

## Obtención y empleo de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico de enfermedades metabólicas congénitas en neonatos

Morejón-García G<sup>1</sup>, Feal-Carballo S<sup>1</sup>, García-de la Rosa I<sup>1</sup>, Quintana-Guerra JM<sup>1</sup>, González-Reyes EC<sup>1</sup>, Castells-Martínez E<sup>1</sup>, Pérez-Moras PL<sup>1</sup>, Hernández-Pérez L<sup>1</sup>, Lafita-Delfino Y<sup>1</sup>, Pupo Infante M<sup>1</sup>, Rubio-Torres A<sup>2</sup>, Stable-Vernier IC<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Inmunoensayo (CIE); <sup>2</sup> Centro para la Biotecnología y Bioingeniería, Universidad de Chile; <sup>3</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba y Santiago de Chile, Chile.

**Email:** [greilys.morejon@cie.cu](mailto:greilys.morejon@cie.cu); [sadys.feal@cie.cu](mailto:sadys.feal@cie.cu)

### RESUMEN

La mayoría de los errores congénitos del metabolismo y las endocrinopatías, causas de mortalidad infantil, no producen síntomas clínicos al momento del nacimiento pero sí biomarcadores elevados que posibilitan su detección temprana mediante programas de pesquisa neonatal (PN). La hiperplasia adrenal congénita (HAC) se caracteriza por crisis de pérdida de sales, virilización de genitales externos en hembras, crecimiento acelerado y retardo de la pubertad. La incidencia global de la forma clásica es de 1:15 000 neonatos vivos. Los resultados más relevantes fueron para TSH de siete híbridos específicos donde se obtuvieron 13 hibridomas secretores de IgG1 con constantes de afinidad de  $3 \times 10^7$ - $8,5 \times 10^9$  L/mol. Para 17OHP de cuatro híbridos específicos se obtuvieron 15 líneas secretoras de IgG1 e IgG2b con afinidad de  $1,07$ - $4,02 \times 10^9$  L/mol. Para tripsina se obtuvieron dos líneas secretoras de IgG1 con valores de afinidad de  $3,98 \times 10^9$  y  $8,14 \times 10^9$  L/mol. La mayoría de los AcMs anti-17OHP funcionaron en la fase sólida del ensayo UMELISA<sup>®</sup>. De 123 niños negativos a HAC, dos tuvieron resultados superiores al nivel de corte del programa (55 nmol/L) cuando se empleó el AcM. El AcM anti-tripsina 4C9E11 mostró una leve RC y reconoce un epítipo diferente al del 4C9C9. El UMELISA<sup>®</sup> sándwich diseñado cuantificó la tripsina con una exactitud satisfactoria demostrando la potencialidad de los AcMs para la normalización de un ensayo de PN de FQ. Finalmente se

obtuvieron AcMs específicos a TSH, 17-OHP y tripsina humana de utilidad en ensayos UMELISA® para el diagnóstico de HC, HAC y FQ, respectivamente.

**Palabras clave:** Anticuerpos monoclonales, TSH, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, tripsina humana, hipotiroidismo congénito, hiperplasia adrenal congénita, fibrosis quística, diagnóstico neonatal.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los errores congénitos del metabolismo y las endocrinopatías, causas de mortalidad infantil, no producen síntomas clínicos al momento del nacimiento pero sí biomarcadores elevados que posibilitan su detección temprana mediante programas de pesquisa neonatal (PN).

El hipotiroidismo congénito (HC), principal causa de retraso mental tratable, tiene una incidencia mundial de 1:3 000 a 1:4 000. Ocasionada por la ausencia anatómica o funcional de la tiroides genera un incremento en sangre de tirotrópina (TSH, del inglés *thyroid-stimulating hormone*). En Cuba se pesquisa con el UMELISA® TSH NEONATAL, ensayo de captura que utiliza placas de ultramicroELISA (UMELISA) recubiertas con anticuerpos monoclonales (AcMs) específicos contra la subunidad  $\beta$  de la TSH<sup>1</sup>. Se precisa generar AcMs con mayor afinidad y especificidad por la hormona para mejorar dicho diagnosticador.

La hiperplasia adrenal congénita (HAC) se caracteriza por crisis de pérdida de sales, virilización de genitales externos en hembras, crecimiento acelerado y retardo de la pubertad. La incidencia global de la forma clásica es de 1:15 000 neonatos vivos. Ocasionada por la deficiencia de una de las enzimas de la esteroidogénesis del cortisol, genera acumulación de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17-OHP). En Cuba se pesquisa con el UMELISA® 17OH Progesterona NEONATAL, ensayo competitivo para la medición de 17-OHP mediante la utilización de anticuerpos policlonales (AcPs) específicos de conejo en la fase sólida<sup>2</sup>. La obtención de AcMs anti-17-OHP específicos permitiría mejorar el proceso productivo y el desempeño del estuche en comparación con los antisueros convencionales.

