ARTÍCULO ORIGINAL

Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*

HERMES ESCALANTE*, ROSA LIÑAN*, ENRIQUE DÍAZ**, KELLY DAVELOIS**
y OBED HUAMANCHAY**

Ascaris suum LUNG LARVAE ANTIGENS RECOGNIZED BY ANTIBODIES PRODUCED IN
Oryctolagus cuniculus

*Excretory/secretory antigens (E/SAg) and somatic antigens (SAg) of **Ascaris suum** lung larvae that induce the immunoglobulin G antibodies production in **Oryctolagus cuniculus** experimentally immunized was determined. For this purposes, specimens of *Mus musculus* BALB/c were inoculated orally with infective eggs of **A. suum** obtained from pigs naturally parasitized in order to obtain the lung larvae. Part of these larvae was cultured in Minimum Essential Medium (MEM) to obtain E/SAg and another part was sonicated to obtain the SAg too. Both, E/SAg and SAg mixed with complete and incomplete Freund's adjuvant were used for rabbits immunization. Five weeks after the immunization, the rabbits were bled by cardiac puncture obtaining the immunosera by centrifugation, which was purified partially by saline precipitation and dialysis. By using an Western blot technique with purified immunoserum and E/SAg obtained to 20 hours and reduced with dithiothreitol, fourteen antigens bands of 100, 72.4, 56.2, 42.7, 39.8, 34.6, 31.6, 30.2, 19.5, 16.9, 15.5 y 14.9 KD, were detected. The bands of 100, 72.4, 16.9, 15.5 and 14.9 KDa were been the most reactivates. Thereby the SAg, also reduced with dithiothreitol, seven bands of 42.7, 39.8, 34.6, 30.2, 28.0 and 25.2 KDa were detected. They were a bit clear. In conclusion, the E/SAg induce the highest production of immunoglobulin G antibodies in rabbits experimentally immunized.*

Key words: *Ascaris suum*, excretory/secretory and somatic antigens, Western Blot.

INTRODUCCIÓN

La ascariosis intestinal es considerada como una de las diez infecciones parasitarias más comunes en el mundo, calculándose que existen entre 800 y mil millones de individuos infectados con *Ascaris lumbricoides*; aunque la mortalidad

es relativamente baja, las complicaciones frecuentemente requieren de atención hospitalaria. La ascariosis pulmonar en el huésped humano está relacionada con la ruptura de los capilares y de las paredes en el huésped humano está relacionada con la ruptura de los capilares y de las paredes de los tabiques alveolares causada por

* Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. hermesmario@hotmail.com

** Centro de Análisis e Investigación escalabs E.I.R.L. Trujillo. Perú. laboratorio@escalabs.com

las larvas L3 y L4 de *A. lumbricoides* y por las larvas de *Ascaris suum*, habiéndose demostrado la existencia de infección cruzada, aunque las larvas de origen porcino no llegan al estado adulto en el humano¹⁻⁵.

Se ha logrado identificar los antígenos de excreción/secreción (AgE/S) de la larva infectiva (L2), así como de las L3 y L4 de *A. lumbricoides* utilizando la técnica de inmunoprecipitación, encontrando antígenos que tienen un peso molecular que varía de 14 a 410 KDa⁶; asimismo, se ha encontrado homología en cuanto a niveles moleculares e inmunológicos entre los Ag E/S de *A. lumbricoides* y los de *A. suum*⁷; y últimamente, se ha identificado, mediante la técnica de electroinmunotransferencia o “Western Blot” bidimensional los antígenos de las L3 de *A. suum*⁸ y se ha verificado que el antígeno somático del helminto induce elevada producción de IgG⁹.

Se han realizado algunas investigaciones orientadas a relacionar el estado nutricional de niños y la respuesta inmunológica de tipo IgE, así como, a relacionar la respuesta inmune de tipo IgG e IgE entre niños expuestos e infectados con *A. lumbricoides*, utilizando la prueba de ELISA y anticuerpos totales empleando la técnica de Inmunoprecipitación¹⁰⁻¹².

