

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DE *TRICHINELLA SPIRALIS* EN CONEJO COMO MODELO EXPERIMENTAL

MARÍA ALEJANDRA MORENO GARCÍA*,
ESPERANZA ÁVALOS DÍAZ*, JESÚS MUÑOZ
ESCOBEDO**, RAFAEL HERRERA ESPARZA*

* Investigadores docentes del Centro de Biología Experimental.

** Investigador docente del Instituto de Investigaciones Odontológicas.

Correspondencia: Apartado postal 12, CP 98600, Guadalupe, Zacatecas, México.

Palabras clave: respuesta inmune, antígenos inmunodominantes.

RESUMEN

Se estudió la respuesta inmune humoral en un modelo experimental en conejos infectados con larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Los animales controles fueron conejos aparentemente sanos. La respuesta humoral se evaluó durante 12 semanas determinando los niveles de anticuerpos contra el antígeno soluble de *T. spiralis* por inmunofluorescencia indirecta (IFI), y Western Blot (WB). Por IFI se identificaron dos patrones de reactividad contra cavidad celómica y contra cutícula. En el WB se encontró que los animales infectados reconocen varios componentes antigénicos, con rango de pesos moleculares de 29-97kDa con el predominio de un triplete de 50kDa, 47kDa, 45kDa y una banda de 67kDa en el 100% de los sueros estudiados; por otro lado la banda de 45kDa persiste aun a diluciones de 1:10,000.

ABSTRACT

The immune humoral response in an experimental model in rabbits exposed to muscular larva of *Trichinella spiralis* was a subject of study. The control group were apparently healthy rabbits. The humoral response was evaluated during a 12 weeks period, determining the levels of antibodies against the soluble antigenic of the *T. spiralis* trough indirect immunofluorescence (IFI), and Western Blot (WB). Trough IFI two patterns of reactiviness were identified against the celomic cavity an against cuticle. In WB was founded that infected animals with molecular weight ranks of 29-97 kDa in wich a triplet of 40 kDa, 47 kDa, 45 kDa predominated, and a band of 67 kDa in 100 % of the studied serums. On other hand, this 45 kDa band persist even in 1:10,00 dilutions.

INTRODUCCIÓN

La triquinosis es una enfermedad parasitaria causada por el nemátodo *Trichinella spiralis* que es capaz de invadir e infectar los músculos de diferentes especies de mamíferos, además de infectar a los humanos. Ocasionalmente ocasiona pérdidas económicas de importancia en la porcicultura por lo que es oportuno contar con mejor conocimiento de la biología del parásito.

Se ha señalado que la presencia de *T. spiralis* en los tejidos desencadena una reacción de hipersensibilidad retardada y de producción de anticuerpos; ambos mecanismos confieren, en ocasiones, una protección específica.^{1,18} La cutícula y los elementos del tubo digestivo del parásito son capaces de desencadenar una respuesta inmune, específicamente los esticocitos y los elementos del espacio pseudo-celómico contienen los antígenos más importantes que varían de acuerdo con la etapa de su ciclo vital.

Las investigaciones de Despomier han mostrado que los esticocitos son de dos tipos; un grupo contiene gránulos alfa y el otro gránulos beta; al aislar antígenos de éstos e inocularlos en animales experimentales obtuvieron altos niveles de protección.^{7,8,9} Varios autores han reportado que antígenos inmunodominantes de *T. spiralis* tienen un peso molecular dentro del rango de 28-120kDa con el predominio de una banda de 45 kDa.^{4,5,10,11,12,16,17,22}

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue determinar las características de los

antígenos inmunodominantes de *T. spiralis* en un modelo experimental en conejo y valorar su utilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se utilizó una población de 20 conejos de raza Nueva Zelanda, hembras de 2.5 kg de peso, de los cuales 10 fueron infectados con LI de *T. spiralis* y 10 fueron controles sanos.

INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *T. SPIRALIS*

El grupo de 10 conejos Nueva Zelanda infectados con LI de *T. spiralis* recibieron un promedio de 1,500 larvas por vía oral. Las LI (larvas infectantes) se obtuvieron a partir del músculo de conejos infectados con *T. spiralis*. Los conejos sangraron por venas marginales cada ocho días por 12 semanas; a los 30 días se reinfectaron. La producción de anticuerpos se evaluó por técnicas inmunoserológicas: IFI y WB.

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO SOLUBLE DE *T. SPIRALIS* (AST).

Fue obtenido a partir de larvas de músculo de conejo experimentalmente infectados con *T. spiralis* (la inoculación se efectuó como ha quedado descrito); para confirmar que los animales estaban infectados se obtuvo suero y se enfrentó al AST por inmunodifusión doble.

