

24-34



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“PRODUCCION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA
ACETILCOLINESTERASA DE
S. MANSONI”**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ELVIRA ESPINOSA GUTIERREZ

México, D. F.

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O.

	PAGINAS.
JUSTIFICACION	1
HIPOTESIS	3
OBJETIVOS	4
INTRODUCCION	5
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	38
DISCUSION	61
RESUMEN	72
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	74

JUSTIFICACION

En México afortunadamente no se ha reportado la presencia de esquistosoma, sin embargo, la experiencia lograda en esta tesis puede ser extrapolado a cualquier parasitosis importante en nuestro medio como cisticercosis (Cisticercus cellulosae) y amibiasis (Entamoeba histolytica), en especial para lograr la producción de anticuerpos monoclonales de una gran especificidad, ya que hasta ahora el diagnóstico inmunológico de estas infecciones se ha visto impedido en su avance porque no se cuenta con anticuerpos con alta especificidad.

En Israel S. mansoni representa un problema de salud pública solo en el sur del país (frontera con Egipto), ya que en el resto del país los depósitos de agua son escasos y por lo tanto el desarrollo de este parásito es difícil.

La acetilcolinesterasa (AChE) es un componente enzimático fundamental del sistema nervioso de S. mansoni (Bueding E. 1952). Recientemente Goldlust A. et. al., (1986), purificaron esta enzima, también se ha demostrado que tiene propiedades antigénicas, ya que los anticuerpos producidos contra AChE de Electrophorus electricus (anguila eléctrica) dieron reacción cruzada con AChE de S. mansoni tanto en el extracto total como en la superficie intacta del parásito (Tarrab-Hazdai et. al., 1984). Además esta enzima se ha reconocido como un nuevo transmisor en S. mansoni (Bueding E., 1952) que controla movimientos de la musculatura e intestino, por esta razón fármacos anticolinérgicos contra la esquistosomiasis. Sin embargo,

los fármacos activos en la sinapsis colinérgica en los mamíferos, son casi inactivos en S. mansoni, además producen efectos secundarios nocivos (Nordgren et. al., 1978; Qillcockson W. et. al., 1982; Levi-Schaffer et. al., 1984). Por esta razón, es importante la producción de un anticuerpo monoclonal (AcM) anti AchE de S. mansoni, debido a que el sistema nervioso del parásito ha sido propuesto como blanco para la acción de agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos.

HIPOTESIS

Si AchE colina es una enzima presente en los tres estados del parásito, es posible la producción de anticuerpos monoclonales que reconozcan este antígeno.

OBJETIVOS

Producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un extracto total de S. mansoni enriquecido con acetil colinesterasa.

Caracterización parcial de los anticuerpos monoclonales con respecto a su clase, peso molecular, naturaleza química y coeficiente de sedimentación del antígeno que reconocen, así como su actividad biológica.

INTRODUCCION

INMUNOPATOLOGIA DE LA ESQUISTOSOMIASIS.

Esquistosomiasis o bilariasis es un problema de salud pública que afecta de 200 a 300 millones de personas en áreas urbanas y suburbanas de países subdesarrollados (Smither, et. al., 1982).

Esta enfermedad es causada por un helminto, parásito del género Schistosoma.

La enfermedad causada por Schistosoma sp., ha sido reconocida por largo tiempo como una respuesta inmune patológica de difícil erradicación. Esto debido a que, un parásito multicelular con un ciclo de vida tan complejo como aquel de los esquistosomas, presenta a su hospedero una multitud de antígenos diferentes en cada estadio de su infección, y aunque se reconoce que la reacción granulomatosa asociada a los huevos y el daño directo o indirecto a los tejidos del hospedero son de gran importancia en la patología de la esquistosomiasis, las interacciones entre el parásito y el sistema inmune deben de tener otras consecuencias relevantes no bien entendidas hasta el momento.

Inmunopatología durante la penetración y migración de los estadios de S. mansoni.

Durante el tiempo que la larva atraviesa la piel, se

induce una reacción inflamatoria en la dermis y epidermis con infiltración de células polimorfonucleares, particularmente neutrófilos (Lichlenberg et. al., 1976). Subsecuentes reinfecciones con cercaria, inducen una infiltración celular rápida y mas intensiva (Lichlenberg et. al., 1961; 1976), por ejemplo, se ha reportado un incremento de ocho a nueve veces en el número de eosinófilos en el infiltrado celular de ratones infectados con S. mansoni, comparado con ratones controles (Lichlenberg et. al., 1976). También se ha observado en los ratones infectados, que durante la respuesta secundaria se desarrollan mecanismos inmunológicos de tipo humoral que median la infiltración celular (Colley et. al., 1972).

La dermatitis provocada por la penetración de las cercarias, se desarrolla en dos etapas, una ligera pruritis, seguida diez a quince horas mas tarde por el desarrollo de papulas de tres a cinco milímetros de diámetro, eritema, edema y pruritis (Cort 1950). Las fases inmediatas y tardías de esta clase de dermatitis recuerdan las observaciones hechas por Colley et. al., (1972) en la piel de los ratones experimentalmente infectados y rexpuestos a antígenos de la cercaria de S. mansoni.

Al igual que las cercarias, la infección primaria por esquistosomas de S. mansoni y S. japonicum parece causar pocas alteraciones en su paso por los pulmones, mientras que las migraciones secundarias provocan reacciones celula

res más rápidas y severas (Hsu et. al., 1965).

Etiología de la esquistosomiasis aguda (Fiebre de Katayama).

La llegada de los parásitos adultos a su destino en el sistema porta y vasos urogénitales y el eminente inicio de la ovoposición, provocan cambios de enorme importancia tanto en el parásito como en su hospedero. Los efectos provocados por una primera infección muy severa son: fiebre, urticaria, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, dolor abdominal, náuseas, diarrea, y eosinofilia en un período comprendido entre dos y once semanas (Hiatt et. al., 1979). La hepatoesplenía por esquistosomiasis, es provocada por una reacción inmunológica nociva que resulta en inflamación y obstrucción del flujo sanguíneo en el hígado y el bazo.

La infección en humanos por S. mansoni y S. japonicum, tiene dos órganos blancos, el hígado y el intestino respectivamente, distinguiéndose dos distintos síndromes clínicos: esquistosomiasis intestinal y la menos común pero mas severa, hepatoesplenía. El desarrollo de la hepatoesplenía por Schistosoma es insidiosa y crónica y en casos avanzados se caracteriza por hepatomegalia, esplenomegalia, ascitis y anemia, y la formación de varices esofágicas que pueden romperse y causar la muerte. Sin embargo, los síntomas mas importantes parecen ser la fibrósis del hígado acompañada por hipertensión de la porta y esplenomegalia. Los estudios realizados por Cheever en Brasil (1968) y en Egipto (1977), han demostrado que la fibrosis se puede relacionar con la

intensidad de la infección, Warren (1974) encontró que el grado de la hipertensión de la porta se encuentra directamente relacionado con el tamaño de los granulomas. Sin embargo no es claro aún si existe relación entre la hipertensión de la porta y la esplenomegalia, pues el crecimiento de el bazo puede ocurrir en ausencia de presión elevada en la porta.

Después de el hígado, el intestino es el siguiente tejido mas afectado en la infecciones de S. mansoni y S. japonicum. Existen reportes de mala absorción intestinal en el hombre (Warren 1969). Sin embargo experimentos con ratones indican que la absorción intestinal no parece ser un problema para estos animales (Domingo y Warren, 1973). Se sabe también que la poliposis contribuye a la pérdida de proteína (Lehman et. al., 1970). La pérdida de sangre durante hemorragias intestinales se puede deber a la presión en la porta, o al daño a los capilares durante la excreción de los huevos. En el humano la obstrucción intestinal por S. japonicum es común y se atribuye a la reacción inflamatoria, en contra de la acumulación masiva de los huevos (Ch'en y Ch'en, 1957; Warran 1969). En las infecciones intensivas por S. haematobium se presentan ulceras y uropatía obstructiva.

RESPUESTA INMUNE.

Las relaciones parásito-hospedero, varían considerablemente de acuerdo a la combinación de hospedero y de especie de esquistosoma de que se trate, por ejemplo, Ciotti et. al., (1977) describieron dos clases de hospederos diferentes: el hospedero permisivo que es aquel que permite a la esquistosomula completar su ciclo de vida hasta la madurez y realizar la ovoposición por un largo período en las venas mesentéricas, por ejemplo; el hombre, ratón, hamster, monos como Babuon y Rhesus; y hospedero no permisivo que el que, en contraste con el anterior, no permite el desarrollo completo de la esquistosomula o interrumpe la ovoposición dentro de un corto tiempo, siendo este el caso para cobayo, conejo y rata.

En el hombre y otros hospederos permisivos, el gusano adulto sobrevive y deposita sus huevos por meses o años. En la mayoría de los hospederos, incluyendo al hombre (Bradley y Mac. Cullogh 1973; Who 1974), hay un desarrollo gradual de la respuesta inmune a la reinfección, esta respuesta se debe a la presencia continua de una alta población de gusanos adultos. Al fenómeno en el cual los gusanos adultos son resistentes a la respuesta inmune que ellos mismos provocan, se le conoce con el nombre de inmunidad concomitante (Smithers y Terry 1969). Este concepto ha dado pie a dos campos de investigación; uno relacionado con la inducción y los mecanismos de la respuesta inmune y el

otro con la habilidad del parásito para evadir esta respuesta.

Se ha demostrado que la esquistosomula tres horas después de la penetración, es susceptible a diferentes mecanismos inmunes que tienen que ver con factores celulares y humorales. Sin embargo en estudios in vitro e in vivo, se ha demostrado que después de las primeras horas de la penetración, la esquistosomula se vuelve menos vulnerable a la respuesta inmune.

Se sabe que el hospedero presenta una respuesta inmune vigorosa en contra de la infección por esquistosomula (Scmithers y Terry 1969; Phillips y Colley 1978), pero no está claro si la protección es dependiente del timo o si el mecanismo efector se basa en una inmunidad humoral o mediada por células. Existen estudios que parecen indicar que un anticuerpo dependiente de un mecanismo efector de tipo celular, que tiene un papel importante en la destrucción de esquistosomulas, posiblemente los eosinófilos sean las células efectoras in vitro. En años recientes, el desarrollo de pruebas más sensibles y especializadas, ha permitido el análisis de varios de los componentes específicos de la respuesta inmune y ha facilitado también la identificación de los daños provocados en el parásito y su total destrucción.

Se ha demostrado con estudios in vivo, la existencia

de efectos citotóxicos del complemento debido a la presencia de anticuerpos, Santoro et. al., (1979,1980), observó efectos citotóxicos en la superficie de esquistosomulas recién transformadas cuando eran incubadas con un suero normal y complemento activado. La esquistosomula después de un corto tiempo pierde la capacidad de activar el complemento, así el daño provocado por éste, puede ser el responsable de la muerte de una porción de esquistosomulas que recientemente han penetrado por la piel del animal. El efecto de complemento-anticuerpo en esquistosomula, fué descrito por Clegg y Smithers en 1972, usando suero proveniente de monos Rhesus, infectados con S. mansoni. Ellos observaron que, después de uno o dos días en cultivo con suero normal y eritrocitos, o en un período de tiempo similar en la piel del hospedero, el parásito se volvía resistente. Este tipo de anticuerpos citotóxicos se han encontrado en sueros de pacientes infectados y en varios hospederos experimentales (Capron et. al., 1979; Pérez et. al., 1974; Tavares 1978; Ramlho-Pinto et. al., 1979). Al parecer, los anticuerpos participan en la inmunidad adquirida in vitro y están en cooperación con otros componentes del sistema inmune.

Diferentes tipos de células participan en la respuesta dañando a las esquistosomulas en presencia de anticuerpos y de complemento. Se ha demostrado in vitro, que el eosinófilo, es la célula mas eficiente a este respecto y es capaz de fijarse a la superficie aún cuando sean la mi-

norria en una población de células (Mc Laren 1980). Los eosinófilos se adhieren a la superficie de esquistosomulas jóvenes en presencia de sueros de diferentes hospederos infectados (Guterworth et. al., 1975, 1977; Capron et. al., 1978; Ramalho Pinto et. al., 1978).

Buterworth (1979), demostró que los linfocitos no tienen una actividad citotóxica directa, sino más bien las células efectoras son neutrófilos, macrófagos y plaquetas, que se adhieren a la superficie y dañan a las esquistosomulas directamente (Dean 1974 1974; Capron 1975, 1979; Joseph et. al., 1983).

La habilidad para evadir la respuesta inmune se desarrolla rápidamente después de que la cercaria ha penetrado por la piel. Una explicación de este fenómeno es la adquisición de moléculas del hospedero, las cuales enmascaran los antígenos del parásito, a estas moléculas se les conoce como "antígenos del hospedero" y fueron descritas por primera vez por Damian (1964). El y Caprón et. al., (1965), demostraron que el parásito tiene la capacidad de adsorber ciertas moléculas del hospedero a su superficie, Smiths et. al., (1969) trasplantó S. mansoni de ratón a monos inmunizados contra antígenos de ratón, encontrando que los parásitos fueron rápidamente destruidos. Estos experimentos indicaron que S. mansoni, adquiere pasivamente los antígenos del hospedero y éstos enmascaran los antígenos propios del

parásito, protegiendolos de la respuesta inmune específica del hospedero. Las esquistosomulas jóvenes, no tienen tiempo de adquirir estos antígenos y son más vulnerables a la respuesta inmune del huésped.

En estudios posteriores, se encontró que algunos de estos antígenos pueden ser glicoproteínas como las que forman parte del complejo de histocompatibilidad de ratón (Scher et. al., 1978; Gitter y Damian 1982). El mecanismo exacto para la adquisición de estos antígenos no está claro, se propone que los antígenos se liberan de las células del hospedero porque la membrana los expone o por la presencia de enzimas secretadas. Un dato contradictorio sin embargo, fue reportado por Tavares (1980), quien observó que los esquistosomulas recientemente transformadas y cultivadas en un medio definido, desarrollan la habilidad de evadir la respuesta inmune en ausencia de moléculas del hospedero. Samuelson et. al., (1980), ha sugerido que puede deberse a la pérdida espontánea de los antígenos y receptores de la superficie del parásito.

