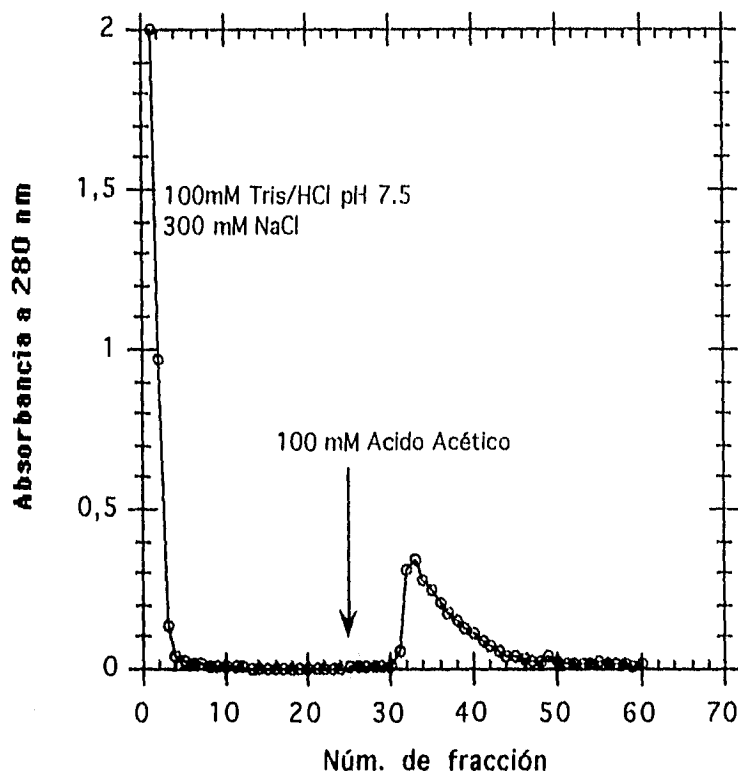


Fig. 6. La purificación se hizo por cromatografía de afinidad a través de una columna de Sepharosa que tenía acoplada gonadotropina coriónica. Además se observó que los anticuerpos policlonales purificados por este método presentaron una actividad funcional hasta 2 ng/ml. Estos anticuerpos fueron utilizados para hacer conjugados de peroxidasa-anti-CG por el método de NaIPO_4 (Nakane and Kawaoi, 1974). Una vez obtenidos los conjugados se les determinó un título de 1:150 para TSH y 1:16000 para CG.

Curva de sensibilidad para TSH empleando dos nuevas estrategias

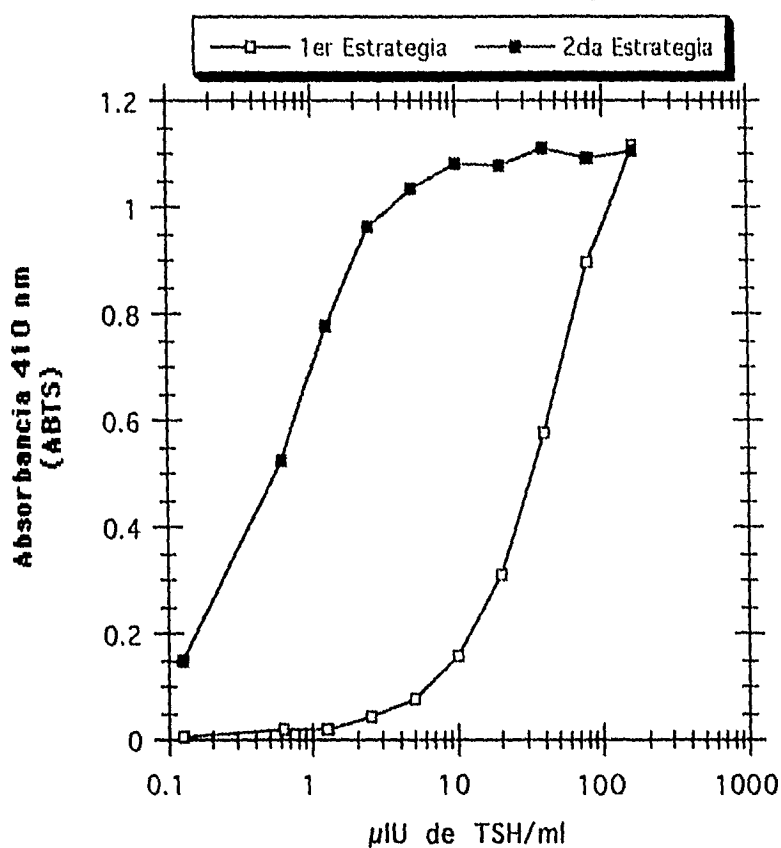


Fig 7. En esta gráfica observamos un cambio en la magnitud de la señal, cuando comparamos las dos nuevas estrategias (ver texto). Para este ensayo primero se pegó el monoclonal C6 al soporte y luego se incubaron $100 \mu\text{l}$ /pozo de cada una de las concentraciones de TSH durante 2h a temperatura ambiente en agitación. Para la primera estrategia se empleó como anticuerpo revelador el conjugado peroxidasa-anti-CG, pero que reconocen también a TSH. En la segunda estrategia se emplearon como anticuerpos reveladores el suero de conejo anti-TSH diluido 1:2000 y el conjugado peroxidasa-anti-conejo 1:2000. Los tiempos de incubación para los anticuerpos empleados en ambas estrategias fueron de 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego se reveló con ABTS y se leyeron a 30 minutos de reacción. Los resultados mostraron que hay una mejor señal para la segunda estrategia aún en las bajas concentraciones de TSH empleadas.

que con dicha estrategia, exploramos la sensibilidad con un mayor rango de valores que fueron los siguientes: 480; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.125; 0.062; 0.031; 0.015 μ IU de TSH/ml. Se colocaron 100 μ l de cada concentración por pozo. En esta curva se puede observar que el límite de sensibilidad es de 0.062 μ IU de TSH/ml (Fig. 8).

La sensibilidad observada en nuestro sistema fue indispensable, puesto que en el procesamiento de la muestra a analizar se parte de una dilución de 3 μ l de sangre seca absorbida en papel filtro que se eluye en un volumen de 100 μ l. Por ensayos posteriores pudimos comparar la magnitud de la señal en la detección de TSH, cuando ésta provenía de una muestra de sangre seca absorbida en papel filtro, o cuando la muestra de sangre era diluída directamente en solución. En la Fig. 9 se observa que hay una mejor señal cuando la TSH proviene de la dilución de sangre directa en el amortiguador que cuando se eluye del papel filtro, lo que representa una recuperación durante la elución del 85% al 90% de la muestra inicial y que existe una muy pequeña retención de la hormona en el papel filtro.

Aún cuando existe esta pequeña retención de la muestra, la sensibilidad obtenida con esta estrategia fue bastante buena. Por lo que se procedió a demostrar su eficacia y confiabilidad en un ensayo ciego para su validación como prueba diagnóstica.