Los animales infectados se sacrificaron a la octava semana de inoculación y se observó al microscopio de luz para determinar la cantidad

de LI en músculo, encontrando un promedio de 25 LI por campo. El tejido infectado fue sometido a digestión por pepsina (10,000 U) 0.3% HCL 0.2 N e incubado a 37°C por 24 horas (conforme al método descrito por Del Río y col.).⁶ Después de completar la digestión de las larvas, fueron lavadas extensamente con SSF (solución salina fosfato) y desengrasadas con acetona, el paquete larvario fue resuspendido en SSF y los antígenos del parásito fueron extraídos por sonicación usando un 50% de eficiencia y dos minutos por pulso, el homogenizado se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por una hora. Se obtuvo el sobrenadante y se le determinó la concentración de proteínas por el método de azul de Coomassie G-250 a 610 nm.² El extracto total fue utilizado como AST, determinando su actividad antigénica por precipitación en gel con un suero prototipo positivo y negativo.

INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA

Las LI se fijaron a portaobjetos tratados con ASB (albúmina sérica bovina) al 5%; las LI fueron obtenidas del músculo de conejos infectados con *T. spiralis*. El suero problema fue diluido progresivamente hasta 1:640; y se incubó sobre las LI en cámara húmeda por 30 minutos, se lavaron 10 minutos con SSF por dos veces, seguida de incubación durante 30 minutos, con antigamma-globulina de conejo marcada con fluoresceína (diluida 1:500) luego se lavaron 10 minutos con SSF por dos veces y los portaobjetos fueron montados con SSF y

glicerol (9:1); las laminillas se observaron al microscopio de epifluorescencia.¹³ Otra fracción de larvas se permeabilizó con Tritón X-100 al 5% por 10 minutos, después se centrifugaron por cinco minutos y se eliminó el detergente de la suspensión; se suspendieron en solución amortiguadora y se fijaron en citocentrífuga a 1,000 rpm por cinco minutos, colocando 1, 5 y 10 microlitros para estandarización del número de LI de *T. spiralis*. Las larvas adheridas a portaobjetos se fijaron con acetona fría por un minuto y se siguió el resto del procedimiento ya señalado.

ELECTROFÓRESIS DE PALIACRILAMIDA

Con el AST se realizaron corrimientos electroforéticos preparativos en

minigeles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones reductoras. Se utilizaron geles de 7x7 cm preparados con dodecil sulfato de sodio (SDS) de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli,¹⁴ con una concentración de acrilamida al 11% y la relación acrilamida-bisacrilamida de 1:60 en el gel separador. Durante el tiempo de corrimiento, se usó una cámara de miniprotean II (Bio-Rad), aplicando 60 volts por 3 horas.

El AST fue preparado por ebullición durante dos minutos en una solución reductora (Tris HCL 1 M pH 6.8, glicerol, SDS 2%, azul de bromofenol al 0.5%, EDTA, H₂O, ditiotreitól 5 mM y 2-mercaptoetanol al 5%). Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular: fosforilasa (97 kDa), albúmina sérica bovina (68kDa), ovoalbúmina (43

kDa), anhidrasa carbónica (24 kDa), lisosima (14 kDa). Posteriormente uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y desteñido con solución aclaradora, luego secado en membranas de papel celofán.

WESTERN BLOT

El AST separado por PAGE fue transferido a papel de nitrocelulosa (NC) de acuerdo al método descrito por Towbin,²¹ utilizando una cámara de minitrasblotcell (Bio-Rad), 15 volts, durante toda la noche a 4°C; las proteínas fueron reveladas por cinco minutos con el colorante de fast green al 0.1% y luego decoloradas con agua destilada. El papel de NC con las proteínas transferidas fue cortado en tiras de 2 mm de ancho en forma paralela al corrimiento, se bloquearon a temperatura ambiente con PTX-ASB (fosfato 0.01 M, pH 7.5, tritón X-100 al 0.2%, NaCl 0.15 M, EGTA 1 mM y albúmina al 4%) en agitación suave, las tiras se incubaron con los sueros problemas y controles a las siguientes diluciones 1:200, 1,000, 10,000, 1,000,000, usando con PTX-ASB 4% se incubaron toda la noche, en agitación suave. Se lavaron por cinco ocasiones con solución de lavado GB (tritón X-100 0.5%, trietanolamina 50mM pH 7.4, NaCl 100mM, EDTA 1mM pH 7.4, SDS 1mM, H₂O), durante 10 minutos por lavado; posteriormente se agregó PTX-ASB por 15 minutos. Los anticuerpos unidos al papel de NC, se marcaron con proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA) SPA-I (60,000 cpm/ml de PTX), incubándose por 45 minutos en agitación suave a temperatura ambiente, posteriormente las tiras de NC fueron lavadas

FIGURA 1



I.F.I. se localiza afinidad de la fluorescencia en la cavidad celómica.

nuevamente con solución de GB, finalmente fueron montadas y secadas. Las bandas inmunorreactivas se observaron por autorradiografía utilizando películas Kodak XAR5 en cassettes con pantallas intensificadoras, incubándose por 16 horas a 70^o C.

