



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y  
EXPERIMENTAL  
CATEDRA BIOLOGÍA MOLECULAR**



**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD BETA DE LA  
HORMONA ESTIMULADORA DE LA TIROIDES ( $\beta$ TSH)**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autor (a):** Christenia Akelyx Pereira Diaz

**Tutor:** Dr. José David Rosales

**Co-tutor:** Msc. William Quintero

Mérida, Agosto de 2019



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y  
EXPERIMENTAL  
CATEDRA: BIOLOGÍA MOLECULAR**



**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD BETA DE LA  
HORMONA ESTIMULADORA DE LA TIROIDES ( $\beta$ TSH)**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Licenciada en Bioanálisis**

**Autor (a):** Christenia Akelyx Pereira Diaz

**Tutor:** Dr. José David Rosales

**Co-tutor:** Biol. William Quintero

Mérida, Agosto de 2019

## DEDICATORIA

Han sido años, meses, días, horas, minutos y segundos en los cuales mi atención fue puesta en inmensos libros, pantallas, pizarras, microscopio, ponencias, evaluaciones, equipos, profesores, compañeros...

¡APRENDIENDO!

Y en ningún momento te apartaste de mí. Pusiste tu atención junto a la mía, observaste todo lo que hacía, y en ti estaba marcar este camino en mi vida. Tu mirada guió cada paso que di y entre caídas, golpes, tropiezos, desánimos y angustias, me sostuviste hasta aquí.

TU

Mi Dios, mi Salvador, mi Protector, mi Proveedor.

El que me dio vida y me libró de la muerte.

A Jehová Dios Todopoderoso

A su Hijo Amado

Mi Señor Jesucristo

Y

A su Santo Espíritu que me guía a donde voy.

Dedico total y absolutamente este trabajo, al final fuiste Tú quien me diste todo para hacerlo y concluirlo.

A Ti sea la Gloria, la Honra y la Alabanza

Por los siglos de los siglos

¡Amen!

## AGRADECIMINETO

A mí Padre Santo y Eterno Jehová Dios Todopoderoso,  
a mí Señor y Salvador Jesucristo Bendito y  
a Su Santo Espíritu, mí Consolador. Esto es parte de Su propósito en mí vida.

A la ilustre Universidad de los Andes, por abrir sus puertas a muchos jóvenes que pueden contar con maravillosos profesionales que aportan todo sus conocimiento para formar profesionales integrales.

Al Laboratorio de Biología Molecular y Experimental de esta casa de estudios por permitir sus espacios para poder desarrollar esta investigación.

Al Dr. José David Rosales y el Profesor William Quintero por la aceptación, compromiso, paciencia, enseñanza, dedicación, confianza y respaldo durante todo el desarrollo de este trabajo. Mil gracias.

A las profesoras Elizabeth Pérez y Carmen Zulay Labrador, por su colaboración como jurado evaluador de esta investigación y su valiosa aprobación.

A mis padres José León Londoño Quintero y Elix Herminia Díaz Monsalve, por el apoyo incondicional, la ayuda y confianza para alcanzar esta meta. Sobre todo por sembrar mí fe en el verdadero fundamento de la vida.

A mí esposo Larrys y mi bella y maravillosa hija Elienai Jhuliette, quienes son un regalo de Dios, que me dan ese momento de respiro y felicidad ante tanta adversidad y ser un motivo más para seguir adelante sin desmayar.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	pp.
VEREDICTO	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLA	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	
Antecedentes del Problema	1
El Problema	6
Enunciado holopráxico	6
Antecedentes de la Hipótesis	
Trabajos Previos	7
Antecedentes Históricos	9
Bases Teóricas	12
<i>Embriología de la glándula tiroides</i>	14
<i>Fisiología</i>	14
<i>Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH)</i>	15
<i>Hipotiroidismo Congénito</i>	17
<i>Etiología</i>	18
<i>Manifestaciones Clínicas</i>	19
<i>Pronostico</i>	20
<i>Pesquisa Neonatal</i>	22
<i>Fundamento de la prueba</i>	24
Definición Operacional de Términos	27
Operacionalización de las Variables	29
Hipótesis de la Investigación	30

Objetivos de la Investigación	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Tipo de Investigación	31
Diseño de la Investigación	31
Población y Muestra	32
Sistema de Variables	32
Instrumento de Recolección de los Datos	33
Procedimiento de la investigación	34
<i>Crecimiento Celular</i>	34
<i>Expresión de la proteína</i>	34
<i>Lisis celular</i>	35
<i>Lisis enzimática</i>	35
<i>Lisis Mecánica</i>	36
<i>Purificación de proteína por cromatografía de afinidad a metales</i>	36
<i>inmovilizados (IMAC) en condiciones nativas.</i>	
<i>Purificación de proteína por IMAC en condiciones desnaturalizantes.</i>	37
<i>Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	37
<i>Detección inmunológica de la proteína mediante Dot Blot</i>	38
<i>Ensayo de ELISA</i>	39
Diseño de Análisis	39
<b>RESULTADOS</b>	
Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína recombinante $\beta$ TSHh	40
Purificación de proteína por cromatografía de afinidad a metales	42
inmovilizados (IMAC)	
Detección inmunológica de la proteína	45
<b>DISCUSIÓN</b>	48
<b>CONCLUSIONES</b>	52
<b>REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS</b>	53

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pp.
<b>Tabla 1.</b> Valores de referencia de hormonas tiroideas en niños.	13
<b>Tabla 2.</b> Propiedades de las hormonas glicoproteicas humanas	17
<b>Tabla 3.</b> Propiedades fisicoquímicas de la $\beta$ TSH	17
<b>Tabla 4.</b> Etiología de hipotiroidismo congénito	20
<b>Tabla 5.</b> Características clínicas de hipotiroidismo congénito	21
<b>Tabla 6.</b> Descripción de cada una de las variables estudiadas	29
<b>Tabla 7.</b> Composición de los geles de poliacrilamida SDS-PAGE	38

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pp.
<b>Figura 1.</b> Papel filtro para la toma de muestra en Programas de Pesquisa Neonatal	25
<b>Figura 2.</b> Ensayo Tipo ELISA anti –TSH	25
<b>Figura 3.</b> Secuencia de la TSH frente a la familia de hormonas glicoproteicas	27
<b>Figura 4.</b> Construcción pQ30- $\beta$ TSHr	32
<b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento de E. coli TG1 en plásmido pQ30- $\beta$ TSHr en medio LB medido por turbidimetria a 600nm	40
<b>Figura 6.</b> Expresión y solubilidad de la proteína recombinante $\beta$ TSHh	41
<b>Figura 7.</b> Proceso de purificación de la $\beta$ TSH por IMAC.	43
<b>Figura 8.</b> Resultados del Dot Blot.	46
<b>Figura 9.</b> Resultados del ensayo de ELISA.	47

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
BIOLOGÍA MOLECULAR  
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD BETA DE LA  
HORMONA ESTIMULADORA DE LA TIROIDES (BTSH)**

**Autor (a):** Christenia Pereira

**Tutor:** Dr. José David Rosales

**Co-tutor:** Msc. William Quintero

**RESUMEN**

En el trabajo realizado se buscó producir la  $\beta$ TSH recombinante pura, partiendo de una proteína sintética en cepas de *Escherichia coli* (TG1), para la fabricación de un kit para pesquisa neonatal de Hipotiroidismo Congénito. Los resultados no fueron muy eficientes en cuanto a cantidad de proteína purificada, Sin embargo, se lograron evaluar las condiciones específicas para la expresión y purificación de esta proteína y corroborar estudios recientes realizados con proteínas de fusión. Por otra parte, se constató que la proteína recombinante conserva su solubilidad durante la expresión y purificación, siempre que se aplique lisis enzimática para la disrupción celular. Dado que con la sonicación la proteína se degrada o forma enlaces con la membrana. De igual modo, la  $\beta$ TSH humana sintética conserva sus propiedades antigénicas similares a la forma natural. Lo que significa que es altamente confiable para hacer diagnóstico con dicha proteína a partir de anticuerpos policlonales en animales.

**Palabras clave:** Hipotiroidismo congénito, pesquisa neonatal,  $\beta$ TSH recombinante, anticuerpos policlonales.

# INTRODUCCIÓN

## Antecedentes del Problema

En los últimos años, el diagnóstico de enfermedad tiroidea ha podido realizarse en forma más confiable y segura dada la aparición de métodos más sensibles para la determinación de hormonas tiroideas, en particular de la Hormona Estimuladora de la Tiroides (TSH) y de anticuerpos antitiroideos. La importancia de detectar precozmente la existencia de enfermedad tiroidea radica en evitar la aparición de complicaciones. Un ejemplo conocido lo compone el Hipotiroidismo Congénito (HC), que constituye un grave problema de salud pública, cuya atención requiere de una detección neonatal precoz (antes del mes de vida), a fin de prevenir una de las endocrinopatías que reviste especial importancia durante la edad temprana de la vida, debido a su asociación directa con el retraso mental (cretinismo), como consecuencia de su pronóstico tardío.<sup>1</sup> Por ello la diagnosis temprana del HC se enfatiza como una verdadera emergencia médica y permite aplicar un tratamiento de sustitución oportuna para que el niño pueda crecer y desarrollarse normalmente.

Si bien es cierto, la producción y secreción de Hormonas Tiroideas (HT) está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis- tiroides (HHT). El eje fetal es funcional al final de primer trimestre del embarazo. Durante el primer trimestre, el desarrollo neurológico del feto dependerá de adecuadas concentraciones de Triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) maternas, las que traspasan la placenta y protegen al feto de hipotiroidismo. El hipotálamo secreta la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) que estimula a los tirotrópos hipofisarios para que secreten TSH. Ésta estimula el crecimiento tiroideo, la síntesis y secreción fundamentalmente de T4, la que se convierte en su forma biológicamente más activa, la T3,<sup>2,3</sup> las cuales son esenciales para el correcto desarrollo, diferenciación y función de prácticamente todos los sistemas del organismo, regulando el metabolismo celular e interviniendo críticamente en el desarrollo del cerebro tanto en el período embrionario como en el fetal y postnatal.

El HC es producido por la deficiencia de yodo debido a la ausencia de glándula tiroidea o falla funcional de las HT (T3 y T4) durante la vida fetal y los tres primeros meses de vida. Si se desarrolla un hipotiroidismo en la etapa fetal se afecta el sistema nervioso central y el desarrollo esquelético; pero la mayoría de los Recién Nacidos (RN) parecen normales debido a la protección relativa producida por el pasaje transplacentario de HT maternas.<sup>4</sup> La falta de hormonas tiroideas produce en el sistema nervioso central un retardo en la arborización dendrítica, reducción del tamaño absoluto del cerebro y cerebelo, disminución de la capacidad de migración y proliferación de las células gliales, retraso en la mielinización, deficiencia en la conducción axonal, atrofia de las circunvoluciones, vascularización, migración neuronal, retraso psiconeurológico y maduración de las conexiones interneuronales, que se traduce en lesiones irreversibles del tejido neuronal, siendo esto la causa del retardo mental y otras alteraciones neurológicas. A nivel sistémico interfiere con todos los procesos metabólicos y de maduración del organismo sobre todo en el tejido óseo y por tanto en el crecimiento.<sup>5</sup>

La Pesquisa Neonatal (PNN) también conocido como tamiz neonatal, cribado (screening) o tamizaje (triagem) metabólico, es un camino completamente establecido para identificar, entre miembros de una población, como es la de RN, aquellos posiblemente afectados por una enfermedad específica antes del desarrollo de signos clínicos de la afección.<sup>6</sup> Los términos pesquisa y diagnóstico implican conceptos diferentes: pesquisa es “la detección en una población de individuos probablemente sanos (con métodos sencillos y aceptables para la población) de individuos probablemente enfermos”. Diagnóstico es “la caracterización de la enfermedad con miras a efectuar un tratamiento”. De esto se deduce que los niños seleccionados por un determinado método de pesquisa deben ser sometidos posteriormente a procedimientos diagnósticos específicos que permitan confirmar la enfermedad.<sup>7</sup> En un programa de PNN, los RN deben ser sometidos a la evaluación inicial, para realizar luego los estudios de confirmación en los casos que resulten positivos.<sup>1,4</sup>

El objetivo final de los programas de tamizaje es lograr el óptimo desarrollo neurológico de los RN. Gracias a estos programas los estudios actuales coinciden en que el retraso mental ha sido exponencialmente eliminado y se ha encontrado una mejoría significativa del funcionamiento intelectual de los niños. Al analizar la relación costo efectividad de realizar tamizaje de HC, se ha determinado que los programas representan un ahorro económico neto para la sociedad. Para calcular, se consideran factores tales como los costos asociados a la discapacidad intelectual, la expectativa de vida de la población, los costos del programa y del tratamiento a largo plazo. El programa previene en forma sustancial la discapacidad intelectual secundaria a HC, por lo que el programa justifica su búsqueda masiva.<sup>2,8</sup>

Uno de los métodos primarios comúnmente aceptados para el diagnóstico de HC es la determinación de la concentración de la TSH en el suero, debido a que los niveles de TSH tienden a aumentar por la ausencia de T4. La sensibilidad de esta prueba puede ser aproximadamente del 95%, y la especificidad puede ser de aproximadamente 90%.<sup>8</sup> Existen una amplia variedad de sistemas de diagnóstico de TSH usados en el Pesquisaje Neonatal, estos usan anticuerpos monoclonales (AcM) o policlonales (AcP) para captar la TSH circulante en el suero y posteriormente cuantifican los niveles de la hormona.<sup>9</sup>

Los anticuerpos usados para determinar la TSH deben ser específicos contra la subunidad  $\beta$ -TSH, ya que esta hormona está químicamente relacionada con las gonadotropinas hipofisarias: la Lutropina (LH) y la Folitropina (FSH) así como también la Gonadotropina Cariónica (CG) predominantemente de origen placentario.<sup>10</sup> Éstas hormonas forman parte del grupo de hormonas glicoproteicas compuestas por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad alfa es común a las tres hormonas, mientras que la subunidad beta es única e independiente para cada péptido. La subunidad beta de la TSH es la que le confiere la respectiva especificidad biológica a la molécula para la unión al receptor y permite su determinación inmunológica en suero.<sup>10,11,12</sup> He aquí la importancia de producir anticuerpos específicos contra la subunidad  $\beta$  y diseñar un sistema de diagnóstico que sea más sensible y permita confirmar los resultados obtenidos en el barrido de la población.<sup>13</sup>

El método usual para producir anticuerpos policlonales experimentalmente consiste en la inoculación de animales con preparaciones purificadas o parcialmente purificadas de antígeno (inmunógeno).<sup>14</sup> La administración de un inmunógeno *in vivo* estimula diferentes células del sistema inmune, dando origen a una población mixta de anticuerpos derivados de un número variado de clones de linfocitos B (policlonal).<sup>14,15</sup> Los AcP son particularmente valiosos como reactivos biológicos para el estudio de proteínas, células y tejidos cuando se utilizan en técnicas muy diversas, tales como: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia e inmunotransferencia<sup>15</sup>. La obtención de  $\beta$ TSH con un alto grado de pureza reviste gran importancia para la confección de estándares e inmunización de animales, de los cuales se obtienen los anticuerpos policlonales (AcP) y monoclonales (AcM) utilizados en los inmunoensayos<sup>11</sup> para la determinación de esta hormona.

Dada la robusta capacidad actual para clonar y expresar cualquier gen foráneo en un hospedero heterólogo mediante la implementación de la biología molecular, es posible producir casi cualquier proteína pura en cantidades abundantes<sup>16</sup>. El sistema de expresión y producción de proteínas recombinantes en cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), han permitido hacer uso de herramientas importantes para la purificación de dichas proteínas.<sup>13</sup>

En efecto, las etiquetas de afinidad (tag) permiten purificar proteínas recombinantes considerablemente a partir de extractos crudos, empleando protocolos generalizados, lo cual contrasta con los procesos asociados a las cromatografías convencionales.<sup>17</sup> La forma más común de las tag son la de polihistidina, consistente típicamente en seis residuos de histidinas (6xHis) que selectivamente se unen a metales de transición, tales como  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ , en un proceso denominado Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados o IMAC por sus siglas en inglés (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*).<sup>18</sup> Este sistema proporciona un número de ventajas significativas que no están disponibles en otros métodos de cromatografía de afinidad a etiquetas.