Los cambios intrínsecos en la membrana de la esquistosomula, también pueden ser responsables de la adaptación exitosa del parásito, el cual puede sobrevivir muchos años en contacto con la sangre del hospedero sin sufrir daño, por ejemplo Rumjanek y Simpson (1980) observaron que la esquistosomula tiene la habilidad de incorporar lípidos neutros en la superficie, Pérez y Terry (1973) en experimentos

in vitro, observaron que gusanos adultos de S. mansoni pueden reparar pequeños daños en su superficie.

Otra explicación que se puede dar para el fenómeno de inmunidad concomitante es que la infección por esquistosoma podría inducir a un bloqueo inmunológico general (Phillis 1975; Kemp et. al., 1977) debido a la presencia de productos liberados por la esquistosomula que bloquean el mecanismo efector, por ejemplo las enzimas proteolíticas (Ariault et. al., 1981) y los factores que inhiben las funciones de los linfocitos (Dessaint et. al., 1977; Capron et. al., 1980). Sin embargo, en una situación donde hay una exposición continua de los antígenos del parásito, la respuesta inmune sería controlada a través de mecanismos de regulación normales que incluyen células supresoras y factores humorales (Ramalho-Pinto et. al., 1979; Ramalho-Pinto y Smithers 1981), por lo que es difícil diferenciar los mecanismos inmunoregulatorios normales, de los efectos inducidos por los productos de la esquistosomula los cuales específicamente ayudan al parásito a sobrevivir en el hospedero.

LA SUPERFICIE DEL PARASITO.

Los estudios de la respuesta inmune del hospedero a la infección por esquistosomula in vivo e in vitro han revelado que la superficie del parásito no solo provoca sino, que al mismo tiempo es el blanco del ataque inmunológico.

La cercaria posee un tegumento trilaminado cubierto por un glicocalis cuya presencia se asocia con la supervivencia de este organismo en el medio acuático. Después de tres horas de haber penetrado a la piel del hospedero, esta membrana trilaminada se transforma en una doble membrana (Hockley 1972, 1973; Hockley y Mc Laren 1973). En los gusanos adultos la membrana puede estar constituida por capas múltiples (doce capas) y puede contener canales, Mc La ren y Hockley (1977), propusieron que esta membrana es una adaptación a su habitat intravascular. La membrana que envuelve al tegumento presenta las características típicas de una membrana plasmática como son por ejemplo: que se encuentre cargada negativamente (Stein y Lumaden 1973) y que contiene carbohidratos en la superficie exterior (Binnet y Seed 1977).

La composición de las proteínas totales de la membrana de cercarias, esquistosomulas y gusanos adultos, resultaron similares cuando se probaron en electroforésis en geles de acrilamida (Snary et. al., 1980). Sin embargo, Brink et. al., (1980) demostró que existe un ligero cambio en las

proteínas de la cercaria y de la esquistosomula y ésto se atribuye a la pérdida de la cola y el glicocalis. En varios trabajos se ha demostrado que en todos los estadios de diferenciación en S. mansoni se expresan carbohidratos complejos en la superficie (Bennet y Seed 1977; Murrell et. al., 1978; Simpson y Smith 1980; Simpson et. al., 1983). Se ha encontrado que existen también alteraciones cuantitativas y cualitativas en los azúcares de la superficie en el parásito maduro. Los oligosacáridos de la superficie son mas complejos y parecidos a los expuestos en las células de la sangre de los mamíferos (Simpson y Smithers 1980) Estos análisis estructurales son consistentes con las observaciones inmunológicas de la superficie del parásito.

USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL ESTUDIO DE S. mansoni.

La utilización de anticuerpos monoclonales en la detección de antígenos ofrece ventajas en comparación con las técnicas comunmente utilizadas con anterioridad, por ejemplo: un anticuerpo monoclonal puede identificar antígenos que se encuentran poco expuestos o aquellos que no se pueden cuantificar externamente.

Existen reportes de la producción de anticuerpos monoclonales, que reconocen antígenos en la superficie de la esquistosoma (Smith et. al., 1982; Taylor et. al., 1982; Gryrch et. al., 1982; Zooda y Philips 1982; Norden et. al., 1982; Horowitz et. al., 1983; Arostein et. al., 1983; Ta-

vares et. al., 1984; Harn et. al., 1984), los anticuerpos se adhieren a la superficie y la señalan como blanco para la respuesta inmune. Se ha demostrado también que la alta concentración de anticuerpos en contra de cierto antígeno puede proteger de la infección, por lo que son de particular interés los antígenos que son reconocidos por un anticuerpo monoclonal capaz de tener algún efecto citotóxico. Zodda y Philips (1982) precipitaron con un anticuerpo monoclonal dos antígenos con un peso molecular de 160 KD y 130 KD de un extracto yodinado de cercaria, Horowitz et. al., (1983), identificaron antígenos de 60 KD, 50 KD y 19 KD, en un sonicado de cercaria. Este anticuerpo presentó efectos citotóxicos en experimentos in vivo. Los anticuerpos producidos por Taylor y Butterworth (1982), Norden et. al., (1982), Arostein (1983), reconocieron antígenos de esquistosomas de pesos moleculares de 24 KD, 120 KD y 180 KD respectivamente. Norden con el mismo anticuerpo monoclonal posteriormente pudo identificar una glucoproteína de 170 KD de un extracto de gusano adulto, indicando la existencia de reacciones cruzadas entre diferentes estadios del parásito y dando la primera prueba experimental del fenómeno de inmunidad concomitante.

El anticuerpo monoclonal producido por Gryzch et. al., (1982) precipita un antígeno de 38 KD. Además se demostró que este anticuerpo medía la respuesta por eosinófilos in vitro. El monoclonal de ratón producido por Tavares et. al

(1984) -quién medía la respuesta por cosinófilos y complemento- precipitó un antígeno de 20 KD en ambos casos los niveles de toxicidad logrados fueron comparables con aquellos sueros hiperinmunes. Los dos monoclonales, el anti 38 KD y el anti 20 KD, reaccionan con antígenos precipitados de sueros de un hospedero infectado, lo cual los hacen candidatos para pruebas de digestión. (Dissous et. al., 1982; Simpson et. al., 1985).

Además algunos autores como Tavares (1984) y Smith (1982), encontraron que los anticuerpos monoclonales reconocen antígenos específicos de la especie.

Bickle et. al., (1986), produjo dos anticuerpos monoclonales en contra de la superficie de esquistosomas de S. mansoni que confirieron protección para ratones M7B3A, del 28 al 78% y del 14 al 58% para ratones M22H12C; el primero reconoció un antígeno de 16 KD y el segundo de 32 KD. Por otro lado Pino Heiss (1986), produjo cuarenta y seis anticuerpos monoclonales en contra de secreciones de la glándula preacetabular de cercaria, uno de ellos resultó ser específico para cercaria y se unía a un antígeno obtenido de un extracto crudo de las secreciones y cuyo peso molecular era de 30 KD.

MATERIAL Y METODOS

Para la elaboración de esta tesis, se utilizó la cepa Puerto Rico de Schistosomula mansoni, cuyo ciclo de vida se mantiene rutinariamente en el laboratorio de la Dra. Ruth Arnon (Departamento de Inmunología Weizmann Institute, Israel). Los parásitos se mantuvieron en caracoles Riomphilaria glabrata y en ratones CD-1 ICS (obtenidos de laboratorios Jackson USA). Las cercarias se obtuvieron después de 90 minutos de someter a los caracoles a la luz artificial. Las esquistosomulas se prepararon por transformación mecánica (Colley y Wickel 1974) y se cultivaron en una concentración aproximada de 1000-1500 organismos por mililitro en medio sintético definido (MSD), a 37°C en atmósfera húmeda con 10% de CO₂ en frascos para cultivos de tejidos de 50 ml (Corning Medical and Scientific Medfield Ma.). Los gusanos adultos se obtienen por perfusión hepática en ratones de 7 a 8 semanas de infectados, (Smithers y Terry, 1965).

TRANSFORMACION MECANICA DE CERCARIA A ESQUISTOSOMULA.

Se concentró en el fondo de tubos cónicos de 50 000 a 100 000 cercarias agregando 0.5 a 1 ml de Ficol 400 al 15% (Sweden) en MSD. Las cercarias se centrifugaron durante 3 min a 1200 revoluciones por minuto, el precipitado se resuspendió en MSD (de 4 a 5 ml) y se pasaron 16 a 18 veces

através de una jeringa de 3 ml con una aguja No. 21, esto con el fin de desprender mecánicamente los cuerpos de las colas (Colle y Bickel, 1974). Posteriormente se lavaron aproximadamente 10 veces con MSD para separar los cuerpos con colas desprendidas. Para el lavado se agregaron 10 ml de medio estéril dejándolos sedimentar por 10 min, desechnando el sobrenadante y conservando el sedimento (que contiene las esquistosomulas) (James y Taylor 1976), se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda y 10% de CO₂ por tres horas.

OBTENCION DE GUSANOS ADULTOS.

Estos se obtuvieron de ratones con 7 a 9 semanas de infección mediante perfusión hepática con MSD que contenía 10 unidades de heparina por mililitro (Organon, Holland), según el método de Smithers y Terry (1965). Los gusanos fueron inmediatamente lavados y separados mediante sedimentación con 5 ml de MSD que contenía suero normal humano.

RATONES.

Se utilizaron ratones GD-1 ICR (Jackson Laboratory) de dos meses de edad para mantener el ciclo de vida y ratones de las cepas BALB/C (Laboratorios Jackson, USA) para inmunizar y hacer la fusión celular y para la producción de ascitis.

PREPARACION DE ANTIGENOS.

Se utilizaron tres diferentes fracciones antigénicas de S. mansoni: un homogeneizado total, una fracción solubilizada con detergente y una fracción semipura enriquecida en Acetil-colinesterasa.

PREPARACION DE EXTRACTOS TOTALES.

Un matraz que contenía aproximadamente 1×10^6 cercarias, se colocó durante dos horas a 4°C para permitir la sedimentación de los parásitos. Una vez sedimentados, se centrifugaron por 3 minutos a 1200 revoluciones por minuto para concentrarlos.

El precipitado se resuspendió en 5 ml de amortiguador TRIS 0.05 M y pH 7.5, éste contenía los siguientes inhibidores de proteasas, leupeptin 40 $\mu\text{g/ml}$, pepstatin a 20 $\mu\text{g/ml}$, bacitracin 1 mg/ml y aprotinin 0.2 u/ml (Sigma). Los parásitos se expusieron durante dos minutos en un sonicador (Heat System ultrasonic, Plain view N. Y.) a 50% de los ciclos repitiendose por triplicado alternando la sonicación con agitación.

Las esquistosomulas (aproximadamente 5×10^5) se homogenizaron bajo las mismas condiciones. Los gusanos adultos (200 a 250 aproximadamente) se resuspendieron en 2.5 ml de amortiguador TRIS 0.05 M pH 7.5, se sonicaron de 6 a 8 veces. Durante todo el procedimiento el baño del sonicador se mantuvo a 4°C . El método utilizado para cuantificación

de proteína, fué el método de Lowry.

PREPARACION DE EXTRACTOS SOLUBLES.

Los sonicados de cercaria, esquistosomula y gusano adulto, se solubilizaron mediante una incubación por 30 min a temperatura ambiente en amortiguador TRIS 0.05 M pH 7.5 que contenía 0.1% de Triton X-100. Las diferentes preparaciones se centrifugaron a 100,000 X G durante 4 horas a 4°C y se conservó el sobrenadante a -20°C hasta su uso.

FRACCION ENRIQUECIDA EN ACETILCOLINESTERASA (FEAChE).

La fracción antigénica semipura se obtuvo de Bertha Espinoza (Departamento Chemical Immunology Weizmann Institute of Science, Israel). Esta fracción consistía de 4 - bandas proteicas, una de las cuales era la de la enzima Acetilcolinesterasa. La metodología para obtener esta fracción ha sido reportada con anterioridad (Goldhist et. al., 1986).

INMUNIZACION.

Ratones hembras BALB/C de 6 a 8 semanas de edad, se inmunizaron con la fracción enriquecida en acetilcolinesterasa, aproximadamente 50 µl de FEAChE con una concentración de 1 µg/ml, se inyectaron subcutáneamente en el cojinete plantar de estos ratones en 3 ocasiones cada 15 días. En las dos primeras ocasiones se utilizó también adyuvante completo

de Freud (ACF) en una porción 1:1. Finalmente en los días 4 y 3 antes de su sacrificio, se les aplicaron otras dos inyecciones del antígeno sin adyuvante.

CELULAS.

Para la fusión se utilizaron dos clases de células, una línea de mieloma cepa NSO HGPRT(-) y células de bazo de ratones inmunizados con la fracción enriquecida con la enzima acetilcolinesterasa.

Células de Mieloma.- Las células de mieloma utilizadas en la hibridación, fueron las NSO HGPRT(-) variante de MOPC 21 obtenidas por el Dr. Milstein. Estas líneas de células no producen ninguna inmunoglobulina.

Las células se cultivaron en botellas de 50 ml (Nure Bio. Med. Lab. Finlandia) a una concentración de aproximadamente 5×10^6 células por mililitro. Una semana antes de la fusión se agregó al medio γ -azoguanidina (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para evitar la presencia de células que pudieran crecer en medio HAT (células revertantes).