RADIOMARCAJE

El radiomarcage de SPA con yodo se hizo por la técnica de cloramina T,¹⁹ para la detección de antígenos.

RESULTADOS

Propiedades inmunoquímicas del AST. El antígeno obtenido de LI de *T. spiralis* alcanzó una concentración proteica de 2.2 mg/ml, y mostró ser estable a 4^o C.

El extracto crudo de AST probado con un suero testigo positivo, mostró una reacción de precipitación por inmunodifusión doble a las 24 horas. Al triturarlo, mediante diluciones progresivas del antígeno se encontró reacción inmune hasta la dilución de 1:32 que corresponde a una concentración proteica de 0.0682 mg/ml.

Detección de anticuerpos anti-T. spiralis por IFI. En las primeras tres semanas los sueros fueron negativos, a partir de la cuarta semana se observó que los 10 sueros problemas presentaban afinidad por la cutícula de la LI y algunos gránulos de fluorescencia en la cavidad celómica (figura 1, 2). Los controles fueron negativos durante las doce semanas de estudio.

Permeabilización de larvas. Al valorar el efecto de la permeabilización de las LI, de *T. spiralis* se observó afinidad de la fluorescencia a lo largo de la cavidad celómica y en cutícula; en las larvas no tratadas con tritón X-100, se observó igual afinidad (figura 3). Los controles fueron negativos.

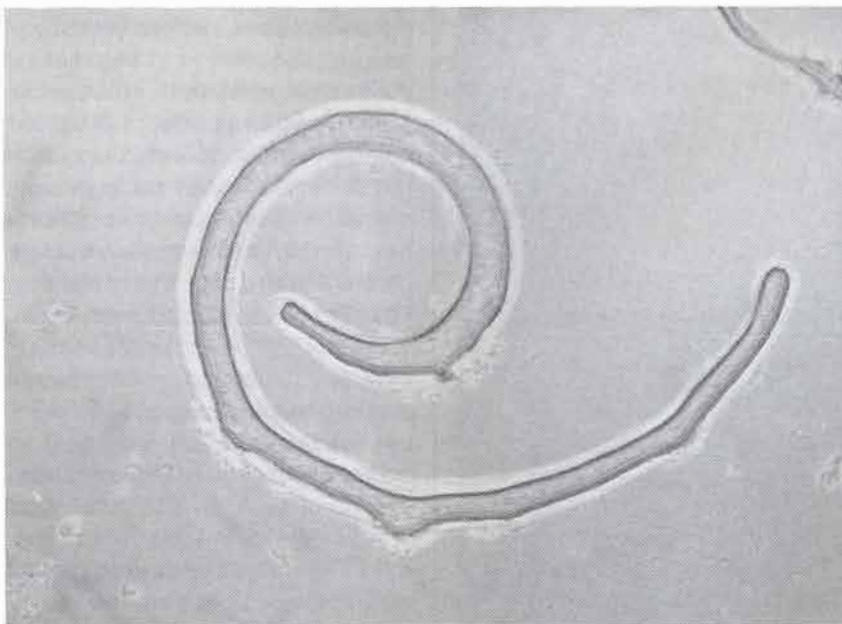
Electroforesis de poliacrilamida, Western blot y autorradiografía. Del total de 240 sueros obtenidos durante el estudio, se analizaron 86 muestras, 76 problemas y 10 controles, los sueros de los animales infectados reconocieron varios componentes antigénicos en el extracto crudo, cuyo rango de peso molecular fue de 29-97 kDa. La reacción resultó específica a diferentes diluciones del suero (1:200, 1:1,000, 1:10,000), la reactividad predominante fue un triplete de 50kDa, 47kDa y 45 kDa en el 100% de los sueros estudiados, otra banda que también fue persistente es la de 68kDa.