V) Validación del ensayo ciego.

Dado que la incidencia de niños con hipotiroidismo congénito en nuestra población es de 1:1,700 calculamos, inicialmente, que el número de muestras para validar el ensayo debería de ser de 10,000. Pero con el fin de poder reducir dicho número, se planeó que artificialmente (de manera ciega) se incrementaría el número de muestras positivas.

La reproducibilidad de controles por duplicados en un mismo ensayo fue muy alta (mayor de 95%). Asimismo, la reproducibilidad entre ensayos realizados el mismo día o en días distintos fue elevada, especialmente, con concentraciones mayores de 8.9 μ IU/ml, lo que le da confiabilidad al ensayo. Esto se ilustra en la Fig. 10, donde puede verse que hay muy poca variación en la magnitud de la señal. El valor de corte establecido para detectar a los niños con probable hipotiroidismo congénito es de 25 μ IU/ml.

Curva de sensibilidad para TSH
usando dos anticuerpos reveladores
(100 μ l de solución/pozo)

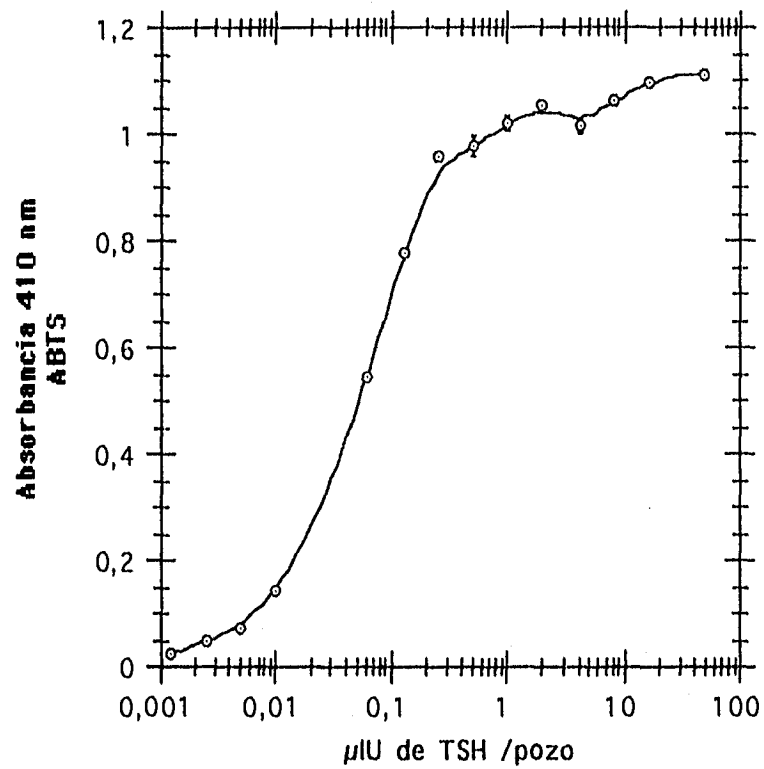


Fig. 8. En esta gráfica se muestra la curva de sensibilidad para TSH cuando se usaron dos anticuerpos reveladores. En este ensayo se colocaron 100 μ l de cada concentración/pozo y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Los anticuerpos anti-TSH se usaron a una dilución de 1:2000 y el conjugado peroxidasa-anti-Igs de conejo 1:2000. Ambos anticuerpos se incubaron 1 h a temperatura ambiente en agitación y luego se revelaron con ABTS.

Curvas de sensibilidad para TSH obtenidas en dos diferentes condiciones experimentales

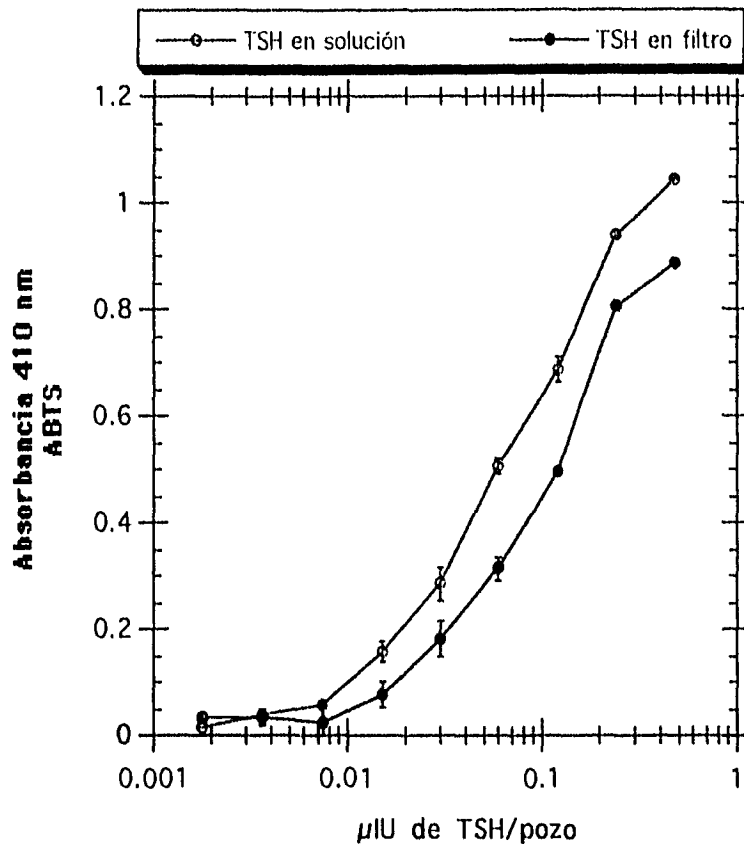


Fig. 9. Para este ensayo se siguió la segunda estrategia. En la gráfica se muestra la sensibilidad obtenida bajo diferentes condiciones: 1) colocando directamente una dilución en el pozo de $3 \mu\text{l}$ de sangre en $100 \mu\text{l}$ de amortiguador y 2) eluyendo de papel absorbente $3 \mu\text{l}$ de sangre seca (preparada en el laboratorio) en un volumen de $100 \mu\text{l}$. En este paso la elución y captura de TSH se hizo durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Para este ensayo, el suero de conejo anti-TSH se usó a una dilución de 1:2000 y el conjugado de peroxidasa-anti-conejo se diluyó 1:2000. Ambos anticuerpos se incubaron 1 h a temperatura ambiente. En la gráfica observamos que hay una ligera disminución de la señal para la segunda condición, esto debido a una falta de recuperación total de las moléculas de TSH presentes en cada muestra. Sin embargo, la magnitud de la señal nos permitió detectar hasta $0.015 \mu\text{IU}$ de TSH/pozo con una A_{410} de 0.08 aproximadamente.

