

Aislamiento e identificación *in situ* de antígenos de *Fasciola hepatica*

Esteban Miranda Miranda*
Zeferino García Vázquez*

Resumen

La identificación y localización de los sitios antigénicos de los parásitos son de gran importancia para conocer los procesos inmunológicos y para mejorar los procedimientos serodiagnósticos de las enfermedades parasitarias. *Fasciola hepatica* es un trematodo de gran complejidad antigénica, por lo que se identificaron, por electroforesis e inmunoelectrotransferencia, los principales antígenos inmunodominantes de *F. hepatica* de 30 días de edad. Se realizó el aislamiento de tres polipéptidos antigénicos (PA) por medio de cromatografía de líquidos de baja presión, teniendo pesos moleculares de 24, 26 y 66 kD. Posteriormente, se produjo antisero específico en contra de estos tres PA para determinar los sitios antigénicos en cortes histológicos del trematodo, utilizando la técnica de inmunoperoxidasa. Se determinó que los antiseros detectan el PA de 24 kD en el tegumento de *F. hepatica*, el de 29 kD en las células de la ventosa ventral y, por último, el de 66 kD se localizó en las células del tracto intestinal. Se concluye que la técnica de inmunoperoxidasa es sensible y fácil de usar, para determinar sitios antigénicos en cortes histológicos de *F. hepatica* y otros helmintos.

Introducción

La identificación y aislamiento de antígenos parasitarios son de fundamental importancia para tener un mejor conocimiento de los mecanismos de inmunidad. Esto se ha realizado a través de estudios experimentales en el laboratorio, demostrando su utilidad en pruebas serodiagnósticas de las parasitosis.

Se han utilizado diversos métodos que han permitido identificar antígenos somáticos y productos metabólicos de *Fasciola hepatica*.^{7,8,9} Existe una amplia información sobre antígenos de *F. hepatica* adulta, debido a su fácil obtención de animales infectados. Esto ha permitido

realizar estudios inmunológicos y parasitológicos usando extractos somáticos de *F. hepatica* como inmunógeno, para inducir una respuesta inmune y posteriormente detectar la cinética de anticuerpos del huésped.^{5,14}

Sin embargo, las técnicas que se emplean para obtener los antígenos somáticos tienen ciertas limitaciones, ya que los métodos utilizados son poco eficientes y los antígenos inmunodominantes en las preparaciones están presentes en bajas concentraciones. Una técnica inmunológica que se ha utilizado, para identificar antígenos somáticos de *F. hepatica*, es la inmunodifusión pero en ocasiones no es capaz de detectar antígenos que no precipitan con su correspondiente anticuerpo, o, en contraste, algunos antígenos poseen más de un determinante, lo que da lugar a más de una línea de precipitación, lo que dificulta su interpretación.¹⁵ Otra técnica más efectiva para la separación de antígenos es la electroforesis, aunada a la posterior identificación de los antígenos por pruebas inmunológicas.¹⁴

Es claro que se requiere una metodología que permita aislar e identificar en forma más precisa, antígenos somáticos de *F. hepatica*. El presente estudio tuvo como objetivo aislar e identificar antígeno somático de *F. hepatica* por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida y cromatografía de líquidos de baja presión, así como producir anticuerpos específicos en contra de estos antígenos inmunodominantes, e identificar los sitios de origen de estos antígenos somáticos en cortes histológicos de *F. hepatica* por la técnica de inmunoperoxidasa.

Material y métodos

Extractos de *F. hepatica*

Seis conejos de la raza Nueva Zelanda se infectaron experimentalmente con 200 metacercarias cada uno. A los 30 días posinfección se sacrificaron 3 de los conejos y se separó el hígado, se localizaron y colectaron los parásitos del parénquima hepático. Los parásitos obtenidos se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos (SAF), se maceraron en un mortero de vidrio, utilizando SAF 0.15 M, pH 7.2, con EDTA 25 mM en un recipiente con hielo. La solución se centrifugó a 5000 xg por 30 minutos a 4°C, se

Recibido para su publicación el 25 de junio de 1993.

* Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria. INIFAP-SARH. Km 11.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso. Apartado Postal 206 CIVAC, 62500, Jiutepec, Morelos.

descartó el sedimento y al sobrenadante se le determinó la concentración en proteínas.¹⁰ El material así obtenido se guardó en alícuotas de 500 µl a -50°C hasta su uso. Los conejos restantes se usaron para la obtención de sueros testigos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (EGP)

Se emplearon geles de poliacrilamida en medio discontinuo con un gel muestra de 4.7%, pH 6.7, de dimensiones de 3 × 25 de 160 mm; y un gel separador al 10%, pH 8.9 con dimensiones de 3 × 35 × 160 mm; ambos geles contenían una solución amortiguadora de Tris-HCl y sodio duodecyl sulfato (SDS) al 0.1%.^{8, 16}

Se colocaron 200 µg de proteína de los extractos de *F. hepatica*, se aplicó corriente eléctrica a 20 mA durante 3 horas. Los geles se fijaron y tiñeron.⁷ Los pesos moleculares se determinaron utilizando las siguientes proteínas marcadoras de peso molecular: lactoalbúmina 14.4 kd, inhibidor de tripsina de soya 20.1 kd, anhidrasa carbónica 30 kd, ovoalbúmina 43 kd, albúmina sérica bovina 67 kd y fosforilasa 94 kd como referencia.

Inmunoelectrotransferencia (IETF)

El extracto de *F. hepatica* de 30 días previamente separado por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, se sometió a una electrotransferencia.¹⁷ El gel fue puesto en contacto con una tira de papel de nitrocelulosa, y después se sumergió en la solución de transferencia (Tris 20 mM, glicina 15 mM y metanol al 20%); se aplicó una corriente eléctrica de 400 mA por 4 horas. Posteriormente, el papel se dividió en dos partes; una se tiñó con azul de Coomassie, la otra se sumergió en una solución de gelatina al 1% en SAF por 15 minutos. El papel se dividió de nuevo en dos partes; una se sumergió en una dilución de 1:100 de suero de conejo seropositivo, y la otra, en suero negativo de *F. hepatica* durante una hora, se procedió a lavar tres veces en SAF y se colocó una dilución de 1:1500 de conjugado cabra anticonejo IgG marcado con peroxidasa, durante 60 minutos a 37°C. Una vez más, se lavó tres veces en la forma antes mencionada y se hizo el revelado con el sustrato Diaminobenzidina-H₂O₂ incubado a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Cromatografía líquida de baja presión (CLBP)

Los extractos de *F. hepatica* de 30 días de edad fueron fraccionados con un sistema completo de CLBP, con espectrofotómetro de luz ultravioleta y flujo continuo, calibrado a una emisión de 202 nm y conectado a dos registradores gráficos.

Se usaron dos columnas de 11 × 600 mm, una con Sephadex G-200 en SAF, pH 7.2, para la cromatografía de exclusión, y otra con DEAE-Sephadex A-50, para la cromatografía de intercambio iónico, en una solución de fosfatos 50 mM con NaCl 5 mM, pH 8.0. Esta columna fue conectada a un sistema de reservorios

Marriot, con un sistema mezclador de gradientes de cloruros de 5 a 500 mM durante 16 horas, a un pH constante.

Los extractos se equilibraron por diálisis con sus respectivas soluciones de corrimiento y se aplicaron 20 mg de proteína diluidos en 5 ml para cada proceso de separación.¹¹ Las muestras de 5 ml fueron recogidas en un colector de fracciones de 200 tubos; a las fracciones obtenidas se les determinó la concentración de proteínas.¹⁰

Sueros hiperinmunes contra polipéptidos antigénicos

A los polipéptidos purificados por medio de CLBP, se les determinó la concentración de proteínas y se ajustaron a 2 mg/ml en SAF. Se emulsificó 1 ml de la proteína de cada muestra con 1 ml de adyuvante completo de Freund y se inoculó en el cojinete plantar de un conejo Nueva Zelanda. Una segunda inoculación de los antígenos se administró a los 14 días en la forma antes mencionada, pero se utilizó para la emulsificación, adyuvante incompleto de Freund; la tercera y cuarta inoculaciones se realizaron con 7 días de separación, aunque exclusivamente con el antígeno. Los conejos fueron sangrados una semana después de la última inoculación; los sueros así obtenidos, se mantuvieron a -50°C hasta su uso.