En el Perú, la ascariosis intestinal determinada mediante técnicas coproparasitológicas se presenta con frecuencias de infección entre el 3,3% y 44,8%, dependiendo de las condiciones biogeográficas, de la contaminación fecal del suelo y de los factores socio-económicos y culturales de la población^{13,14}; sin embargo, la ascariosis pulmonar, que precede a la intestinal, no ha sido investigada principalmente por no contar con una técnica apropiada de diagnóstico.

Considerando que no existen investigaciones relacionadas con la producción de anticuerpos en animales de laboratorio contra antígenos de excreción/secreción y somáticos de larvas pulmonares de *A. suum*, las cuales puedan servir como modelo para evaluar técnicas que permitan el diagnóstico de la ascariosis pulmonar en humanos a través de la detección de anticuerpos o antígenos en líquidos biológicos, se propuso el presente trabajo de investigación, el cual estuvo orientado a determinar, mediante la técnica de Western Blot los antígenos de las larvas pulmonares de *A. suum* que son detectados por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus* (conejo) inmunizado experimentalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de huevos infectivos *A. suum* con larvas de segundo estado (L2). Del intestino de dos cerdos beneficiados en el Camal Municipal de El Porvenir (Trujillo, Perú) se recolectaron 20 hembras maduras de *A. suum* que fueron mantenidas en SSF 0,85%. Se realizó la disección y extracción de los úteros grávidos y con la ayuda de estereomicroscopio y de estiletes se rompió las paredes del útero para liberar los huevos, los cuales fueron lavados varias veces con SSF estéril por sedimentación y decantación. Los huevos libres de tejido uterino fueron incubados en placas de Petri con SSF 0,85% a 27° C por 28 días, solución que fue removida diariamente hasta obtener los huevos infectivos con L2.

Obtención de larvas pulmonares. Las larvas pulmonares se obtuvieron en 120 ejemplares de *Mus musculos* cepa BALB/c inoculando experimentalmente por vía oral 3.200 huevos infectivos de *A. suum* en 0,12 ml de SSF. Previamente se realizó un análisis coproparasitológico a cada animal, mediante una técnica directa, para descartar la presencia de parásitos intestinales que pudieran hacer ciclo pulmonar.

A los siete días de la administración oral de los huevos infectivos, los ratones fueron sacrificados y disecados para obtener los pulmones, los cuales fueron disgregados y homogenizados con la ayuda de un mortero para dejar en libertad las larvas, que fueron concentradas mediante la Técnica de Baerman modificada en copa. Las larvas separadas, fueron colocadas en tubos de ensayo con tapa rosca que contenía buffer fosfato pH 7,2 estéril con penicilina G sódica de 1.000 000 UI (1 ml/100 ml) y Gentamicina de 80 mg (2 ml/100 ml), donde fueron lavados cinco veces por centrifugación a 3.000 rpm por 10 minutos y decantación.

Obtención y preparación de los antígenos de las larvas pulmonares

a) Obtención de los antígenos de excreción/secreción

Las larvas fueron lavadas dos veces en medio Minimum Essential Medium (MEM Eagles-Sigma) conteniendo 0,5 ml/100 ml de penicilina G sódica de 1.000.000 UI y 0,5 ml/100 ml de Gentamicina de 80 mg, previa incubación a 37°C por 30 minutos. Finalmente, las larvas se

incubaron en condiciones estériles en el medio antes mencionado a 37°C, siendo recolectado el medio con los antígenos de excreción/secreción a las 24 y 46 horas de incubación de las larvas para ser guardados a -20° C en tubos Eppendorff.

b) Obtención de los antígenos somáticos

Se colocaron aproximadamente 60,000 larvas pulmonares en tres ml de PBS pH 7,2 para ser sonicadas a 60 Hertz con 2 minutos de exposición y 5 minutos de reposo, procedimiento que fue realizado en baño de hielo. Luego, el material sonificado que constituye los antígenos somáticos fue guardado a -20° C hasta el momento de su uso. La concentración de proteínas de ambas soluciones con antígenos se determinó por el método colorimétrico de Bradford¹⁵.