DISCUSIÓN

El modelo experimental de triquinosis en conejo es un modelo favorable de estudio, ya que todo su ciclo de vida puede llevarse a cabo en un solo huésped y proporciona información sobre los mecanismos que participan en la inducción de la respuesta inmune, este modelo fue útil para explorar métodos más sensibles de diagnóstico, los resultados concuerdan con los reportados para otros modelos experimentales.

Nuestros resultados demuestran que los conejos infectados con LI de *T. spiralis* producen anticuerpos

FIGURA 2



I.F.I. se localiza afinidad de la fluorescencia en la superficie corporal y cutícula.

en contra de epítopes que se expresan en la superficie del parásito y en los componentes del tubo interno (esófago), que al expulsar sus secreciones son accesibles al sistema inmune del huésped.

Los estudios de IFI mostraron que el antígeno de superficie se localiza en la cutícula y en la cavidad celómica en forma de puntillero lineal. La similitud de la respuesta referente a las LI tratadas y no tratadas es debido a la digestión de la LI por 24 horas a 37°C.

Las características moleculares demuestran el reconocimiento de varias fracciones antigénicas con rango de 29kDa a 97kDa, siendo la más prominente la de 45kDa, todos los animales infectados reconocen esta banda, aun con sueros diluidos 1:10,000.

Dispommier describe que los esticocitos son de dos tipos, uno contiene gránulos alfa y otro beta; éstos han sido purificados y por medio de monoclonales se definió que los esticocitos tienen un peso molecular de 37 kDa, 48kDa, y 50/55 kDa.^{7,8} En sus más recientes observaciones reporta la formación de una célula nodriza la cual secreta un antígeno de 43 kDa, que parece corresponder a un antígeno inmunodominante.¹¹

Takahashi, por microscopía electrónica, reporta que los sueros de animales infectados por *T. spiralis*, están dirigidos contra antígenos secretorios de los esticocitos alfa en las células anteriores y beta en células posteriores.^{19,20}

Ortega y col. llevaron a cabo un estudio con anticuerpos monoclonales,

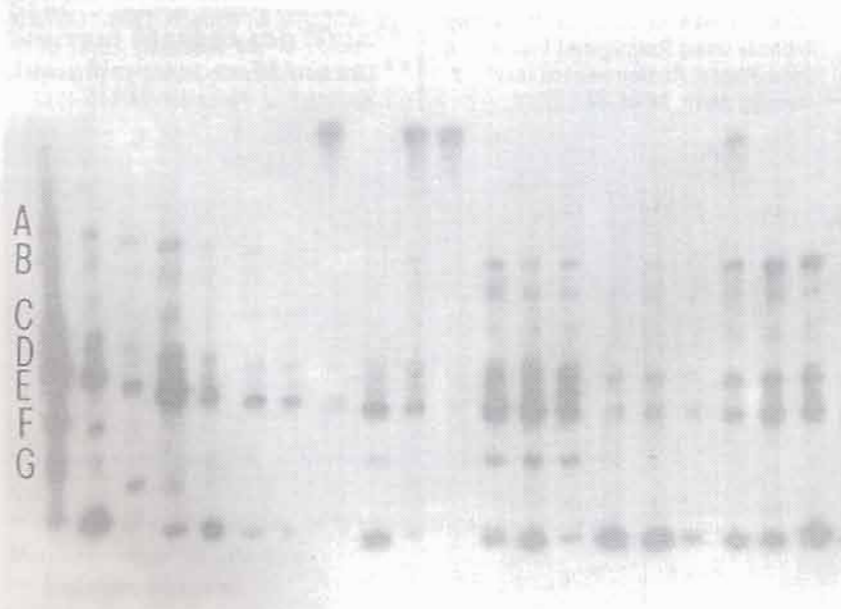
sobre los antígenos de superficie de la *T. spiralis* en diferentes estadios, encontrando que los esticocitos son el sitio de producción de los antígenos de superficie.^{16,17}

Cox encontró que los antígenos mayores de 60-120 kDa corresponden a cutícula³ y Wright reporta que estos antígenos de cutícula, son secretados en los esticocitos alfa.²²

Los estudios citados apoyan, que el esófago está formado por esticosomas (alfa y beta) y compuestos por esticocitos, que son las células que secretan material antigénico, el cual es importante en la respuesta inmune del huésped.

Varios autores han demostrado que las moléculas de superficie y algunos de los componentes de secreción-excreción de la LI del parásito son inmunodominantes en todos los modelos experimentales estudiados incluyendo al hombre.

FIGURA 3



WB de sueros positivos anti-tríquina a una dilución de 1:1,00 detectándose hasta 7 bandas, con el predominio del triplete de 50 kDa, 47 kDa y 45 kDa (C, D, E).