Absorbancias obtenidas de los controles en diferentes ensayos

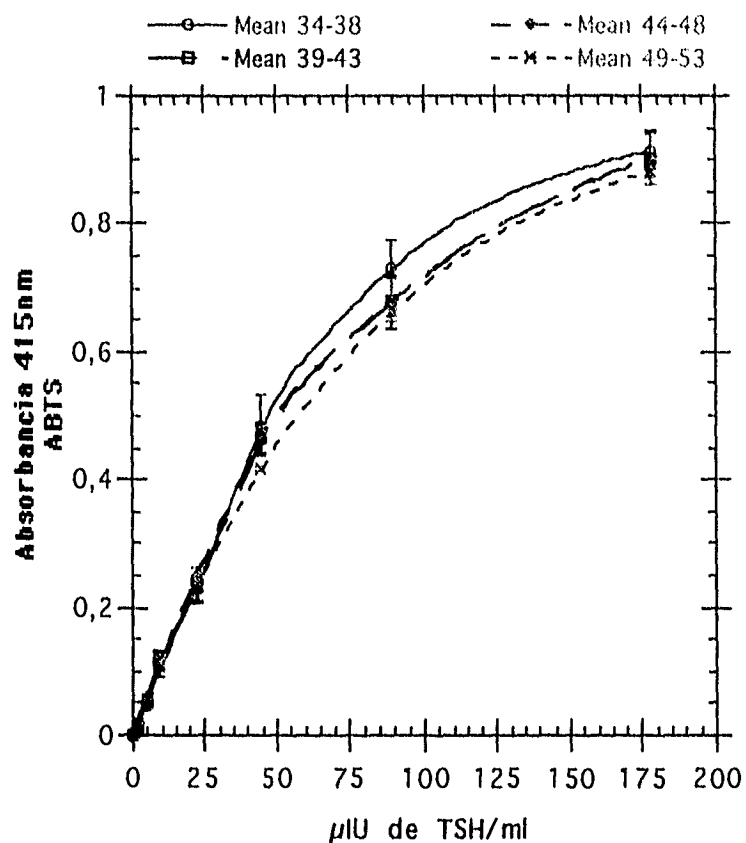


Fig.10. En esta gráfica se comparan las lecturas de los controles entre ensayos hechos en diferentes días; en ella, se observa como se sobrelapan las lecturas en las concentraciones que se indican, lo cual habla del bajo coeficiente de variación que hay y de la reproducibilidad de la prueba diagnóstica propuesta. Los puntos en cada una de las curvas que se indican son el promedio de los controles y sus duplicados en 5 placas hechas por día.

Las muestras fueron valoradas con nuestro ensayo de manera ciega. Al igual de lo que ocurre en el Sector Salud, las muestras positivas después de la primera prueba fueron analizadas una vez más. Para la validación, las muestras fueron simplemente categorizadas en positivas (valores mayores a 25 μ IU/ml) o negativas (valores menores a 25 μ IU/ml). El cruce de los resultados de nuestra prueba con los del Sector Salud se hizo al término del análisis de las 3,932 muestras.

Para la valoración se cruzaron los datos en una tabla de 2 X 2, como se indica en la Tabla III. Los resultados, tanto después de la primera prueba como de la segunda, se dan en la Tabla IV. Como se observa en ésta tabla, los resultados fueron altamente satisfactorios: todos los casos positivos fueron detectados como tales (sensibilidad 100%) y el número de falsos positivos fue muy bajo (especificidad de 99.95%). Los resultados obtenidos en nuestro sistema comparan muy favorablemente con los resultados del Sector Salud que en el último año tuvieron un 5% de falsos positivos, lo que los ha llevado a cambiar de marca de estuches diagnósticos.

VI) Almacenaje de placas conteniendo el monoclonal C6.

Considerando lo laborioso que puede ser preparar las placas un día antes de hacer el ensayo, se prepararon varias placas con el anticuerpo monoclonal C6, a las cuales, se les adicionó un agente estabilizador de moléculas como es la trehalosa que es un disacárido (Blakeley, et.al. 1990; Colaco, et.al. 1992); se dejaron secar a 37 °C. y se guardaron a temperatura ambiente. La presencia de este agente estabilizador ayuda a mantener la viabilidad de los anticuerpos en seco, las placas fueron probadas a los 20 días después en el ensayo. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

Por otro lado, es de mencionar que existen en el mercado numerosos estuches para TSH en los que el tipo de muestra a analizar puede ser: suero o sangre. Nosotros optamos por esta última, porque ha sido establecido oficialmente dentro de los programas neonatales de prevención en países desarrollados, la colecta de muestras de sangre en papel filtro que facilitan su manipulación y almacenaje; pero creemos que también podrían establecerse las condiciones para que los anticuerpos propuestos en este proyecto se emplearan en el análisis para ambos tipos de muestras.

TABLA III. PARAMETROS DE UNA TABLA 2 X 2

		RESULTADO DE LA PRUEBA DE REFERENCIA		
		HC+	HC-	
RESULTADO DE LA PRUEBA	+	a (VP)	b (FP)	VPP= [a / (a+b)] x100
	-	c (FN)	d (VN)	VPN= [d / (c+d)] x100

SENSIBILIDAD= [a / (a+c)] x100 ESPECIFICIDAD= [d / (b+d)] x100 MUESTRA= a+b+c+d

PREVALENCIA=
 $(a+c) / (a+b+c+d)$

EXACTITUD=
 $[(a+d) / (a+b+c+d)] * 100$

DONDE:
 HC+= niños con hipotiroidismo congénito (comprobado)
 HC-= niños sin hipotiroidismo congénito
 V= verdadero; P= positivo; F= falso; N= negativo
 VPP= valor predictivo positivo (porcentaje de la muestra con prueba positiva que tiene HC)
 VPN= valor predictivo negativo (porcentaje de la muestra con prueba negativa que no tiene HC)
 SENSIBILIDAD= porcentaje de la muestra con HC con prueba positiva
 ESPECIFICIDAD= porcentaje de la muestra sin HC con prueba negativa

**TABLA IV. VALIDACION DEL ENSAYO DE ELISA PARA LA
DETECCION TEMPRANA HIPOTIROIDISMO CONGENITO**

RESULTADOS DESPUES DE LA PRIMERA PRUEBA

		RESULTADO DE LA PRUEBA DE REFERENCIA		
		HC+	HC-	
RESULTADO DE LA PRUEBA	+	25 (VP)	8 (FP)	VPP= 75.76
	-	0 (FN)	3899 (VN)	VPN= 100.00
		SENSIBILIDAD= ESPECIFICIDAD=		MUESTRA=
		100.00 99.80		3932

PREVALENCIA (x 10,000)=
63.58

EXACTITUD=
99.80

RESULTADO DESPUES DE LA SEGUNDA PRUEBA

		RESULTADO DE LA PRUEBA DE REFERENCIA		
		HC+	HC-	
RESULTADO DE LA PRUEBA	+	25 (VP)	2 (FP)	VPP= 92.59
	-	0 (FN)	3905 (VN)	VPN= 100.00
		SENSIBILIDAD= ESPECIFICIDAD=		MUESTRA=
		100.00 99.95		3932