Células de Bazo.- Los bazos de los ratones inmunizados se extrajeron en una campana estéril y se colocaron en cajas de Petri que contenían MEMD. Se trabajó teniendo cuidado de evitar contaminación debido al pelo del animal. Las células se disgregaron con un bisturí, resuspendiéndolas en medio MEMD estéril en un tubo cónico y colocándolos a 4°C

durante 10 min en posición vertical, dejando que los pedazos de tejido se sedimentaran y transfiriendo la suspensión de células a un nuevo tubo, aquí las células se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto y resuspendiéndose el paquete celular en MEMD estéril. Finalmente se tomó una muestra y se contó el número de células obtenidas.

FUSION CELULAR.

Fusión.- Se mezclaron linfocitos y células NSP en una proporción de 5:1 en un tubo de 50 ml (no más de 10^8 células de bazo), se agregaron 40 ml de MEMD, se centrifugó a 1500 rpm, se quitó el sobrenadante cuidadosamente y se agitó el tubo ligeramente para evitar la formación de precipitado. Se agregaron 2.0 ml de Polietilenglicol (PEG) (a 37°C) gota a gota con una pipeta, resuspendiendo ligeramente por 1 min tratando de no destruir los pequeños agregados y se incubó 1 min a 37°C . Se agregó entonces el MEMD (a 37°C) para diluir el PEG, esta adición se hizo lentamente y mezclando suavemente las células, se centrifugó a 1500 rpm desechar el sobrenadante y tomando una muestra para contar las células vivas. Se resuspendieron las células fusionadas en una concentración de aproximadamente 5×10^4 de células NSO vivas/ml de MEMD-SC-HAT y se distribuyeron en alícuotas de 0.1 ml de cada uno de los 96 pozos de una microplaca (Nune Bio Med Lab. Finalandia), incubándose a 37°C en 8% de O_2 en una incubadora humidificada. Después de 24 h se agregaron 0.1 ml de MEMD-SC-HAT (precalentado a 37°C)

a cada pozo. Cinco días más tarde se sustituyó el medio viejo por medio fresco (a 37°C), esta operación se repitió cada 3 ó 4 días. El crecimiento de las células híbridas se inspeccionó frecuentemente. Después de aproximadamente 10 días los sobrenadantes se revisaron para localizar la presencia de anticuerpos. Dos semanas después de la fusión, el medio HAT se reemplazó por medio HT y una semana después por MEMD-SC. Los pozos que contenían anticuerpos, se transfirieron a placas de 24 pozos (Nure Bio Med Lab Finlandia) y después en botellas para cultivo de tejidos.

CLONACION.

Se diluyeron las células híbridas por el método de dilución limitante, hasta obtener una célula por pozo y se agregaron células de bazo de ratones no inmunizados en una concentración de 10^5 , como células acompañantes. Días más tarde se verificó la producción de anticuerpos.

PRODUCCION DE ASCITIS.

Para obtener suficientes cantidades de anticuerpos monoclonales, las clonas productoras de anticuerpos se expandieron y se inocularon en la cavidad peritoneal de ratones BALB/C que habían sido previamente tratados con Pristan (Aldrich). Aproximadamente diez días después de la inoculación, los ratones presentaron líquido ascítico en la cavidad abdominal. Este líquido se drenó por punsi3n peritoneal.

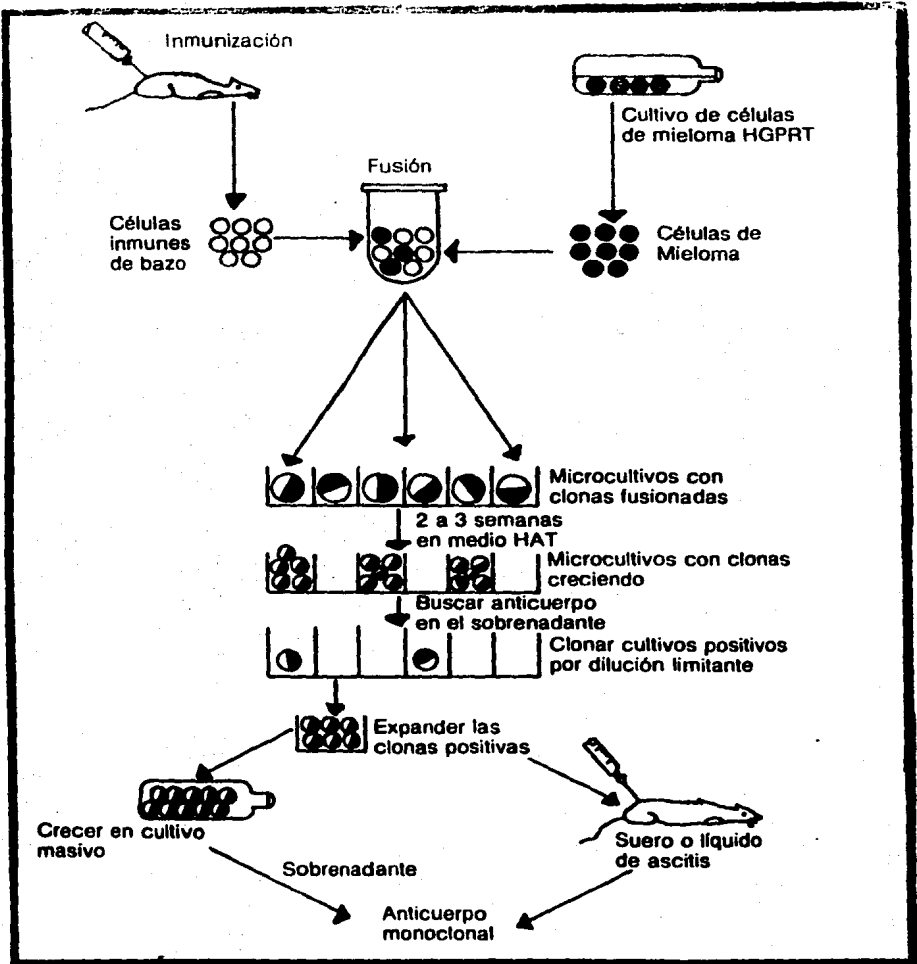


Fig. 3 Procedimiento general para la producción de anticuerpos monoclonales en ratón.

ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA).

Se usaron placas titerek (Flow laboratory) a los cuales se adsorbieron 100 μ l por ppzo de antígeno disuelto en amortiguador de carbonatos pH 9.5. La concentración de antígeno utilizado fué de 5 μ g/ml extracto crudo de parásitos, se incubaron dos horas a 37°C. Después cada pozo se lavó 3 veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 7.5 que contenía 0.1% de Tween 20 (Sigma) el mismo lavado se repite después de cada paso. Para bloquear uniones no específicas, se utilizó albumina de bovino al 1% en SSAF (100 μ l por pozo) durante una hora a 37°C. Después se agregaron 50 μ l por pozo del anticuerpo monoclonal y se incubó durante dos horas a 37°C. Posteriormente se agregaron 50 μ l por pozo de protefna A- β -galactosidasa (Amersham International) diluída 1:500, se incubó tres horas a 37°C o a 4°C toda la noche. Finalmente se agregaron 100 μ l del sustrato ortonitrofènil β -D-galactopiranosida 3 mM (Amershan International), incubandose a temperatura ambiente una hora. Para parar la reacción se utilizaron 50 μ l de carbonato de sodio 1 M. Se leyó a 405 nm en un espectrofotómetro (Titertek ELISA reader Multiskan MC, Flow laboratories).

RADIOINMUNOENSAYO (RIE).

A placas de cloruro de poliestiréno (Bri-fly Falcon No. 3911 Bacton Dickinson), se adsorbieron 100 μ l del antígeno (5 μ g/ml) diluido en SSAF pH 7.5. Se incubó dos horas a temperatura ambiente. Después de cada paso se lavó tres veces con albumina al 1% en SSAF, con el fin de bloquear uniones inespecíficas, se agregaron 200 μ l por pozo de albumina al 1% en SSAF y se incubó dos horas a temperatura ambiente y después a 4°C toda 1 noche. Posteriormente se agregaron 50 μ l de proteína A marcada radiactivamente con I^{125} y conjugada a suero de borrego anti ratón. Aproximadamente 100,000 cuentas por minuto en cada pozo. Se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Finalmente se lavó, se secó a temperatura ambiente, y se contó en un contador gamma (Gammamatic Kontron).

DETERMINACION DE LA CLASE DE LOS ANTICUERPOS.

La clase de los anticuerpos se determinó por el método de Ouchterlony (Ouchterlony, 1958).

INMUNOPRECIPITACION CON Staphylococcus aureus.

En éste trabajo la inmunoprecipitación se realizó de acuerdo al método de Kessler (1975).

Se utilizó S. aureus inactivado en formol al 10% y suspendido en SSAF. El cual se centrifugó durante un minuto a

1200 revoluciones por minuto (rpm) el precipitado se re-suspendió en 800 µl de amortiguador A (TRIS-ácido clorhídrico 50 mM pH 7.4, EDTA cloruro de sodio 150 mM), se incubó 15 min a temperatura ambiente, y se repite ésta misma operación una vez más.

Preabsorción.- Se mezcló extracto de cercaria marcado radiactivamente con I^{125} con 25 µl de S. aureus previamente lavado como se indicó anteriormente, se incubó 10 min a 0°C se centrifugó a 1200 rpm durante 60 seg, se toma el sobrenadante para usarse como antígeno en la inmunoprecipitación.

Inmunoprecipitación reacción antígeno-anticuerpo.- Se mezcló antígeno con el anticuerpo y se llevó a un volumen total de 500 µl con amortiguador A, se incubó una hora a 0°C se agregaron 25 µl de la bacteria y se incubaron a 0°C durante 10 min. Posteriormente se lavó tres veces con amortiguador B (Sacarosa 5%, TRIS/ácido clorhídrico 50 mM pH 7.4, cloruro de sodio 500 mM, EDTA/5 mM), mediante centrifugación a 1200 rpm durante 30 seg. Finalmente se lavó de la misma manera con amortiguador C-(TRIS-ácido clorhídrico 50 mM pH 7.4, cloruro de sodio 50 mM, EDTA/ 5 mM).

Los precipitados obtenidos fueron analizados por medio de electroforésis en gel de poliacrilamida-SDS.

PRECIPITACION DE INMUNOGLOBULINAS CON SULFATO DE AMONIO.

Se precipitó ascitis de ratón que contenía anticuerpos monoclonales. Estos ascitis, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min para eliminar agregados. Se mezclaron volúmenes iguales de ascitis y sulfato de amonio concentrado final de 40% pH 7.0. La adición de sulfato de amonio se realizó lentamente con agitación constante, esta mezcla se incubó durante doce horas a 4°C y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos, el precipitado se resuspende en solución de sulfato de amonio al 40% pH 7.0 y se centrifuga nuevamente tres veces en las mismas condiciones anteriores. Finalmente el precipitado se resuspendió en SSAF en la mitad del volumen original, se dializó amortiguador TRIS HCl 10mM pH 7.5, hasta la eliminación del sulfato de amonio.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Para la construcción de la columna, se suspendieron 50 g de DEAE en 400 ml de TRIS-ácido clorhídrico 200 mM pH 7.8 y se empacaron en una columna de 22 cm de largo y 2.5 cm de diámetro. La columna se lavó para equilibrar la solución amortiguadora TRIS-ácido clorhídrico 10 mM de cloruro de sodio. Se colectaron fracciones de 4 ml se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro (Carl Zeiss Alemania). Las fracciones que contenían proteínas se colectaron y se dializaron contra solución amortiguadora de TRIS-ácido clorhídrico 10 mM pH 7.5. Esta fracción de anticuerpos puros

se mantuvo a -20°C hasta su uso.

COLUMNA DE PROTEINA A.

La preparación de la columna así como la elusión de la muestra se describen a continuación:

En 5 ml de SSAF se suspendieron 1.5 gr de proteína A (Janssen Pharmaceutica) y se agitó durante 15 min. A continuación se construyó la columna y se lavó con SSAF 50 mM pH 8.0 hasta alcanzar éste pH. A ésta columna, se le agregaron 5 ml de inmunoglobulinas en SSAF y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Y se lavó la columna con amortiguador de fosfatos 0.14 M pH 8 hasta que la lectura en absorbancia fue menor de 0.2 - 0.1 a 200 nm. Se eluyó entonces con 20 ml de amortiguador de citratos pH 5.0 y se colectaron fracciones de 2 ml cada una, se continuó la elusión con aproximadamente 20 ml de amortiguador de citratos pH 3.0 y se colectaron fracciones de 2 ml. A todas las muestras se les determinó proteína a una absorbancia de 280 nm. Finalmente se dializaron contra SSAF durante 2 días y se guardaron a -20°C hasta su uso.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

El análisis de polipeptidos, se realizó en geles de poliacrilamida con una concentración de 7.5% a 15% (gradiente) con dodecilsulfato de sodio (SDS), 50 μl de buffer TRIS-ácido clorhídrico en 0.05 M, pH 6.8 que contenía EDTA 0.002 M,

1% β -mercaptoetanol y 10% de glicerol calentandolas a ebullición durante 5 min. Los geles se tiñieron con 0.25% de azul brillante de Cromassie R250 en 7% de ácido acético y 50% de metanol y se destiñieron con 7% de ácido acético y 20% de metanol. Los estándares utilizados en orden decreciente de peso molecular: fosforilasa b(94KD), albumina de suero de bovino (67KD), ovoalbumina (43KD), anhidrasa carbónica (30KD), inhibidor de tripsina de soya (20KD), lactoalbumina (14 KD).

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA (Western Blot).

