



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

20251

5 P. (A. 1)

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA  
LATINA Y EL CARIBE DP/RLA/83/003**

**PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:  
UN ESFUERZO COMPARTIDO EN AMERICA LATINA**

**INFORME TECNICO FINAL**

**CONTRATO No. 91/086 G  
Instituto de Biomedicina  
Caracas, Venezuela**

PROYECTO: PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES, UN  
ESFUERZO COMPARTIDO EN AMERICA LATINA.  
DP/RLA/83/003.

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA  
PNUD/UNESCO/ONUDI PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE

INFORME: INFORME FINAL DEL PROYECTO CORRESPONDIENTE A LOS  
CONTRATOS N° 89/62, 91/086G. firmados en Caracas, Venezuela  
el 15-8-89 y el 9-5-91 respectivamente.

COORDINADOR TECNICO POR VENEZUELA:

Dr. Gustavo Ortega, M.Sc., M.D.  
Coordinador Laboratorio de Híbridosomas  
Instituto de Biomedicina  
Caracas, Venezuela.

Caracas. 20 de Enero de 1993.

El presente informe corresponde al informe final de las actividades desarrolladas durante la ejecución del Proyecto DP/RLA/83/003 iniciado en el mes de Agosto de 1989 bajo contrato firmado en Vienna el 21-7-89 y en Caracas, el 15-8-89.

La información relacionada con la caracterización de anticuerpos monoclonales previamente existentes en el Laboratorio de Hibridomas del Instituto de Biomedicina, ha sido enviada en informe anterior con fecha abril 1991. En resumen, se describen en dicho informe la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra Mycobacterium leprae y Leishmania mexicana.

Han sido generados durante el presente año anticuerpos monoclonales contra el Paracoccidioides brasiliensis. La selección del inmunógeno se hizo en base a resultados obtenidos del estudio de la respuesta inmunológica humoral de pacientes con Paracoccidioidomicosis del Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina. Los anticuerpos reconocen la Gp 43, glicoproteína específica para el diagnóstico. Actualmente se trabaja en función de purificar la glicoproteína para iniciar estudios de respuesta inmunológica en personas que habitan en zonas endémicas de Paracoccidioidomicosis en Venezuela. Se anexa página frontal de trabajo publicado en Acta Científica Venezolana y resumen de un segundo trabajo enviado para publicación actualmente sometido a arbitraje en la misma revista.

El presente proyecto ha permitido el reforzamiento de la capacidad del Laboratorio de Hibridomas del Instituto de Biomedicina, la adquisición de algunos equipos y reactivos; el adiestramiento de investigadores, y el financiamiento de la tesis doctoral de la Lic. María Correnti del postgrado de Biología Celular de la Facultad de Ciencias

Como coordinador técnico del proyecto debo destacar, que se ha cumplido con todas las responsabilidades contraídas y señaladas en los contratos.

Atentamente,

Dr. Gustavo Ortega  
Coordinador.

Cursos de Adiestramiento realizados durante el desarrollo del Proyecto:

1.- Curso teórico práctico realizado en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba. Octubre a Diciembre 1990. Participante Lic. Nunciada Salma.  
Adiestramiento en: Aspectos Generales relacionados al cultivo de hibridomas, producción de anticuerpos monoclonales in vitro y métodos de purificación.

2.- Curso teórico práctico realizado en el Centro de Biotecnología, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil. Febrero a Marzo 1991. Participante Lic. Nunciada Salma.  
Adiestramiento en: Expansión de hibridomas y estudio de parámetros metabólicos de crecimiento. Cultivo masivo a mediana escala en fibra hueca Vitafiber (Amicón).

3.- Producción Masiva en biorreactores del anticuerpo monoclonal B2-C114 y anti He-A con especificidad contra el antígeno A de eritrocitos humanos, y OKT3. Julio a Septiembre 1991. Participante Lic. Nunciada Salma.

# CARACTERIZACION DE ANTIGENOS *Paracoccidioides brasiliensis* INMUNODIAGNOSTICO SEROLOGICO MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Gustavo Ortega, Elio Villanueva, José Pereira, Nunciada Salma y María B. de Albornoz.

1.- Instituto de Biomedicina. Apartado Postal 4043, Caracas 1010-A, Venezuela.