PREVALENCIA (x 10,000)=
63.58

EXACTITUD=
99.95

Estabilidad de las placas conteniendo el anticuerpo monoclonal C6 y almacenadas con trehalosa a temperatura ambiente

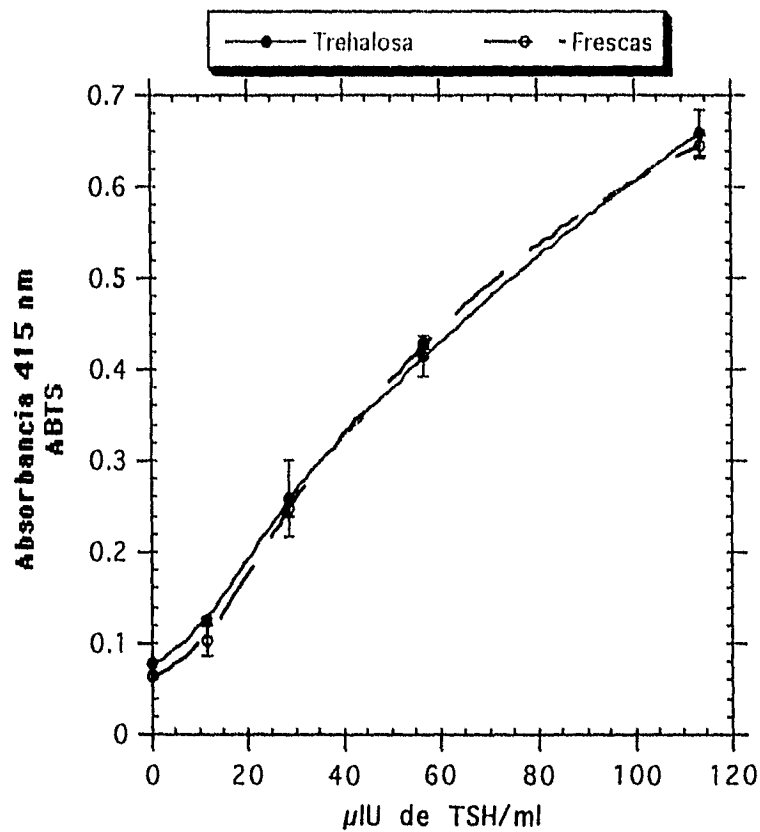


Fig. 11. Veinte días después de haberse preparado y almacenado a temperatura ambiente fueron probadas. Cuando se compararon estas placas con otras preparadas previamente antes de iniciar ("frescas") el ensayo, observamos que la magnitud de la señal para ambos casos es la misma, lo que significa la conservación del estado funcional de los anticuerpos monoclonales pegados a la placa en condiciones secas sin refrigeración. Este ensayo se hizo con estándares de sangre seca que se eluyeron toda la noche. Las concentraciones de TSH para este ensayo fueron las siguientes: 0.1; 11.4; 28.4; 56.8 y 113.6 μ IU de TSH/ml. Los anticuerpos reveladores fueron suero de conejo anti-TSH 1: 5000 y peroxidasa-anti-IgG de conejo 1:2000. Los resultados obtenidos hasta ahora nos permitieron considerar a la trehalosa dentro del desarrollo de este proyecto para facilitar la manipulación y almacenaje de un gran número de placas.

DISCUSION:

1).- Por los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (una baja frecuencia de hibridomas anti-TSH por fusión y la pérdida de estabilidad de casi todos los hibridomas) consideramos la necesidad de hacer varias fusiones para obtener una colección de anticuerpos, y luego seleccionar aquellos con uso potencial en el diagnóstico. Aún cuando han sido mencionadas varias referencias en la sección de Antecedentes, en la mayoría de los casos no se menciona ninguna explicación acerca de la baja frecuencia de hibridomas positivos anti-TSH, ni de la pérdida de estabilidad que estos pueden llegar a tener. En realidad son pocos los grupos que muestran sus resultados con un poco más de detalle; por ejemplo Soos y Siddle (1982) en su primer intento obtuvieron 5 hibridomas específicos anti-TSH en "4 fusiones"; en un segundo intento, Soos y col. (1984) obtuvieron 22 hibridomas anti-TSH en "4 fusiones"; Benkirane y col. (1987b) obtuvieron 17 hibridomas en "varias fusiones"; Benkirane y col. (1987a) obtuvieron 13 hibridomas de los cuales 4 fueron específicos para TSH. El caso más extremo es el de Endo y col.(1989) que hicieron "21 fusiones" para la obtención de 33 anticuerpos monoclonales; solamente Braun y Charreire (1990) hacen referencia en sus resultados a la pérdida de estabilidad observada en 14 de los 24 hibridomas obtenidos en una fusión, de los 11 hibridomas que conservaron su estabilidad sólo 5 hibridomas fueron específicos para TSH; mientras que Ridgway y col.(1982) obtuvieron solamente un anticuerpo monoclonal en una fusión. Por estudios hechos en los últimos años se piensa que la pérdida de estabilidad es producto de varios factores. Por un lado Grigsby y col.(1993) reportaron evidencias sobre la susceptibilidad a la degradación o pérdida del ADN que tienen los hibridomas; por otro lado Kessler y col.(1993) dicen que la estabilidad de los hibridomas murinos depende tanto de la línea clonal como de la composición de los medios de cultivo. Más tarde Nonaka e Hirai (1994) comprobaron la existencia de un componente tóxico presente en el suero fetal bovino que en cantidades de microgramos inhibe y mata a las células en cultivo; por lo que Lumanglas y Wang (1993) han propuesto el empleo de líquido de ascitis en lugar del suero fetal bovino como complemento en el medio de cultivo. Ellos identificaron la existencia de un componente proteínico presente en el líquido ascítico que aumenta 4 veces más la producción de anticuerpos en los cultivos.

El alto costo de estas hormonas glicoproteínicas y la falta de disponibilidad inmediata, junto con la baja frecuencia de hibridomas

positivos y su falta de estabilidad, plantean la necesidad de buscar nuevas alternativas; una es utilizar péptidos sintéticos diseñados a partir de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de TSH. Esta alternativa ha sido usada por Bidar y col.(1991), que inmunizando con pequeñas regiones peptídicas lograron obtener 51 anticuerpos monoclonales en "4 fusiones". Otra alternativa es expresar anticuerpos en fagos, partiendo de hibridomas positivos o de poblaciones de linfocitos. (Winter y col, 1994; Griffiths y col. 1994).