El extracto total de cercaria se sometió a una electroforésis en gel de poliacrilamida-SDS y posteriormente se transfirió a papel de nitrocelulosa (Membrananfilter BA850, 45 mm Schleicher y Schiill Germany) utilizando un aparato para Western blot. Los estándares de peso molecular (los mismos que utilizaron para la electroforésis en geles de poliacrilamida), se tiñieron con amido azul al 0.1% (Sigma) en metanol al 50%. El papel que contenía el extracto de cercaria se bloqueó con hemoglobina al 1% en SSAF a 4°C para evitar reacciones inespecíficas. Posteriormente se lavó, para quitar el exceso de hemoglobina, con SSAF que contenía Tween 20 al 1% (el lavado se repite después de cada incubación), se incubó con el anticuerpo monoclonal en una dilución 1:15 en hemoglobina al 1% en SSAF durante tres horas a

temperatura ambiente, finalmente se lavó varias veces para eliminar el exceso de radiactividad. Durante todo el tiempo de trabajo con material radiactivo se tomaron las debidas precauciones para evitar posibles contaminaciones.

OXIDACION CON PERYODATO.

Para determinar si el antígeno reconocido por los anticuerpos monoclonales era una glucoproteína, los antígenos adsorbidos en las placas para ELISA, se trataron de la siguiente manera:

Se lavaron con amortiguador de acetatos 50 mM pH 4.5 y se incubaron con 100 μ l de peryodato de sodio 5 mM en amortiguadores de acetatos. Después de una hora a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante tres lavados con amortiguador de acetatos, finalmente se agregaron 100 μ l de glicina al 1% en SSAF se incubó 30 min a temperatura ambiente, se lava con SSAF tres veces.

Después de este tratamiento al antígeno, se continuó el ELISA en la misma forma reportada con anterioridad.

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION. GRADIENTES DE SACAROSA.

Los coeficientes aparentes de sedimentación se determinaron de acuerdo a Martin y Ames (1961) mediante sedimentación de gradiente de sacarosa del 5 al 20% peso/volumen en TRIS 0.05 M pH 7.5. Las proteínas marcadoras fueron

β -Galactosidasa de E. coli (16 S), catalasa de hígado de bovino (11 S). La sedimentación se llevó a cabo a 4°C, usando un rotor TW51 a una velocidad de 34 rpm, durante 16 hr en una ultracentrifuga Beckman L-5.

El primer marcador se determinó de acuerdo al método de Craven et. al., (1965) utilizando β -o-galactopiranososa como sustrato y cuantificando la absorbancia a 420 nm (ver más adelante sección reacciones enzimáticas). La catalasa se localizó al determinar la absorbancia a 407 nm de cada una de las fracciones.

REACCIONES ENZIMATICAS.

Actividad de la acetilcolinesterasa.

La actividad de la acetilcolinesterasa se determinó bajo las condiciones descritas por Johnson y Rusell (1975), usando como sustrato acetilcolina marcado radiactivamente con Tritio (³H)-acetilcolina a una concentración final de 3 mM, fueron incubadas por 2 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al agregar 100 μ l de una solución que contenía ácido cloroacético 1 M, hidróxido de sodio 0.05 M y cloruro de sodio 2 M. La radiactividad producida se extrajo en 4 ml de solución centillante (alcohol isoamílico al 10% Kilafloor al 9% y Xileno al 8%) y fué cuantificada en un contador Beta Parckard).

Actividad de la β -galactosidasa.

La actividad de la enzima β -galactosidasa se determinó según el método de Craven, et. al., (1965). Se tomaron 20 μ l de muestra problema y se agregó el sustrato p-nitrofenil β -D-galactopiranosido 5 M en SSAF (100 μ l) mas 100 μ l de agua destilada, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se leyó a 408 nm en un espectrofotómetro para ELISA (TITERKER ELISA reader Multiskan Mc. Flow laboratories).

ENSAYO CITOTOXICO.

La susceptibilidad de la esquistosomula a los anticuerpos monoclonales en presencia de complemento, fué determinada como lo describe Levi Schaffer y Smolarsky (1981). Brevemente, 100 μ l de medio MSD que contenía 250 esquistosomulas de 3 h después de transformadas, se incubaron con volúmenes iguales de los sobrenadantes del cultivo de hibridomas o con suero normal. Después de 30 min de incubación a 37 °C, se agregaron 100 μ l de suero de cobayo como fuente de complemento (el complemento diluido 1:1 en suero normal de conejo). Los controles consistieron en muestras con anticuerpo y complemento que había sido previamente desactivado a 56°C por espacio de 30 min. Las muestras se incubaron con los anticuerpos monoclonales y el complemento por 24 h a 37°C y en una atmósfera de 10% de CO₂. Finalmente, se de

terminó el porcentaje de muerte de las esquistosomulas basándose en el criterio de inmovilidad y con la ayuda de un microscopio óptico.

PURIFICACION DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL IC23C21.

Brevemente el método fué como sigue: 1.5 ml de Affi-Gel se lavaron con tres volúmenes de agua desionizada fría (4°C) teniendo cuidado en no dejar secar el gel. El gel húmedo se trasladó a tubo y se agregaron 45 mg de anticuerpos puros IC23C21 disueltos en BFS pH 7.5 a 4°C, agitándose suavemente por una hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo se filtró el gel para quitar los anticuerpos no unidos al gel y se incubó 1 h a temperatura ambiente con 1 M glicina pH 8 para bloquear cualquier ester que pudiera haber quedado activo. Después de este bloqueo, el gel se transfirió a una columna (jeringa de 3 ml) y se lavó con SSAF pH 7.4 y con amonio 0.1 N más 0.1% de TRITON x 100 que se usaría posteriormente para eluir la proteína específicamente unida a la columna. Después de esto, la columna se volvió a equilibrar con SSAF pH 7.4.

Después de preparar la columna, se procedió a purificar el antígeno reconocido por el anticuerpo IC23C21 para lo cual 600 µl de la fracción de cercaria solubilizadas con triton, se marcaron con I^{125} y se aplicaron a la columna de

Affi-Gel 10 anticuerpos IC23C21 en total se aplicaron 10×10^6 cpm, se incubó por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con SSAF pH 7.4 hasta que todo el exceso de antígeno fue removido. Finalmente se eluyó con amonio 0.1 N mas 0.1% de triton x 100, la elusión se monitoro en un contador Beta Pachard.

El material obtenido de esta columna, se redujo con β -mercaptoetanol y se electrotransferió en un gel de acrílida SDS. Finalmente el gel se secó y la radiactividad se localizó sobre una película de rayos X (Agfa-Gevoert).

RESULTADOS

INMUNIZACION CON FRACCION ENRIQUECIDA CON ACETILCOLINESTE RASA (FEAChE).

El antígeno enriquecido en AchE, que se utilizó para la producción de los anticuerpos monoclonales, se obtuvo siguiendo la técnica reportada por Goldust et. al., (1986). según esta técnica, la utilización de la columna Sefarosa acoplada al inhibidor de AchE (N-(6-aminocaproil-6-aminocaproil)m-aminofenil) trimetil amonio, separa una fracción enriquecida en la concentración de AchE. La presencia de esta enzima en la FEAChE, se comprobó midiendo la actividad enzimática por el método reportado por Johnson and Russel (1975). Una muestra de esta fracción, se marcó con I^{125} para su análisis mediante electroforesis en gel de poli-acrilamida. Como se observa en la figura 4 en condiciones reductoras, se encontraron tres bandas de aproximadamente 67, 40 y 16 KD, en la autorradiografía original se observaron dos bandas tenues, la primera correspondía aproximadamente a un peso de 90 KD y la segunda a 30 KD. Este material se utilizó para la inmunización de seis ratones hembras de la cepa BALB/C para su posterior utilización como donadores de células de bazo en la producción de los anticuerpos monoclonales.

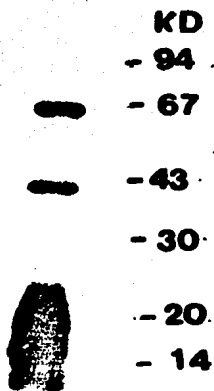


Fig. 4 Autorradiografía de electroforesis en gel de poliacrilamida del antígeno utilizado para la producción de anticuerpos monoclonales. La electroforesis se efectuó en condiciones reductoras, encontrándose principalmente dos bandas polipeptídicas de 67 y 40 KD.

RESPUESTA INMUNE A LA FRACCIÓN FEACHÉ POR RATONES BALB/C.

La presencia de anticuerpos anti FEACHÉ, se probó mediante radioinmunoensayos utilizando como antígeno un extracto total de cercarias. En la fig. 5 se observa el resultado obtenido con el suero de los seis ratones inmunizados. Como se observa en dicha figura los 6 ratones inmunizados produjeron anticuerpos anti la fracción FEACHÉ, todos ellos tuvieron títulos de hasta 1:800.

Para saber contra que proteína estaban dirigidos los anticuerpos de estos ratones, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación con los sueros murinos utilizando como antígeno extracto total de cercarias marcado con I^{125} . Se encontró que los anticuerpos eran principalmente contra dos bandas de aproximadamente 94 y 67 KD, aunque también se reconocieron otras dos bandas menores de aproximadamente 45 KD y 30 KD de peso molecular (Figura 6). Dos proteínas contra las que los ratones respondieron, corresponden a los pesos moleculares de aquellas que les fueron inyectadas. Cabe hacer notar que las proteínas de 94, 67 y 30 KD que contenía el antígeno, fueron las más inmunogénicas independientemente de su concentración, provocando una fuerte respuesta en los ratones inmunizados.

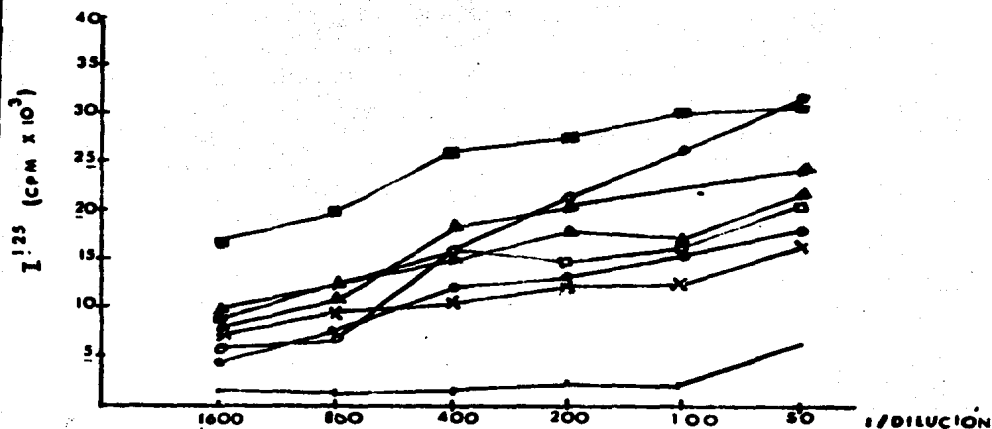


Fig. 5 Radioinmunoensayo de suero de ratones inmunizados contra la fracción enriquecida con acetilcolinesterasa. El antígeno se adsorbió en la placa en una concentración de 10 g/ml como primer anticuerpo se utilizó respectivamente:

- Suero normal de ratón (suero preinmune)
- Suero hiperinmune anticercaria
- Suero de ratón 1 ▲ Suero de ratón 4
- △ Suero de ratón 2 ○ Suero de ratón 5
- × Suero de ratón 3 ● Suero de ratón 6

Como segundo anticuerpo se utilizó suero anti ratón obtenido en carnero marcado con I^{125} a una concentración de 80,000 cpm/pozo, el ensayo se leyó en un contador gamma.

PRODUCCION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los experimentos de fusión se llevaron a cabo usando las células de bazo de los ratones número 5 y 6, que contaban las células productoras de anticuerpos anti la fracción enriquecida con Ach. Se realizaron dos fusiones, de las cuales solo la segunda tuvo éxito, y se logró el crecimiento de las células híbridas de 10 a 12 días después la fusión. Al doceavo día, el medio de cultivo en el que se encontraban las células híbridas, fué probado por radioinmunoensayo (RIE) para la detección de anticuerpos anti S. mansoni. Los extractos totales de cercaria, esquistosomula y de gusanos adultos en una concentración de 10 g/ml se adsorbieron a placas de poliestireno. Se encontró que de aproximadamente 573 pozos con células híbridas, el 10% respondieron a algún antígeno del extracto total de cercaria, 6% de las mismas respondieron a antígenos en el extracto de gusano adulto y 4.5% a antígenos del extracto total de esquistosomula. Había 1.3% de células híbridas que reconocieron antígenos de los 3 estadios del parásito.

Las células híbridas anteriores se separaron del resto de células y se cultivaron en placas para células de 24 pozos, se realizaron dos radioinmunoensayos más para confirmar la positividad de estas células. Debido a problemas de contaminación por hongos, sólo se pudo continuar trabajando con una sola clona, ésta fue seleccionada y clonada bajo condiciones de dilución limitante, seleccionandose 4

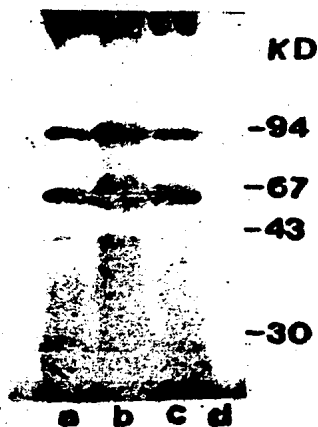


Fig. 6 Autorradiografía de una inmunoprecipitación de un extracto total de cercaria por los sueros de ratones BALB/c. Se utilizó *S. aureus* para precipitar los complejos inmunes formados por los sueros de los ratones inmunizados con la fracción enriquecida en acetilcolinesterasa.

- a Suero de ratón 4
- b Suero de ratón 5
- c Suero de ratón 6
- d Control negativo, suero preinmune.

subclonas denominadas IB52C4, IC23C21, IE14F2 y IF126B1 que resultaron positivas a los tres estadios del parásito aunque mostrando diferencias entre ellas como se pueden observar en la Tabla 1, por ejemplo la clona IB52C4 resultó fuertemente positiva al extracto de gusano adulto, por el contrario la clona IF126B1 reconoce mejor al extracto de cercaria.

CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Para determinar contra que antígenos estaban dirigidos los anticuerpos monoclonales producidos por estas cuatro clonas, se intentó hacer inmunoprecipitación, pero después de varios intentos fallidos, se procedió a determinar la clase de inmunoglobulina de que se trataba, encontrándose que tres de estas clonas producían anticuerpos de clase IgM (IE14F2, IF126B1, IB52C4), la clona IC23C21, produjo anticuerpos de clase IgG. La figura 7 ilustra una placa de doble inmunodifusión, que fue la técnica empleada para determinar los isotipos de los anticuerpos. Estos resultados explican el porque de los resultados negativos con la técnica de inmunoprecipitación, ya que se sabe que la inmunoglobulina IgM se une debilmente a la protefna A del Staphylococcus aureus, que fué usado como agente precipitante. Por lo tanto se trató de caracterizar los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales, por medio de la técnica de transferencia a papel de nitrocelulosa (Western blott).

Tabla 1.- Radioinmunoensayo de hibridomas anti S. mansoni utilizando tres estados de diferenciación del parásito.

HIBRIDOMA	CERCARIA	ESQUISTOSOMULA	GUSANO ADULTO
IB52C4	1726	--	5852
IC23C21	736	1322	1174
IE14F2	828	1058	1534
IF126B1	2962	1676	936

Los antígenos utilizados fueron extractos totales con una concentración de 5µg/ml por pozo.

Los resultados están reportados en cpm del segundo anti-cuerpo: borrego anti ratón marcado con I^{125} .

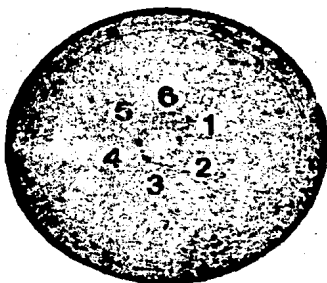


Fig. 7 Determinación de la clase de inmunoglobulinas producidas por los hibridomas IC23C21, IE14F2, IF126B1, IB52C4. La clase de cada una de las inmunoglobulinas producidas por estas clonas fue determinado por doble inmunodifusión. En el pozo central se colocó suero anti IgM de ratón obtenido en carnero.

- 1 Anticuerpo producido por la clona IC23C21
- 2 Anticuerpo producido por la clona IB52C4
- 3 Anticuerpo producido por la clona IE14F2
- 4 Anticuerpo producido por la clona IF126B1

Cuando se utilizaron los extractos totales de los tres estadios del parásito en "Western blot", se encontró que el anticuerpo IB52C4 no reconoció a ninguno de los antígenos presentes. Sin embargo la clona IC23C21 reconoció la misma banda de aproximadamente 67 KD en los tres estadios del parásito, además, este anticuerpo reconoció tres bandas más una de mas de 100 KD en esquistosomula, una de 10 KD en gusano adulto y esquistosomula, y una de 21 KD sólo en gusano adulto. Los anticuerpos IE14F2 e IF126B1 reconocieron una banda de 32 KD de gusano adulto y esquistosomula, de 25 KD y 10 KD en gusano adulto, y ninguna protefna en cercaria. (Fig. 8)

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION.

Para tener una caracterización mas completa del antígeno que reconocfan estos anticuerpos monoclonales, se fraccionó el extracto total de cercaria por medio de gradientes de densidad de sacarosa. Cada fracción del gradiente, se adsorbió a microplacas de poliestireno y el antígeno se detectó mediante los anticuerpos monoclonales, utilizando como segundo anticuerpo antiratón obtenido en carneros, marcado con I¹²⁵. Como se observa en la figura 9 los anticuerpos IB52C4 y IE1452 no mostraron ningún reconocimiento específico. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal designado como IC23C21, reconoció principalmente una sola protefna de 13.6 S. En contraste, cuando las mismas fracciones se

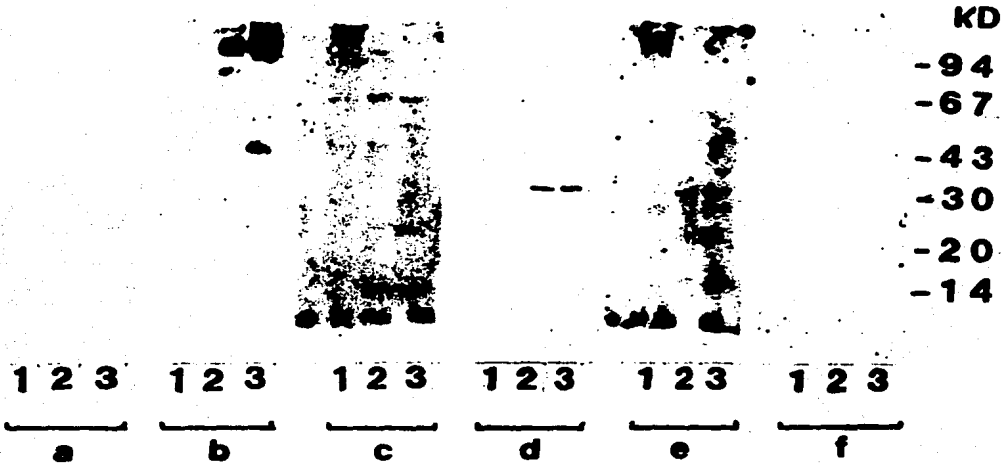


Fig. 8 Autorradiografía de Western blot de los anticuerpos monoclonales IB52C4, IE14F2, IF126B1, IC23C21. Los extractos totales de cercaria (1), esquistosoma (2), y gusano adulto (3) fueron transferidos a papel de nitrocelulosa, el papel conteniendo el antígeno se incubó con cada uno de los hibridomas, posteriormente se agregó anticuerpo anti ratón obtenido en carnero, marcado con I^{125} .

- a Control negativo, anticuerpo monoclonal anti su perficie de células basófilas.
- b Control positivo, anticuerpo monoclonal anti su perficie de S. mansoni.
- c Anticuerpo monoclonal IC23C21.
- d Anticuerpo monoclonal IF126B1.
- e Anticuerpo monoclonal IE14F2.
- f Anticuerpo monoclonal IB52C4.

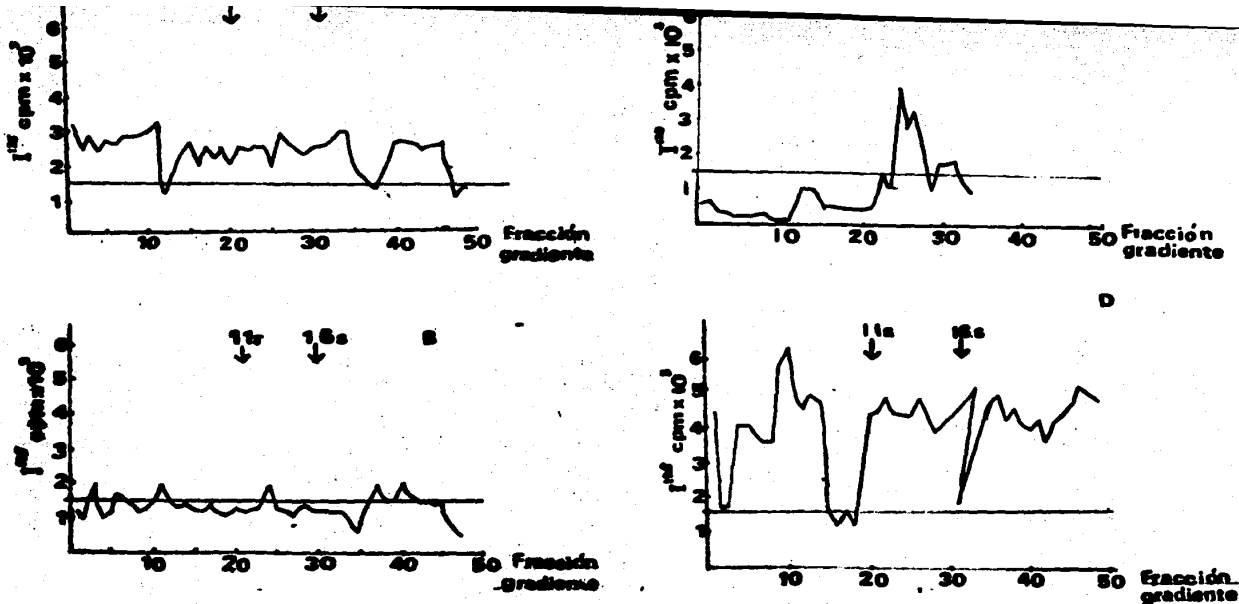


Fig. 9 Radioinmunoensayo de los anticuerpos monoclonales usando como antígeno extracto de cercaria fraccionado en un gradiente de sacarosa. Extractos de cercaria solubilizados con tritón X-100 se fraccionaron en gradientes de sacarosa. Cada una de las fracciones del gradiente fue adsorbida a las placas de poliestireno, posteriormente se agregaron 50 μ l de proteína A- I^{125} (80,000 cpm/pozo) y se leyó en un contador gama. Las flechas indican la posición de los marcadores β -galactosidasa de *E. coli* (16 S) y catalasa de hígado de bovino (11 S). La línea indica el valor del blanco sin anticuerpos. A IB14F2 BIB52C4, CIC23C21, D. suero hiperinmune de ratón.

usaron para revelar un control positivo, que consistía en un suero de ratón hiperinmune, se obtuvieron múltiples picos lo que indicó la presencia de anticuerpos dirigidos contra varios antígenos en el extracto de cercaria, con un intervalo muy amplio de coeficientes de sedimentación.

OXIDACION CON PERYODATO DE SODIO.

Con el fin de reconocer la naturaleza química del epítopo específico para anticuerpos monoclonales producidos en este trabajo, se efectuó una oxidación leve con peryodato de sodio a un pH de 3. El extracto total de cercaria adsorbido a placas para ELISA, se sometió a la oxidación, empleando diferentes concentraciones de peryodato como se describe en material y métodos. Se probaron en este ensayo las clonas IC23C21 y IE14F2, que habían resultado positivas en "Western blot". Se encontró que al tratar el extracto total de cercaria con una concentración de 10 mM de peryodato de sodio por espacio de 10 minutos, se logró una inhibición del 61% en la unión del anticuerpo IE14F2 al antígeno de S. mansoni (Fig. 10). En el caso del anticuerpo IC23C21, se inhibió la unión al antígeno en un 59%, con una concentración de 7.5 mM de peryodato de sodio (Fig. 10). Lo anterior indica que los antígenos que reconocen estos anticuerpos son glucoproteínas.

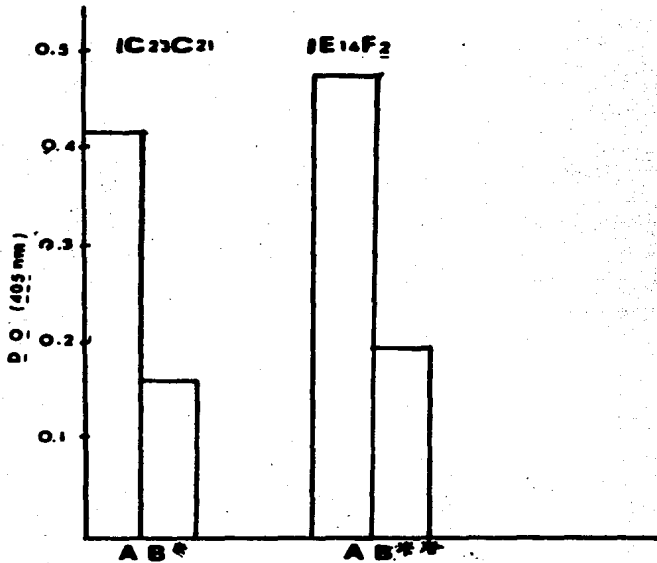


Fig. 10 Oxidación con peryodato de sodio de los antígenos reconocidos por los anticuerpos IC23C21, IE14F2. Extracto total de cercaria fue adsorbido a microplacas para ELISA y tratado con diferentes concentraciones de peryodato por 10 min., se agregaron los sobrenadantes de las clonas IC23C21 e IE14F2 se reincubaron por dos horas a 37°C. Después de lavar el exceso de anticuerpos se agregó proteína A galactosidasa incubándose dos horas a 37°C finalmente se agregó el sustrato p-nitroβDgalactopiranosida A Control, antígeno sin tratar; B* Antígeno tratado con 7.5 mM de peryodato; B** Antígeno tratado con 10 mM de peryodato.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales fueron probados para conocer su posible efecto in vitro sobre el parásito, se investigó la capacidad de los anticuerpos IC23C21 (IgG), IB5234, IE14F2 y IF126B1 (IgM), para intervenir en la muerte de esquistosomula por citotoxicidad dependiente del complemento in vitro. Se utilizó el suero de ratones normales e infectados con cercaria como controles negativos y positivos, respectivamente. Los experimentos se realizaron usando como fuente de complemento suero de cobayo fresco y calentado a 56°C por 30 min (completamente inactivo) como control interno. El porcentaje de muerte se interpretó como la diferencia entre el porcentaje de esquistosomulas muertas en presencia de complemento activo, menos el porcentaje de esquistosomulas muertas con complemento inactivado. Como se puede ver en la Tabla II, el efecto de los anticuerpos varían de anticuerpo a anticuerpo, encontrándose que el anticuerpo IC23C21 mató al 26% de los parásitos y el anticuerpo IF126B1 mató el 38% de las mismas, el anticuerpo IE14F2 mató al 20% y finalmente el anticuerpo IB52C4 solamente logró afectar al 10% de los parásitos.

Tabla 2.- Efecto de los anticuerpos monoclonales y complemento sobre esquistosomas de 3 horas en cultivo.

ANTICUERPOS*	PORCENTAJE DE MUERTE**		
	X	±	σ
IB52C4	10		5
IC23C21	26		5
IE14F2	20		6
IF126B1	38		3
Suero hiperinmune de ratón	70		3
Suero normal de ratón	0		1

* La fuente de anticuerpos fue sobrenadante de medio de cultivo, dilución final 1:6

**Estos valores son la diferencia entre el valor absoluto de esquistosomas muertas obtenidas en presencia de complemento activo menos los valores obtenidos con complemento inactivado.