Obtención y purificación de las IgG de *O. cuniculus*. Para la obtención de IgG específicas se utilizaron dos conejos obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS), al primero se le inmunizó con 1 ml (0,112 mg/ml)

de antígeno somático emulsionado con igual cantidad de Adyuvante Completo de Freund en la primera inyección y con Adyuvante Incompleto en los tres restantes. Al segundo conejo se le inmunizó con 1,2 mL (0,085 mg/mL) del antígeno de excreción/secreción y 0,8 ml de Adyuvante Completo de Freund en la primera inmunización y con Adyuvante Incompleto en los tres restantes. En ambos casos se inyectó por vía subcutánea en cada una de las caras externas de las patas anteriores y posteriores, el proceso se repitió tres veces más con intervalos de una semana¹⁶.

A las cinco semanas de la primera inmunización se obtuvo por punción cardíaca de los conejos, sangre que fue centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos para obtener el suero inmune que fue conservado a -20° C hasta el momento de su procesamiento. Las IgG fueron purificadas parcialmente por precipitación salina con sulfato de amonio al 33% y por diálisis en membrana de celulosa (Dialysis tubing «Sigma»¹⁷.

Evaluación de los sueros por la técnica de

Figura 1. Bandas antigénicas de larvas pulmonares de *Ascaris suum* detectadas mediante la técnica de Western Blot por el suero inmune(I) y las IgG purificadas (II) producidas en *Oryctolagus cuniculus*.

- A. Antígeno somático.
- B. PM (KDa)
- C. Antígeno excreción/secreción de 20 horas de incubación.
- D. Antígeno excreción/secreción de 46 horas de incubación
- a. Con dithiothreitol (DTT)
- b. Sin dithiothreitol (DTT)

Western Blot: La ejecución de la técnica y la preparación de los reactivos se realizó siguiendo el Manual de Tsang¹⁸, cuyas particulares características fueron:

- Los Ag E/S y los AgS fueron preparados a la concentración de 0,0125 ug/uL. Una parte de los antígenos fueron tratados con dithiothreitol (DTT), 0,1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 1% de glicerol y 0,025% de azul de bromofenol y la parte restante se preparó sin DTT. Se calentó a 65°C por 15 minutos, dejándose a temperatura ambiente antes de su uso.
- La SDS-PAGE se realizó utilizando la proporción de 1 a 2 ul de antígeno por cada mm de ancho de gel, siendo los corridos realizados en minigeles de 8 x 7 x 0,05 cm a la concentración del 12% de acrilamida del gel separador y al 3% del gel concentrador.
- La transferencia a papel de nitrocelulosa se hizo en una cámara de electroforesis horizontal (Trans Blot Cell, Bio Rad) a 1 A por espacio de dos horas y a 4°C, utilizando un buffer de transferencia constituido por 0,2 ml Tris/HCl pH 8,0; 20% de metanol y agua destilada.

Figura 2. Bandas antigénicas de larvas pulmonares de *Ascaris suum* detectadas mediante Western Blot por IgG producidas en *Oryctolagus cuniculus*.

A. Antígeno somático (AgS) con dithiothreitol

B. PM (KDa)

C. Antígeno excreción/secreción (Ag E/S) de 20 horas de incubación, con dithiothreitol (DTT).

RESULTADOS

Los AgE/S de las larvas pulmonares de *A. suum* obtenidas a las 20 horas de incubación en el medio MEM produjeron bandas más nítidas que los AgS y los AgE/S de 46 horas de incubación, sin embargo, no se encontró diferencias saltantes en los preparados de AgE/S con y sin DTT (Figura 1).

Se encontró, asimismo, que las larvas pulmonares incubadas por 20 horas produjeron 13 bandas antigénicas, cuyos pesos moleculares son: 100, 72.4, 56.2, 42.7, 39.8, 34.6, 31.6, 30.2, 19.5, 16.9, 15.5 y 14.9 KDa; siendo las más reactivas las de 100, 72.4, 16.9, 15.5 y 14.9 KDa. Los AgS produjeron sólo seis bandas, cuyos pesos moleculares son 42.7, 39.8, 34.6, 30.2, 28.6 y 25.2 KDa (Figura. 2).

Cuando se evaluaron los AgE/S de 20 horas de incubación con o sin DTT en función a su concentración, se encontró que a mayor

Figura 3. Bandas antigénicas de larvas pulmonares de *Ascaris suum* detectadas mediante Western Blot por IgG purificada producida en *Oryctolagus cuniculus*.