Cortes histológicos de *F. hepatica*

Se realizaron cortes en microtomo de congelación a -50°C, de especímenes de *F. hepatica* de 30 días de edad, los cortes fueron de 6 micras y se fijaron por efecto del gradiente de la temperatura del corte congelado y la del portaobjetos a temperatura ambiente,¹³ conservándose a -50°C hasta su uso.

Técnica de inmunoperoxidasa

Las laminillas con cortes de *F. hepatica* se descongelaron a temperatura ambiente. Se colocaron en diluciones de 1:1000 de los sueros hiperinmunes y de sueros de conejo testigos negativos, y se incubaron durante 60 minutos a 37°C; luego, las laminillas se lavaron 3 veces por inmersión en SAF. Se preparó un conjugado anticonejo marcado con peroxidasa¹² y se utilizó a la dilución 1:1500 durante 60 minutos en incubación a 37°C; se lavó otra vez en la forma antes descrita. Se colocó el sustrato Diaminobenzidina-H₂O₂ por 60 minutos a temperatura ambiente, y se observó al microscopio óptico.¹¹

Resultados

Del extracto de *F. hepatica* de 30 días de edad, se detectaron por electroforesis 31 bandas de polipéptidos en un rango molecular (rm) de 10-116 kd. Destacaron un grupo de 7 polipéptidos entre 66-116 kd; un segundo grupo de 9 polipéptidos entre 60-31 kd, un tercero con 6 polipéptidos entre 29-17 kd, y una agrupación de 9 polipéptidos de bajo peso molecular entre 10-15 kd (Figura 1).

Se localizó una zona entre 22-60 kd, que mostró una marcada coloración al emplear el reactivo de Schiff, lo que indica su naturaleza glicoproteínica, así como una zona lipídica de bajo peso molecular, menor de 10 kd, y una abundante cantidad de polisacáridos entre 8-12 kd. Las diferentes porciones antigénicas del extracto, se determinaron a través de inmunoelectrotransferencia (Figura 1).

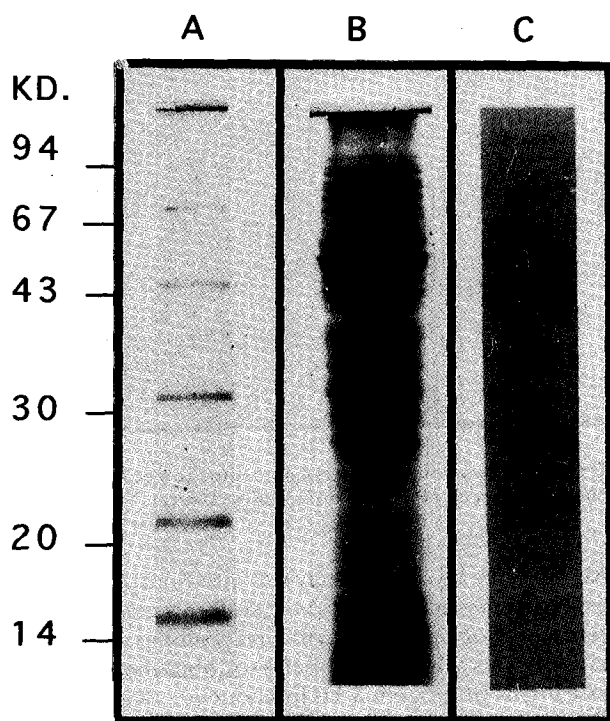


Figura 1. Electroforesis e inmunoelectrotransferencia del extracto total de *Fasciola hepatica*. A. Marcadores de peso molecular. B. Patrón electroforético teñido con azul de Coomassie. C. Inmunoelectrotransferencia revelada por inmunotinción

A través de CLBP se obtuvo la purificación de los polipéptidos de 24, 29 y 66 kd, cuya pureza se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 2). Aunque se intentó la purificación de un mayor número de polipéptidos para verificar su antigenicidad, no se pudieron obtener con suficiente pureza. Sólo tres polipéptidos (PA) fueron antigénicos en conejos, ya que estimularon la respuesta inmune humoral de los animales.

Al utilizar los sueros hiperinmunes obtenidos en los conejos inoculados con los PA de 24, 29 y 66 kd con la técnica de inmunoprecipitación en cortes histológicos de *F. hepatica*, el antisuero en contra del PA de 66 kd mostró una fuerte tinción del tracto intestinal en cortes del parásito (Figura 3); el suero PA de 29 kd tiñó intensamente las células que circundan la ventosa ventral exclusivamente. En cambio, el suero PA de 24 kd se detectó en el tegumento del parásito, no siendo tan intensa la reacción como en los otros casos (Figura 4).