Cada valor representa el promedio de cinco experimentos

PURIFICACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL IC23C2.

La clona IC23C21 se seleccionó para ser propagada en ratones BALBC y producir ascitis para la purificación del anticuerpo monoclonal. La ascitis se precipitó con sulfato de amonio como se detalla en Material y Métodos. Los anticuerpos precipitados, se dividieron en dos partes y cada una de ellas se purificó por diferentes métodos, esto con el fin de encontrar la metodología más adecuada para esta particular clase de anticuerpo monoclonal.

Una parte (14 mg) de anticuerpos puros IC23C21 se aplicaron a una columna de intercambio iónico DEAE, el anticuerpo fué eluido en un gradiente de 1.0 M a 0.001 M de cloruro de sodio, cada una de las fracciones obtenidas se almacenaron, para posteriormente probar su grado de pureza. Por otro lado, la segunda parte de anticuerpos IC23C21 precipitados con sulfato de amonio, se aplicó a una columna de proteína A de Staphylococcus aureus. La elusión de esta columna con ácido cítrico pH 3 dió como resultado dos fracciones de anticuerpos monoclonales de subclase IgG 2b.

Las fracciones de anticuerpos se pasaron por una columna, se sometieron a la electroforésis en gel de acrylamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) y 2-mercaptoetanol para comprobar su pureza. La figura 11 muestra las fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico y las dos fracciones de la columna de proteína A. Como se puede

observar en la figura 11.2 el empleo de la columna de proteína A produce un anticuerpo puro que sólo contiene un borde de 50 KD y otro de 25 KD que corresponden a las cadenas H y L respectivamente de las inmunoglobulinas de clase IgG. La columna de DEAE también produjo una fracción que contenía inmunoglobulina pura (fracción 59, Fig. 11.10)

Para comprobar que estos anticuerpos después del proceso de purificación continuaban reconociendo al antígeno de S. mansoni, se adsorbió el extracto total de cercaria a placas de poliestireno y se probó cada una de las fracciones de las columnas de DEAE y proteína A por RIE. La Fig. 12 muestra los resultados obtenidos en RIE con algunas de las fracciones obtenidas de la columna de DEAE. Tres fracciones reconocieron al antígeno hasta una dilución 1:20 (fracciones 68, 69 y 70). Las fracciones 69 y 70 también contenían la mayor concentración de anticuerpos aunque con algunos contaminantes. (Fig. 11.6-7)

En el caso de la fracción obtenida de la columna de proteína A, el RIE muestra que este anticuerpo puede reconocer el extracto total de cercaria hasta una dilución de 1:40 (figura 13). Esta misma fracción se encontró completamente pura, como se puede ver en la figura 11.2. Por lo tanto, esta fracción se eligió para unir a una columna de afinidad y así tratar de purificar el antígeno al cual se une el anticuerpo monoclonal IC23C21.

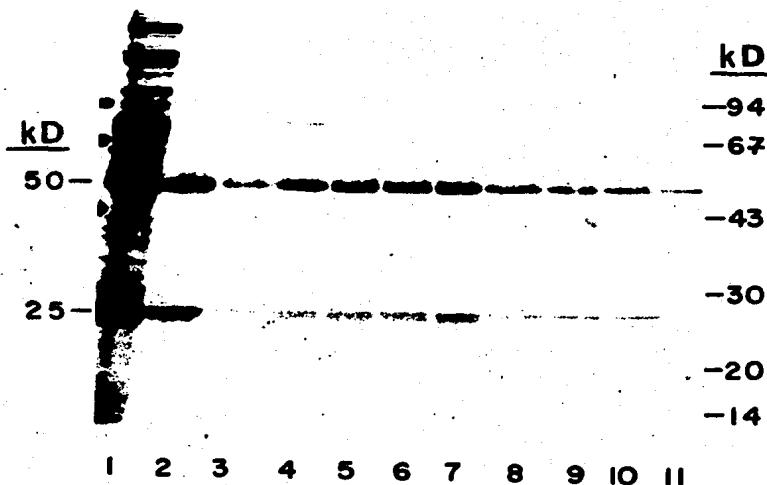


Fig. 11 Gel de poliacrilamida de las inmunoglobulinas purificadas de las ascitis del hibridoma IC23C21, Las inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio de ascitis de la clona IC23C21 se pasaron por una columna de proteína A de DEAE. Diferentes fracciones obtenidas de estas columnas se trataron con dos-mercaptoetanol y sometidas a electroforésis en geles de poliacrilamida para conocer el grado de pureza.

- 1 Inmunoglobulinas después de precipitación con sulfato de amonio y antes de ser cromatografiadas.
- 2 y 3 Dos fracciones obtenidas de la columna de proteína A.
- 4 a 11 Diferentes fracciones en la columna de DEAE:
4) fracción 72; 5) fracción 71; 6) fracción 70;
7) fracción 69; 8) fracción 67; 9) fracción 64; 10) fracción 59; 11) fracción 56.

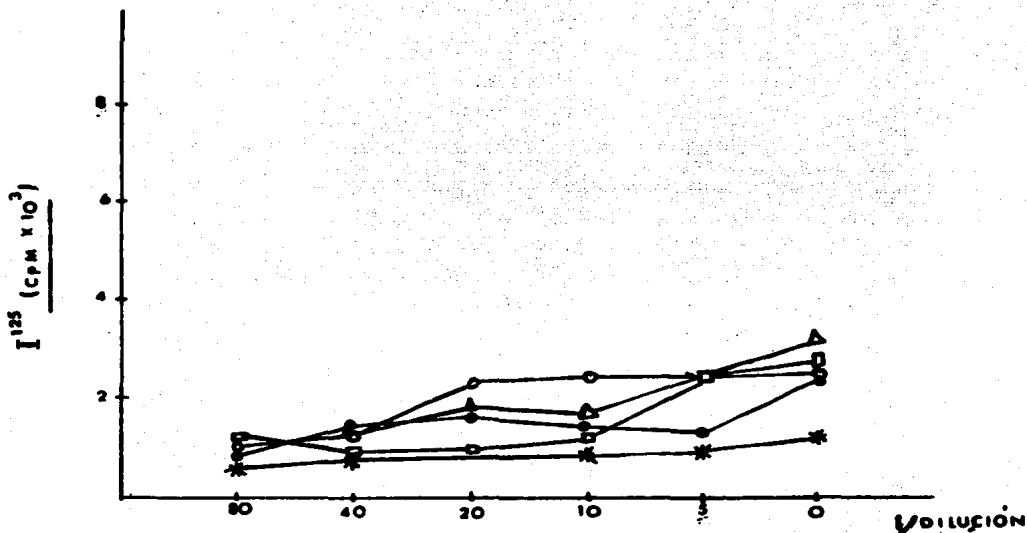


Fig. 12 Radioinmunoensayo de las fracciones obtenidas de la purificación del anticuerpo mediante una columna de afinidad DEAE.

- Fracción No. 68
- Fracción No. 69
- ▲ Fracción No. 70
- Fracción No. 71
- ◆ Control negativo, anticuerpo monoclonal anti superficie de células basófilas.

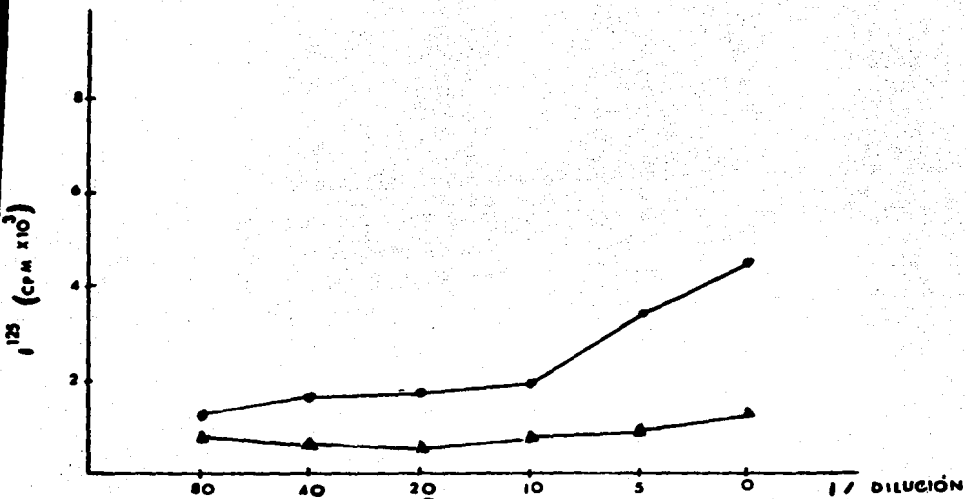


Fig. 13 Radioinmunoensayo de las fracciones obtenidas de la purificación de anticuerpos mediante una columna de afinidad sefarosa proteína A.

- Fracción IgG2b eluida con amortiguador de citratos pH 3.
- ▲ Control negativo, anticuerpo monoclonal anti superficie de células basófilas.

PURIFICACION DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL IC23C21.

El anticuerpo monoclonal IC23C21 purificado por medio de la columna de protefna A, se uni6 a una columna de Affigel-10 (Bio Rod), como se describe en la secci6n de materiales y m6todos. A esta columna se le aplicaron 600 μ l de extracto total de cercaria marcados con I^{125} . El material eluido de esta columna con amonio 0.1N con el 1% de Triton X-100, se trat6 con 2 mercaptoetanol y se sometio a electrofor6sis en geles de acrilamida (7.5 - 15%). Como se observa en la figura 14, el anticuerpo IC23C21 reconoci6 principalmente una protefna de aproximadamente 60 KD mas unas bandas muy difusas de menos de 20 KD.

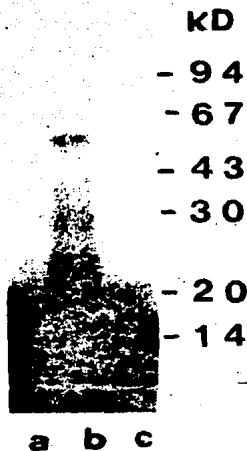


Fig. 14 Autorradiografía de la purificación del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal IC23C21. Extracto total de cercaria marcado con I^{125} fue aplicado a una columna de affi-Gel 10-anticuerpo IC23C21. El material eluido de esta columna se trató con β -mercaptoetanol y se aplicó a un gel de poliacrilamida (7.5-15%) con SDS. El antígeno no radiactivo se localizó sobre película para rayos X. a, b y c son tres diferentes fracciones obtenidas de la columna de affi-Gel-anticuerpo IC23C21.

DISCUSION

La fracción de extracto total de cercaria enriquecida de AchE para inmunizar a los ratones donadores para la fusión, estaba constituida por dos bandas específicas que correspondieron a los pesos moleculares reportados para AchE en S. mansoni (aproximadamente 10 KD y 30 KD) (Goldlust et. al., 1986) con una pequeña contaminación. Se utilizó esta fracción semipurificada ya que existen dificultades para obtener una fracción pura que con una concentración de AchE suficiente para inmunizar varios ratones. Sin embargo, una de las grandes ventajas de la técnica de producción de hibridomas es que la pureza del antígeno usado como inmunógeno, no es crucial para la generación de anticuerpos monoclonales (AcM) (Eshhar, Z., 1985).

Se realizaron dos fusiones de las cuales, sólo en la segunda se logró el crecimiento de las células híbridas, después de 12 días el medio de cultivo donde crecieron, se probó en radioinmunoensayo (RIE) con los tres diferentes antígenos: cercaria, esquistosomula y gusano adulto, las células que resultaron positivas a este ensayo, se separaron del resto y se probaron nuevamente para confirmar su positividad, ya que es frecuente obtener resultados falsos positivos. Debido a problemas de contaminación fúngica sólo se pudo continuar trabajando con una clona, la cual se subclonó bajo condiciones de dilución limitante (Eshhar Z.,

1985). Aquí es importante señalar, que en el empleo de AcMs existen muchas condiciones limitantes como son: la baja frecuencia de fusión en la preparación de hibridomas, que aunado a la facilidad de contaminación fúngica y bacteriana dan como consecuencia un rendimiento bajo de clonas en crecimiento, algunos AcM son sensibles a cambios pequeños de pH, temperatura, congelamiento y descongelamiento, dependiendo de su estructura, y pueden inactivarse durante su purificación o durante su empleo. (Barden R. H. et al., 1984).

De acuerdo a los resultados de los radioinmunoensayos (Tabla I), se seleccionaron cuatro clonas designadas como IB52C4, IC23C21, IE14F2 y IF126B1. Estas cuatro clonas por lo menos reconocían uno de los estadios de diferenciación de S. mansoni. Las clonas IB52C4 reconocieron antígeno presente en el gusano adulto, las clonas IC23C21 e IE14F2 reconocieron antígenos en los tres diferentes estadios y la clona IF126B1 parecía tener preferencia por antígenos de cercaria (Tabla I)

El siguiente paso fué determinar por el método de Ouchterlony la clase de los anticuerpos monoclonales que estábamos trabajando. Los anticuerpos monoclonales IE14F2 y IF126B1 resultaron ser de la clase IgM y solo el anticuerpo IC23C21 fué clase IgG subclase 2b. Estos resultados eran de esperarse, pues es común encontrar durante la

producción de anticuerpos monoclonales anti S. mansoni que la clase de éstos generalmente IgG o IgM. Posiblemente debido a que durante el proceso de inmunización de ratones con antígenos de S. mansoni, se da un incremento considerable en los niveles de estas mismas inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) (Ramalho-Pinto, F. J., et. al., 1979; Bout, et. al., 1980).