Cabe señalar que la información sobre la purificación de la  $\beta$ TSH es escasa. Sin embargo, los dos trabajos previos citados afirman que para expresar, producir y purificar dicha proteína es necesario diseñar una fusión con quimeras que aumenten la solubilidad y el peso molecular, debido a que la subunidad  $\beta$  es una glicoproteína de bajo peso molecular (18 kDa)<sup>10</sup>, lo que implica mayor complejidad en su purificación. No obstante, en este trabajo se decidió evaluar las condiciones de expresión, producción y purificación de la proteína básica, con el fin de identificar los parámetros que influyen sobre el proceso de obtención de la proteína pura y estandarizar las condiciones del método empleado.

Por consiguiente, el trabajo realizado consistió en purificar la proteína, mediante el método IMAC, a partir de cultivos de la cepa de *E. coli* TG1, con plásmidos construidos con un gen sintético de  $\beta$ TSH humano (pQ30-  $\beta$ TSHr) fusionada a una tag (6xHis). De manera que se disponga de dicha proteína, con un alto grado de pureza, para su posterior uso como inmunógeno en la producción de anticuerpos policlonales y el desarrollo del kit de Pesquisa Neonatal que respalde el Programa de Detección Precoz de Hipotiroidismo Congénito a nivel nacional.

Actualmente en Venezuela, estos programas se desarrollan con enzimas, antígenos y anticuerpos contra la subunidad  $\beta$ -TSH que contienen los kits comerciales importados. El tiempo de llegada de los productos, métodos de almacenamiento y el transporte pueden disminuir el tiempo de vida útil de los sistemas, e incluso llegar sin actividad. El alto costo generado en la compra de estos insumos y los demás problemas mencionados impulsan a plantear la producción de sistemas de diagnóstico propios, que permitan cuantificar el nivel de TSH en las muestras de RN, determinando a tiempo el HC y evitando que los pacientes desarrollen retardo mental u otro tipo de enfermedades, mediante el control y seguimiento de los mismos, y con las consecuentes ventajas económicas.

## **El Problema**

### ***Enunciado Holopráxico***

El desarrollo de la investigación dio respuesta al problema de investigación formulado a través de las siguientes preguntas:

¿Cómo será la efectividad de la expresión y purificación de la subunidad beta de la Hormona Estimuladora de la Tiroides ( $\beta$ TSH) desarrollada en el Laboratorio de Biología Molecular y Experimental (LABIOMEX) de la Universidad de los Andes de la Facultad de Ciencias, durante el periodo marzo-junio del 2019?

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Antecedentes de la Hipótesis

### Trabajos Previos

- **Mohammadzade H. et al. Clonación, expresión y purificación de la subunidad beta de la proteína TSH humana recombinante y evaluación de su antigenicidad (2017).**

Mohammadzade H. et al.<sup>19</sup> realizaron una construcción a partir del plásmido pET32a y lo expresaron en la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli*, que contenía la  $\beta$ TSH. La expresión se indujo a las 2, 4 y 6 horas de incubación en medio Luria-Bertini a OD<sub>600nm</sub> 0,4 a 1 mM de IPTG en 37 °C con suplemento de ampicilina y cloranfenicol. El método de purificación fue el de cromatografía de afinidad a Níquel (Qiagen). El peso de la proteína obtenida fue de 30kDa. También evaluaron la antigenicidad de la proteína contra un anticuerpo monoclonal anti-TSH de ratón utilizando la técnica de Western Blot. Los investigadores concluyeron que el gen  $\beta$ TSH se clonó y se expresó correctamente en el huésped bacteriano. Sin embargo, la expresión fue baja debido a la gran diferencia entre el codón humano dominante y el de *E. coli*, además por la formación de cuerpos de inclusión de la proteína recombinante. Los resultados de este estudio indican que la proteína  $\beta$ TSH se produce mediante un método recombinante y su antigenicidad es similar a la forma natural. Aunque la proteína recombinante es diferente de la natural en algunos aspectos, como estructura y forma espacial, la antigenicidad es aceptable, lo cual es consistente con la participación del ácido siálico y otras estructuras, de acuerdo a estudios previos. Por otra parte, los autores agregan que debido a que la proteína tiene más epítomos de TSH, se puede aplicar en kits de diagnóstico para mejorar la especificidad de estas pruebas.

- **Maysam M. et al. Eliciting an antibody response against a recombinant TSH containing fusion protein (2016).**

Los investigadores desarrollaron anticuerpos policlonales frente a una proteína de fusión con TSH recombinante. El diseño consistió en el plásmido pET32a transformado en *E. coli* BL21 (DE3), con la secuencia proteica de la subunidad beta de TSH, fusionada con un epítipo inmunodominante de la toxina del tétanos y un péptido llamado Proteína Matriz Oligomérica del Cartílago (COMP) que aumenta la solubilidad de la proteína expresada y el peso molecular de la misma (32 kDa). Esta construcción fue sintetizada para la expresión y purificación de la proteína e inmunización en conejo. Los resultados arrojaron que las mejores condiciones para la expresión y purificación de la proteína de fusión fueron crecimiento a 18 °C, con concentraciones de 1mM de IPTG, bajo condiciones desnaturalizantes. La proteína purificada de TSH se utilizó para preparar anticuerpos. Los anticuerpos producidos fueron utilizados para la detección de TSH $\beta$ . Este estudio indicó que el enfoque empleado es capaz de provocar anticuerpos específicos de TSH con suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de TSH.<sup>20</sup>

- **Echenique V. Expresión y purificación de la proteína antigénica recombinante TPP17 de *Treponema pallidum* para su utilización en el diagnóstico de sífilis (2014).**

La investigadora se enfocó en la proteína antigénica Tpp17 de *Treponema pallidum* para su posterior uso en test rápidos para el diagnóstico de sífilis. Logró en primera instancia la expresión de la proteína antigénica recombinante TPP17 en *E. coli* utilizando diferentes condiciones. En una etapa posterior se llegó a la purificación utilizando diferentes métodos cromatográficos y se cuantificó la cantidad de proteína generada mediante el método del BCA (Método del Ácido Bicinconínico) para estudiar el rendimiento. La investigadora concluyó, entre otras cosas, que en lo que se refiere a la purificación, se constata que si bien el IMAC

resulta ser un método primario eficiente, este debe ser complementado con otros métodos de purificación ya que no se logran purificaciones a homogeneidad.<sup>21</sup>

### **Antecedentes Históricos**

El tamiz neonatal, también conocido como pesquisa neonatal o tamiz metabólico, es un programa de tamizaje o pesquisa de enfermedades congénitas inaparentes surgido en 1963.<sup>22</sup> El desarrollo de Robert Guthrie y Susi, quienes descubrieron el método diagnóstico para la fenilcetonuria, mediante la recolección de una gota de sangre en papel filtro de un niño a unas horas del nacimiento con un simple ensayo de inhibición bacteriana, inició el tamizaje o pesquisa neonatal. Una década después, en 1972 en Quebec se promulga el programa para la detección de hipotiroidismo congénito.<sup>23</sup> El Dr. Guthrie adaptó la determinación de la hormona estimulante de tiroides (TSH), posibilitando en la misma muestra de sangre el diagnóstico del hipotiroidismo congénito. Seguido por el programa de Pittsburgh en 1973 y en 1974 Dussault y colaboradores, en el programa de Quebec, adaptaron el radio inmunoensayo (RIA) de T4.<sup>1,9,22,23,24</sup> Esto abrió el camino a los programas masivos de detección temprana de HC como un acto de medicina preventiva dentro de la salud pública mundial.

Sin embargo, el síndrome de hipotiroidismo congénito (HC) fue conocido antes del advenimiento del tamizaje masivo para esta enfermedad. En 1527 Paracelso fue quien describió por primera vez la relación que existe entre la ausencia de tejido tiroideo y el retraso mental<sup>1</sup>. Pero Curling en 1850 describió el primer niño con manifestaciones de HC y la ausencia de la glándula tiroides en la autopsia, mientras que Osler relacionó la deficiencia de la función tiroidea y los cambios característicos encontrados en el cretinismo esporádico. Bruchy y McCune (1944) relataron el desarrollo mental de niños hipotiroideos con tratamiento adecuado y este concepto fue ampliado por otros investigadores. Smith y colegas en 1957 revisaron 128 casos<sup>9</sup> y a principios de los años 70 Raiti y Newns (1971) y Klein y colaboradores (1972)

documentaron que el tratamiento antes de los 3 meses de edad podría evitar el retardo mental que se presenta en el cretinismo no tratado y mejorar el pronóstico para el desarrollo mental en los infantes con HC.<sup>23</sup> Ellos mostraron que ocurría un daño cerebral irreversible si el tratamiento no era iniciado antes de los 3 meses.<sup>1,9</sup> Jacobsen y Brandt habían reportado que sólo un tercio de los niños recién nacidos afectados fueron diagnosticados clínicamente antes de la edad crucial debido a la subjetividad de los signos y síntomas.<sup>1</sup> Por lo cual, la escasez de los primeros signos y síntomas en infantes con HC entorpecieron el diagnóstico primario y el tratamiento en muchos casos.<sup>9</sup>

Antes del programa de tamiz neonatal, factores como la habilidad clínica de los médicos para identificar tempranamente la deficiencia de hormonas tiroideas, así como la oportunidad con la que los padres acudían a los médicos, contribuía al diagnóstico del retraso del desarrollo psicomotor<sup>1</sup>.

Los principios de detección temprana formulados por Wilson y Jungner en 1968 auspiciados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), han sido el marco inicial establecido y usado para considerar si un programa de pesquisa neonatal es aplicable. En 1997, estos criterios fueron revisados, modificados y expandidos por Pollit y colaboradores<sup>22</sup>. Los principios de Wilson y Jungner exponen la necesidad de que las enfermedades a ser tamizadas constituyan un grave problema de salud y puedan ser detectadas precozmente; que exista un tratamiento efectivo así como métodos de diagnóstico; la población esté informada adecuadamente y acepte su inclusión al estudio y exista una favorable relación costo-efectiva y costo-beneficio<sup>24</sup>.

En América Latina, el país pionero lo constituye México en 1973 cuando inicia un proyecto para la detección temprana de fenilcetonuria. Brasil en 1976 se constituye el segundo país en aplicar el tamiz neonatal para esa patología pero es en 1992 cuando entra en vigencia el decreto ministerial (Portaria GM/MS no. 22) de la obligatoriedad de la pesquisa. A pesar del decreto pocos estados lo ejecutan y en el año de 2001 tras la ratificación de la ley Portaria GM/MS no. 822, se exige la ejecución del programa de pesquisa para todo recién nacido en el país.<sup>24</sup> Cuba inicia su programa en 1986, seguido de Chile, Colombia, Costa Rica, Uruguay y Venezuela.

En la actualidad, son pocos los países que han implementado la pesquisa como programa nacional. Existen algunas iniciativas privadas pero con una cobertura limitada. Los países pueden agruparse en seis grupos de acuerdo a la modalidad de sus programas, siendo el primer grupo el de países con mayor desarrollo y con una cobertura del 100% de la población: Cuba, Costa Rica, Chile y Uruguay. El segundo grupo: Brasil, México y Argentina; países en los que la cobertura está es en promedio del 70%. El tercer grupo: Colombia, Paraguay y Venezuela donde los programas apenas se inician a partir de 1999 y no han sido totalmente implementados. El grupo cuatro constituido por Nicaragua y Perú, donde los programas fueron institucionalizados en 2005 y la cobertura hasta el 2007 era del 6%. El grupo cinco en el que se encuentra Ecuador junto a Guatemala, República Dominicana, Bolivia y Panamá; se caracteriza por países en los que no existen programas nacionales de pesquisa neonatal liderados por el estado, sino más bien, una actividad exclusivamente privada con una cobertura de menos del 1% de la población. Finalmente, el grupo seis en el que países como El Salvador, Honduras y Haití, no tienen actividades de pesquisa neonatal ni privada ni pública.<sup>2,22,23,24</sup>

La Pesquisa Neonatal en Venezuela comienza en 1985, por iniciativa del Dr. Jorge Villegas.<sup>25</sup> La evidencia actualmente disponible, tanto sobre los efectos devastadores del Hipotiroidismo Congénito y la Fenilcetonuria Clásica, hace urgente y necesario establecer la Pesquisa Neonatal de estas dos enfermedades como práctica obligatoria de rutina para todos los Recién Nacidos de la población.<sup>26</sup>

En Venezuela desde hace algunos años el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) inició la prueba de selección masiva neonatal, pero con una cobertura de población muy baja. El índice en este país es elevado, siendo de 1:2800-3000 RN vivos.<sup>27</sup> Desde enero del año 2000 el despistaje Neonatal ha sido asumido como un Programa a desarrollar por el Ministerio de Salud y Desarrollo Social, a través de la dirección de Salud Poblacional. Se aprobó un Programa de Detección Precoz de Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria Clásica bajo la responsabilidad de la Dirección de Salud Poblacional del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, el cual entró en vigencia en Enero del año 2000. Existe una Comisión Nacional para la

detección del Hipotiroidismo Congénito creada por resolución del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social publicada en la Gaceta Oficial N° 33.595 del 11 de noviembre de 1986.<sup>28</sup> A partir de este momento es obligatorio para instituciones públicas y privadas realizar la Prueba de talón para el despistaje de al menos dos enfermedades metabólicas, Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria.<sup>26</sup> Actualmente, para el año 2019, no se encuentra activo el funcionamiento de ésta Comisión.

Durante el año 2016 la Dirección de Salud del IDEA a través de la Unidad de Errores Innatos del Metabolismo (UDEIM), amplió la capacidad de diagnóstico de enfermedades en el campo de errores innatos del metabolismo (EIM) y hemoglobinopatías a nivel nacional, mediante la Pesquisa Neonatal, alcanzando un total de 26.913 muestras recolectadas para ser analizadas en el descarte de Hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria.<sup>27</sup> En el Estado Mérida existe también el centro de Desarrollo Infantil que cuenta con programas de Tamizado bajo la dirección del Centro de Estudio y Prevención del Retardo Mental y Alteraciones en el Desarrollo (CEPREMAD)

## **Bases Teóricas**

### ***La Glándula Tiroides***

La tiroides es la primera glándula endocrina que aparece en el desarrollo embrionario; es capaz de concentrar yodo desde la décima semana y desde la duodécima inicia la síntesis y secreción, progresivamente ascendente de hormonas tiroideas bajo el estímulo creciente de TSH, a su vez regulado por la Hormona Liberadora de la Tirotropina (TRH) hipotalámica. La retroalimentación negativa de T4 sobre TSH, si bien comienza en útero, alcanza su madurez en los primeros meses posnatales.<sup>3</sup>

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides del feto se desarrolla independientemente del eje materno, ya que la placenta es impermeable a TSH y sólo parcialmente a T3 y T4. A pesar que la TRH materna puede pasar al feto, no se ha demostrado que tenga, en condiciones fisiológicas, importancia en el desarrollo de la tiroides fetal.<sup>29</sup>

Durante el primer trimestre del embarazo, el desarrollo del feto depende de T4 materna, la cual pierde importancia en el resto de la gestación. Con excepción de los niños atireóticos o con defectos importantes de la hormonogénesis, quienes dependen de la fuente materna de hormonas tiroideas. Estos niños tienen concentraciones sanguíneas de T4 en el cordón umbilical equivalentes a un 20 a 50% de lo normal.<sup>29</sup>

Las hormonas tiroideas son fundamentales en la embriogénesis y maduración fetal, particularmente en el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso. Regulan la síntesis de proteínas de la neurogénesis, migración neuronal, formación de axones y dendritas, mielinización, estructuración de sinapsis y regulación de neurotransmisores específicos. La organización neuronal y la mielinización se extienden a la vida postnatal, de modo que la hormona tiroidea es indispensable para la función intelectual, desde el segundo trimestre de gestación hasta los primeros años de vida.<sup>3,5</sup> En el neonato varían según la edad gestacional y presentan rápidas modificaciones en las primeras horas y días de nacido, por lo que al momento de interpretar los niveles de hormonas tiroideas se deben considerar estas variables (ver Tabla 1).<sup>3</sup>

**Tabla 1.** Valores de referencia de hormonas tiroideas en niños<sup>3</sup>

Edad	T4 ng/dl	T3 /ng/dL	TSH mUI/L
1-4 días	11,0-21,5	97,5-741	1,0-39
1-4 semanas	8,2-17,2	104,0-345	1,7-9,1
1-12 meses	5,9-16,3	104,0-247	0,8-8,2
1-5 años	7,3-15,0	104,0-267	0,7-5,7

### ***Embriología de la Glándula Tiroides***

El desarrollo de la glándula tiroides se inicia a partir de la cuarta semana de desarrollo embrionario y se encuentra regulado por una serie de genes.<sup>1</sup> La tiroides se origina como engrosamiento del endodermo en la pared ventral de la faringe primitiva, caudal a la región del primer arco branquial, proceso denominado “especificación”. Luego, el primordio tiroideo comienza a invadir el mesénquima circundante formando un brote que prolifera y migra desde el piso faríngeo hacia su ubicación definitiva, la porción media anterior del cuello, en la séptima semana del desarrollo. En la octava semana, se identifica un pequeño istmo, y dos lóbulos laterales. Un error en este período produce alteraciones anatómicas del tiroides, es decir, disembriogénesis o disgenesia tiroidea (aplasia, hipoplasia o ectopia tiroidea).<sup>2,3</sup>

Una vez ubicada en la porción anterior del cuello (10 a 12 semanas del desarrollo) se inicia el período de diferenciación funcional de las células foliculares y comienza la expresión de proteínas necesarias para la síntesis de hormonas tiroideas (Transportador sodio- yodo, Pendrina, Tiroglobulina, Peroxidasa tiroidea, Receptor de TSH, Oxidasas tiroideas). Una alteración de estas proteínas resulta en dishormonogénesis, es decir, alteraciones en la síntesis de hormonas tiroideas, con una tiroides de ubicación normal<sup>2</sup>.