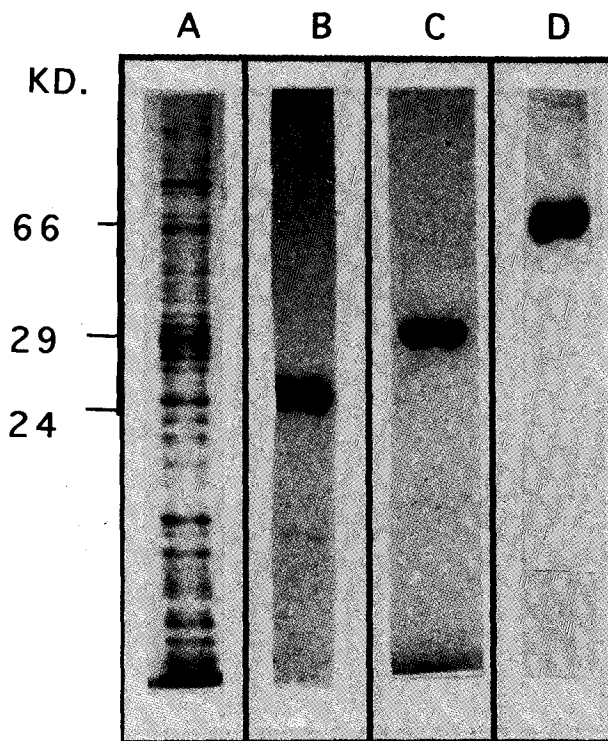


Figura 2. Análisis de pureza y concentración de los antígenos purificados por medio de cromatografía líquida de baja presión. A. Patrón electroforético de extracto total. B. Antígeno de 24 KD. C. Antígeno de 29 KD. D. Antígeno de 66 KD.

Discusión

Los procedimientos de obtención de los antígenos de *F. hepatica* han sido tradicionalmente a través de la maceración y lavado de los parásitos adultos. Sin embargo, existen problemas en su estabilidad y no es completa su solubilidad;⁶ por lo tanto, el procedimiento utilizado en este estudio es recomendable para estabilizar las muestras antigénicas.

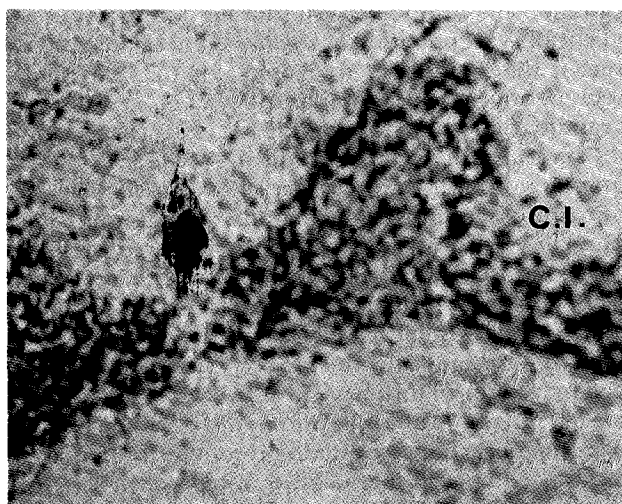


Figura 3. Localización del antígeno de 66 KD en cortes histológicos de *Fasciola hepatica*. La fotografía muestra un ciego intestinal (C.I.) del parásito, detectado por medio de inmunoperoxidasa. Fotografía tomada al microscopio óptico con objetivo 40X