CONCLUSIONES

Se observó que los anticuerpos antitriquina tienen una afinidad en cutícula y cavidad celómica por técnicas de IFI, se demostró que en los animales infectados con LI de *T. spiralis* los anticuerpos encuentran predominio por los antígenos de 45 kDa, la cual es persistente aun a diluciones del suero de 1:10,000.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por otros autores, con otros modelos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bachman, W.G. *Inmunología*. México: Limusa, 1989.
2. Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem.* 72:248-254.
3. Cox, G.N. 1992. "Molecular and Biochemical Aspects of Nematode Collagens". *J. Parasitol.* 78:1-15.
 4. Chapa-Ruiz, R., Salinas Tobón, M. R., Martínez, R.M., Cedillo, R., García, E. 1989. "Diagnosis of Human Trichinosis by Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay". *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 31:136-139.
 5. Chapa-Ruiz, R., Salinas, T.R., Aguilar, D.J., Martínez, M.R. 1992. "Recognition of *Trichinella Spiralis* Muscle Larvae Antigens by Sera from Human Infected with this Parasite and its Potential Use in Diagnosis". *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 34:95-99.
 6. Del Río, A., Herrera, R.M., Herrera, R. 1986. "Triquinosis experimental I: extracción de antígenos y procedimientos para detectar anticuerpos". *Arch. Invest. Med.* 17:359-367.
 7. Despommier, D.D., Muller, M. 1970. "The Sticosome of *Trichinella Spiralis*: Its Structure and Function". *J. Parasitol.* 56:76-77.
 8. Despommier, D.D., Muller, M. 1976. "The Sticosome and its Secretion granules in the Mature Muscle Larvae of *Trichinella Spiralis*". *J. Parasitol.* 62:775-785.
 9. Despommier, D.D., Laccetti, A. 1981. "Antigens Isolated from a Large-Particle Fraction Derived from Muscle Larva". *Exp. Parasitol.* 51:279-294.
 10. Despommier, D.D., Laccetti, A. 1981. "*Trichinella Spiralis*: Partial Characterization of Antigens Isolated by Immuno-Affinity Chromatography from the Large-Particle Fraction of the Muscle Larvae". *J. Parasitol.* 67:332-339.
 11. Despommier, D.D., Symmans, W.F., Dell, R. 1991. "Changes in Nurse Cell Nuclei During Synchronous Infection with *Trichinella Spiralis*". *J. Parasitol.* 77: 290-295.
 12. Herrera, R., Del Río, A., Avalos, E., Herrera, R.M. 1987. "*Trichinella Spiralis* Immunochemical Characterization of Antigens in Experimental Infections". *Exp. Parasitol.* 63:233-236.
 13. Labzoffsky, N.A., Baratawidjaja, B.K., Kuitunen, E., Lewis, F.N., Kavelman, D.A., Morrysey, L.P. 1964. "Immunofluorescence as an Aid in the Early Diagnosis of Trichinosis". *Canad. Med. Ass. J.* 90:920-921.
 14. Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* 227:680-685.
 15. Marier, R., Jansen, M., Andriole, V.T. 1979. "A New Method for Measuring Antibody Using Radiolabeled Protein A in Solid-Phase Radioimmunoassay". *J. Immunol Meth.* 28:41-49.
 16. Ortega-Pierris, M.G., Almond, N.W., Parkhouse, M.E. 1987. "Applications of Biochemically Defined Antigens of *Trichinella Spiralis* in Host Immunity, Protection and Diagnosis". *W. Parazytologiczne.* 4:420-452.
 17. Ortega-Pierris, M.G., Mackenzie, D.D., Parkhouse, M.E. 1987. "Protection Against *Trichinella Spiralis* Induced by a Monoclonal Antibody that Promotes Killing of Newborn Larvae by Granulocytes". *Parasite Immunol.* 6:275-284.
 18. Stites, D.P., Stobos, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V. 1994. *Inmunología básica y clínica*, 8ª ed. México, El Manual Moderno.
 19. Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Susuki, Yagi, J., Araki, T. 1988. "Immunohistochemical Localization of Antigenic Substances in *Trichinella spiralis* muscle larvae". *J. Parasitol.* 37:435-440.
 20. Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Susuki, H., Yagi, J., Araki, T. 1989. "Morphological Study of the Stichocyte Granules of *Trichinella Spiralis* Muscle Larvae". *J. Parasitol.* 38:21-29.
 21. Towbin, H.T., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
 22. Wright, K.A., Hong, H. 1988. "Characterization of the Accessory Layer of the Cuticle of Muscle Larvae of *Trichinella Spiralis*". *J. Parasitol.* 74:440-451.