### ***Fisiología de la producción de Hormonas Tiroideas***

La producción y secreción de hormonas tiroideas está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis- tiroides (HHT). El eje fetal es funcional al final de primer trimestre del embarazo. Durante el primer trimestre, el desarrollo neurológico del feto dependerá de adecuadas concentraciones de T3 y T4 maternas, las que traspasan la placenta y protegen al feto de hipotiroidismo. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) que estimula a los tirotrópos hipofisarios para que secreten TSH. Ésta estimula el crecimiento tiroideo, la síntesis y secreción

fundamentalmente de tiroxina (T4), la que se convierte en su forma biológicamente más activa, la T3, gracias a las deiodinasas ubicadas en los tejidos periféricos. En estos tejidos las hormonas tiroideas actúan uniéndose a receptores específicos en el DNA (TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2, TR $\beta$ 3). El hipotiroidismo puede resultar de una alteración en cualquier de estos niveles.<sup>2,3,29</sup>

Los altos niveles circulantes de las hormonas tiroideas intervienen en el interior de la hipófisis suprimiendo la síntesis y producción de la TSH mediante un mecanismo de retroalimentación, erigiéndose de esta manera en los reguladores más importantes de la TSH circulante.<sup>1</sup> Desde el hipotálamo, la hormona liberadora de la tirotropina (TRH) y la Dopamina (DA), estimula e inhibe respectivamente la secreción de la TSH. Las hormonas tiroideas e hipotalámicas interactúan para controlar tanto los niveles de la TSH en circulación como la transcripción de los genes que codifica la hormona.<sup>3</sup> La TSH asume el control de la función tiroidea al interactuar con el receptor TSH-R, lo que permite la estimulación de la vía del segundo mensajero que compromete principalmente al cAMP; en última instancia, el inositol 1,4,5-trifosfato y el diacilglicerol, son los responsables de entonar la expresión de los genes.<sup>10</sup>

### ***Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH)***

La TSH es una hormona que se sintetiza y secreta en los tirotrofos de la hipófisis anterior, la TSH está químicamente relacionada con las gonadotropinas hipofisarias: la lutropina (LH) y la folitropina (FSH) así como también la gonadotropina coriónica (CG) predominantemente de origen placentario. La TSH actúa sobre la glándula tiroidea para estimular la producción de las hormonas tiroideas T3 y T4, las cuales ejercen su efecto sobre el organismo controlando el crecimiento y una gran cantidad de procesos metabólicos.<sup>10</sup>

Los niveles circulantes de la TSH están controlados no solo por el sistema regulador de retroalimentación negativa de la hormona tiroidea sino también por neuropéptidos hipotalámicos: la TRH, la dopamina, la somatostatina, el IGF-1, entre otros. La hormona tiroidea actúa directamente sobre el tirotrofo inhibiendo la

transcripción de los genes de las subunidades de la TSH. La TRH incrementa la transcripción de las subunidades alfa y beta de la TSH después de acoplarse a su receptor de membrana vía proteinocinasas C (PKC)- calcio-fosfolípido inositol. El efector genómico de la TSH es el factor específico de transcripción hipofisiario (Pit-1), que no solamente estimula la transcripción de los genes de la GH y PRL sino también el de la subunidad beta de la TSH. La dopamina, la somatostatina y el IGF-1 ejercen una influencia negativa sobre la síntesis y secreción de la TSH, al suprimir la transcripción de los genes de las subunidades de la TSH. Los estrógenos, la testosterona y los glucocorticoides influyen sobre la expresión de los genes de las subunidades de la TSH en estados fisiológicos muy particulares, pero en todo caso no son determinantes fundamentales de los niveles de TSH circulante.<sup>10,11,12</sup>

La TSH es una glicoproteína de 210 aminoácidos con un peso de 28 kDa, compuesta por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ . Es secretada por la glándula pituitaria e interactúa posteriormente con receptores ubicado en las células de la tiroides.<sup>12</sup> La subunidad alfa es común a las tres hormonas, mientras que la subunidad beta es única e independiente para cada péptido, es esta subunidad la que le confiere la respectiva especificidad biológica. La subunidad alfa contiene un corazón de apoproteínas de 92 aminoácidos que incluye a las diez fracciones de residuos de cisteína, esta cadena de aminoácidos se encuentra unida por seis puentes de disulfuro ( $\text{SO}_4$ ).<sup>10</sup> Tiene un peso molecular de aproximadamente de 20.000 a 22.000. La secuencia de aminoácidos de las subunidades alfa tiene un 30 a 80 % de homología entre las glicoproteínas.<sup>12</sup>

A diferencia de la subunidad beta, la cual es lo suficientemente distinta como para dirigir el enlace diferencial con el receptor a una alta tasa de especificidad, cuyo peso molecular es de 18.000 Da.<sup>10,11,12</sup> Los genes de la subunidad beta de las hormonas glicoprotéicas difieren entre sí con respecto a: longitud, organización estructural y ubicación cromosómica (Tabla 2).<sup>10,30</sup> El gen de la subunidad beta de la TSH humana (hTSH-B) se encuentra ubicado en el cromosoma 1, desde donde proyecta una proteína madura integrada por 138 residuos de aminoácidos. Algunas características fisicoquímicas de esta proteína madura se describen en la Tabla 3.

**Tabla 2.** Propiedades de las hormonas glicoproteicas humanas<sup>10</sup>

Subunidad $\beta$	Ubicación cromosómica	Longitud del gen (kb)	Nº de aminoácidos
<b>TSH</b>	1p13.2	4.9	138*
<b>LH</b>	19q13.3	1.5	121
<b>FSH</b>	11p13	3.9	111
<b>CG</b>	19q13.3	1.9	145

\* Valor modificado de la fuente original, fuente<sup>30</sup>

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas de la  $\beta$ TSH<sup>30</sup>.

Características	Secuencia	Gen sintético**
Fórmula Química	$C_{696}H_{1071}N_{173}$ $O_{198}S_{19}$	ATGACCGCGCTGTTCTCTGATGT CTATGCTGTTCCGGTCTGACCTGC
Peso molecular	15.63 g/mol (15 kDa)	GGTCAGGCGATGTCTTTCTGCA TCCCGACCGAATACACCATGCA
Número de residuos de aminoácidos	138	CATCGAACGTCGTGAATGCGCG TACTGCCTGACCATCAACACCA
Carga*	3.5	CCATCTGCGCGGGTTACTGCAT GACCCGTGACATCAACGGTAAA
Punto isoeléctrico teórico	7.92	CTG TTCCTGCCGAAATACGCGCTGT
Coefficiente de extinción molar $M^{-1}cm^{-1}$ a 280nm	16390	CTCAGGACGTTTGCACCTACCG TGACTTCATCTACCGTACCGTTG
Coefficiente de extinción molar Abs 0.1% a 280nm (1 mg/ml)	1.048	AAATCCCGGGTTGCCCGCTGCA CGTTGCGCCGTA CTCTCTTACC
Improbabilidad de ubicarse en los cuerpos de inclusión.	de 0.164	CGGTTGCGCTGTCTTGCAAATG CGGTAATGCAACACCGACTAC
Promedio hidrofobicidad	de PROTEINA SOLUBLE	TCTGACTGCATCCACGAAGCGA TCAAAACCAACTACTGCACCAA ACCGCAGAAATCTTACCTGGTT GGTTCTCTGTT

\*Fuente<sup>31</sup>; \*\* Fuente<sup>32</sup>

### *Hipotiroidismo Congénito*

El Hipotiroidismo Congénito (HC) es la situación clínica resultante de una disminución de la actividad biológica de las hormonas tiroideas a nivel tisular, ya sea por deficiente producción de las mismas o por resistencia a su acción.<sup>1,2,29,33,34</sup> El HC es la endocrinopatía más frecuente en el período neonatal y una de las causas más comunes de deficiencia mental prevenible en la infancia, razón por la cual su

diagnóstico inmediato y tratamiento precoz son de vital importancia para evitar el retraso mental irreversible.<sup>33,35,36</sup>

La falta de hormonas tiroideas produce en el sistema nervioso central un retardo en la arborización dendrítica, reducción del tamaño absoluto del cerebro y cerebelo, disminución de la capacidad de migración y proliferación de las células gliales, retraso en la mielinización, deficiencia en la conducción axonal, atrofia de las circunvoluciones, vascularización, migración neuronal, retraso psiconeurológico y maduración de las conexiones interneuronales, que se traduce en lesiones irreversibles del tejido neuronal, siendo esto la causa del retardo mental y otras alteraciones neurológicas. A nivel sistémico interfiere con todos los procesos metabólicos y de maduración del organismo sobre todo en el tejido óseo y por tanto en el crecimiento.<sup>1,3,7</sup>

### ***Etiología del Hipotiroidismo Congénito***

Las etiologías incluyen el HC primario por agenesia, hipoplasia o ectopia de la glándula tiroidea (disembriogénesis y dishormonogénesis), hipotiroidismo central e hipotiroidismo transitorio (inducido por yodo, drogas o anticuerpos maternos) (Tabla 4).<sup>3,24</sup> La causa más frecuente de HC es la disembriogénesis tiroidea, que corresponde al 85% del total de casos. La ectopia es la causa más frecuente de disembriogénesis (2/3 de los casos), seguidos de aplasia e hipoplasia tiroidea. Las dishormonogénesis representan la segunda causa de HC (15% de los casos), se heredan en forma autosómica recesiva, que se caracteriza por una deficiencia en la enzima peroxidasa tiroidea.<sup>3</sup> La glándula tiroidea fetal comienza a atrapar yodo en el primer trimestre del embarazo para la producción y secreción de T4 y T3 fetal a mediados de la gestación.

La exposición del feto o el neonato a exceso de yodo puede ocasionar hipotiroidismo por medio del efecto Wolff-Chaikoff que se producen por mutaciones en las proteínas responsables del transporte, oxidación y organificación del yodo.<sup>33,34</sup>

Dentro de las causas de hipotiroidismo transitorio, se debe descartar la presencia de anticuerpos maternos (que bloquean el receptor de TSH neonatal), el déficit o

exceso de yodo y el uso de drogas anti tiroideas maternas.<sup>29</sup> En contraste, la deficiencia de yodo puede ocasionar también hipotiroidismo congénito y para estar seguros que no ocurra deficiencia de yodo en el periodo postparto, y que el contenido de yodo en la leche materna sea suficiente para cubrir los requerimientos del neonato, se recomienda una ingesta de yodo de 250 µg/día en embarazadas o madres en etapas de lactancia.<sup>7</sup> Además, el tratamiento de la mujer embarazada con hipotiroidismo con dosis altas de drogas antitiroideas es capaz también de ocasionar hipotiroidismo en el neonato, el cual puede influir en el crecimiento, en el coeficiente intelectual (cretinismo neurológico) en la función cardiovascular y en la calidad de vida a largo plazo<sup>1,2,36</sup>.

### ***Manifestaciones Clínicas del Hipotiroidismo Congénito***

Las características clásicas de HC casi no se observan hoy en día en los países que cuentan con programas de tamizaje neonatal, es por esto que la sospecha clínica debe ser aún mayor. Se estima que sólo un 25% de los niños nacen en países que cuentan con programas de tamizaje neonatal. En el resto, el diagnóstico debe ser sospechado por la clínica, sin embargo, ésta es poco sensible para el diagnóstico precoz de la patología. Al nacer, el peso y longitud de nacimiento habitualmente son normales, pueden presentar una circunferencia craneana mayor. Si el HC no es pesquisado por el tamizaje, durante los 3 primeros meses de vida aparecerá letargia, hipotonía, aumento del tamaño de la lengua, llanto ronco, hernia umbilical, piel seca y moteada, constipación e ictericia prolongada. La presencia de bocio puede manifestarse al momento del nacimiento o más tarde en la infancia si la causa es la dishormonogénesis. La prevalencia de malformaciones congénitas asociadas, independiente de la causa, es mayor que la de la población general. Ésta varía entre un 7 a 23%, dependiendo de la población estudiada siendo las más frecuentes las cardiopatías congénitas<sup>2,34,35</sup> (Tabla 5).

**Tabla 4.** Etiología de hipotiroidismo congénito.<sup>2</sup>

Alteración			Frecuencia
1. Primario	Dis- embriogénesis (1:4 000)	Aplasia Hipoplasia Ectopia Hemiagenesia	
	Dis- hormonogénesis (1:40 000)	Defecto de <i>NIS</i>  Defectos de <i>TPO</i>  Defectos de Tg Defectos de <i>DUOX2</i> Defecto de Pendrina Defectos de Deyodinasa	1:66 000 a 1:177 000 1:67 000 - 1: 71 000 1:44 000 1:50 000 Raro
	Resistencia de unión o señalización de TSH	Receptor de TSH Defecto de Proteína G	1:100 000
2. Central (1:20 000)	Déficit de TRH Déficit de TSH		Raro
3. Periférico	Defecto del transportador de hormonas tiroideas Resistencia a hormonas tiroideas	Mutaciones de <i>MCT8</i> Mutación de <i>TRH</i>	1:100 000
4. Transitorio (1:10 000)	Déficit o exceso de yodo Uso de drogas anti tiroideas maternas	Materna o neonatal	

Abreviaciones: *NIS*: cotransportador de sodio-yodo, *TPO* thyroid peroxidase oxidase, Tg: Tiroglobulina, *RTSH*: Receptor de TSH, *MCT8*, *TRH* : Subunidad del Receptor de TSH, *TRAB*: thyroid receptor antibodies (Anticuerpos anti receptor de TSH), Dual oxidase 2 (*DUOX2*) and *DUOX* maturation factor 2 (*DUOXA2*). La prevalencia de cada una de las etiologías dependerá del área geográfica estudiada<sup>2</sup>.