Los primeros intentos para determinar el peso molecular aproximado de los antígenos reconocidos por estos anticuerpos, se hicieron mediante inmunoprecipitación. Esta técnica resultó ser inadecuada en el caso particular de estos anticuerpos monoclonales, seguramente debido a la clase de la mayoría de los anticuerpos, ya que se sabe que las inmunoglobulinas de ratón de clase IgM se unen solo debilmente (22% a pH 3) a la proteína A del Staphylococcus aureus (Lindmark, R., et. al., 1983) que en este caso, fué el agente inmunoprecipitante.

En cambio, cuando se utilizó la técnica de electrotransferencia a papel de nitrocelulosa (Western blot), se pudo determinar el peso molecular de los antígenos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales. En el caso del anticuerpo monoclonal IC23C21, se encontró que éste reconocía una proteína de aproximadamente 67 KD en los tres estadios del parásito (Fig. 11.C). Estos resultados son muy alentadores, ya que este peso molecular es el mismo que se ha reportado con anterioridad para AchE de S. mansoni (Goul

dust, et. al., 1986). Además el hecho de que el anticuerpo reconoció la misma protefna en los tres estadios de desarrollo del parásito concuerda con los datos de que la enzima AchE, por ser un componente enzimático fundamental del sistema nervioso del parásito se encuentra presente en todos los estadios del parásito (Torral-Hazdai, et. al., 1984). El mismo anticuerpo IC23C21 reconoció una segunda banda de 21 KD en el gusano adulto y otra banda mayor de 100 KD en esquistosomula.

El hecho de que este anticuerpo reconociera más de una molécula en el mismo estadio del parásito, nos sugirió laposibilidad de que se tratase de una degradación del mismo antígeno (Barden y Von Knepperberg, 1984), o de que este anticuerpo pudiera estar reconociendo pequeños epitopes de una glucoprotefna, siendo este el caso, como se demostró posteriormente (ver mas adelante).

Por su parte el anticuerpo IE14F2, reconoció una molécula de 32 KD en gusano adulto y esquistosomula y otras de 25 KD en gusano adulto. El anticuerpo IF126B1 reconoció muy débilmente los mismos antígenos de 32 KD y 25 KD en gusano adulto. Estos anticuerpos resultaron también muy interesantes ya que reconocen un atígeno de 32 KD, valor muy aproximado a aquel del fragmento de AchE que comprende el sitio activo de la enzima (Gouldust, et. al., 1986).

El estudio de antígenos en las etapas no juveniles

del parásito resulta vital para tratar de controlar esta parasitosis, pues se sabe que la mayoría de los componentes antigénicos de S. mansoni se pierden durante las primeras 24 h de cultivo (Samuelson, et. al., 1980; Dessain et. al., 1981), lo que probablemente también ocurre in vivo. También se ha reportado que esquistosomas de mas de 24 h se vuelven resistentes al efecto citotóxico del complemento (Tavares, C. A. P., et. al., 1980), ésto seguramente está relacionado con la pérdida o transformación de los antígenos de superficie que junto con otros mecanismos constituye su defensa a la respuesta inmune (Simpson A. J. et. al., 1984).

Cuando se trató de analizar al antígeno específico para el anticuerpo monoclonal IB52C4, los resultados fueron negativos, encontrándose que ninguna molécula transferida al papel de nitrocelulosa pudo ser reconocida por este anticuerpo. Este resultado en el caso del gusano adulto, parece ser muy extraño, puesto que en los radioinmunoensayos este anticuerpo reconoció al extracto total de gusano adulto (Tabla I). Una posible explicación para este fenómeno, puede ser que este anticuerpo sólo reconoce las proteínas del gusano adulto en su forma nativa (proteínas con su estructura tridimensional). En el "Western blot", los antígenos primero son desnaturalizados con β -mercaptoetanol y luego electrotransferidos (separados por cromatografía) en geles de poliacrilamida con SDS que separa los componenu

tes proteicos provocando la desaparición de determinantes conformacionales y exponiendo solamente los secuenciales (Girard, 1981). Por lo tanto, probablemente el anticuerpo IB52C4, no reconoció al antígeno por estar desnaturado.

Para caracterizar aun mas al antígeno reconocido por los AcMs, se determinó el coeficiente de sedimentación. Se encontró que el AcM IC23C21 reconoce específicamente a un antígeno de 13.6 S que resultó diferente al coeficiente de sedimentación 8 S, reportado para acetilcolinesterasa de cercaria de S. mansoni extraída en presencia de un detergente no iónico (Triton X-100) (Tarrab Hazdai et. al., 1984). Sin embargo, se puede mencionar aqui que esta forma de 8 S de la AchE solo se encuentra en cercaria cuando se utilizan detergentes para su solubilización, pero la AchE en el gusano adulto, esquistosomula, o en extracto de cercaria sin detergente, presenta un coeficiente de sedimentación mayor (Tarrab-Hazdai et. al., 1984). Este hecho puede reflejar diferencia en el estadio y comportamiento de esta enzima a lo largo de la vida del parásito, lo que tal vez puede también estar relacionado con la alta sensibilidad del gusano adulto a varios fármacos antiesquistosomiasis incluyendo agentes acetilcolinérgicos (Kim et. al., 1981; Pereira et. al., 1975; Cioli y Knoff 1980).

En lo que respecta a los AcMs IE14F2, los resultados obtenidos demuestran que éstos son específicos para un epítope compartido por varios antígenos o reconoce varios antígenos en el extracto total de cercaria (Tarrab Hazdai et. al., 1985).

En experimentos preliminares en los que se efectuó una oxidación leve del antígeno con peryodato de sodio, para modificar la fracción glucosídica de las glicoproteínas (Woodward et. al., 1985), se demostró que los AcMs IC23C21 e IE14F2, son específicos para la fracción glucosídica del antígeno, pues al aplicar este tratamiento se logró una reducción en la afinidad por el antígeno de 59.1% y 61.1% respectivamente. Con base a estos resultados podemos concluir que los antígenos reconocidos por estos dos anticuerpos son glucoproteínas. También parece ser que los anticuerpos están dirigidos específicamente contra la fracción glucosídica de dichas glucoproteínas, lo que hizo que estos anticuerpos pudieran reconocer la misma molécula de azúcar en diferentes proteínas, explicando así la aparición de más de una banda en los experimentos de electrotransferencia.

El hecho de que el antígeno reconocido por el anticuerpo IC23C21 fuera una glucoproteína, fué un criterio más que indujo a pensar que se estaba trabajando con el anticuerpo que identificaba a la AChE de S. mansoni toda vez que esta molécula también es una glucoproteína (Tarrab-Haz

dai, R., et. al., 1984).

Recientemente se han descrito varios anticuerpos monoclonales que reconocen la superficie de S. mansoni comprobándose en algunos casos que éstos produjeron protección pasiva en ratones o ratas (Gryzch, et. al., 1982; Zodka y Phillips, 1982; Tarrab-Hazdai, et. al., 1985). En el caso de los anticuerpos IC23C21 y IF126B1 se usó una prueba de citotoxicidad para demostrar actividad biológica in vitro, es decir, su capacidad para mediar la muerte de esquistosomulas mediante citotoxicidad dependiente de complemento. El efecto citotóxico de los AcMs es significativamente alto sobre todo en el caso de AcMs IF126B1 con un 38% de esquistosomulas muertas en 24 h y IC23C21 con un 26%, sobrepasa el porciento reportado para otros AcMs, que es en promedio de 22% de esquistosomulas muertas (Pino-Heiss et. al., 1986; Tarrab-Hazdai et. al., 1985). Los resultados encontrados para el anticuerpo IC23C21 coinciden con los de Ramalho-Pinto, et. al., (1979) quienes demostraron que el efecto citotóxico del complemento sobre la superficie de S. mansoni era mediado por anticuerpos de la clase IgG 2a. Sería de gran interés realizar el estudio del anticuerpo IF126B1, que es de la clase IgM, ya que hasta el momento no existen reportes de que anticuerpos monoclonales de clase IgM puedan conferir alguna clase de protección ya sea in vivo o in vitro (Capron M, Capron A, et. al., 1978).

Basándose en que el anticuerpo IC23C21 reconocía una glicoproteína de 67 KD, lo cual coincidía con dos de las características de anticuerpo anti de S. mansoni (Tarrab-Hazdai et. al., 1984; Gouldust et. al., 1986) y en que además este anticuerpo presentaba efectos citotóxicos sobre el parásito, se procedió a purificarlo para unirlo a una columna y poder purificar por afinidad el antígeno que reconocía. El antígeno obtenido con dicha columna de afinidad fué una glucoproteína de aproximadamente 60 KD. Dicha glucoproteína es evidente cuando se extrae de un extracto marcado con I^{125} , lo que indica que se encuentra presente en muy baja concentración en el parásito. La diferencia entre el peso molecular obtenido cuando se purificó el antígeno y el obtenido por el "Wester blot", es relativamente pequeña y se puede explicar, ya que existen algunos detalles técnicos que pueden modificar ligeramente la apreciación real de los pesos moleculares obtenidos en electrotransferencia; por ejemplo, los marcadores de peso molecular no se tratan en la misma forma que el papel de nitrocelulosa que contienen el antígeno más los anticuerpos.

La posibilidad de contar con la columna de afinidad con el anticuerpo IC23C21 permitirá en el futuro purificar mayores cantidades de antígeno, y así poder llevar a cabo las pruebas definitivas para determinar si se trata de Ache de S. mansoni. Otros estudios que pudieran hacerse en un

futuro para estos anticuerpos son por ejemplo; electroforesis en gel de dos dimensiones para determinar si las diferentes bandas obtenidas en el "blot" corresponden a la misma protefna lo cual llevaría a conocer el peso molecular y por ende, determinar si se trata efectivamente de AchE. Las pruebas de competencia entre antígenos y entre anticuerpos: en el caso de antígenos se puede desarrollar en un sistema "ELISA" fijando uno de los antígenos en competencia, a la placa y agregando una solución que contenga al anticuerpo previamente unido a el otro antígeno, si existe competencia indicaría que los determinantes se encuentran por igual en ambos antígenos, este mismo ensayo se puede aplicar a los diferentes AcMs para verificar que no estén dirigidos al mismo antígeno; otras de las pruebas que se pueden hacer a este anticuerpo es si este es específico de espacio o no, es decir, probar su actividad sobre antígenos provenientes de S. japonicum o S. hematobium por ejemplo, debido a que estas pruebas son de vital importancia en inmunodiagnósticos en el caso de ser ésta la aplicación final de los AcMs producidos en este trabajo de tesis.

Finalmente, es importante haber demostrado que un anticuerpo monoclonal, que seguramente reconoce un solo epítopo en el antígeno, puede tener un efecto nocivo sobre el parásito y la identificación y caracterización del antígeno reconocido por este anticuerpo será de utilidad para el mejor entendimiento de la inmunidad contra S. mansoni y de sus posibles mecanismos de evasión.

Cabe señalar que los estudios de este tipo pueden ser aplicados a cualquier otra clase de parásitos en nuestro medio podría ser: Cisticercus cellulosae o Entamoeba histolytica, con el objetivo final de desarrollar una posible vacuna utilizando el antígeno puro o semipuro identificado por el AcMs o en la producción de sueros, que reduzca la incidencia de estas enfermedades parasitarias en los países del tercer mundo.

RESUMEN

Este trabajo consiste en la producción de anticuerpos monoclonales obtenidos después de una inmunización de ratones con un extracto total de cercaria enriquecida en la presencia de AchE, previamente purificada. El AcM IC23C21 de clase IgG 2a, en particular muestra un reconocimiento específico de 4 bandas en gel de poliacrilamida (100 KD, 67 KD, 24 KD, 10 KD) en los tres estadios del parásito que coinciden con las bandas que presentó el antígeno utilizado en la inmunización. En los experimentos preliminares con una oxidación leve del antígeno con peryodato de sodio se demostró que este anticuerpo se encuentra dirigido contra una glucoproteína, cuyo coeficiente de sedimentación es 13.6 S. El efecto citotóxico de los AcMs IF126B1 (38%) y IC23C21 (26%) medido por el porcentaje de esquistosomulas muertas en 24 h es significativo, comparado con el reportado para otros AcMs. Sobre estos anticuerpos quedan por hacer varios estudios para su caracterización total y abren la posibilidad de desarrollar una vacuna utilizando los antígenos puros y semipuros identificados por estos AcMs o el desarrollo de sueros en los que participen directamente los AcMs producidos en este trabajo.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron cuatro anticuerpos monoclonales (IB52C4, IC23C21, IE14F2, IF126B1) y se logró a lo largo de este trabajo caracterizarlos parcialmente.

El anticuerpo IC23C21 (IgG) reconoce una glucoproteína cuyo coeficiente de sedimentación es de 13.6 S y presenta una banda específica en gel de poliacrilamida 67 KD, corresponde al peso reportado para la enzima acetilcolinesterasa en S. mansoni. Además tiene una actividad biológica in vitro significativamente alta. Por otro lado, el AcM IF126B1 también presenta una actividad biológica alta a pesar de ser un anticuerpo de clase IgM.

Dadas las características de estos anticuerpos, pueden tener en un futuro una amplia aplicación en el estudio de S. mansoni.