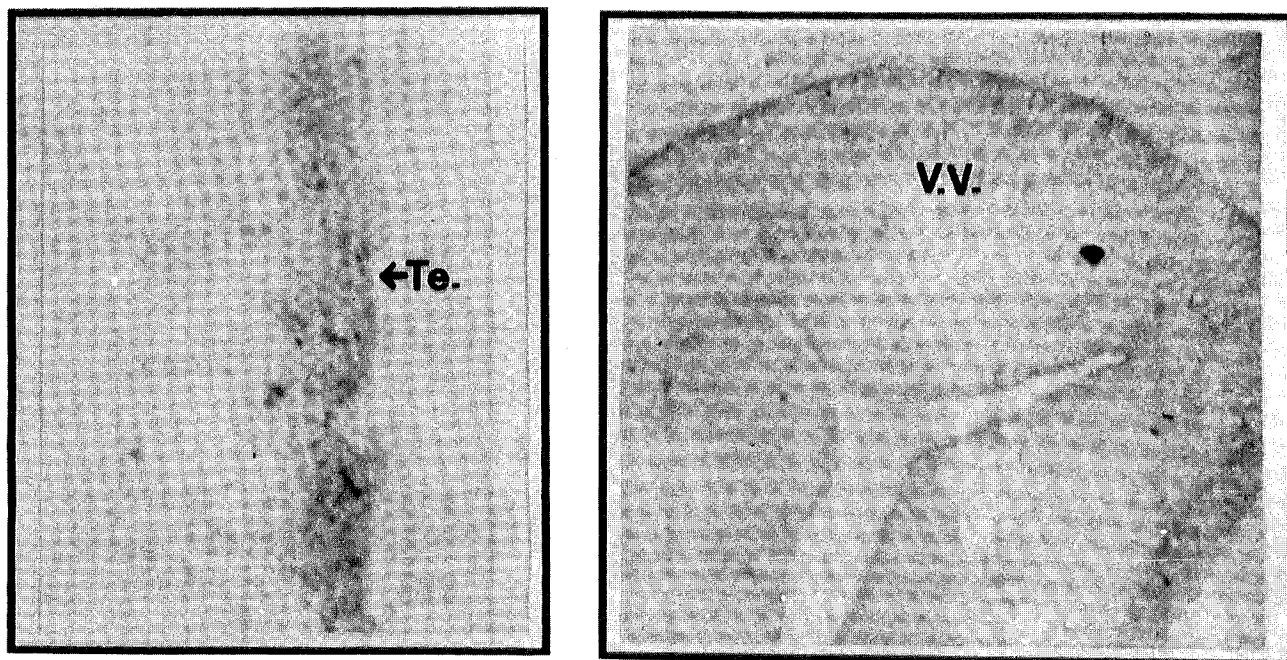


Figura 4. Localización de los antígenos de 24 y 29 kD A. El antígeno de 24 kD produce inmunotinción en el tegumento (Te.) de *Fasciola hepatica*. Fotografía tomada con objetivo 40 X. B. El antígeno de 29 kD produce inmunotinción en las células de la ventosa ventral (V.V.). Fotografía tomada con objetivo 10X.

Entre los componentes antigénicos identificados en *F. hepatica*, son de especial interés los de peso molecular de 24, 29 y 66 kD, este último parece similar al identificado por otros autores,¹⁶ de 62 kD y que indujo la formación de anticuerpos detectables a las tres semanas posinfección. Otros investigadores han detectado antígenos similares a los encontrados en este estudio entre el rm de 23-28 kD, que se asemejan a los obtenidos, de 24-29 kD.¹⁴

En su desarrollo y migración, *F. hepatica* sufre cambios morfológicos y fisiológicos. Tal vez uno de los cambios más importantes son las alteraciones de glicocáliz y tegumento.¹ *F. hepatica* en su estadio juvenil recién desenquistada, sólo tiene un tipo de células tegumentales denominadas tipo O, que segregan gránulos denominados gránulos T_O. Esta es una característica morfológica que la distingue de las células y gránulos tipo 1 y tipo 2 presentes en los estadios inmaduros y adultos del trematodo.⁵ Los gránulos juveniles T_O y T₁ son antigénicamente similares, más diferentes de los del tipo 2.¹ El polipéptido de peso molecular de 24 kD parece formar parte del último tipo de células mencionadas, debido a la reactividad mostrada del suero hiperinmune producido con este antígeno con el que reaccionó en forma positiva. Tal vez la reacción no fue tan intensa ya que en el momento de obtención del parásito, pudo haberse estado presentando algún cambio de células tegumentales, o debido al proceso de fijación del parásito para el ensayo de inmunoperoxidasa.

El sistema digestivo del parásito también sufre considerables cambios durante su migración y maduración.