Recibido: 26/03/92; Revisado: 19/06/92; Aceptado: 03/11/92

**RESUMEN:** La caracterización de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* cepas 2511 y 6688 mediante electroforesis en geles SDS-PAGE, y el uso adicional de inmunoblotting ha permitido en el presente trabajo identificar las fracciones antigénicas inmunogénicas, sensibles y específicas para el diagnóstico de Paracoccidioidomicosis. Las preparaciones antigénicas mostraron diferencias de acuerdo a la fase morfológica del hongo y al método utilizado. La respuesta inmunológica humoral fué heterogénea en los pacientes estudiados, y el estudio secuencial de sueros obtenidos en diferentes estadios de la enfermedad, permitió establecer índices de actividad del proceso. La alta sensibilidad del método, lo hace útil como técnica adicional para el inmunodiagnóstico serológico de Paracoccidioidomicosis. Palabras clave: *Paracoccidioides brasiliensis*, micosis, diagnóstico.

## CHARACTERIZATION OF *Paracoccidioides brasiliensis* ANTIGENS. SEROLOGIC IMMUNODIAGNOSIS BY WESTERN BLOTTING

**ABSTRACT:** The electrophoretic characterization on SDS-PAGE gels of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens, strains 2511 and 6688; and the additional use of immunoblotting has permitted in this study to identify the immunogenic, sensitive and specific antigen fractions for the diagnosis of Paracoccidioidomycosis. The antigenic preparations showed differences depending on the morphologic form of the fungus and the method utilized. The procedure revealed heterogeneity in the humoral immune response of the patients studied and permitted us to establish indices of activity of Paracoccidioidomycosis by the sequential analysis of sera obtained during different stages of the disease. The high sensitivity of this method makes it useful as an additional technique for the serologic immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, mycosis, diagnosis.

## INTRODUCCION

La Paracoccidioidomicosis (PCM), micosis prevalente en América Latina, es una enfermedad granulomatosa causada por el hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Múltiples órganos pueden ser afectados y diversas formas clínicas han sido descritas, desde lesiones asintomáticas e infecciones subclínicas hasta formas sistémicas, encontrándose un espectro clínico parecido al observado en otras entidades granulomatosas donde existe correlación con la respuesta inmunológica del hospedador.

Han sido descritas formas benignas, localizadas o regresivas con un título bajo de anticuerpos y reacción cutánea positiva a la paracoccidioidina, y formas generalizadas con hiperanmaglobulinemia y disminución de la respuesta inmunológica mediada por células.<sup>7</sup>

Debido a que en muchos casos la demostración del hongo es difícil, la orientación diagnóstica es realizada por procedimientos serológicos. El hallazgo de precipitinas específicas por diversos métodos es considerado como evidencia de diagnóstico presuntivo de PCM.

Un antígeno de importancia en el diagnóstico descrito en la literatura, ha sido denominado precipitina A<sup>13</sup>, antígeno

de inmunodifusión I<sup>14</sup>, banda de precipitación E2<sup>16,19</sup> y más reciente gp 43 (glicoproteína de 43.000 daltons)<sup>11</sup>, antígeno de migración catódica con heterogeneidad molecular que ha sido precipitado por anticuerpos específicos y su alta especificidad lo califica de antígeno de elección para exámenes de inmunoprecipitación.

Si bien la gp 43 del *P. brasiliensis* es inmunogénica, otros determinantes en mezclas antigénicas de antígenos metabólicos de la fase levaduriforme o micelial exocelular y antígeno citoplásmico han sido descritos<sup>5</sup>, capaces de generar anticuerpos.

La técnica Western Blotting o inmunoblotting<sup>12,13</sup>, provee una manera de analizar la respuesta inmunológica humoral contra mezclas complejas de antígenos y constituye un procedimiento adicional o complementario para el diagnóstico y evolución serológica.

El objetivo del presente trabajo fué caracterizar antígenos de *P. brasiliensis* exocelular y citoplásmico y mediante el uso de inmunoblotting utilizando sueros de pacientes con PCM y otras micosis, identificar antígenos específicos de utilidad para diagnóstico.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA PARACOCIDIUM  
BRASILIENSIS.

Gustavo Ortega, Nunciada Salma, Elio Villanueva y María B. de Albornoz.

Instituto de Biomedicina. Apartado Postal 40-3. Caracas 1010-A. Venezuela.

RESUMEN:

Una de las aplicaciones de AcMs en Micología Médica, ha sido el utilizarlos como sondas moleculares para separar e identificar fracciones antigénicas en mezclas complejas de macromoléculas. En el presente trabajo han sido obtenidos varios AcMs contra el P. brasiliensis, que reconocen determinantes antigénicos en exoantígenos y antígeno citoplásmico de diferentes cepas del hongo.

En ensayos inmunocitoquímicos, los AcMs fueron capaces de identificar formas de levadura y micelio, con diferencia en la intensidad y patrón de reconocimiento en la superficie del hongo.