La fibrosis quística (FQ) se origina por mutaciones en el gen codificante para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ. Su función reducida o ausente provoca complicaciones multisistémicas. El reflujo de las enzimas pancreáticas al torrente sanguíneo incrementa los niveles de tripsina humana, principal marcador diagnóstico. En Cuba, la FQ presenta una incidencia superior a 1:9 000 neonatos vivos<sup>3</sup> pero no se dispone de AcMs para normalizar un ensayo UMELISA<sup>®</sup> de PN.

## OBJETIVO

*General:* Obtener AcMs específicos a TSH, 17-OHP y tripsina humana útiles en ensayos UMELISA<sup>®</sup> para el diagnóstico de HC, HAC y FQ, respectivamente. *Específicos:*

- Obtener AcMs específicos a TSH, 17-OHP y tripsina humana.
- Determinar la reactividad cruzada (RC) de los AcMs frente a biomoléculas relacionadas estructural y funcionalmente con TSH, 17-OHP y tripsina.
- Evaluar los AcMs en las fases sólida y líquida de los ensayos.
- Estudiar el reconocimiento de epítomos por los AcMs.
- Evaluar preliminarmente los AcMs en ensayos UMELISA<sup>®</sup> para muestras de sangre seca sobre papel de filtro (SSPF).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos y biológicos: Del CIE (Cuba) se obtuvieron ratones BALB/c, tripsinógeno humano, 17-OHP-3-(O-carboximetil) oxima-albúmina sérica bovina (17-OHP-BSA), anti-IgG de ratón (obtenida en carnero) y conjugados 17-OHP-fosfatasa alcalina (FA) y anti-IgG de ratón (obtenida en carnero)-FA. SIGMA (E.U.A.) proporcionó adyuvantes completo e incompleto de Freund (ACF y AIF), medio de cultivo (DMEM/F-12) y sus suplementos HT (hipoxantina-timidina) y HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina), L-glutamina, penicilina-estreptomina, polietilenglicol-dimetilsulfóxido (PEG-DMSO), PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonylfluoride*) y reactivos químicos para preparación de soluciones. Scripps<sup>®</sup>, Athens Research<sup>®</sup>, Gibco<sup>®</sup> y Calbiochem<sup>®</sup> (E.U.A.) suministraron TSH, tripsina humana, suero fetal bovino (SFB) y sistema *Hybridoma Subisotyping Kit, Mouse*, respectivamente.

Equipamiento y accesorios: Lavador automático de placas MW-2001, lector de placas PR-521, ponchador y juego de reactivos y placas UMELISA<sup>®</sup> (Tecnosuma Internacional S.A., Cuba).

Inmunización de ratones BALB/c: Un grupo de ratones se inmunizó subcutáneamente con 50 µg de TSH en ACF, seguido de tres reinmunizaciones intraperitoneales de igual dosis en AIF; se midió la respuesta inmune (RI) mediante un UMELISA<sup>®</sup> indirecto y se administró una última dosis de refuerzo. Otro grupo fue inmunizado intraperitonealmente con 50 µg de 17-OHP-BSA, primero en ACF y una semana después en AIF. Después de determinar la RI por un UMELISA<sup>®</sup> de captura, el animal mejor respondedor recibió tres dosis consecutivas de 400 µg del inmunógeno en AIF. Se reevaluó la respuesta y se aplicó una dosis final de 400 µg de 17-OHP-BSA. En otro grupo se aplicaron tres dosis de 100 µg de tripsinógeno humano por vía intraperitoneal, primero en ACF y el resto en AIF con intervalos de 21 días. Se evaluó la RI mediante un UMELISA<sup>®</sup> indirecto y se aplicó una dosis final de refuerzo.

Sensibilización de placas para los ensayos UMELISA<sup>®</sup>: Para los ensayos indirectos se recubrieron placas con 15-17 µL/pozo de TSH a 0,8 µg/mL en disolución carbonato-bicarbonato pH 9,6 (CB) y con tripsina humana a 2 µg/mL en PBS (del inglés *phosphate buffered saline solution*), estabilizada con 0,5 mmol/L del inhibidor PMSF. Las placas se incubaron en cámara húmeda por 18 h entre 2-8 °C y por 4 h a temperatura ambiente (TA, 20-25 °C), respectivamente. Para el ensayo de captura se sensibilizaron placas con 10 µg/mL de anti-IgG de ratón en CB, 18 h entre 2-8 °C.