Al principio, las células del tracto intestinal parecen tener exclusivamente una función secretora y existen diferencias morfológicas entre las formas juveniles y adultas.² En el adulto, las células intestinales son abundantes, grandes y de forma homogénea, las funciones de estas células son de absorción y secreción.³ El PA de 66 kD podría formar parte de estas estructuras conforme a los resultados obtenidos por la técnica de inmunoperoxidasa.

Estos resultados permiten sugerir el empleo de la técnica de inmunoperoxidasa para la identificación de los distintos sitios antigénicos de *F. hepatica*, en los diversos estadios del parásito, ya que es una técnica más fácil y accesible que la utilizada en otros estudios con compuestos radiactivos⁷ o anticuerpos fluorescentes,⁴ que requieren equipo más sofisticado que el que se utilizó en este estudio.

Abstract

Identification of antigenic sites of parasites is important to understand immunologic mechanisms and for serodiagnosis of parasitic diseases. The trematode *Fasciola hepatica* has a great antigenic complexity. This study was carried out to determine immunodominant antigens of 30 days of age *F. hepatica* by Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Westernblot. Three antigenic polipetides (AP), with molecular weights of 24, 26 and 66 KiloDaltons (kD), were detected by Low Pressure Liquid Chromatography. Antisera against these antigens was produced in rabbits and used to identify antigenic sites on histological slides of the trematode using

immunoperoxidase techniques. Specific antisera produced a dye precipitation at the following sites: 24 kD in the tegument; 26 kD in the cells of the ventral sucker and 66 kD in the intestinal cells of the parasite. It is concluded that the immunoperoxidase technique is effective and easy to perform to detect antigenic sites on histological preparations of *F. hepatica* and other helminths.

Literatura citada

1. Bennet, C.E., Joshua, W.P. and Hughes, L.D.: Demonstration of juvenile-specific antigens of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, 68: 791-795 (1982).
2. Bennet, C.E. and Threadgold, L.T.: Electron microscope studies on *Fasciola hepatica*. Fine structure of newly excysted juvenile. *Exp. Parasitol.*, 34: 85-89 (1973).
3. Bennet, C.E. and Threadgold, L.T.: *Fasciola hepatica*: Development of tegument during migration in mouse. *Exp. Parasitol.*, 38: 38-55 (1975).
4. Hanna, R.E.B.: *Fasciola hepatica*. An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Exp. Parasitol.*, 50: 155-170 (1980).
5. Haroun, E.M., Hammond, J.E. and Sewell, M.M.H.: Resistance to *Fasciola hepatica* in rats and rabbits following implantation of adult flukes contained in diffusion chambers. *Res. vet. Sci.*, 29: 310-314 (1980).
6. Hillyer, G.V., Pelley, R.P. and Llano-del Diaz-de, A.: Solubilization of antigens of *Fasciola hepatica* which reacts with antibodies to *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 65: 55-60 (1979).
7. Irving, D.O. and Howell, M.J.: Characterization of excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 85: 791-795 (1982).
8. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 668-685 (1970).
9. Lehner, R.P. and Sewell, M.M.H.: A study of antigens produced by adult *Fasciola hepatica* maintained *in vitro*. *Parasite Immunol.*, 2: 99-109 (1980).
10. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951).
11. Mayes, E.L.V.: Electrophoretic and chromatographic separation of peptides on paper. In: *Methods in Molecular Biology I. Proteins*. Edited by: Walker, J.M., 41-170. *Humana Press*, Clifton, New Jersey, 1984.
12. Nakane, P.K. and Kawaoi, A.: Peroxidase-labeled antibody: A new method of conjugations. *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084-1091 (1974).
13. Pearse, A.G.E.: *Histochemistry: Theoretical and Applied*. *Little Brown and Co.*, Boston, Massachusetts, 1972.
14. Pfister, K., Daveau, Ch. and Ambroise-Thomas, P.: Partial purification of somatic and excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* and their application for the serodiagnosis of experimental and natural fasciolosis using ELISA. *Res. vet. Sci.*, 37: 39-43 (1984).
15. Sandeman, R.M. and Howell, M.J.: Precipitating antibodies against excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* in sheep serum. *Vet. Parasitol.*, 9: 35-46 (1981).
16. Santiago, R.M., Hiller, G.V., Garcia-Rosa, M. and Morales, H.M.: Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infection in rabbits. *Am. J. Trop. Med.*, 35: 135-140 (1986).
17. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 76: 4350-4354 (1979).