2).-Diferentes tipos de muestras han sido aplicadas directamente sobre filtros para hacer los "dot blots o slot blots". Las muestras aplicadas han variado desde parásitos (Pappas y col., 1983) hasta antígenos puros (Herbrink y col., 1982), que han sido revelados con diferentes sustratos. El empleo de los "dot o slot blots" ha ido desde la detección de anticuerpos en sueros hasta su empleo en el tamizado de cultivos de hibridoma. Towbin y Gordon (1984) fueron quienes propusieron al "immunoblotting" y al "dot immunobinding" como métodos de diagnósticos alternativos en los que se pueden usar pequeñas cantidades de antígenos y probar más de un antígeno simultáneamente. Además sus estudios indicaron que concentraciones de 10^{-9} M del primer anticuerpo solo requerían de 1 h de incubación para reconocer a su antígeno. Nghiem (1988) aplicó la idea de la miniaturización de estos "immunodot-blots" y su empleo en el tamizado de los cultivos de hibridomas pero ahora usando muy pequeños volúmenes de sobrenadante. Finalmente Ekins y Chu (1994), continuando con la miniaturización, han propuesto el diseño y el desarrollo de un inmunoensayo "microspot". Con este diseño del ensayo "microspot", se podrían hacer análisis de diferentes analitos simultáneamente por el uso de anticuerpos marcados con diferentes fluoróforos. La especificidad alcanzada en estos tipos de ensayos fue propuesta por Brennan y col.(1986) al sugerir hacer "dot blot" tipo sandwich para evitar el enmascaramiento de epítopes y mejorar la sensibilidad. Con la introducción de los sustratos quimoluminiscentes en los "immuno-dot" por Bakkali y col.(1994) los "dot blots" han aumentado su sensibilidad y continúan siendo una herramienta sencilla e importante no solo en la investigación básica sino también para la investigación aplicada.

La técnica del "slot blot" desarrollada en nuestro laboratorio nos permitió: a) emplear concentraciones muy pequeñas de hormonas con respecto a aquellas usadas en un ELISA, lo que significó un ahorro a nuestra economía; b) probar las cuatro hormonas relacionadas simultáneamente para seleccionar específicamente a los hibridomas productores de anticuerpo de interés, con lo cual evitamos preparar placas de ELISA específicas para cada una de ellas; c) tomar únicamente 100 μ l de sobrenadante de cultivo

por pozo para hacer el tamizado y d) analizar más de 10 sobrenadantes de cultivo simultáneamente en un tiempo corto. De esta manera alcanzamos satisfactoriamente el objetivo principal: hacer una selección discriminativa para identificar los hibridomas productores de anticuerpos anti-TSH de aquellos que daban reacción cruzada. Con las variantes que ofrece esta técnica pensamos que podría emplearse para hacer una segunda selección dentro de los hibridomas específicos. Esta selección sería para saber cuales anticuerpos tienen alta afinidad. Por las metas alcanzadas en este campo como la miniaturización, especificidad y sensibilidad y por las perspectivas futuras de los ensayos diagnósticos, pensamos que nuestro diseño de "slot blot" sería todavía más atractivo y eficiente si lo empleáramos en una segunda selección, en la cual, disminuyendo la cantidad de hormona por "slot" y diluyendo los volúmenes de sobrenadante todavía más, permitiría hacer una selección preliminar de aquellos hibridomas que produjeran anticuerpos de mayor afinidad.

3).- Las dos alternativas propuestas para el estuche diagnóstico son formatos de ELISA tipo sandwich pero a la vez son diferentes sistemas de amplificación. En ambas la amplificación se da después de la captura de TSH. En el caso de la primera alternativa, solamente existe un anticuerpo monoclonal de captura pegado al soporte y luego del pegado de TSH a éste, se da la única amplificación por la participación de los anticuerpos policlonales anti-CG conjugados con una enzima.

En la segunda alternativa también se inicia con el anticuerpo monoclonal de captura pegado al soporte, luego del pegado de TSH al anticuerpo de captura se dan 2 amplificaciones, la primera por la participación de los anticuerpos policlonales de conejo anti-TSH y la segunda por el empleo de anticuerpos policlonales anti-conejo conjugados con una enzima.

Aunque hemos obtenido una mejor sensibilidad con la segunda alternativa también es cierto que representa un mayor número de pasos y que una de las tendencias siempre presentes en las pruebas diagnósticas es que éstas tienen que ser sencillas y fáciles de hacer. En la gráfica de la Fig. 7 en la que se muestran estos resultados se usó el conjugado peroxidasa anti-CG y no el conjugado peroxidasa anti-TSH (por no contar con él), por lo que podríamos esperar "quizás un mejoramiento" en la señal cuando se utilice éste último conjugado. Alcanzar la sensibilidad usando un anticuerpo revelador en vez de dos nos permitiría hacer el ensayo más simple.

4).- Por lo resultados obtenidos hasta ahora, aún cuando no hemos determinado la constante de afinidad, podemos afirmar que el anticuerpo

monoclonal C6 tiene alta afinidad puesto que nos permite detectar pg de hormona/ml. Esta sensibilidad es suficiente para el fin diagnóstico que se buscaba. Sin embargo, es posible proponer que mejorando la sensibilidad de nuestro ensayo incluso pudiera emplearse como apoyo diagnóstico para otros padecimientos tiroideos en los que los niveles sanguíneos de TSH están muy disminuídos (e.g. hipertiroidismo). Actualmente con el desarrollo de sustratos florescentes, quimoluminescentes o bioluminescentes, o el diseño de nuevos sistemas de amplificación (Kricka, 1993) para los ensayos diagnósticos, se ha observado que estos pueden mejorar los límites de sensibilidad. Se sabe que en el caso de la quimoluminescencia la sensibilidad puede mejorarse hasta por un factor de 10 a 100 veces. Algunos de estos ensayos diagnósticos por quimoluminescencia pueden detectar concentraciones subclínicas de TSH (Ross y col., 1989a y Ross y col., 1990b).

5).- El objetivo principal del proyecto fue la producción de anticuerpos monoclonales y su empleo en diagnóstico de hipotiroidismo congénito en niños. Esta prueba mide niveles de TSH en sangre seca de niños recién nacidos. La sangre es colectada en papel filtro para facilitar su manipulación y almacenaje, por lo que la muestra puede ser tomada a distancia y luego llevarse a un laboratorio para su procesamiento.

Por otro lado, La Secretaría de Salud publicó el día Jueves 22 de Septiembre de 1988 en el Diario Oficial de la Federación: que la concentración de 25 μ IU de TSH/ ml de sangre debe ser el límite máximo normal. Con dicho límite de corte, el ELISA implementado durante este trabajo identificó correctamente a quienes no padecen la enfermedad de quienes la padecen. Además, se generaron reactivos biológicos que permitirían realizar más de 3 000 000 pruebas.

La incorporación de este ensayo de manufactura mexicana como parte del conjunto de pruebas para la detección de enfermedades tiroideas, podría llevarse a cabo si es transferido a la Secretaría de Salud o a alguna empresa particular. Por lo que creemos que en un futuro cercano podría tener una aplicación importante, en la cobertura del programa nacional para la detección temprana de hipotiroidismo congénito.