Luego se aspiró la disolución de recubrimiento y se lavó con 28-30 µL por pocillo de PBS-Tween<sup>®</sup> 20. Se añadieron 15 µL por pozo de disolución de bloqueo (BSA 14,5 µmol/L, sacarosa 0,15 mol/L, Tween<sup>®</sup> 20 0,45 mmol/L) y se incubó 1 h a TA. Se aspiró la disolución de bloqueo y se secaron las placas por 2 h a 37 °C. Las placas se conservaron entre 2-8 °C selladas junto con una bolsa de sílice gel como desecante. Evaluación de anticuerpos: Las muestras (suero de ratón, sobrenadante de cultivo, ascitis, AcM purificado) se añadieron por duplicado a las placas (10 µL/pozo). La incubación en cámara húmeda fue de 2 h a 37 °C para los UMELISA<sup>®</sup> indirectos y 1 h a 37 °C para el de captura. Las muestras se aspiraron y se lavaron cuatro veces las placas con disolución de lavado ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>-HCl 0,37 mmol/L, NaCl 3,76 mol/L, NaN<sub>3</sub>

0,769 mol/L, Tween-20 1,1 mmol/L, pH 7,8), a razón de 28-30  $\mu$ L/pozo, en el lavador. Seguidamente, para los ensayos indirectos se adicionaron 10  $\mu$ L/pozo de conjugado anti-IgG de ratón-FA y se incubaron las placas por 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Para el ensayo de captura se aplicaron 10  $\mu$ L/pozo del conjugado 17-OHP-FA y se incubó por 1 h a TA. Se repitió el lavado, se aplicaron 10  $\mu$ L/pozo del sustrato 4-metilumbeliferil fosfato (5 mmol/L) y las placas se incubaron durante 30 min a TA en cámara húmeda para el revelado de la reacción. Finalmente, se detectó la señal de fluorescencia con el lector de placas.

Generación y producción de AcMs: Se aplicó la tecnología del hibridoma con algunas modificaciones. Los esplenocitos se mezclaron con células de mieloma murino (P3/X63-Ag8) en proporción 10:1 en presencia de PEG–DMSO. Los híbridos que crecieron en el medio selectivo HAT con 10% de SFB (v/v) se evaluaron para la presencia de anticuerpos específicos mediante los ensayos UMELISA<sup>®</sup> descritos anteriormente. Los cultivos con señales de fluorescencia superiores a 150 unidades se clonaron repetidamente mediante dilución limitante y fueron ensayados con el sistema *Hybridoma Subisotyping Kit, Mouse* para clasificar las inmunoglobulinas. La producción *in vitro* e *in vivo* de los AcMs y la purificación a partir de ascitis se realizó según Baluja y colaboradores<sup>4</sup>.

Caracterización de los AcMs: Para determinar la constante de afinidad se procedió según Baluja y colaboradores<sup>4</sup> con un UMELISA<sup>®</sup> indirecto que implicó el recubrimiento de placas de poliestireno con cuatro concentraciones de TSH, 17-OHP-BSA y tripsina humana y la preparación de 11 diluciones dobles seriadas para cada anticuerpo.

Se evaluaron sustancias con homología estructural o funcional que pueden interferir en los neonatos. Con los AcMs en la fase sólida de los ensayos UMELISA<sup>®</sup> se evaluaron controles de dichos marcadores preparados en las mismas condiciones que las moléculas en estudio, excepto para tripsina humana donde se evaluaron los AcMs mediante un ensayo indirecto con placas recubiertas con las sustancias homólogas en las mismas condiciones descritas para la tripsina humana.

Para determinar el reconocimiento de epítomos de la TSH se realizó un ensayo de inhibición entre los nuevos AcMs y los que se utilizaban en la fase sólida del ensayo UMELISA® TSH NEONATAL según lo planteado por Baluja y colaboradores<sup>4</sup>. El reconocimiento de epítomos de la tripsina se realizó mediante un ensayo de competencia descrito por Stable<sup>5</sup>.

Evaluación de los AcMs en la fase sólida de los ensayos UMELISA®: Se evaluaron calibradores de 0 a 48 mUI/L de TSH con placas recubiertas con los AcMs específicos según lo descrito por Frómeta<sup>1</sup>.

Se recubrieron placas con los AcMs anti-17OHP a 2-6 µg/mL en CB, 18 h a TA, luego se procedió según lo antes descrito. Para la inmovilización indirecta, a placas sensibilizadas con 10 µg/mL de anti-IgG de ratón, después del lavado se les añadió disolución de bloqueo que contenía los AcMs (0,1-0,4 µg/mL) y se incubó por 1 h a TA. Finalmente se procedió según lo antes descrito. Con el AcM 6E2G9 se midieron las concentraciones de 17OHP en muestras de SSPF según el protocolo propuesto por González y colaboradores<sup>2</sup>. Se evaluaron 123 muestras de neonatos cubanos, con el AcM en la fase sólida a 2 µg/mL y mediante inmovilización indirecta a 0,2 µg/mL. Para comparar con el ensayo UMELISA® 17OH Progesterona NEONATAL se analizó la media, la mediana, la varianza y los percentiles 98, 99 y 99,5 de la distribución.