A. Antígeno excreción/secreción de 20 horas de incubación, sin dithiotreitol

a) 5 ul b) 10 ul c) 15 ul.

B. PM (KDa)

C. Antígeno excreción/secreción de 20 horas de incubación, con dithiotreitol

a) 5 ul b) 10 ul c) 15 ul.

concentración (15 ul) se obtuvo mejores resultados que con otras concentraciones (Figura 3).

DISCUSIÓN

La obtención de huevos larvados de *A. suum* a los 28 días y a 27° C concuerdan con lo encontrado previamente por otros investigadores¹⁹. Si bien en ese tiempo se logró el desarrollo de las larvas de segundo estado (L2) que constituyen el estado infectivo, se tuvo que cultivarlos por una semana más, debido a que experimentalmente se ha mostrado que el huevo de este helmineto no es infectivo inmediatamente después que se forma la segunda larva²⁰.

El uso de *M. musculus* cepa BALB/c de 20 a 30 días de edad como modelo experimental para la obtención de larvas pulmonares dio un buen resultado, con un porcentaje de éxito aproximadamente 100%. También se encontró que a menor edad del ratón el porcentaje de infección fue mayor, lo cual se evidencia por la apariencia macroscópica del pulmón; es decir, mientras que los mayores presentaban los pulmones con puntos rojizos, los de menor edad aparecían totalmente hemorrágicos. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por otros autores²¹, lo cual se debería a que en los ratones de menor edad su sistema inmune está menos desarrollado, siendo por ello más sensibles a la infección.

El hallazgo de mayor número y mejor calidad de bandas de los AgE/S en relación a los AgS corrobora lo afirmado por otros investigadores quienes sostienen que los antígenos de E/S de los estados tisulares de *A. lumbricoides* son potencialmente más antigénicos²² que los AgS que proceden mayormente de la gruesa cutícula del parásito.

En el presente estudio los antígenos de E/S y somáticos fueron utilizados de dos formas, reducidas con DTT y sin reducción, detectándose bandas antigénicas más nítidas cuando se utilizó AgE/S de 20 horas bajo condiciones de reducción, esto significa que los productos de excreción de las larvas pulmonares son mayormente proteínas complejas que necesitan ser reducidas. Asimismo, cuando se usó AgE/S de 46 horas no se detectaron bandas antigénicas, lo cual significa que las larvas pulmonares presentan su metabolismo incrementado en las primeras horas de cultivo y que después esta actividad va decreciendo²⁴.

De las bandas obtenidas cuando se usaron los

AgS reducidos y no reducidos al ser enfrentado con suero purificado, las de 42.7, 39.8, 346 y 30.2 KDa aparecen compartidas con los AgE/S, lo que llevaría a suponer que estos antígenos quedan atrapados en los tejidos de las larvas la cual determina que ellos sean encontrados en los sonificados.

Las bandas antigénicas de AgE/S detectada en el presente trabajo, se encuentra dentro del rango de peso molecular de 14,9 a 100 KDa encontradas por otros investigadores para las larvas pulmonares de *A. suum*⁷; sin embargo, el amplio rango encontrado por ellos en cuanto a los pesos moleculares se debería a que utilizaron otras técnicas (radioiodinización e inmunoprecipitación) para la caracterización de los antígenos y variación en la preparación de éstos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que los AgE/S de las larvas pulmonares de *A. suum* cultivados por 20 horas en medio MEM, inducen la producción de un mayor número de anticuerpos de tipo IgG (13 bandas) en *O. cuniculus* inmunizados experimentalmente, en relación a los antígenos somáticos (cinco bandas). Sin embargo, es necesario efectuar un estudio comparativo entre las larvas pulmonares de *Ascaris* de procedencia humana y porcina, a fin de verificar si se presentan las mismas bandas o no, hecho que permitiría hacer un diagnóstico diferencial, ya que dicho parásito se comporta de modo distinto en el hombre.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar mediante la técnica de Western Blot los antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* que son detectados por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizado experimentalmente.