REFERENCIAS:

Bakkali, L., Guillou, R., Gonzague, M. and Cruciere, C. (1994). A rapid and sensitive chemiluminescence dot-immunobinding assay for screening hybridoma supernatants. *J. Immunol. Methods* 170(2): 177-184.

Bayer, M.F. (1991). Effective laboratory evaluation of thyroid status. *Med. Clin. North. Am.* 75(1): 1-26.

Benkirane, M.M., Bon, D., Bellot, F., Princé, P., Hassoun, J., Carayon, P. and Delori, P. (1987a). Characterization of monoclonal antibodies against human thyrotropin and use in an immunoradiometric assay and immunohistochemistry. *J. Immunol. Methods* 98: 173-181.

Benkirane, M.M., Bon, D., Costagliola, S., Paolucci, F., Darboret, B., Princé, P. and Carayon, P. (1987b). Monoclonal antibody mapping of the antigenic surface of human thyrotropin and its subunits. *Endocrinology* 121(3): 1171-1177.

Benkirane, M.M., Bon, D., Cordeil, M., Delori, P. and Delaage M.A. (1987c). Immunization with immune complexes: Characterization of monoclonal antibodies against a TSH-antibody complex. *Mol. Immunol.* 24(12): 1309-1315.

Benkovic, S.J. (1992). Catalytic antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 29-54.

Bennett, G.W. and Whitehead, S.A. (1983). Neuroendocrine investigation and control of thyroid stimulating hormone. En: *Mammalian neuroendocrinology*. Editorial Croom Helm Ltd. pp 59-61; 66-71; 139-153.

Berridge, M.J. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-324.

Bethune, J.E. (1989). Interpretation of thyroid function test. In: *Disease a Month* (Bone, R.C. Editor) Year Book Medical Publishers, Inc. pp. 543-595.

Bidart, J.M., Troalen, F., Ghillani, P., Puisieux, A., Bohuon, C. and Bellet, D. (1991). Immunochemical mapping of antigenic regions on the human thyrotropin B-subunit by antipeptide antibodies. *J. Biol. Chem.* 266(29): 19238-19244.

Blakeley, D., Tolliday, B., Colaco, C. and Roser, B. (1990). Dry instant blood typing plate for bedside use. *The Lancet* 336: 854-855.

Braun, J.M. and Charreire, J. (1990). Production and characterization of monoclonal antibodies directed against different epitopes of human thyroid stimulating hormone. *J. Immunol. Methods* 132: 197-263.

Brennad, D.M., Danson, M.J. and Hough, D.W. (1986). A comparison of ELISA screening methods for the production of monoclonal antibodies against soluble protein antigens. *J. Immunol. Methods* 93: 9-14.

Caldwell, B.V. and Kayne R.D. (1987). Normal endocrine function of the pituitary. In: The pituitary clinical aspect of normal and abnormal function (Goodrich and Lee editors). Editorial Elsevier. pp. 29-33.

Campbell, J., Wathen, N., Macintosh, M., Cass, P. and Chard, T. (1992). Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *British Journal Obstetrics and Gynaecology*. 99: 563-565.

Colaco, C., Blakeley, D., Sen, S. and Roser, B. (1992). Trehalose stabilisation of biological molecules. *Biotechnology International*: 345-350.

D'Alton, M.E. (1994). Prenatal diagnostic procedures. *Semin. Perinatol.* 18(3):140-162.

Demeester-Mirkine, N. and Dumont, J.E. The hypothalamo-pituitary thyroid Axis. En Comprehensive endocrinology. The thyroid gland. Raven Press Editorial (Editor M. De Visscher. Series Editor Luciano Martini). 1980 pp 145-152.

Denyer, M.D., Hubbard, R. and Marks, V.(1985). Production and growth of hybridomas secreting monoclonal antibodies to human thyroid stimulating hormone. 60: 493-501.

Dussault, J.H. and Ruel, J. (1987). Thyroid hormones and brain development. *Ann. Rev. Physiol.* 1987 49: 321-334.

Ekins, R.P. and Chu, F. (1994). Developing multianalite assays. *Trends in Biotechnology* 12(3): 89-94.

- Endo, Y., Miyai, K., Iijima, Y., Nikajima, T., Eda, Y., F, H and Unoki, M. (1989). Epitope mapping of human thyrotropin. *Acta Endocrinológica* 120: 201-209.
- Fisher, D.A. and Klein, A.H. (1981). Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. *N. Engl. J. Med.* 304: 702-712.
- Gennser, G., Liedholm, P. and Thorell, J. (1976). Pituitary hormone levels in plasma of the human fetus after administration of LRH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 470-473.
- Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A. and Chin, W.W. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrine Reviews* 11(1): 177-198.
- Gómez Vargas, E., Bolaños, F. y Valverde-Rodríguez, C. Tiroides. En: Fundamentos de endocrinología clínica. Editorial Prensa Medica Mexicana (Editores: J. Manuel Malacara; Mariano García Viveros y Carlos Valverde-Rodríguez). Tercera edición 1977 pp. 59-91.
- Goodman, H.M. and Van Middlesworth, L. The thyroid gland. En: Medical Physiology. Editorial MOSBY (Editor Vernon B. Mountcastle). Fourteenth edition 1980; vol 2:1495-1518.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison J.L., Zaccolo, M., Gherardi, E., Winter, G. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13(14): 3245-3260.
- Grigsby, R.V., Fairbairn, D. and O'Neill, K.L. (1993). Differential DNA damage detected in hybridomas. *Hybridoma* 12(6): 755-761.
- Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry* 119: 142-147
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies a laboratory manual*. CSH Editorial.
- Herbrink, P., Van Bussel, F.J. and Warnaar, S.O. (1982). The antigen spot test (AST): A highly sensitive assay for the detection of antibodies. *J. Immunol. Methods* 48: 293-298.
- Isada, N.B. and BlaKemore, K.J. (1993). Basic concepts in molecular (DNA) diagnosis. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 20(3):413-420.

Jauniaux, E., Gulbis, B., Jurkovic, D., Campbell, S., Collins, W.P., and Ooms, H.A. (1994). Relationship between protein concentrations in embryological fluid and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy. *Human Reproduction* 9(1): 161-166.

Kawakami, Y., Fujita, R., Okuda, Y. and Yamashita, K. (1993). TSH receptor and signal transduction. *Nippon Rinsho* 51(10): 2649-2654.

Kessler, N., Bertrand, S. and Aymard, M. (1993). Stability of a murine hybridoma is dependent on the clonal line and culture media (letter). *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29A(3 pt 1): 203-207.

Kohler, G. and Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(7): 495-497.

Kricka, L.J. (1993). Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clin. Biochem.* 26: 325-331.

Larsen, P.R. (1989) Maternal thyroxine and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 321(1): 44-46.