Según el procedimiento planteado por Stable<sup>5</sup> se diseñó un ensayo UMELISA® sándwich para tripsina con placas recubiertas con 8 µg/mL del AcM 4C9C9 y el 4C9E11 conjugado a FA para el revelado. A partir de una curva de calibración preparada con tripsina humana en el intervalo de 0-500 ng/mL se cuantificaron controles de SSPF procedentes del CDC (del inglés, *Center for Disease Control and Prevention*).

## RESULTADOS

Para TSH de siete híbridos específicos se obtuvieron 13 hibridomas secretores de IgG1 con constantes de afinidad de  $3 \times 10^7$ - $8,5 \times 10^9$  L/mol. Para 17OHP de cuatro híbridos específicos se obtuvieron 15 líneas secretoras de IgG1 e IgG2b con afinidad de  $1,07$ - $4,02 \times 10^9$  L/mol. Para tripsina se obtuvieron dos líneas secretoras de IgG1 con valores de afinidad de  $3,98 \times 10^9$  y  $8,14 \times 10^9$  L/mol.

De los AcMs anti-TSH el 1A4D10 reconoció la subunidad  $\alpha$ , común para todas las hormonas glicoproteicas. El 10B12C7 reconoció la interfase  $\alpha$ - $\beta$  de la TSH. Los demás eran afines por la cadena  $\beta$ , de ellos el 7G11E3 reconoció bajas concentraciones de la hormona en solución y mostró 100 % de inhibición con los AcMs 4A2A8 y 2C1G10 de la fase sólida de los ensayos UMELISA<sup>®</sup> TSH demostrando su capacidad de reemplazarlos eficientemente.

La mayoría de los AcMs anti-17OHP funcionaron en la fase sólida del ensayo UMELISA<sup>®</sup> 17OH Progesterona NEONATAL directamente entre 2-4  $\mu$ g/mL y en inmovilización indirecta a 0,2 o 0,4  $\mu$ g/mL. Los AcMs de la familia 6E2 mostraron valores de RC menores de 3 % comparables con los del antisuero utilizado en el ensayo UMELISA<sup>®</sup>. Con el AcM 6E2G9 se evaluaron muestras de SSPF de neonatos prematuros, enfermos, con estrés de parto o provenientes de partos múltiples. En estas condiciones pueden aumentar los falsos positivos (FP) debido a la elevada síntesis de esteroides hidrosolubles que pueden interferir en los ensayos de pesquisa. De 123 niños negativos a HAC, dos tuvieron resultados superiores al nivel de corte del programa (55 nmol/L) cuando se empleó el AcM, siendo seis veces menor el porcentaje de FP con respecto al ensayo control probando la sustitución eficiente del antisuero de conejo por el 6E2G9 en el UMELISA<sup>®</sup>.

El AcM anti-tripsina 4C9E11 mostró una leve RC y reconoce un epítipo diferente al del 4C9C9. El UMELISA<sup>®</sup> sándwich diseñado cuantificó la tripsina con una exactitud satisfactoria demostrando la potencialidad de los AcMs para la normalización de un ensayo de PN de FQ.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron AcMs específicos a TSH, 17-OHP y tripsina humana de utilidad en ensayos UMELISA<sup>®</sup> para el diagnóstico de HC, HAC y FQ, respectivamente.

## RECOMENDACIONES

Continuar con la evaluación y normalización de los ensayos UMELISA<sup>®</sup> con los nuevos AcMs.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Frómeta A. Desarrollo y utilización de un ultramicroELISA para medir la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) en manchas de sangre seca colectadas en papel de filtro [tesis]. Universidad de la Habana; 2000.
2. González EC, Marrero N, Pérez PL, Frómeta A, Zulueta O, Herrera D et al. An enzyme immunoassay for determining  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone in dried blood spots on filter paper using an ultramicro analytical system. Clin Chim Acta 2008; 394:63-6.
3. González JA, Abreu G y Rodríguez F. Reseña histórica de la fibrosis quística y su estudio y tratamiento en Cuba. Rev Cubana Pediatr 2014; 86(4):535-40.
4. Baluja I, Brito A, Amores I y Acosta C. Production and characterization of specific monoclonal antibodies of the human thyroid stimulating hormone. Hybridoma 2000; 19(4):335-8.
5. Stable I. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra la tripsina humana [tesis]. Universidad de la Habana; 2016.