### ***Pronóstico del Hipotiroidismo Congénito***

El pronóstico es bueno si se detecta la enfermedad en las primeras tres semanas de vida, si no se detecta se puede presentar enanismo, retraso mental irreversible y ataxia progresiva. El retraso mental es de acuerdo al tiempo en que se efectúa el diagnóstico y se inicie el tratamiento, en el primer mes de la vida el desarrollo psicomotor es casi

normal solo tendrá incoordinación motora fina e hipoacusia de percepción (Síndrome de Morgon). Por cada mes que se retrase el tratamiento se pierden aproximadamente cinco puntos del coeficiente intelectual estableciéndose un retraso mental cada vez más severo.<sup>35</sup>

**Tabla 5.** Características clínicas de hipotiroidismo congénito<sup>2</sup>

Edad	Síntoma	Signo
1. Recién nacido	Embarazo prolongado	Macrosomía Hipotermia transitoria Fontanela posterior amplia (> 5 mm) Bocio
2. Manifestaciones precoces	Hipoactividad, somnolencia Dificultad alimentación Alteraciones respiratorias	Mal incremento ponderal Distensión abdominal, constipación  Ictericia prolongada > 3 días
3. Manifestaciones tardías		Mal incremento ponderal Piel y fanéreos secos Hernia umbilical Macroglosia Mixedema Llanto ronco RDSM Talla baja

RDSM: Retraso del desarrollo psicomotor.<sup>2</sup>

La importancia de la detección precoz es detener el deterioro neuro-intelectual que se presentará siempre en niños carentes o deficientes de hormonas tiroideas en los 3 primeros años de vida por afectar el desarrollo del cerebro y del sistema nervioso central en forma integral. Se evita así el retardo mental generalmente moderado o profundo y también las secuelas neurológicas.<sup>36</sup>

En relación al tratamiento, el mismo consiste en la suplementación con hormona tiroidea levotiroxina (levo-T4), resultando imprescindible que su implementación sea

efectiva antes de los 15 días de vida con una dosis adecuada que varía entre 10-15  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ , según la severidad del HC inicial. A través de este tratamiento se plantea como objetivo inmediato la normalización en los niveles de T4 y T4 libre dentro de las 2 semanas de iniciado el mismo, y de los niveles de TSH dentro del primer mes de vida, debiendo asegurarse la continuidad del mencionado tratamiento hasta los 3 años de edad, o eventualmente de por vida en caso de confirmarse un HC permanente.<sup>7,37</sup>

### ***Pesquisa Neonatal***

La pesquisa neonatal (PNN) también conocido como tamiz neonatal, cribado (screening) o tamizaje (triagem) metabólico (término propuesto en 1952 por la Comisión de Enfermedades Crónicas de los Estados Unidos de Norteamérica y aceptado universalmente en 1968 por la OMS con sus respectivas traducciones), es un sistema interdisciplinario de la Salud Pública diseñado para llevar a cabo la búsqueda masiva y universal, y el posterior tratamiento precoz de una serie de enfermedades congénitas potencialmente catastróficas y difíciles de reconocer clínicamente sobre la población neonatal,<sup>37</sup> es un camino completamente establecido para identificar, entre miembros de una población, como es la de RN, aquellos posiblemente afectados por una enfermedad específica antes del desarrollo de signos clínicos de la afección.<sup>6</sup> Los términos pesquisa y diagnóstico implican conceptos diferentes: pesquisa es “la detección en una población de individuos probablemente sanos (con métodos sencillos y aceptables para la población) de individuos probablemente enfermos”. Diagnóstico es “la caracterización de la enfermedad con miras a efectuar un tratamiento”. De esto se deduce que los niños seleccionados por un determinado método de pesquisa deben ser sometidos posteriormente a los correspondientes procedimientos diagnósticos que permitan confirmar la enfermedad. En un programa de pesquisa neonatal, los RN deben ser sometidos a la evaluación inicial, para realizar luego los estudios de confirmación en los casos que resulten positivos.<sup>7</sup>

Por lo tanto, la PNN se puede definir como la búsqueda temprana de enfermedades que no son fácilmente detectadas en las primeras semanas de vida y que pueden tener

grandes consecuencias en un futuro. Son detectadas por exámenes de laboratorio u otros procedimientos diagnósticos.<sup>35</sup> Es un estudio que se realiza a toda una población de neonatos a quienes se les realiza una serie de análisis de laboratorio para identificar a aquellos que presenten un error innato del metabolismo. A estos pacientes identificados se los considera población de alto riesgo.

La pesquisa neonatal, si bien es un estudio, es considerada un verdadero proceso de selección de individuos de alto riesgo puesto que incluye la recolección adecuada de las muestras, la aplicación de métodos de laboratorio bioquímico genético, la entrega de resultados, la confirmación diagnóstica, el pronóstico para el paciente, y finalmente, obliga la aplicación de un tratamiento oportuno para evitar la manifestación de la enfermedad metabólica, y es en esta última instancia donde se manifiesta toda su bondad y utilidad. Por lo que, como bien considera la Academia Americana de Pediatría, la pesquisa neonatal es un procedimiento preventivo de salud pública que debería estar disponible para todo recién nacido.<sup>24</sup> A través de la pesquisa neonatal se identifican enfermedades que se presentan con relativa frecuencia, cuyo diagnóstico y tratamiento oportuno mejora significativamente la calidad de vida del niño, niña y su familia. Estas enfermedades no son aparentes al momento del nacimiento y las secuelas pueden ser irreversibles, por lo que se vuelve necesario realizar esta evaluación lo más pronto posible.<sup>35</sup>

Los objetivos generales de la pesquisa neonatal son:

1. Prevenir un proceso de enfermedad irreversible y discapacitante,
2. Proporcionar información a los padres sobre el riesgo de recurrencia,
3. Determinar datos de incidencia y prevalencia en la población, y
4. Aportar proyectos de investigación.

La detección de hipotiroidismo congénito mediante programas de pesquisa neonatal ha permitido su diagnóstico y tratamiento temprano y la prevención de la discapacidad severa en los pacientes que lo presentan. Desde el punto de vista de la PN, existen 3 tipos de estrategias posibles para la detección del HC:

- Medida primaria de TSH
- Medida primaria de T4 y seguimiento con TSH a todos aquellos RN con T4 baja

- Medida simultánea de T4 y TSH.<sup>38</sup>

Sin embargo, la estrategia más utilizada en la actualidad principalmente en Europa, Australia, Japón, Nueva Zelanda, Canadá, Latinoamérica y algunos estados de los EE.UU, es la que lleva a cabo la medida primaria de TSH, aún a pesar de que la misma no permite detectar los HC centrales y de que podría perder aquellos casos de HC Primario que se presentan con un aumento retrasado de TSH.<sup>38</sup>

### ***Fundamento de la prueba***

*Enzimoimmunoensayo (ELISA) Enzymun-test TSH : ELISA TSH NEONATAL* es un ensayo heterogéneo inmunoenzimático tipo sandwich, en el cual se utiliza como fase sólida placas de tiras con pocillos cubiertos previamente con anticuerpos monoclonales Anti cadena Beta de la TSH, lo cual da la especificidad del ensayo.

La muestra de sangre impregnada en el papel de filtro (Figura 1) es eluida e incubada con un buffer conteniendo un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad  $\beta$  de la TSH unidos a Biotina y luego incubados contra anticuerpos policlonales anti-TSH conjugados con Peroxidasa en tubos recubiertos con Estreptavidina. Después de remover los discos de papel y de lavar los tubos, la reacción se revela agregando el cromógeno ABTS [2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina) 6-sulfonato], el cual desarrollará un color verde intenso cuantificable a 492 nm,<sup>37</sup> (Figura 2). La hormona presente en la muestra es capturada por el anticuerpo monoclonal fijado al pocillo, una vez incubada con el anticuerpo policlonal conjugado a peroxidasa, este se une de igual forma a la TSH haciendo una captura tipo sandwich que reaccionará con el cromógeno emitiendo una señal colorimétrica visible y medible por absorbancia de luz. La intensidad del color es proporcional a la concentración de TSH presente en la muestra.<sup>37</sup>

**PROGRAMA DE METABOPATÍAS**

CLAVE N° A000000000

SAS 903 LOTE # W-011 L-XXXXXX

**DATOS DE LA EXTRACCIÓN**

CENTRO DE EXTRACCIÓN: Fecha: PARTO: CESAREA: LACTANCIA: YACIA:

**DATOS PERSONALES Y DEMOGRÁFICOS**

HOSPITAL O CENTRO DE NACIMIENTO:

**DATOS DEL NIÑO:** Segundo Apellido: Nombre:

FECHA DE NACIMIENTO: Sexo: SEÑO: PESO: NNSA: Madre patológica Intrauterina:

**DATOS DE LA MADRE:** Segundo Apellido: Nombre:

**RESIDENCIA:** Municipio: Localidad/Barrio: CODIGO POSTAL: Calle: Teléfono móvil: Teléfono:

**DATOS DEL LABORATORIO:** RECEPTORADO: CALIDAD: RESULTADO: Nº: Nº orden:

INTRODUZCA LA FICHA EN EL SOBRE

¡NO TOQUE LOS CÍRCULOS CON LOS DEDOS!

Figura 1. Papel filtro para la toma de muestra en Programas de Pesquisa Neonatal.<sup>40</sup>

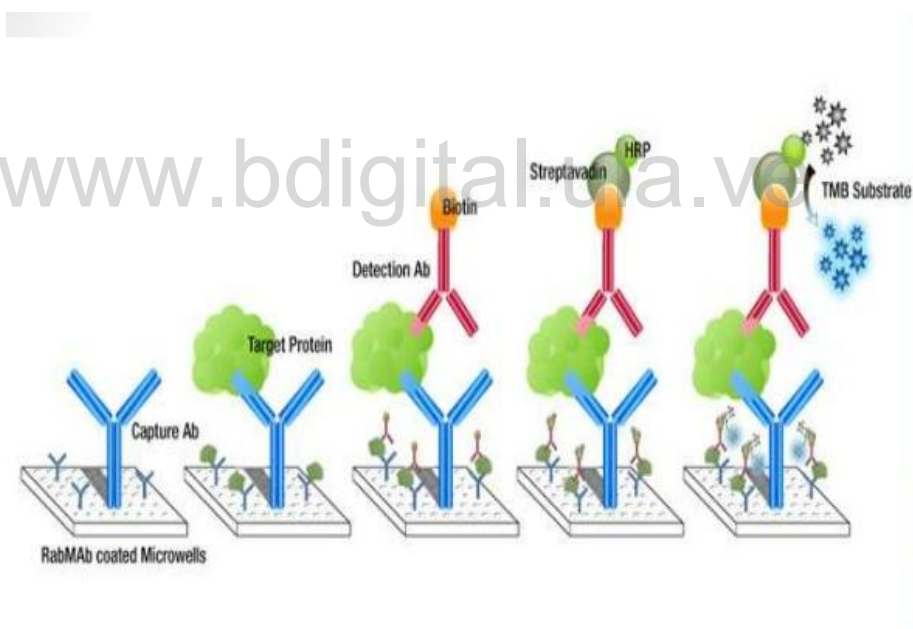


Figura 2. Ensayo Tipo ELISA anti –TSH.<sup>41</sup>

La determinación de la concentración de la TSH en el suero es comúnmente aceptado como una de los métodos primarios de diagnóstico de Hipertiroidismo Congénito, y esto es debido a que los niveles de TSH tienden a aumentar por la

ausencia de T4, la sensibilidad de esta prueba puede ser aproximadamente del 95%, y la especificidad puede ser de aproximadamente 90%<sup>8</sup>.

Existe una amplia variedad de sistemas de diagnóstico de TSH usados en el Pesquisaje Neonatal, éstos usan anticuerpos monoclonales o policlonales para captar la TSH circulante en el suero y posteriormente cuantifican los niveles de la hormona. Sin embargo, los anticuerpos usados para realizar las pruebas de pesquisa neonatal deben ser específicos contra la subunidad  $\beta$ -TSH, pues la  $\alpha$ -TSH está presente en otras hormonas peptídicas como la Hormona Estimulante de los Folículos (FSH), Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) y la Hormona Luteinizante (LH)<sup>10,11,12</sup> (Figura 3).

Repasando los métodos de diagnósticos contemporáneos, particularmente diagnóstico de HC, revela la necesidad de tener un protocolo dotado de un método de alta precisión, sensibilidad y especificidad. En este sentido, los métodos basados en determinar anticuerpos incluyendo Ensayo Inmunoabsorbente (ELISA), Inmunoensayo de Quimioluminiscencia (CIA) y Radioinmunoensayo (RIA) se encuentran entre los métodos bien establecidos. Sin embargo, para obtener anticuerpos específicos, teniendo alta sensibilidad y especificidad representa un obstáculo importante antes de desarrollar dichas plataformas de diagnóstico, debido a su alta homología con el resto de hormonas glicoproteicas. Además, desencadenar una respuesta inmunológica, dado a la semejanza en la secuencia de la  $\beta$ TSH entre el ser humano y otros animales (conejo, ratón, perro, caballo, vaca, cerdo, oveja) hasta en un 94% de similitud, es otro problema que tiene que ser tratado. Por otro lado, el diagnóstico basado en anticuerpos monoclonales contra la TSH con epítopes inmunes podría terminar con resultados falsos como consecuencia de variantes naturales de estos epítopes.

Contemplando lo anterior el desafío de diseñar proteínas recombinantes que abarcan regiones de la TSH con la menor identidad con las otras hormonas de la familia glicoproteicas justifica su búsqueda.<sup>20</sup>

TSH	-----FCIPTEYTMHIERRECA YCLTINTTICAGYC--MTRDINGKLF LPKYALSQDV
LH	SREPLRPWCHPINAILAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCP TMMRVLQA--VLP--PLPQVV
FSH	-----NSCELTNITIAIEKEECRFCISINTTWCAGYC--YTRDLVY--KDPARPKIQKT
HCG	SKEPLRPRCRPINATLAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCP TMRVLQG--VLP--ALPQVV
TSH	CTYRDFIYRTVEIPGCPLHVAPYFSYPVALSCKCGKCN TDYSDCIHEAIKTN YCTKPQKS
LH	CTYRDVRFESIRLPGCPRGVD PVVSPVALSCRCGPCRRSTSDCGGPKDHPLTCDHPQLS
FSH	CTFKELVYETVRVPGCAHHADSLYTYPVATQCHCGKCDSDSTDC TVRGLGPSYCSFGEMK
HCG	CNYRDVRFESIRLPGCPRGVN PVVSYAVALSCQCALCRRSTTDCGGPKDHPLTCDDPRFQ
TSH	YLVGFSV-----
LH	GLLFL-----
FSH	E-----
HCG	DSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

*Figura 3.* Secuencia de la TSH frente a la familia de hormonas glicoproteicas<sup>20</sup>

### Definición Operacional de Términos

www.bdigital.ula.ve

**Anticuerpos:** Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) son un grupo de glicoproteínas heterogéneas presentes en el plasma y en los tejidos que poseen una especificidad de enlace para un antígeno particular. Los Ac forman parte de los mecanismos de defensa del sistema inmunológico, éstos se unen a antígenos, y los neutralizan. Los anticuerpos están presentes en la sangre y en los tejidos y son producidos por los linfocitos B.<sup>42</sup>

**Anticuerpos Policlonales:** son una mezcla compleja de varios anticuerpos que sean producidos generalmente por diversas copias del Linfocito B de un animal. Estos anticuerpos pueden reconocer y fijar a muchos diversos epítopes de un único antígeno y por lo tanto puede formar complejos con los antígenos<sup>42</sup>.

**Antígeno:** Es una molécula, tal como un péptido, un hidrato de carbono, un glicolípido, una glicoproteína o una molécula pequeña que es reconocida y se une a

un anticuerpo. La parte del antígeno que es la diana de la unión del anticuerpo corresponde al determinante antigénico o Epitope.<sup>43</sup>

**Disembriogénesis:** Alteraciones anatómicas de la tiroides.<sup>2</sup>

**Dishormogénesis:** Alteraciones en la síntesis de hormonas tiroideas.<sup>2</sup>

**Epítotope:** Determinante antigénico que produce la reacción específica a través de una inmunoglobulina. Está formado por un grupo de aminoácidos presentes en la superficie del antígeno.<sup>44</sup>

**Inmunoensayo:** es un método inmunoquímico en el que se emplea un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o cuantificar el antígeno.<sup>43</sup>

**Inmunógeno:** Es una molécula capaz de unirse a un anticuerpo y de generar una respuesta inmune de generación de anticuerpos. El inmunógeno hace referencia a un péptido conjugado con una proteína portadora, siendo dicha proteína la responsable del carácter inmunogénico del conjugado.<sup>43</sup>

**Macroglosia:** Lengua grande<sup>2</sup>

**Mixedema:** Edema duro causado por infiltración de tejido subcutáneo<sup>2</sup>

**Proteína Recombinante:** son péptidos y/o proteínas que se pueden obtener a gran escala a partir de diversos organismos en los cuales no se producen de manera natural sino aplicando ingeniería genética. A las proteínas obtenidas de esta manera se les conoce como Proteínas Recombinantes (PR).<sup>13</sup> Es decir, son proteínas producidas artificialmente a partir de genes clonados.

## Operacionalización de las Variables

Un sistema de variables consiste en una serie de características por estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores o unidades de medida.<sup>45</sup> En la Tabla 6 se sintetizan los elementos a medir, controlar y estudiar dentro del problema formulado.