BIBLIOGRAFIA

- Aronstein, W. S., Narden, A. P., Strand, M. "Tegumental expression in larval and adult stages of a major schistosome structureil glycoprotein". Am. J. Trop. Med Hyg. 32: 334-342. (1983)
- Auriault, C., QuaiSSI, M. A., Torpier, G., Eisen, H., Capron A. "Proteolitic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of S. mansoni schistosomula". Paracite Immunol 31:33 (1981)
- Baker, L. R., Bueding, E., and Timms A. R. "The posible role of acetylcholine in S. mansoni "Br. J. Pharmacol 26:656 (1966)
- Barski, G., Sorceve, S., and Carnefert, F. "Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires in association, de cellules de caractere hybride" Acadd. Sci. Paris 251:1825-1827 (1960)
- Bickle, Q. D., Andrews, B. J. Taylor, M. G. "Schistosoma mansoni: caraterization of two protective monoclonal antibodies" Parasite Immunology 8-95-107 (1986)
- Bueding, E., "Acetylcholinesterase activity of S. mansoni" Br J. Pharmacol 7:563 (1952)
- Burden, R. H., Van Knippenberg, P. H., "Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology" Vol. 13 ELSEVIER Science Publish. Netherlands (1984)
- Burnet, F. M., "The clonal selection theory of acquered Immunity". Cambridge University Press, London. The classic exposition of clonal selection (1959)
- Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, A. F., Mahmoud, A., Sher, A., Rees, P. H., "Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistosomula" Nature 256:727 (1975)
- Capron, A., Biguet, S., Rose, F. and Vernes, A. "The antigenes the S. mansoni stude immunoelectrophoresis comparee de stades larvaires et des adultes de deux sexes. Aspects immunologiques des relations hote-parasite de la cercarie et del'adulte S. mansoni Annls. Pasteur Paris 109:789 (1965)
- Capron, A. H., Bazin, J. P., Dessaint, P. and Capron, M. "Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to S. mansoni schistosomules Naute 253:474 (1975)

- Capron, A., Capron, M., Torpier, G., Bazin, H., Bout, D., and Joseph, A. "Eosinophil dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a, antibody and role of mast cells. European Journal of Immunology 8:127-33(1978)
- Capron, M., Carlier, y., Nzeimana, H., Minoprio, P., Santoro, F., Sellin, B., and Capron A. "in vitro study of immunological events in human and experimental schistosomiasis: relationships between cytotoxic antibodies and circulation of *Schistosoma* antigens". Parasite Immunol 2:233 (1980)
- Colley, D. G., "Intradermal immune responses to *Schistosoma* egg antigen during *S. mansoni* infection." Pro Soc. exp. Biol Med. 140:772 (1972)
- Colley, D.G., Andwikel, S.K., "*S. mansoni* : Simplified method for the production of schistosomules". Exp. Parasitology 35; 44-55 (1974)
- Cooper, T.G., "The tools of biochemistry" John Wiley and Sons N.Y. (1977)
- Cort, W.W., "Studies on schistosome dermatitis VI status of knowledge after more than twenty years" Am. J. Hyg. 52: 251 (1950)
- Cotton, R.G. and Mielstein, C., "Fusion of two immunoglobulin produce myeloma cells" Nature 244: 42-43 91973)
- Craven, G., Steers, R.E., and Anfinsen, C.B. "Purification composition and molecular weight of the α -galactosidase of *E. coli* k12 " J. Biol. Chem 240: 24-68 (1965)
- Croce, C.M., Linnenbach, A., Halew, W., Steplewski, Z., and Koprowski, H., "Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus" Nature 288; 488-489 (1980)
- Cuatrecasas, P., "Protein purification by affinity chromatography". J. Biol. Chem. 245; 3059-3065 (1970)
- Davison, R.L., and Ephuissi, B., "A selective system for the isolation of hybrids between L. cell and normal cells" Nature 205: 1170-1171 (1965)
- Dean, D.A., Wister, and Murrell, K.D. "Combined in vitro effect of rat antibody and neurotrophic leukocytes on schistosomule of *S. mansoni*" Am. J. Trop. Med. Hyg. 23 ; 420 (1974)
- Dissous, C., Gryzch, J., Capron, A. "*S. mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG 2a" J. Immunol 129: 345-356 (1982)

- Ennvall, E. Perlmann, P., and Jousson, K. "Enzyme -Linked Immuno sorben assay (ELISA)" *Biochem Biophys.* 345-356 (1971)
- Fripp, P. J., "Histochemical localization of esterase activity in schistosomiasis" *Expe. Parasitol* 21: 380 (1962)
- Gear, N. R., Fripp, P. J., "Comparison of the characteristic of acetylcholinesterase present in four species of S. mansoni Comp. Biochem. Physiol 47B: 743 (1973)
- Gitter, B. D. and Damian, R. T., "Murina alloantigen by schistosomula of S. mansoni further evidence for the presence of K D and I region gene products on the tegumental surface" *Parasite Immunol* 4: 383 (1982)
- Gryzch J. M., Capron, M., Bazin, H., Capron, A., "In vitro and vivo effector function of rat IgG monoclonal anti-S. mansoni antibodies" *J. Immunol* 129: 2739-2743 (1982)
- Harn, D. A., Mitsuyana, M., David, J. R., "S. mansoni: anti-egg monoclonal antibodies protecting against cercarial challenge in vivo" *J. Exp. Med.* 159: 1371-1387 (1984)
- Hiatt, R. A., Sotomayor, Z. R. Sánchez, G., Zambrana, M. and Knight W. B. "Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis" *J. Inf Dis* 139: 659 (1979)
- Horowitz, S., Tarrab-Hazdai, R., Eshhar, Z, Arnon, R. "Anti-schistosoma monoclonal antibody different isotypes-correlation with cytotoxicity" *EMBO J.* 2:193-198 (1983)
- Husu, S. Y., David, J. R. and Husu, H. F. "Histopathology in rhesus monkeys infected four times with the forsan strain of Schistosoma japonicum" *Parasitol* 16:297 (1965)
- Larrick, J. and Andrew, R., "Human hybridomas and monoclonal antibodies" Edit. Edgar, G. Engleman and Steven, K. Fount, Plenum Press New York USA Chapter 1 5-17 (1985)
- Johnson, C., Russell, R. L. "A rapid simple radiometric assay for cholinesterase suitable for multiple determination" *Anal. Biochem.* 64: 229-238 (1975)
- Kesser, S. W., "Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A antibody absorbent: parameters of the interaction antibody antigen complexes with prot Z" *J. Immunol* 115:1617 (1975)
- Kohler, G., and Molstein, C., "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" *Nature* 256: 495-497 (1975)

- Laemmli, U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4" *Nature* 227: 680 (1970)
- Levi-Schaffer, F., Tarrab-Hazdai, R., "Efecto of phosphonium salts and phosphoraneg on the acetylcholinesterase activity and the viability of S. mansoni parasite" *Int. J. Immunopharmac* 6:619 (1984)
- Lichtenberg, F. Von, Ritchie, L. S., "Cellular resistance against schistosomula of S. mansoni in Macaca mulatta monkeys following prolongea infection" *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10:859 (1961)
- Littlefield, J. W., "Selection of hibrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants" *Science* 145: 709-710 (1964)
- Lowry, O. H., Rosebrowgh, N. J., Fair, L., Randall, R. J. "Protein measurement with folin phenol reagent" *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
- March, S. C., Parikh, I. Cuatrecasas, P., "A simple method of cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography". *Anal. Biochem.* 60:149-159 (1974)
- Martin, R. G. and Ames, B. N., "A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: aplication to protein mixture" *J. Biol. Chem.* 236:1372 (1961)
- Norden, A. P., Aronstein, W. S. Strand, M., "S. mansoni: identification, characterization and purification of spine glycoprotein by monoclonal antibody Exp. parasitol 54: 432-442 (1982)
- Nordegren, I., Bergstron, M., Holmsted, T. B., and Sandoz M. "Transformation action of metriofonato" *Arch. Toxicol* 41:31 (1978)
- Okada, Y. and Takodoro, J. "Analysis by H_vJ virus from Ehrlich's tumor cells." II Quantitative analysis of grant polynuclear cell formation" *Exp. cell REs.* 26:108-118 (1962)
- Olsson, L. and Kaplan, H. S. "Human/Human hybridomes producing monoclonal antigenic specificity" *Proc. Nature Acad. Sci, USA* 77: 5429-5431 (1980)
- Ouchterlony, O, (1958) Difusion in gel methods for immunological Analysis. In Progress in allergy. Vol. V pp1-78 ed. Kallos P. Ba-gel and New York: Korger.
- Ouchterlony, O, (1962) Difusion in gel methods for immunological Analysis. In progress in allergy. Vol. V pp-1-78 ed. Kallos P. Ba-gel and New York: Korger.
- Pierce, S. K., and Klemman, N. R. "Allogenic carrier specific enhancement of hapten-specific secondary B-cell responses" *J. Exp. Med.* 144: 1254 (1967)

- Pino-Heiss, S., Petitt, M., Beckstead, J. A., and Mc Kerrow, J. "Monoclonal antibody against S. mansoni proteinase from" The Department of parasitology University of California School of medicine in press (1986)
- Potter, M. and Boyce, C. R., "Induction of plasma neoplasia in strain BALB b/C mice with mineral oil and mineral oil adjuvants" Nature 193:1086-1087 (1962)
- Ramalho-Pinto, J. F., Mc Laren, D. J. and Smithers, S. R. "Complement mediated killing of schistosomula of S. mansoni by rat eosinophils in vitro" J. Exp. Med. 147: 147 (1978)
- Romano, E. L., Romano, M. "Staphylococcus protein A bound to colloidal gold a useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy" Immunochemistry 14: 711-715 (1977)
- Samuelson, J. C. Sher, A. and Caufield, J. P., "Newly transformed schistosomula spontaneously lose surface antigens and C3 acceptor sites during culture" J. Immunol 124: 2055 (1980)
- Santoro, F. P. Lachman, J. Capron, A. and Capron, M., "Activation of complement by Schistosomula of S. mansoni: Killing of parasites by alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation" J. Immunol 124: 1551 (1979)
- Schwaber, J. and Cohen, E. P. "Human/mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulin of both parental types" Nature 244: 444-447 (1973).
- Sher, A., Hall, B. R. and Vadas, M. A. "Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of S. mansoni" J. Exp.-Med 148 (1978)
- Simpson, A. J., Payares, G. Walter, T. Knight M. Smithers R. S. "The modulation of expression of polypeptide surface antigens on developing schistosomula of S. mansoni" J. Immunol 133: 2725-2730 (1984)
- Simpson, A. J., Knight, M. Payares, G., Smithers, S. R. "Identification and biosynthesis of schistosoma surface antigens in August T (ed) proceedings of third John Jacob Abek Symposium on drug development molecular parasitology Academic London 177: 184 (1984)
- Simpson, A. J., Smithers, S. R., "Schistosomiasis: Surface Egg and antigen circulating" current topics in Microbiology and Immunology 120 (1985)
- Simpson, A. J., Hackett, F. Walker T., Payares, G., de Rossi, R., Smithers, S. R. "The antibody response against schistosomula surface antigens following immunization with highly irradiated cercariae of S. mansoni" Parasite Immunol 7: 133-152 (1986)

- Sincouris, J. L., Shirato, E., Gyroky, F., Cabieness, J. R., and Howe, C. D. "Leukemia Lymphoma, Yearbook Med. Publ. Chicago (1970)
- Smith, M. A., Clegg, J. A., Sanary, D. Trejdosiowicz, A. J. "Passive immunization of mice against S. mansoni with IgM monoclonal antibody" Parasitology 84: 83-91 (1982)
- Smithers, S. R. and Terry, R. J. "Acquired resistance to experimental infections of S. mansoni in albino rat Parasitology 55: 695 (1965)
- Smithers, S. R. and Terry, R. J. "The infection of laboratory hosts with cercariae of S. mansoni and the recovery of adult worms "Parasitology 55: 695 (1965)
- Smithers, S. R., and Terry, R. J., "Immunity in Schistosomiasis" Ann N. Y. Acad. Sci 160: 826 (1969)
- Smithers, S. R., Terry, R. J., and Hockley O. H., "Host antigens in Schistosomiasis" Proc. R. Soc. London (Biol) 1971: 483 (1969)
- Smithers, S. R., Doenhoff, M. J. "Schistosomiasis In: Immunology of parasitic Infections" S. Cohen K. S. Wanen (eds) Blackwell London 527: (1982)
- Tarrab-Hazdai, R., Levi-Schaffer, F., Smolarsky, M. and Arnon, R. "Acetyl cholinesterase of S. mansoni: antigenic cross reactivity with Electrophorus electricus and its functional implications" Eur. J. Immunol 14: 205 (1984)
- Tavares, C. A.P., Cardeiro, M. V., Mota-Santos, T. A., and Gazzine Ili "Artificially transformed schistosomula of S. mansoni: mechanisms of acquisition of protection against antibody-mediated killing Parasitology 80:95 (1980)
- Tavares, C. A., De Rosi, R., Payares, G., Simpson, A. J., Mc Laren D. J., Smithers, S. R. "A monoclonal antibody raised against adult S. mansoni which recognizes a surface antigen on schistosomula". Z. Parasitenkd 70: 189-197 (1984)
- Taylor, D. W., Butterworth A. E. "Monoclonal antibodies against surface antigens of S. mansoni" Parasitology 82: 65-82 (1982)
- Warren, K. S. "Worms In: Immunological diseases" M. S. nter (ed) Little brown, Boston 668 (1971)
- Warren, K. S. "Hepatosplenic schistosomiasis: an immunologic disease" Bull N. Y. Acad. Med. 51 545 (1975)
- Weber, K., and Osborn, M., "The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfato-poliacrilamide gel electrophoresis J. Biol. Chem. 24: 41-116 (1969)

- Weir, D. M., "Hand Book of experimental Immunology" Vol. 1 3er. Edition Blackwell Saentic publications Oxford London Charper 7-8 (1978)
- Willcockson, W. S., Dotson, M. J., Mc Allister, P., Grim, S. D., Ahmed A. E., and Hillman, G. R. "Effect of phosphonium and chlorethyl-acetylcholine compouns on schistosome and vertebrate acetylcholinesterase" *Comp. Biochem. Physiol.* 72C: 101 (1982)
- Woodward, M. P., Young, Jr. and Bloodgorf, R. A. "Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydratoes epytopes using periodiated oxidation *J. Immunol. Methods* 78: 143. (1985)
- Zodda, D. M., Phillips, S. M. "Monoclonal antibodies-mediated protection agains S. mansoni infection in mice" *J. Immunol* 129: 2326-2328 (1982)