Leedman, P.J., Frauman, A.G., Colman, P.G. and Michelangeli, V.P. (1992). Measurement of thyroid-stimulating immunoglobulins by incorporation of tritiated-adenine into intact FRTL-5 cells: a viable alternative to radioimmunoassay for the measurement of cAMP. *Clinical Endocrinology* 37: 493-499.

Li, G., Liu, B. and Liu, Y. (1995). A dynamical model of the pulsatile secretion of the hypothalamo-pituitary axis. *BioSystems* 35: 83-92.

Liddell, J.E. and Cryer, A. (1991) Mieloma Cells, lymphocytes, fusion En: A practical guide to monoclonal antibodies. Editorial Wiley (Editor John Wiley & Sons). pp. 65-88.

Lumanglas, A.L. and Wang, B.S. (1993). Effect of murine ascites on the ability of hybridoma cells to produce antibody and proliferate in vitro. *Hybridoma* 12(1): 127-133.

Magner, J.A. (1990). Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology and bioactivity. *Endocrine Reviews* 11(2): 354-385.

McCullough, K.C. and Spier, R.E. (1990). In conclusion: the diversity in application of monoclonal antibodies and hybridoma technology. In: Monoclonal antibodies in biotechnology: theoretical and practical aspects. Editorial Cambridge Studies in Biotechnology (editores Baddiley, J., Carey, N.H., Higgins, I.J. and Potter, W.G.). pp. 316-346.

Mckenzie, J.M. (1958a). The bioassay of thyrotropin in serum. *Endocrinology* 63: 372-382.

Mckenzie, J.M. (1960b). Bio-assay of thyrotropin in man. *Physiol. Rev.* 40: 398-414

Miyai, K., Fukuchi, M. and Kumahara, Y. (1969). Correlation between biological and immunological potencies of human serum and pituitary thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 1438-1442.

Miyai, K. (1994). Molecular genetics of congenital isolated thyrotropin deficiency. *Nippon Rinsho* 52(4): 948-955.

Miyoshi, I., Kasai, N. and Hayashizaki, Y. (1994). Structure and regulation of human thyroid-stimulating hormone (TSH) gene. *Nippon Rinsho* 52(4): 940-947.

Moltz, K.C. and Postellon, D.C. (1994). Congenital hypothyroidism and mental development. *Comprehensive Therapy* 20(6): 342-346.

Musset, M.V. and Perry, W.L.M. (1955). The international standard for thyrotrophin. *Bull. World Health Organ.* 13: 917-929.

Nakamura, H. and Nakao, K. (1993). Mechanism of regulation of TSH biosynthesis and secretion. *Nippon Rinsho* 51(10): 2611-2617.

Nakane, P.K. and Kawaoi, A. (1974). *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1084

Nathanielsz, P.W. The fetal thyroid. the thyroid in the rat, human and subhuman primate fetus. In Fetal Endocrinology an experimental approach. Editorial North-Holland. 1976 pp. 73-89.

Nghiem, H.A. (1988). Miniaturization of the immunoblot technique (Rapid screening for the detection of monoclonal and polyclonal antibodies). *J. Immunol. Methods* 111: 137-141.

Nonaka, N. and Hirai, H. (1994). Identification and purification of a toxic component to B cell hybridoma cells in fetal calf serum. *Jpn. J. Cancer Res.* 85(4): 372-377.

Pappas, M.G., Hajkowski, R. and Hockmeyer, W.T. (1983). Dot Enzyme-linked immunoabsorbent assay (Dot-ELISA): a Micro Technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 64: 205-214.

Radunovic, N., Dumez, Y., Nastic, D., Mandelbrot, L., Dommergues, M. (1991). Thyroid function in fetus and mother during the second half of normal pregnancy. *Biol. Neonate* 59: 139-148.

Ridgway, E.Ch., Ardisson, L.J., Meskell, M.J. and Mudgett-Hunter, M. (1982). Monoclonal antibody to human thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol and Metab.* 55 () : 44-48

Ross, D.S., Ardisson, L.J. and Meskell, M.J. (1989a). Measurement of thyrotropin in clinical and subclinical hyperthyroidism using a new chemiluminescent assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69: 684-688.

Ross, D.S., Daniels, G.H. and Gouveia, D. (1990b). The use and limitations of a chemiluminescent thyrotropin assay as a single thyroid function test in an out-patient endocrine clinic. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71(3): 764-769.

Sakurada, Y.K., Takahashi, T., Furuashi, N., Kaise, K. and Yoshinaga, K. (1986). Measurement of TSH in human amniotic fluid: diagnosis of fetal thyroid abnormality in utero. *Clin. Endocri.* 25: 313-318.

Sandhu, J.S.(1992). Protein engineering of antibodies. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12(5-6): 437-462.

Sergi, I., Papandreou, M.J., Medri, G., Canonne, C., Verrier, B. and Ronin, C.(1991). Immunoreactive and bioactive isoforms of human thyrotropin. *Endocrinology* 128(6): 3259-3268.

Shupnik, M.A., Ridgway, E.Ch. and Chin, W.W.(1989). Molecular biology of thyrotropin. *Endocrine Reviews* 10(4): 459-475.

Soos, M. and Siddle, K.(1982a). Characterization of monoclonal antibodies directed against human thyroid stimulating hormone. *J. Immunol. Methods* 51: 57-68.

Soos, M., Taylor, S.J., Gard, T. and Siddle, K. (1984b). A rapid, sensitive two-site immunometric assay for TSH using monoclonal antibodies: Investigation of factors affecting optimisation. *J. Immunol. Methods* 73: 237-249.

Spencer, C.A., LoPresti, J.S., Patel, A., Guttler R.B., Eigen, A., Shen, D., Gray, D. and Nicoloff, J.T.(1990). Applications of new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 453-460.

Stites, D.P. and Terr, A.I. (1991). Immunoglobulin structure and function. En: Basic and Clinical Immunology. Editorial Appleton & Lange (Séptima Edición). Pp. 109-122.

Stuart, M.C., Underwood, P.A., Harman, D.F., Payne, K.L., Rathjen, D.A., Razziudin, S., Von Sturmer, S.R. and Vines, K. (1983). The production of monoclonal antibodies to human chorionic gonadotrophin and its subunits. *J. Endocr.* 98: 323-330.

Tachman, M.L. and Guthrie Jr. G.P. (1984). Hypothyroidism: Diversity of presentation. *Endocrine Reviews* 5(3): 456-465.

Towbin, H. and Gordon, J. (1984). "Immunoblotting and dot immunobinding" current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* 72: 313-340.

Vassart, G. and Dumont, J.E. (1992). The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrine Reviews* 13(3): 596-611.

Vulsma, T., Gons, M.H. and de Vijlder, J.J. (1989). Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N. Engl. J. Med.* 321(1):13-16.