**Tabla 6.** Descripción de cada una de las variables estudiadas.

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicador
βTSHr	Dependiente	La TSHB es un gen sintético clonado en un vector de expresión pQ30- βTSHr en cepas de <i>E. coli</i> TG1	Crecimiento de la cepa en medios de cultivo LB	Cinética de crecimiento microbiano	OD <sub>600nm</sub>
1.Expresión 2.Disrupción	Independiente	La expresión es el proceso mediante el cual la información codificada en un gen es traducida en una proteína. Depende del desbloqueo y activación del promotor mediante la unión de un inductor a su represor.	1.Estandarización de los parámetros de inducción con IPTG y condiciones de incubación. 2.Obtención de la proteína activa por medio de lisis enzimática o mecánica	Producción de proteína expresada y Solubilidad	Medición de la OD <sub>600nm</sub> y identificación de las Bandas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE
Purificación	Interviniente	La purificación es el proceso mediante el cual se obtiene la proteína pura producida en sistemas recombinantes, sin que contenga contaminantes del microorganismo hospedador.	Elusión de la proteína adherida a una columna recubierta de resina metálica por cromatografía de afinidad a metales mediante incrementos del gradiente de concentración del eluyente imidazol.	Purificación	OD <sub>280nm</sub> e identificación de las Bandas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Ensayos inmunológicos Dot Blot y ELISA

Fuente: Propia del autor.

## **Hipótesis de la Investigación**

**Alternativa:** Se obtendrá un alto rendimiento de producción y purificación de la proteína base  $\beta$ TSHr mediante la técnica cromatografía IMAC.

**Nula:** No se obtendrá un alto rendimiento de producción y purificación de la proteína base  $\beta$ TSHr mediante la técnica cromatografía IMAC.

## **Objetivos de la Investigación**

### *Objetivo General*

Evaluar la expresión y purificación de la sub-unidad beta de la Hormona Estimuladora de la Tiroides recombinante ( $\beta$ TSHr)

### *Objetivos Específicos*

1. Establecer los parámetros óptimos del crecimiento celular y expresión de la proteína recombinante  $\beta$ TSH en cepas bacterianas de *E. coli* TG1.
2. Determinar la efectividad de recuperación de la proteína tras la disrupción celular por diferentes métodos.
3. Comprobar el rendimiento de purificación de la proteína recombinante  $\beta$ TSH básica por el método IMAC.
4. Identificar la pureza de la proteína en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.
5. Verificar la especificidad de la proteína recombinante  $\beta$ TSH purificada mediante las técnicas inmunológicas Dot Blot y ELISA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de investigación

La presente investigación se consideró de tipo evaluativa ya que la recopilación y análisis de resultados permitieron verificar si las hipótesis planteadas fueron correctas y evaluar los resultados de la intervención en términos de lo que se pretende lograr<sup>45</sup>, de allí pues, el propósito de la investigación fue lograr obtener la proteína recombinante de la TSH $\beta$  expresada y purificada en el laboratorio.

### Diseño de la Investigación

Considerando la naturaleza de la presente investigación, se enmarcó en un diseño experimental puro, de laboratorio, transeccional-evolutivo, multivariable de caso, por cuanto se estudió la relación entre las variables dependientes (TSH $\beta$ r) e independientes (expresión y disrupción celular) manipulando o haciendo variar estas últimas para observar las consecuencias de la misma sobre la variable dependiente. Esta investigación se clasificó como de laboratorio debido a que la información se obtuvo en un ambiente artificial o creado (Laboratorio de Biología Molecular y Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes), de igual forma fue transeccional porque el investigador estudió la variable independiente en un único momento del tiempo, pero a su vez fue evolutiva ya que el investigador estudió la variable dependiente en su proceso de cambio a lo largo del tiempo, por ello requirió hacer mediciones repetidas, además fue multivariable de caso porque estuvo orientada al estudio de varios eventos por cada tipo de evento, enfatizando la unidad de estudio como totalidad, es decir, en todo aquello que la caracteriza e identifica<sup>45,46,47</sup>.

## Población y Muestra

La población se presentó finita y accesible, por lo tanto, para el estudio se tomó el 100% de la población general; por lo cual no se requirió realizar el cálculo del tamaño muestral, por lo tanto se asumió el censo poblacional, el cual consiste en la enumeración completa de la población, es decir, el análisis del universo del estudio, es el recuento de todas las unidades poblacionales, es decir, asume la población completa como muestra de la investigación<sup>45,47</sup>.

Para la presente investigación, la población objeto de estudio estuvo conformada por la cepa de *Escherichia coli* TG1, transformada con el plásmido pQ30-  $\beta$ TSHr (Figura 4), suministrada por el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

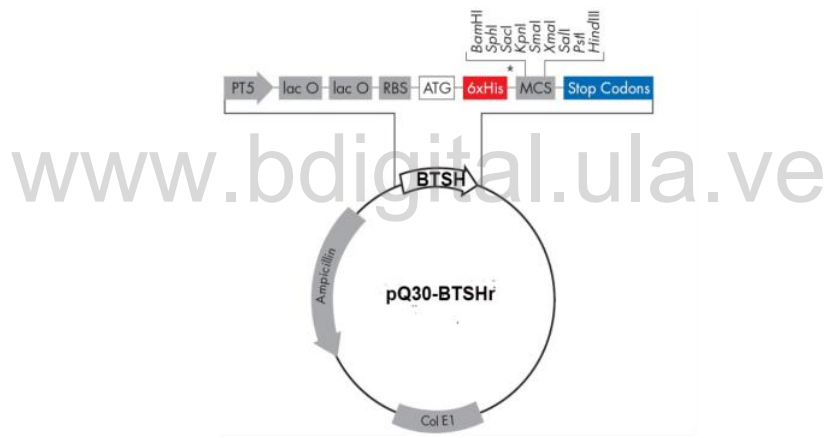


Figura 4. Construcción pQ30-  $\beta$ TSHr.<sup>27</sup>

## Sistema de Variables

### *Variable Independiente*

Se refiere a aquella donde el investigador puede manipular ciertos efectos; en otras palabras supone la causa del fenómeno estudiado.<sup>48</sup>

### ***Variable Dependiente***

Implica el efecto producido por la variable independiente, es decir representa lo que se quiere determinar en forma directa en la investigación.<sup>48</sup>

### ***Variable Interviniente***

Es aquella que puede influir en la variable dependiente, pero que no está sometida a consideración como variable de investigación.<sup>48</sup>

Para la siguiente investigación se plantean las siguientes variables:

- Variable Independiente: La expresión y disrupción celular de la recombinante  $\beta$ TSH
- Variable dependiente: La sub unidad beta de la Hormona estimuladora de la tiroides de humano recombinante
- Variable interviniente: El proceso de purificación de la recombinante  $\beta$ TSH

www.bdigital.ula.ve

### **Instrumento de Recolección de Datos**

Para esta investigación se consideraron los siguientes instrumentos de medición electrónicos:<sup>49</sup>

- Las proteínas totales se analizaron mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15 %
- Espectrofotometro de absorcion para medir la densidad optica y absorbancias de los extractos expresados y purificados.
- Se uso membrana de transferencia de nitrocelulosa (Whatman Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) con el fin de realizar la detección por Dot Blot.
- Elisometro para medir la fluorescencia en la prueba de ELISA.

## **Procedimiento de la Investigación**

### ***Medios y condiciones del cultivo***

Todos los cultivos se realizaron en medio líquido Luria-Bertini (LB: Bacto-triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10 g/L) con agitación constante, empleando un agitador orbital. El crecimiento de células se realizó en placas LB-Agar 1,5%, con Ampicilina (100 µg/mL), e incubadas a 37 °C para la obtención de colonias aisladas. Las cepas se conservaron en alícuotas de los diferentes cultivos, se mezclaron con 15% de glicerol y se almacenaron a -20°C.

### ***Crecimiento Celular***

Se seleccionaron colonias individuales de las placas sembradas para crecer preinóculos de 5 mL y 10 mL con 100 µg/mL de Ampicilina, se incubaron a 37 °C, por 24 horas, en agitación constante a 190 rpm. Los preinóculos se utilizaron para inocular 100 mL de medios líquidos LB en diluciones 1:10 y 1:100, con 100 µg/mL suplemento del antibiótico, a temperaturas de 18 y 37 °C. Se incubaron con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0,5-0,7 a 600 nm. correspondiente a la fase exponencial del crecimiento bacteriano.

### ***Expresión de la Proteína***

La expresión de la proteína se optimizó explorando diferentes condiciones como: dilución del cultivo (1:10 y 1:100), concentración del inductor Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG: 0,5, y 1 mM), temperatura de incubación (18 y 37 °C) y tiempo de incubación (1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas después de la inducción). Una vez crecidos los cultivos a una OD<sub>600nm</sub> entre 0,5-0,6 se indujo la producción de proteína con IPTG a concentraciones de 0,5 y 1 mM manteniendo la agitación a 190 rpm y a

18 y 37 °C. Se tomaron alícuotas antes de la inducción y de los tiempos 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas después de la inducción.

### *Lisis Celular*

Dadas las condiciones del ensayo y la localización citoplasmática de la proteína, la ruptura celular se llevó a cabo mediante los métodos de lisis enzimática y lisis mecánica de la membrana celular, por separado.

#### *Lisis Enzimática*

Para separar la fracción citoplasmática por medio de lisis enzimática se tomó el cultivo que creció bajo las siguientes condiciones: dilución 1:100, 37°C, 0,5 mM IPTG, 24 h. de incubación después de la inducción. Se centrifugó el volumen restante del cultivo a 4400 rpm a 4°C por 10 minutos. El pellet se resuspendió y concentró 5X con 20mL de Buffer Fosfato Salino (PBS: 300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 10 mM pH 8, y 1mg/mL de Lisozima. Se incubó a 4°C por 30 minutos. Posteriormente se congeló por 96 horas continuas y se descongeló incubando a 40 °C. (Temperatura óptima de la lisozima). Con este paso se facilita la ruptura de la membrana de las células y se solubilizan los lípidos de membrana. Además de eliminar impurezas asociadas a los cuerpos de inclusión.<sup>50</sup>

Seguidamente al sustrato obtenido se le agregó 1 mM de PMSF (por sus siglas en inglés Phenyl methyl sulfonyl fluoride) y se centrifugó por 10 min. a 4400 rpm a 4°C, obteniendo un sobrenadante altamente viscoso, el cual se filtró según método seguido por Ferrer,<sup>51</sup> a través de un colador de acero inoxidable de malla fina, recuperando 18 mL de la suspensión celular. Posteriormente, se volvió a filtrar con el colador a través de una gasa doble, recuperando 15 mL del concentrado celular. Por último se procedió a filtrar nuevamente en gasa con dos dobleces y se comprimió lo suficiente para recuperar lo máximo posible del sustrato de la capa viscosa adherida a la gasa,

recuperando un total de 12 mL de todo el sustrato celular. Se tomó una alícuota de este sustrato para ser analizadas por electroforesis SDS-PAGE.

### ***Lisis Mecánica***

Para separar la fracción citoplasmática por medio de lisis mecánica se tomaron los cultivos que crecieron bajo las siguientes condiciones:

Dilución 1:10 a 37 °C, 0,5 mM IPTG y 24 h. de incubación después de la inducción.

Dilución 1:100 a 18°C, 1 mM IPTG y 24 h. de incubación después de la inducción.

El cultivo celular se centrifugó a 4.400 rpm por 10 min. a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en 10 mL de PBS pH 8, con PMSF 1 mM. Las células se lisaron por sonicación durante 8 ciclos a 10% de amplitud con periodos de 15s ON/45s OFF. Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 12000 rpm por 15 min. a 4 °C. A partir del sobrenadante del extracto celular se realizó la purificación.

### ***Purificación de proteína por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC)***

#### ***En Condiciones Nativas***

Para la purificación de cada uno de los extractos celulares obtenidos de los diferentes cultivos, se equilibró la columna cromatográfica recubierta con resina Ni+NTA de Agarosa (Qiagen, Alemania) previamente, con lavados de 4 volúmenes de columna (VC) de PBS pH 8 sin Imidazol. La resina se transfirió a un vaso de precipitado y se mezcló con el sobrenadante del extracto celular, se incubó por 150 min. con hielo y leve agitación constante.

La mezcla se transfirió a la columna y se obtuvo la fracción que no se unió a la columna. El lavado se hizo con 2 VC de PBS con 10 mM de Imidazol pH 8 y 2 VC

con 50 mM de Imidazol. La elución se realizó con concentraciones crecientes de Imidazol 100, 250, 500, 750 mM preparados con PBS. Las fracciones eluidas fueron colectadas en alícuotas de 1 mL para seguir mediante medidas espectrofotométricas el cambio de la OD<sub>280nm</sub>. Se utilizó el aparato Thermo Scientific TECAN M200, las muestras también se analizaron en geles de poliacrilamida con S.D.S .

### ***En Condiciones Desnaturalizantes***

Los pellets obtenidos del lisado celular se solubilizaron con 10 mL de PBS 20 mM pH 8, conteniendo cloruro de guanidinio (GuHCl) 5 M pH 7,8. Luego fueron incubados con la resina IMAC y posteriormente se empaquetó la columna con el extracto celular así fijado. Se realizaron dos lavados con 2 VC de PBS-GuHCl. La elución se hizo con concentraciones crecientes de Guanidina (250 y 500). Se recolectaron fracciones de 1 mL para ser analizadas por SDS-PAGE.

### ***Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)***

La separación de las proteínas en una dimensión se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli.<sup>47</sup> Se utilizaron minigeles (8x8 cm) de poliacrilamida en concentraciones de 15% y 20% (Tabla 7). La electroforesis se realizó en buffer Tris-glicina-SDS (25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3), a temperatura ambiente, con precorridas de 30' y corridas a 25 mA constantes. Se utilizaron 50 µL de muestra de proteína mezclada con 20 µL de buffer de muestras (sampler buffer: Tris-HCl 100 mM pH 6,8, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) en los experimentos de electroforesis, se les aplicó tratamiento térmico a 98 °C por 10 minutos. Las muestras de los pellets se resuspendieron en 1 mL de PBS y se trataron de la misma forma que las demás muestras. Para cada corrida se utilizó 1 µL de Lisozima comercial como marcador de bajo peso molecular.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y las proteínas se tiñeron con el colorante azul de Coomassie 0,05% (Coomassie Brilliant

Blue R 250 0,05%, metanol 25%, ácido acético 10%) por 1 a 2 h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se eliminó el exceso de colorante mediante incubación con suave agitación en solución de lavado (metanol 25%, ácido acético 10%), para la observación en el transiluminador.

**Tabla 7.** Composición de los geles de poliacrilamida SDS-PAGE<sup>52</sup>

Composición	Gel separador 15% (5 mL)	Gel separador 20% (5 mL)	Gel concentrador (2 mL)
H <sub>2</sub> O	1,2 mL	0,5 mL	1,4 mL
Acrilamida	2,5 mL	3,3 mL	330 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,3 mL	1,3 mL	-
Tris-HCl 1 M pH 6,8	-	-	250 µL
SDS 10%	50 µL	50 µL	20 µL
Persulfato de Amonio 10%	50 µL	50 µL	20 µL
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	4 µL	4 µL	2 µL

#### *Detección inmunológica de la proteína mediante Dot Blot*

Para detectar e identificar inmunológicamente la proteína mediante captura del anticuerpo específico contra la  $\beta$ TSHhr y determinar su presencia en el sustrato purificado, se aplicó la técnica de transferencia de mancha o Dot Blot. Para la cual se utilizó una tira de membrana de nitrocelulosa Bio-Rad (10 x 2 cm), se depositaron 2 µL de cada una de las muestras y control en un área de penetración de 3 mm de diámetro aproximadamente. La membrana se dejó secar por 30 min. a temperatura ambiente. Luego se bloquearon los sitios no específicos por inmersión en 5% de buffer de bloqueo BSA/PBS-T (0,1% BSA, 20 mM PBS, NaCl 150 mM, pH 7,5, 0,05% Tween 20) en cámara de reacción a 37°C por 45 min. Posteriormente se incubó con 200 µL del anticuerpo conjugado a Peroxidasa del kit comercial de BioRad Quantase Neonatal TSH Scening Assay, por 30 min. a 37 °C, bajo agitación

constante. El lavado se realizó en tres tiempos de 5 min. con 15 mL de PBS-T que es el PBS-T y un último lavado de 5 min. con 15 mL de PBS (20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Para el revelado se agregó 0,5 mg/mL del cromógeno DAB (3,3' – Diaminobenzidina) en TBS (Tris-HCl 20 mM, 150 mM NaCl a pH 7,5) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03% durante 5 min.

### ***Ensayo de ELISA***

Para la determinación de la proteína en prueba de ELISA se utilizó el kit comercial de BioRad Quantase Neonatal TSH Scening Assay. Se dispensaron 100 µL de cada una de las muestras en PBS de incubación, en los pocillos previamente sensibilizados con el anticuerpo monoclonal del kit, y se incubaron por 1 h. a 37°C. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con 100 µL de PBS de lavado. Se agregaron 50 µL del anticuerpo conjugado a peroxidasa y se incubó por 2 h a 37 °C. Por último, se realizaron 5 lavados con 100 µL de PBS de lavado. Para el revelado se agregaron 50 µL de sustrato de membrana Tetrametilbenzidina (TMB) y se dejó un tiempo de reacción de 1 h, transcurrido ese tiempo se le agregó la solución stock. Se midió la D.O a 450 nm. Cada muestra se midió por duplicado y se evaluó el promedio de las réplicas obtenidas.

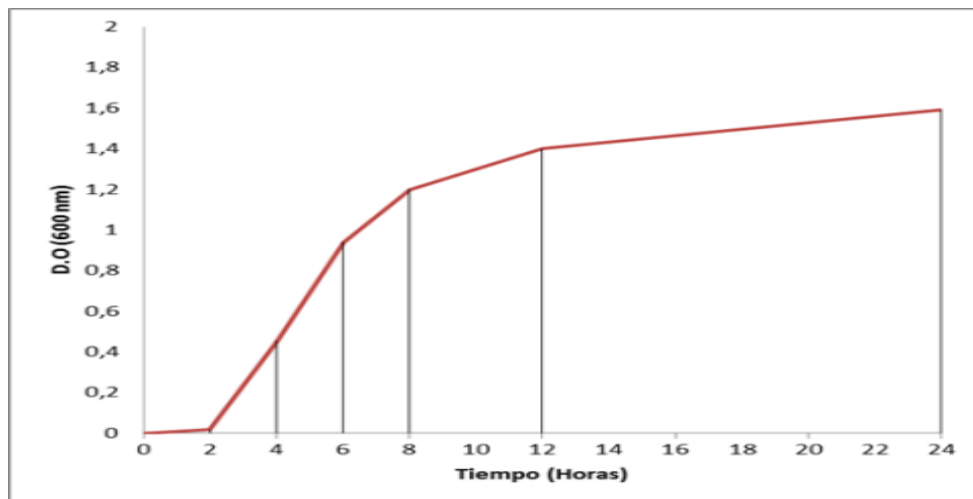
### **Diseño de Análisis**

En el presente trabajo se utilizó el Test no paramétrico adecuado para cada caso. Se tuvo apoyo para el almacenamiento de los datos y graficas en el programa de office Excel. El estudio estadístico se realizó con el programa IBM SPSS versión 21.0 (2012).

## RESULTADOS

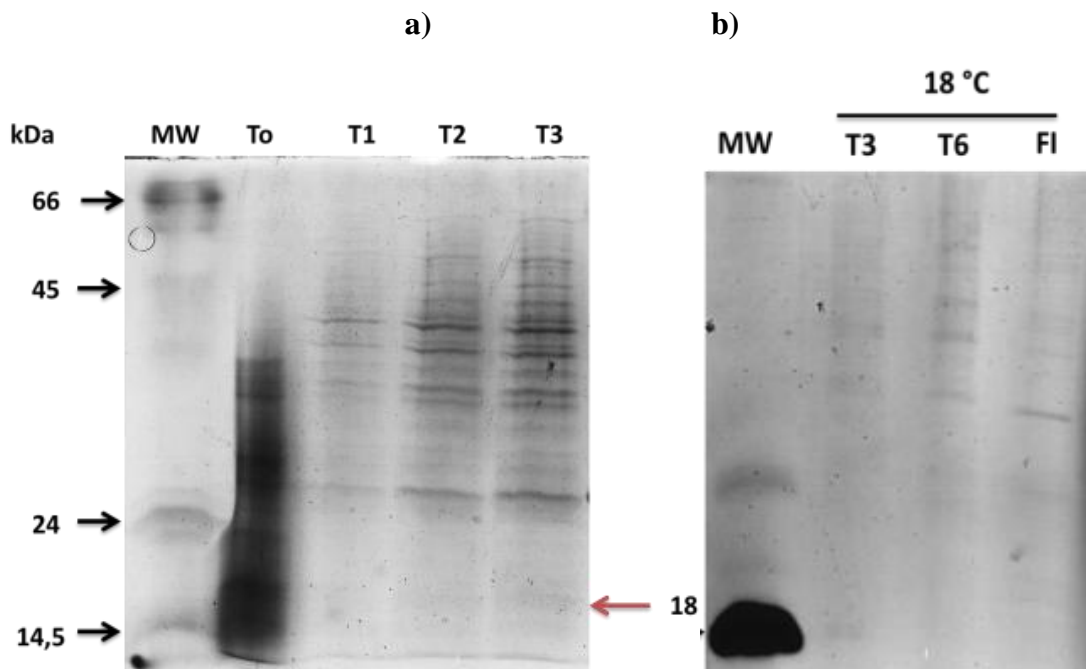
### Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína recombinante $\beta$ TSHh

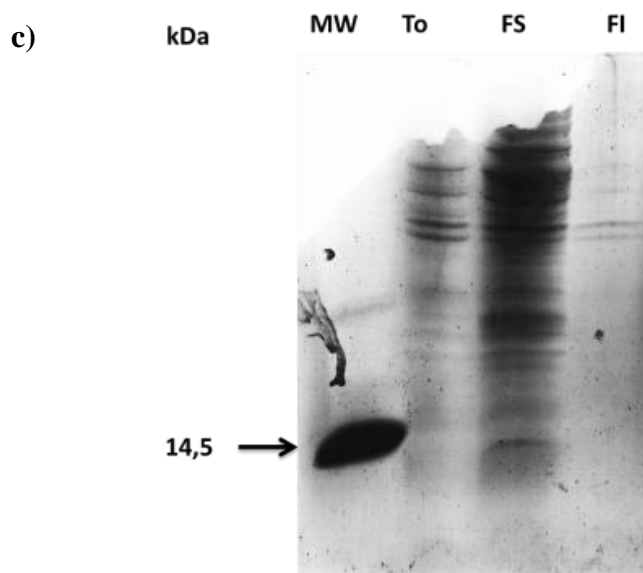
Para la expresión de la  $\beta$ TSHr fue necesario evaluar las condiciones óptimas para obtener la mayor expresión de la proteína. La primera variable a medir fue la cinética de crecimiento bacteriano, mediante la  $D.O_{600nm}$  por unidad de tiempo. Partiendo de un cultivo de *E. coli* cepa TG1, construida con el plásmido pQ30 (pQ30-  $\beta$ TSHr), en medio LB en dilución 1:100 con 100 $\mu$ g/mL de ampicilina e inducido con IPTG a 0,5mM de concentración, incubadas a 37°C. El cultivo crecido según estos parámetros se sometió a medición de la  $D.O_{600nm}$  cada dos horas hasta las 12 horas continuas y posteriormente se midió a las 24 horas de incubación. En la Figura 5 se muestra la curva del crecimiento microbiano  $D.O$  vs tiempo, en la cual se puede identificar las diferentes fases de crecimiento de las bacterias transformadas, los tres primeros tiempos (0, 2 y 4 horas) fueron tomados antes de la inducción, los restantes se tomaron después de agregado el IPTG, teniendo en cuenta la relación directa entre el incremento del número de células y el valor de absorbancia registrado. Se tomaron muestras en la fase exponencial de crecimiento, correspondiente a tiempos de entre 2 y 8 horas.



**Figura 5.** Curva de crecimiento de *E. coli* TG1 en plásmido pQ30- $\beta$ TSHr en medio LB medido por turbidimetría a 600nm.

En el análisis de SDS-PAGE de la expresión y solubilidad de la proteína se tomaron muestras antes y después de inducir con IPTG una vez alcanzado una  $DO_{600nm}$  de 0,5 a 0,6 (Figura 6a), se evidenció una baja expresión basal de la proteína, según lo indica la aparición de una banda difusa en el carril T2, (To: antes de agregar el inductor) y se pudo notar el incremento de una banda de manera muy tenue (carriles T1, T2 y T3) que correspondieron a los tiempos de 1, 2, y 3 horas después de la inducción, con un peso molecular de aproximadamente de 18 kDa, el cual corresponde al peso aproximado de la proteína recombinante. En los experimentos en los que se estudia la influencia de la temperatura, se observó una expresión muy débil a las tres horas después de la inducción y desaparición de la banda luego de 6 horas de inducción debido probablemente a su degradación (Figura 6b). En la Figura 6c donde se evalúa la dependencia de la producción de la proteína recombinante con respecto a su solubilidad se observa una banda de  $\beta$ TSH recombinante en la fracción soluble (Figura 6c, carril FS). En la fracción insoluble no se evidencio la aparición de una banda de la  $\beta$ TSH (Figura 6c, carril FI).





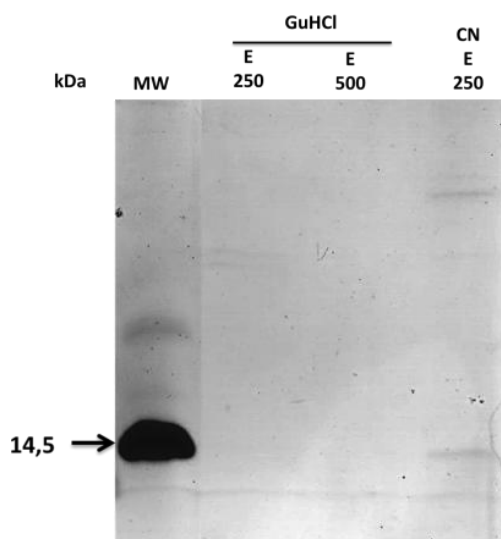
**Figura 6.** Expresión y solubilidad de la proteína recombinante  $\beta$ TSHh. a) SDS-PAGE de expresión de la proteína, donde To: es el tiempo cero antes de la inducción; T1, T2 y T3 es el tiempo tomado cada hora después de la inducción con 0,5 mM de IPTG a 37 °C de incubación; MW: marcador de peso molecular, lisozima. b) Evaluación de la dependencia de la expresión con respecto a la temperatura a 18 °C. c) Evaluación de la solubilidad de la proteína a 37°C, FS: fracción soluble (sobrenadante); FI: fracción insoluble (pellet).

www.bdigital.ula.ve

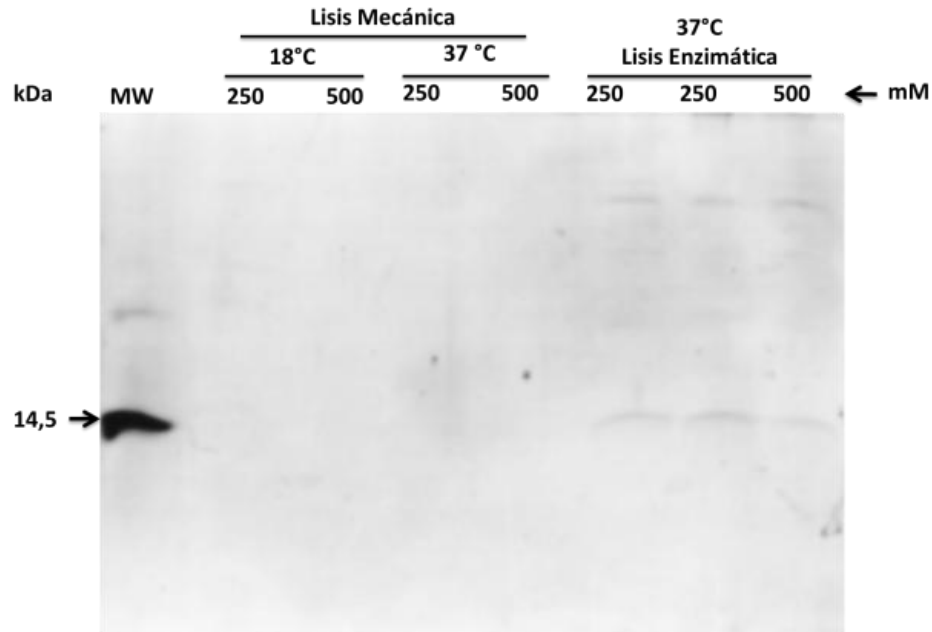
### **Purificación de proteína por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC)**

La  $\beta$ TSH se purificó haciendo uso de la cromatografía de afinidad eluyendo con concentraciones crecientes de imidazol. A fin de obtener la proteína con alto grado de pureza, se aprovechó la capacidad de interacción de la proteína con iones metálicos, de acuerdo a la construcción con la etiqueta de histidina (6xHis) en el extremo C-terminal que se une eficientemente a la columna de Agarosa Ni-NTA, para eliminar las proteínas contaminantes en las primeras fases de elución a través del método de purificación cromatográfico IMAC. Una vez equilibrada la columna y previa incubación del extracto celular con la resina, se empaquetó la columna, se realizaron lavados y se eluyó mediante gradientes de concentración creciente de imidazol. Se tomaron alícuotas de las fracciones eluidas haciéndose mediciones de la

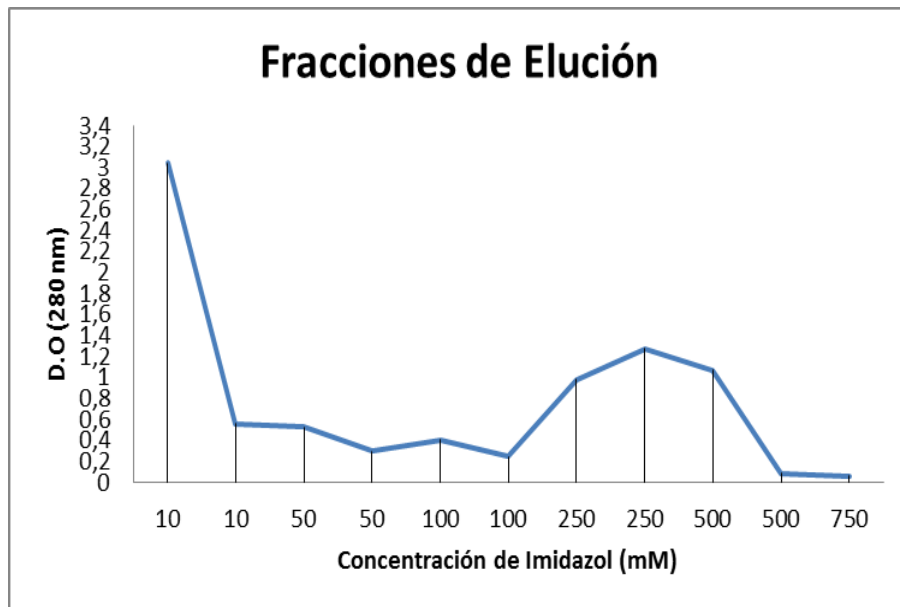
D.O a 280 n.m y analizándose el perfil proteico en geles de poliacrilamida (Figura 7). En condiciones desnaturalizantes, no se observaron bandas correspondientes a la proteína en eluciones con 250 y 500 mM de guanidina (Figura 7 a). Mediante la lisis mecánica no se observaron evidencias de la proteína en los geles, ni a temperaturas de 18 °C ni a 37 °C (Figura 7b). Se pudo evidenciar la aparición de la proteína recombinante en la purificación del extracto celular obtenido a través de lisis enzimática. La proteína se evidenció en la purificación del extracto celular lisado enzimáticamente, la cual se eluyó en 2 fracciones de 250 mM de imidazol, obteniéndose la mayor cantidad en la segunda fracción eluida con 250 mM de imidazol, terminandose de eluir con imidazol a 500 mM (figura 7c). Se pudo evidenciar la ausencia de la banda de  $\beta$ TSH en las eluciones iniciales de 10 y 50 mM de imidazol. La concentración de la proteína purificada se cuantificó espectrofotométricamente de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 3) y mediante la ecuación de Lambert-Beer,<sup>53</sup> dando como resultado 0,935; 1,221 y 1,020 mg/mL para las 2 primeras fracciones eluidas con 250 mM y 500 mM de imidazol respectivamente, para un total de 3,176 mg/mL de proteína purificada.