Wild, D. (1994). Thyroid. Thyroid testing strategies. In: The Immunoassay Handbook, Editorial Stockton Press (David Wild editor) pp. 344.

Wilde, C. (1994). Subject preparation, sample collection and Handling: Amniotic fluid. In: The Immunoassay Handbook Editorial Stockton Press. (David Wild editor) pp. 254

Willi, S.M. and Moshang, T. (1991). Diagnostic dilemmas. results of screening tests for congenital hypothyroidism. *Pediatr. Clin. North. Am.* 38(3): 555-566.

Winter, G., Griffiths, A.D. Hawkins, R.E. Hoogenboon, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu.Rev.Immunol.* 12: 433-355.

Wright, A., Shin, S. and Morrison, S.L. (1992). Genetically engineered antibodies: Progress and Prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12(3-4):125-168

Yoshida, K., Sakurada, T., Takahashi, T., Furuhashi, N., Kaise, K. and Yoshinaga, K. (1986). Measurement of TSH in human amniotic fluid: Diagnosis of fetal thyroid abnormality in utero. *Clin. Endocrinol.* 25: 313-318.

Apéndice de Amortiguadores

1) PBS 1X

Se disolvieron 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.24 g de KH_2PO_4 en 800 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.2 y se aforó a 1 l.

2) 100 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9.6

Se pesaron 0.840 g de NaHCO_3 y se aforó a 100 ml. Se pesó 1.059 g de Na_2CO_3 y se aforó a 100 ml. Se colocó en hielo la solución de NaHCO_3 y se ajustó el pH a 9.6 con la solución Na_2CO_3 .

3) 100 mM Citrato/Ac. cítrico pH 6.0

Se pesaron 10.50 g de ácido cítrico monohidratado y se disolvieron en 500 ml de agua destilada. Se pesaron 14.70 g de citrato de sodio dihidratado y se disolvieron en 500 ml de agua. Se tomaron 200 ml de la solución de citrato de sodio y se ajustó el pH a 6.0 con ácido cítrico.

4) 50 mM Acido Cítrico pH 4.0

Se pesaron 4.8 g de ácido cítrico y se disolvió en 400 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 4.0. Se aforó a 500 ml y guardó en refrigeración.

5) 1M Tris/HCl pH 7.2; 7.5; 8.0; y 8.9

Para preparar cada una de éstas soluciones con diferente pH, se pesaron 121.14 g de Tris-(hidroxi)-aminometano base y se disolvieron en 800 ml de agua destilada. Se ajustó al pH deseado con HCl concentrado y luego se aforó a 1 l

6) 100 mM buffer fosfatos pH 6.8

Se adicionaron 49 ml de 0.2 M Na_2HPO_4 y 51 ml de NaH_2PO_4 y se aforaron a 200 ml con agua destilada.

7) 100 mM Acido Acético glacial

Se adicionó 1 ml de ácido acético glacial a 173 ml de agua destilada.

8) 10X de Tris/NaCl/MgSO₄/Tween (solución de lavado para ELISA)

Se pesaron 87.66 g de NaCl (1.5 M), 48.14 g de MgSO₄ (400 mM) y se disolvieron en 500 mM Tris/HCl pH 8.0. Se aforó a 1 l con el mismo buffer y se filtró por 0.2 µm. Por cada litro de solución de lavado 1X se adicionaron 500 µl de Tween 20. Esta solución se guardó a 4°C.

9) Solución para incubación de anticuerpos en ELISA

Tris/Gelatina/NaCl/Tween: Para cada 100 ml de buffer 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 500 mM NaCl se disolvieron 10 mg de gelatina (0.1 mg/ml) con ayuda de un ligero calentamiento; cuando esta solución alcanzó la temperatura ambiente se adicionaron 50 µl de Tween 20. Esta solución se guardó a 4°C.

Apéndice de soluciones de bloqueo

1) Solución Blotto/Tween para slot blot

5% leche en polvo descremada, 0.2% de tween 20 y 0.02% azida de sodio disueltos en PBS.

2) Solución Gelatina/Tween para ELISA

0.5% de gelatina, 0.2% Tween 20 disueltos en 50 mM Tris/HCl pH 8.0

Apéndice de cultivo

1) Medio DMEM (con glucosa y L-glutamina sin bicarbonato de sodio pH 7.0)

Se disolvió en el contenido de un frasco en 1 l de agua destilada estéril se adicionaron 3.7 g de bicarbonato de sodio y se ajustó el pH a 7.0

burbujeando CO₂. Se esterilizó por filtración y se alicuoteó, se protegió de la luz y se guardó a 4 °C (como indica el fabricante)

2) Suero fetal bovino

El suero fue descomplemento antes de se usado durante 45 min a 58 °C y luego fue alicuoteado en volúmenes de 100 ml. Se guardaron a -20 °C hasta antes de usarlos.

3) Solución OPI 100X

Se pesaron 0.15 g de oxalacetato, 50 mg ácido pirúvico y adicionaron 200 unidades internacionales de insulina, se disolvieron en 10 ml de agua destilada esteril, la solución se esterilizó por filtración. Se alicuoteó y se guardaron a -20°C (Harlow and Lane, 1988).

4) Solución de L-Glutamina 100X

Se prepararon 10 ml de 200 mM de L-glutamina con agua destilada estéril, la solución se esterilizó por filtración. Se alicuoteó y se guardaron a -20°C (Liddell and Cryer, 1991).

5) Suplemento HAT 100X

Se disolvió un frasco de HAT 50X (hipoxantina 5×10^{-3} M; aminopterina 2×10^{-5} M y timidina 8×10^{-4} M) en la mitad del volumen recomendado. Se alicuoteó, protegió de la luz y se guardó a 4°C.

6) Suplemento Aminopterina 100X

Se disolvió un frasco de Aminopterina 50X (2×10^{-5} M) en la mitad del volumen recomendado. Se alicuoteó, se protegió y se guardó a 4°C.

7) Solución Gentamicina

Una solución de gentamicina 80 mg/ml fue esterilizada por filtración, se alicuoteó y se guardó a 4°C.

8) Medio de cultivo para células de mieloma, linfocitos T y B.

20% de SFB en medio DMEM

9) Medio de cultivo selectivo para hibridomas

20% de SFB, 1X de OPI, 1X L-glutamina, 1X HAT en medio DMEM.

La adición de 1X de aminopterina y 25 µg/ml de gentamicina fue opcional de acuerdo a las circunstancias. Inicialmente la concentración de suero fetal bovino fue de 20% pero se bajó gradualmente hasta 10% (esto se hizo tanto para el medio 8 como el 9 de esta apéndice).

10) Polietilenglico 50%

Para las fusiones se utilizó PEG de un peso molecular de 3000-3700. Un frasco de 5 g de Polietilenglicol se autoclaveó por 5 min a 121 °C y luego se adicionó 5 ml de medio DMEM (como indica el fabricante). Se alicuoteó y se guardó a 4°C.