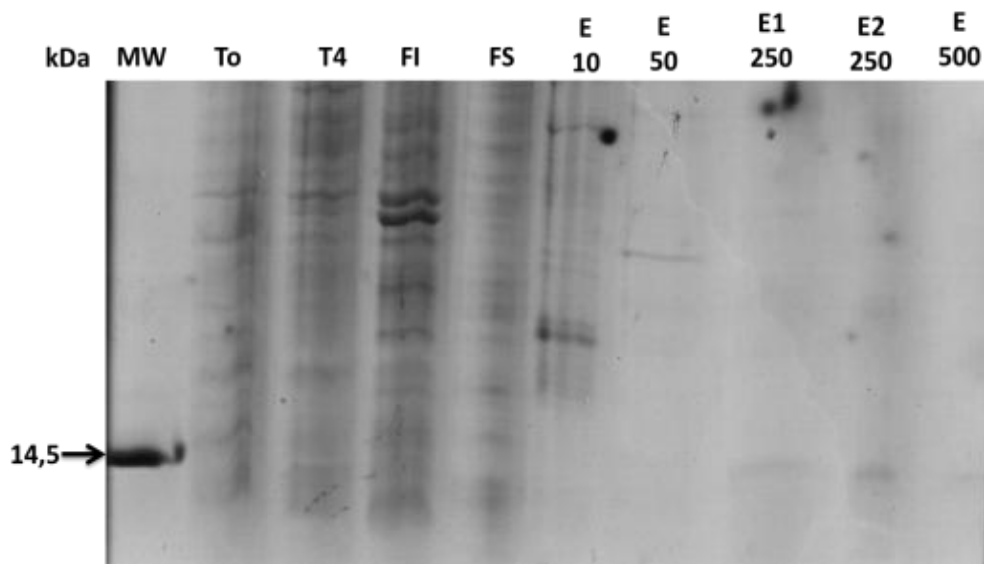
**Figura 7a.** Proceso de purificación de la  $\beta$ TSH por IMAC. a) SDS-PAGE de la purificación en condiciones desnaturalizantes, se muestra carriles 2 y 3 E: eluciones a 250 y 500 mM de GuHCl, carril 4 E: elución a 250 mM de Imidazol en condiciones nativas, MW: marcador de peso molecular lisozima.



**Figura 7b:** Proceso de purificación de la  $\beta$ TSH por IMAC. SDS-PAGE de la purificación según la lisis celular: lisis mecánica por sonicación carriles 2 y 3 eluciones a 250 y 500 mM de imidazol del cultivo crecido a 18°C, 1mM de IPTG y dilución 1:100; carriles 4 y 5 eluciones a 250 y 500 mM de imidazol del cultivo crecido a 37 °C, 0,5 mM IPTG y dilución 1:10. Lisis enzimática carriles 6, 7 y 8 eluciones de 250, 250 y 500 respectivamente, en condiciones nativas, a 37 °C. 0,5 mM IPTG y dilución 1:100.



**Figura 7c:** Proceso de purificación de la  $\beta$ TSH por IMAC. Cromatograma de la purificación. La proteína empezó a eluir en la primera fracción de 250 mM de imidazol y eluyó completa en la fracción de 500 mM.

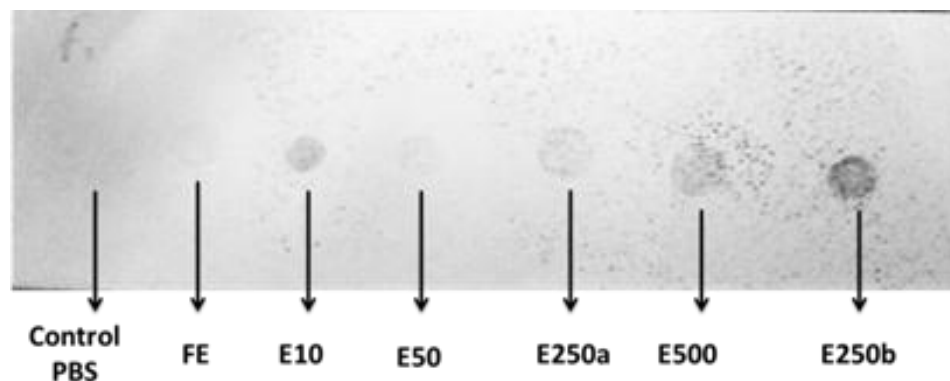


**Figura 7d:** Proceso de expresión y purificación del cultivo estandarizado bajo condiciones nativas, a 37 °C. 0,5 mM IPTG y dilución 1:100 con lisis enzimática. To: tiempo cero antes de la inducción; T4: cuatro horas después de la inducción; FI: fracción insoluble, pellet después del sonicado; FS: fracción soluble, sobrenadante después del sonicado, E: eluciones a 10, 50, 250<sub>1</sub>, 250<sub>2</sub> y 500 mM de imidazol

## www.bdigital.ula.ve Detección Inmunológica de la Proteína

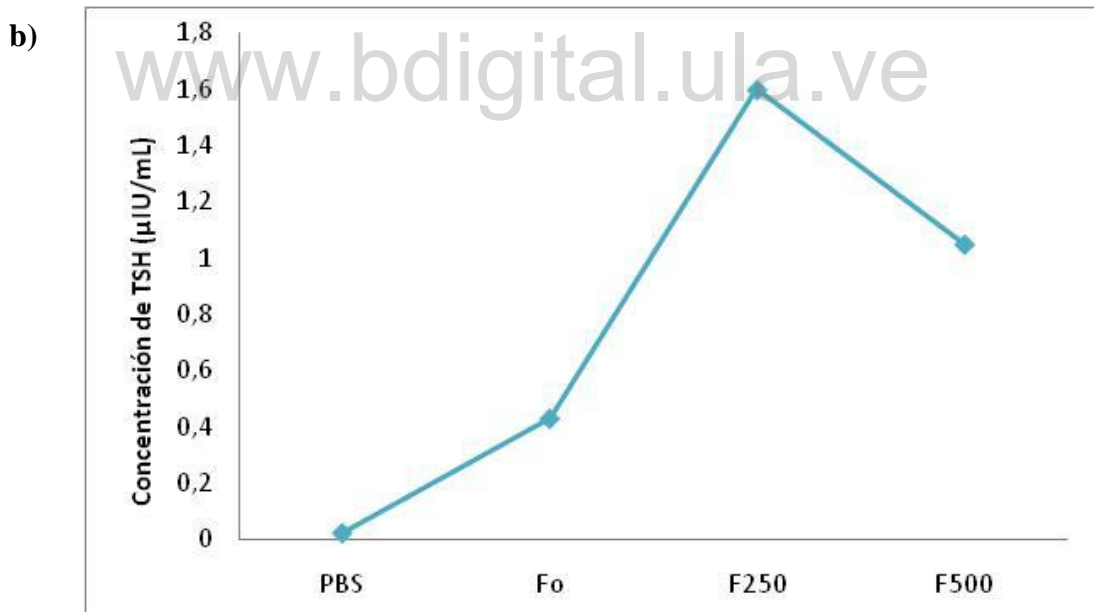
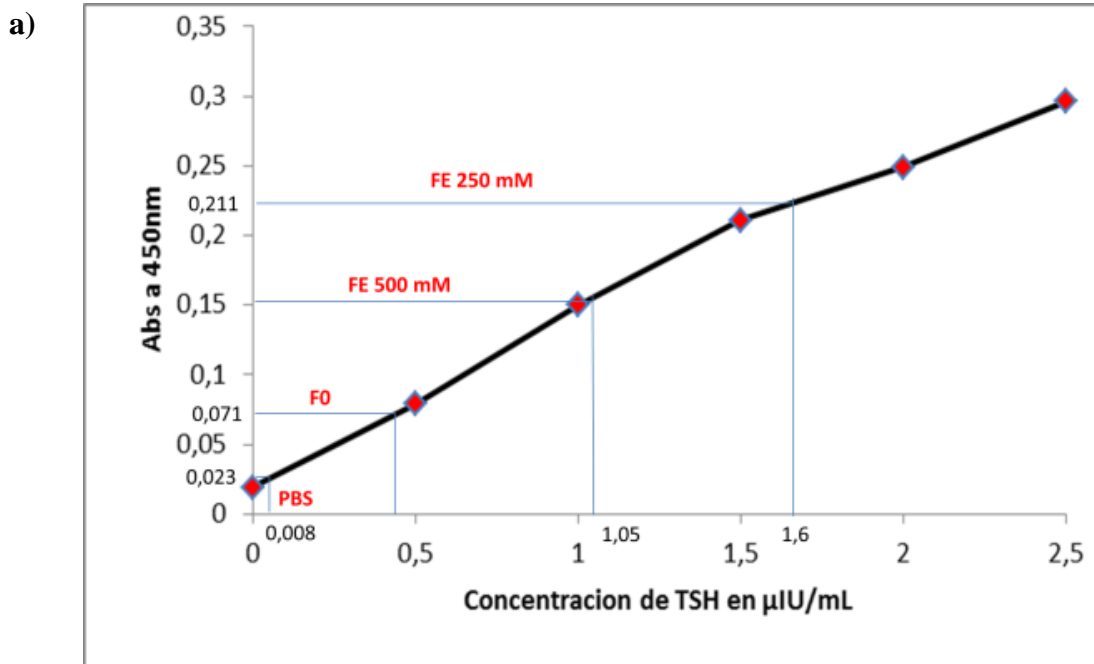
La detección inmunoquímica se verificó haciendo uso de un anticuerpo específico contra la  $\beta$ TSH, en la técnica designada como Dot Blot, según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos. En una tira de membrana de nitrocelulosa se colocaron 2  $\mu$ L de las fracciones eluidas con 10, 50, 250 y 500 mM de la purificación y el lisado proveniente de la ruptura enzimática. Luego de la incubación con el anticuerpo conjugado a Peroxidasa del kit comercial de BioRad Quantase Neonatal TSH Scening Assay y posterior revelado con el cromógeno DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó que la mayor intensidad de la mancha corresponde a la fracción 2 de la elución con 250 mM de imidazol, sin embargo, se evidencia una mancha de intensidad intermedia en la elución con 10 mM y manchas de intensidad muy débil en las demás fracciones exceptuando la muestra control que correspondía a un punto de PBS sin proteína, (Figura 8). Existe similitud con los datos del cromatograma, donde la intensidad de la banda aumenta en la primera fracción de 250 mM pero se incrementa en la segunda

fracción y disminuye en la fracción de 500 mM, aunque la intensidad de la mancha en E10 parece ser mayor que en E250a e incluso que en E500.



**Figura 8.** Resultados del Dot Blot. FE: lo que no se unió a la columna, E(10, 50, 250a, 500 y 250b): Eluciones con diferentes gradientes de imidazol. Membrana donde se marca la intensidad de la mancha de acuerdo a la concentración de la proteína en cada una de las fracciones.

Como se describió en el apartado de materiales y métodos, para el ensayo de ELISA se siguió el procedimiento correspondiente. Las muestras se midieron por duplicado y se montaron en el siguiente orden: controles, F0: fracciones de elución (lo que no se unió a la columna), fracciones 250 mM de imidazol y fracciones de 500 mM de imidazol. Se trazó la curva de calibración (Figura 9) con las medidas de absorbancias de los calibradores del kit comercial utilizado vs el rango de la concentración correspondiente para cada calibrador. Los resultados obtenidos de las muestras problemas se promediaron y se correlacionaron con las absorbancias de la curva trazada. La media de la absorbancia de las muestras se extrapolaron en la recta para determinar la concentración de  $\beta$ TSHr purificada. Obteniéndose para la fracción que no se unió 0,43  $\mu$ UI/mL, fracción de 250 mM de imidazol 1,6  $\mu$ UI/mL y fracción de 500 mM 1,05  $\mu$ UI/mL.



**Figura 9.** Resultados del ensayo de ELISA. a) Curva de calibración estándar con extrapolación de las absorbancias de las muestras de interés. b) Variación de la intensidad del color según la concentración de proteína recombinante en cada muestra analizada.

## DISCUSIÓN

La Tirotropina Humana o TSH es una glicoproteína que comparte más del 80% de homología en la secuencia de aminoácidos de las hormonas de la familia gonadotropinas hipofisarias, debido a que tanto la LH, FSH, y la CG de origen placentario presentan una estructura química idéntica en la composición de su unidad alfa<sup>10,11,12</sup> que es común en los 92 residuos de aminoácidos que la componen, la ubicación cromosómica 6p21.1-23; las 9,4 kb de longitud del gen y las 0,8 kb de longitud del mRNA.<sup>10</sup> A diferencia de las subunidades beta de estas hormonas, las cuales presentan una variación entre 8 y 27 residuos de aminoácidos con respecto a la TSH, además de la diferenciación de la ubicación cromosómica, longitud del gen y longitud del mRNA entre rangos de 1.4 a 3,0 kb y de 0 a 1,1 kb, respectivamente.<sup>10,11</sup> Por lo tanto, es evidente que cualquier estrategia de producción y purificación de la TSHr para reconocimiento inmunológico específico sea dirigida a la subunidad beta de la misma.

La TSH es una hormona esencial para la detección precoz de la población en alto riesgo de padecer cretinismo tardío a causa del hipotiroidismo congénito.<sup>29</sup> Las pruebas de programas de despistaje neonatal de la enfermedad están basadas en la determinación de las concentraciones séricas de dicha hormona en muestras de sangre obtenidas del cordón umbilical postparto o de la punción del talón del recién nacido a los 3 u 8 días después del nacimiento.<sup>37</sup> El fundamento de la prueba de enzimmunoensayo requiere de anticuerpos altamente específicos y sensibles a la TSH<sup>20</sup>, que en correspondencia con el párrafo anterior, la prueba solo será confiable, precisa y exacta mediante el reconocimiento antigénico de la subunidad beta de la misma.

En la búsqueda para alcanzar estos resultados se encontró que existen variantes de la TSH que muestran secuencias alternativas o modificaciones postraduccionales como patrones de glicosilación,<sup>20</sup> además de la alta complejidad de purificar proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, en la región C-terminal se ubica la menor cantidad de enlaces disulfuros y los puntos de glicosilación. Por lo tanto, se han diseñado plásmidos con proteínas de fusión en dichas regiones que aumenta la

solubilidad y el peso molecular de la proteína, facilitando mayor producción y mejor purificación de la misma. Una de las proteínas utilizadas en la construcción de vectores fue la Proteína de la Matriz Oigomérica del Cartílago (COMP) y los epítomos de tetanos PII y P30.<sup>20</sup>

Partiendo de un plásmido básico de la proteína como es el pQ30- $\beta$ TSHr se obtuvieron niveles considerables de expresión de la proteína bajo condiciones estandarizadas a 37°C, inducción a las 4 horas de crecimiento microbiano con una D.O<sub>600nm</sub> de 0,5 a 0,6, con 0,5 mM de IPTG. Según los resultados obtenidos la  $\beta$ TSH solo se detecta en la fracción soluble, sin evidenciarse tampoco la formación de cuerpos de inclusión.

En los cultivos crecidos e inducidos a temperatura de 18 °C y 1 mM de IPTG, no se obtuvo producción de  $\beta$ TSH. No obstante, en el plásmido pET32a- $\beta$ TSH en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) se ha reportado que la mejor condición para la expresión de la proteína se obtuvo a los 18 °C con 1mM de concentración del inductor IPTG,<sup>20</sup> aunque no se indica la ubicación de la proteína ni resultados de solubilidad de la misma, el proceso de purificación se realizó bajo condiciones desnaturalizantes La cepa BL21 al expresar proteínas recombinantes, provoca un desequilibrio entre la forma soluble y la insoluble y por tanto, acumula proteínas en cuerpos de inclusión.<sup>49</sup> concordantemente con lo expresado por Mohammadzade H. et al.<sup>19</sup>

Cabe señalar que un factor importante que influyó directamente en la purificación de la  $\beta$ TSH fue la disrupción celular. Se pudo observar que mediante la lisis enzimática se logró purificar la proteína en concentraciones muy bajas. Sin embargo, al emplear ruptura mecánica por medio de sonicación no se observaron evidencias de bandas correspondientes a la proteína de interés, ni en condiciones nativas ni desnaturalizantes. Esto posiblemente se deba a condiciones de estrés generadas durante de ruptura celular que conducen a la desnaturalización proteica por mal plegamiento de las proteínas, proceso que es promovido por la existencia de proteínas chaperonas que evitan el correcto plegamiento al interactuar con la  $\beta$ TSH.<sup>55</sup> Otra posible causa es la adhesión de la  $\beta$ TSH a la fracción membranal debido a enlaces iónicos entre la proteína y la membrana o su inclusión en vesículas de

membrana que se forman luego de sonicar quedando atrapada en dichas estructuras, también es posible que la lisis mecánica favorezca la degradación proteolítica.

Por otra parte la purificación que incluía la lisis enzimática permitió evidenciar y purificar la  $\beta$ TSH hasta homogeneidad. La purificación se realizó mediante la técnica cromatográfica de afinidad a Níquel. Se realizaron 4 lavados con 10 y 50 mM de imidazol por duplicado, del extracto celular proveniente de un cultivo a 37°C y recolectado en la fase exponencial de crecimiento y inducido con 0,5 mM de IPTG. La elución se llevó a cabo con incrementos de gradientes de concentración de imidazol por duplicado (100mM, 250mM y 500mM). La proteína empezó a eluir en la primera fracción de 250 mM de imidazol, y eluyó por completo en la fracción de 500 mM de imidazol. El pico máximo de elución se evidencia en la segunda fracción de 250 mM, incrementando la D.O<sub>280nm</sub> de 0,3 (segunda fracción de lavado con 50 mM de imidazol) a 1,28 (Figura 7c). La cantidad total de proteína purificada entre las tres fracciones donde eluyó fue de 3,176 mg/mL.

No obstante, la inmunización de animales con el antígeno demanda de una cantidad considerable, aproximadamente 12 mg de proteína pura, para completar un protocolo de inmunización con cinco dosificaciones en concentraciones crecientes (1, 1,5; 2; 2,5 y 4 mg).<sup>56</sup> En consecuencia, se podría afirmar que la cantidad de proteína purificada que se obtuvo es muy baja para tales fines, aunque se podrían evaluar las condiciones para producir anticuerpos mediante métodos diferentes.

Del mismo modo, la proteína recombinante emite buena señal en la detección inmunológica, lo que indica que su capacidad antigénica ante los métodos empleados es consistente.<sup>19</sup> El Dot Blot ratifica que hay reconocimiento del anticuerpo monoclonal utilizado ante la proteína  $\beta$ TSH. Aunque se pudo notar cierto reconocimiento antigénico en la fracción de lavado con 10 mM de imidazol, su presencia en los geles de poliacrilamida SDS-PAGE no fue evidente, debido a la diferencia de sensibilidad de los 2 métodos ( Dot Blot y geles de poliacrilamida. Pese a que no se pudo realizar el Western Blot, los ensayos realizados corroboraron significativamente la obtención de la proteína con un nivel de pureza aceptable.

Sin embargo, los niveles de producción fueron muy bajos desde la expresión de la proteína basal. Aunque aún quedan parámetros importantes por evaluar, como es el caso de la disrupción celular específica para esta proteína, la formación de chaperonas por acción de la sonicación o su degradación,<sup>55</sup> evaluación de la proteína basal en otras cepas y construcción con plásmidos diferente,<sup>19,20</sup> que abre camino para futuras investigaciones. Asimismo, la utilidad de la misma en la producción de anticuerpos y su aplicabilidad en programas de tamizaje y diagnóstico de hipotiroidismo congénito a nivel nacional.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CONCLUSIONES

El trabajo de investigación realizado y los resultados obtenidos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se lograron evaluar y determinar parámetros estándares para la producción y purificación de la proteína  $\beta$ TSH, dando así respuesta a la pregunta de investigación formulada.
2. Se acepta la hipótesis nula, ya que el rendimiento de purificación no fue alto.
3. La proteína recombinante  $\beta$ TSH presenta bajo nivel de expresión en cepas convencionales de *E. coli*. pQ30, por lo tanto, su efectividad no es óptima.
4. El método de lisis enzimática permitió la purificación de la betaTSH y es el método a elegir en futuros ensayos de aislamiento.
5. La proteína recombinante básica  $\beta$ TSH sin unión a proteínas de fusión conserva su solubilidad durante la expresión y purificación.
6. La  $\beta$ TSH humana sintética conserva sus propiedades antigénicas similares a la forma natural.
7. La importancia de obtener la  $\beta$ TSH pura radica en que puede convertirse en una valiosa herramienta para el despistaje, confirmación y seguimiento del síndrome de hipotiroidismo congénito a nivel nacional.
8. La producción nacional de los kit para estas pruebas justifica su producción masiva, o su implementación en tecnologías genómica (genotecas) para obtener los anticuerpos de manera permanente.

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

1. Rodríguez L, (et al). Hipotiroidismo congénito y tamiz neonatal como método de detección oportuna en Tabasco. (Experiencia 1994-2012). Salud en Tabasco. 2013; 19 (1): 19-22.
2. Grob L, Martínez A. Hipotiroidismo congénito: un diagnóstico que no debemos olvidar. Rev Chil Pediatr. 2012; 83 (5): 482-491.
3. Cattani A. Trastornos tiroideos neonatales. Bol Sch Med. 2000; 29 (3): 3-11
4. Ludueña P, (et al). Hipotiroidismo Congénito: Propuesta de una norma para su detección temprana. Rev. Soc. Bol. Ped. 1996; 35 (1): 32-35.
5. Queiruga G, (et al). Hipotiroidismo congénito, un tema vigente. ¿Qué pasa con prematuros y gemelares? Arch Pediatr Urug. 2013; 84 (4): 281-284.
6. Lemes A, Queijo C, Garlo P, Machado M, Queiruga G. Pesquisa neonatal. Arch Pediatr Urug. 2012; 83 (1): 40-44.
7. Santucci Z, (et al). Programa de pesquisa neonatal de hipotiroidismo congénito de la provincia de Buenos Aires. Arch. Argent. Pediatr. 2002; 100 (6): 456-467.
8. Matyjaszek B, Pyzik A, Nowakowski A, Jarosz M. Diagnostic methods of TSH in thyroid screening tests. Ann Agric Environ Med. 2013; 20 (4): 731–735.
9. Marrero N, Frometa A, Coto R, Villegas L. Medición de TSH, T4 y Phe en muestras de sangre del cordón umbilical en papel de filtro: impacto en el tamizaje neonatal. Biomédica. 2000; 20: 33-41
10. Moreno U. Hormonas del hipotálamo y de la hipófisis anterior sinopsis endocrino-genética. Mérida- Venezuela: Editorial Venezuela CA.; 2002. pág. 337.
11. Pérez L, (et al). Aislamiento y purificación de tirotropina humana a partir de glándulas hipofisarias para su uso en el inmunodiagnóstico. Bioquim. 2008; 33 (4): 137-146.
12. Mullur R, Liu Y, Brent G. Thyroid hormone regulation of metabolism. Physiol Rev. Apr. 2014; 94 (2): 355-82.

13. Guevara H, López Z, Jiménez G, Sotelo M. Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotecnia*. 2013; 15 (3): 8-17.
14. Coligan J, Bierer B, Margulies D, Shevach E, Strober W. (eds.) *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley; 2010.
15. Wu Y, Fan C, Li Y. Protein purification involving a unique autocleave feature of repeated KAAAK peptide. *Jorn Chromat*. 2009; 877 (31): 4015-4021
16. Rai M., Padh H. Expression systems for the production of heterologous proteins. *Current Science*. 2001; 80 (9): 27-35.
17. Lichty J, Malecki, J, Agnew H, Horowitz D, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expres Purific* 2005; 41:98-105.
18. McCluskey A, Poon G, Gariép J. A rapid and universal tandempurification strategy for recombinant proteins. *Protein Science*. 2007; 16:2726-2732.
19. Mahammadzade H. Khansarinejad B. Sadeghi A. Abtahi H. Clonacion, expression y purificacion de la proteína subunidad TSH beta recombinante y evaluación de su antigenicidad. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2017; 27 (147): 87-96
20. Maysam M, Mohamad J. AbdolKarim S, Mehdi H. Eliciting an antibody response against a recombinant TSH containing fusion protein. *Journ Immunoass Immunochemis*. [En línea] 2016 [citado el 22 de Ene 2017]. DOI: 10.1080/15321819.2016.1250774. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/15321819.2016.1250774>
21. Echenique V. Expresión y purificación de la proteína antigénica recombinante Tpp17 de *Treponema pallidum* para su utilización en el diagnóstico de Sífilis. Uruguay: Universidad de la Republica. Facultad de Ciencias: 2014
22. Lemes A. Queijo C. Garlo P. Machado M. Queiruga G. Pesquisa neonatal. *Arch Pediatr Urug* 2012; 83(1): 40-44
23. Marrero G, Rodríguez F. Hipotiroidismo Congénito: historia e impacto del tamizaje. *Rev Biomed*. 2000; 11: 283-292.
24. Morales L. Propuesta de un modelo de Programa Nacional de Pesquisa Neonatal para Errores Innatos del Metabolismo como una estrategia de Salud Pública para la

prevención de discapacidades. [Tesis Doctoral]. Ecuador: Universidad San Francisco de Quito. Colegio de Postgrados: 2011

25. BPS: Banco de Prevención Social. [Internet]. Uruguay: BPS; 2010 [citado 25 Nov 2016]. Disponible en: <http://www.bps.gub.uy/bps/file/3543/5/pesquisa-neonatal.pdf>.

ISBN: 978-9974-8277-0-7 2010Pesquisa Neonatal: lo que puede prevenir una gota de sangre

26. UNIDEN: Unidad de Diagnóstico Neonatal [Internet] Venezuela: UNIDEN; 2017 [citado 21 Ene 2017]. Disponible en:

<http://www.uniden.com.ve/pruebatalonp.php>. prueba de talón: pesquisa neonatal ¿que es esto?

27. IDEA: Instituto de Estudios Avanzados. [Internet]. Venezuela: IDEA; 2006. [citado 08 Jul 2016] Fundación Idea realiza investigaciones con impacto social. Fortalecimiento del Sistema de Salud Pública Nacional. [aprox. 2 pantallas] Disponible en: <http://www.idea.gob.ve/>

28. Cromoion.com [Internet] Argentina: Cromoion 2010; [actualizada el 25 Feb 2016; citado 08 jul 2016]. Disponible en: <http://www.cromoion.com/biblioteca/Pesquisa%20Neonatal%20en%20Venezuela%20con%20Tecnosuma.pdf>

29. Lima M. (et al). Hipotiroidismo: conceptos actuales en diagnóstico y tratamiento. Venez. Informed. 2010; 12(7): 354-356.

30. ExPASy ProtParam [Internet]. Bioinformatics Resource Portal. [Citado 25 Mar 2019]. Disponible en: <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>

31. ensembl [Internet]. Transcrip: TSHB-202 (ENST00000369517.1). Citado 25 Mar 2019]. Disponible en:

[www.ensembl.org/homo\\_sapiens/transcript/proteinSummary?g=ENSG00000134200r=1:115033363-115034284;t=ENST0](http://www.ensembl.org/homo_sapiens/transcript/proteinSummary?g=ENSG00000134200r=1:115033363-115034284;t=ENST0)

32. GenScript [Internet]. GenScript Quotation 1209228. [Citado 25 Mar 2019]. Disponible en: <https://www.genscript.com/search/general=TSH1209228>

33. Borrajo G, Fideleff G, Herzovich V. Hipotiroidismo Congénito: Pesquisa, Confirmación y Seguimiento. Rev. argent. endocrinol. metab. 2009; 46 (4).

34. Rodríguez L, Tamiz neonatal para hipotiroidismo congénito. Salud en Tabasco. 2002; 8 (1): 26-28
35. Lineamientos técnicos de tamizaje neonatal para hipotiroidismo congénito. El Salvador. Ministerio de Salud. Viceministerio de Políticas de Salud. Dirección de Regulación y Legislación en Salud. Viceministerio de Servicios de Salud. Unidad de Atención Integral a la Niñez. El Salvador. C.A. Diciembre de 2015.
36. Becerra F. Hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria en el niño Rev Chil Pediatr 2008; 79(1): 96-102.
37. Borrajo G. Pesquisa neonatal de enfermedades congénitas [Tesis Doctoral] Argentina: Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias Biológicas; 2011.
38. LaFranchi S. Newborn Screening Strategies for Congenital Hypothyroidism: an Update. J Inherit Metab. 2010; 33 (2): 225-233.
39. News-medical.net [Internet]. Australia: AZoNetwork; 2000 [actualizado 9 Jun 2016; citado 21 Ene 2017]. Anticuerpos policlonales. Disponible en: [http://www.news-medical.net/life-sciences/Polyclonal-Antibodies-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/life-sciences/Polyclonal-Antibodies-(Spanish).aspx)
40. enfermerapediatricasevilla.es [Internet]. España: Enfermera Pediátrica Sevilla [actualización 14 Sep 2016; citado 27 Ene 2017]. Disponible en: <http://www.enfermerapediatricasevilla.es/2013/04/todo-sobre-la-prueba-del-talon-en.html>
41. Perkinelmer.com.cn [Internet]. China: PerkinElmer for the Better. [Citado 27 Ene 2017]. Disponible en: <https://www.perkinelmer.com.cn/Catalog/Product/ID/3301-0010>, [https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/gsp\\_instrument/gsp\\_neonatal\\_irt\\_kit](https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/gsp_instrument/gsp_neonatal_irt_kit)
42. Dausset J, Nenna A. Presence of leukoagglutinin in the serum of a case of chronic agranulocytosis. C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 1952; 146: 1539–1541.
43. Vico J. Colás M. ABG Patentes. Centro De Investigación Biomédica En Red En Bioingeniería, Biomateriales Y Nanomedicina, Consejo Superior De Investigaciones Científicas. Anticuerpos para la detección y cuantificación de agentes anticoagulantes. España. WO 2014083226. 2014 Jun 05.

44. Diccionario.medciclopedia.com [Internet]. Argentina: Diccionario Médico. [Citado 27 Ene 2017]. Disponible en: <https://diccionario.medciclopedia.com/e/epitope/>
45. Hurtado, J. El proyecto de Investigación: Comprensión Holística de la metodología y la investigación. 8va edición. Caracas: Ediciones Quirón. 2015.
46. Hernández, Fernández y Baptista. Metodología de la Investigación. 4ta edición. México: Editorial Mc Graw Hill. 2007.
47. Arias F. El proyecto de Investigación: Introducción a la metodología científica. 5ta edición. Caracas – Venezuela: Editorial Episteme. 2006.
48. Álvarez W. La Naturaleza de la Investigación. Caracas: BIOSFERA. 2008.
49. Tamayo M. y Tamayo, M. El proceso de la investigación científica, 4ta ed. México: Limusa. 2004.
50. Díaz González S. NAD-glutamato deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*: clonaje, secuenciación y expresión. Purificación y propiedades de la enzima nativa y recombinante. [Tesis Doctoral]. España: Universidad de Alicante; 2007.
51. Ferrer MF. Construcción y evaluación de virus MVA recombinantes que expresan la glicoproteína D del virus BoHV-1. [Tesis Doctoral]. Argentina: Universidad de Buenos Aires; 2010
52. Laeemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685
53. Clemente J. Construcción de un sistema de expresión heterólogo con los genes de la D,L hidantoinasa y de la D-carbamilasa. Evaluación de su aplicación biotecnológica a la síntesis enzimática de d-aminoácidos a partir de derivados de la D,L-hidantoina. [Tesis Doctoral]. España: Universidad de Almería. Facultad de Ciencias Experimentales; 2005
54. Rojas MA. Evaluación de dos clones de *Escherichia coli* transformados mediante un vector plasmídico con el ADN complementario de la iduronato 2-sulfato sulfatasa humana. [Trabajo de Grado]. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias; 2007

55. Morales E, Parcerisa I, Ceccarelli E. Efecto del método de ruptura celular sobre la calidad de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. ResearchGate. 2018. DOI: 10.13140/RG.2.2.13941.63207
56. Camacho V. Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark: a potential therapeutic use. MAbs. 2013; 5 (1): 80-85. [www.uniprot.org/uniprot/P01222](http://www.uniprot.org/uniprot/P01222)

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)