Las larvas pulmonares (L3 y L4) fueron obtenidas en 120 ejemplares de *Mus musculus* cepa BALB/c ratón infectados experimentalmente por vía oral con huevos infectivos de *A. suum*. Parte de estas larvas fueron cultivadas en el medio Eagle (MEM) para la obtención de antígenos de excreción/secreción y la otra fue sonificada para la obtención de antígenos somáticos, los cuales sirvieron para inmunizar dos ejemplares de *O. cuniculus*, utilizando Adyuvante Completo e Incompleto de Freund. A las 5 semanas de inmunización se obtuvo sangre de los conejos por

punción cardiaca a fin de recuperar el suero, parte del cual fue purificado parcialmente por precipitación salina y diálisis.

Mediante la técnica de electroinmunotransferencia (Western Blot) y usando sueros de los conejos inmunizados se detectaron en los antígenos de excreción/secreción de 20 horas de cultivo reducidos con dithiothreitol, 12 bandas antigénicas de 100, 72.4, 56.2, 42.7, 39.8, 34.6, 31.6, 30.2, 19.5, 16.9, 15.5 y 14.9 KDa, siendo las más reactivas las de 100, 72.4, 16.9, 15.5 y 14.9 KDa. En los antígenos somáticos bajo condiciones de reducción, se detectaron solamente seis bandas de 42.7, 39.8, 34.6, 30.2, 28 y 25.2 KDa de poca reactividad. Estos resultados permiten afirmar que los antígenos de excreción/secreción de *A. suum* de 20 horas de incubación en el medio MEM inducen la producción de un mayor número de anticuerpos de tipo IgG en conejos inmunizados experimentalmente.

REFERENCIAS

- 1.- PÉREZ O M, GONZÁLEZ A M. Relación de Neumonía y parásitos del ciclo pulmonar en niños de 1 a 12 años. Bol Méd Be Postgrado 1994; 10: 192-5.
- 2.- GOLDSMITH R, HEYNEMAN D. Parasitología y Medicina Tropical. Edit. El Manual Moderno, S.A. de C. V. México DF, México. 1995.
- 3.- OCAMPO G G, CUEVAS R S, BOBADILLA J R. La omnipresencia de las helmintiasis. Bol Sal Púb Méx 1992; 34: 357-60.
- 4.- ATÍAS, A. Parasitología Clínica 3ra ed. Publicaciones técnicas Mediterráneo. Santiago de Chile, Chile 1997.
- 5.- HEGGERS J P, MULLER M J, ELWOOD E, HERNDON D N. Ascariasis pneumonitis a potentially fatal complication in smoke inhalation. Burns Mar 1995; 21: 149-51.
- 6.- KENNEDY M W, QURESHI F. Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stage of the nematode *Ascaris*. Immunology 1995; 58: 512-22.
- 7.- KASUGA-AOKI H, TSUJI N, SUSUKI K, et al. Identification of larval-stage of *Ascaris suum* recognized with immune sera from pigs. J Vet Med Sci 2001; 63: 683-5.
- 8.- BHATTACHARYYA T, SANTRA A, MAJUMDER DNG, et al. Possible approach for serodiagnosis of ascariasis by evaluation of immunoglobulin G4 response using *Ascaris lumbricoides* somatic antigens. J Clin Microbiol 2001; 39: 2991-4.
- 9.- HAGEL T, LINCH NR, DI PRISCO M C, et al. Nutritional status and the IgE response against *Ascaris lumbricoides* in children, Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 526-5.
- 10.- DEL GIORGIO M E P, ABRAMS V, DE MACEDO C. et al. Estudio de afinidad de anticuerpos en un grupo de niños mal nutridos parasitados con *Ascaris lumbricoides*. Instituto de Biomedicina. Universidad Central de Venezuela. Ide@usb.ve
- 11.- ME SHARRY C, XIA Y, HOLLAND C V, KENNEDY M W. Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. Infect Immun 1999; 67: 484-9.
- 12.- HASWELL-ELKÍNS M R, LEONARD H, KENNEDY N W, et al. Immuno- epidemiology of *Ascaris lumbricoides*: relationships between antibody specific exposure and infection in a human community. Parasitology 1992; 1: 153-9.
- 13.- MURGA S, CUSTODIO M, SÁNCHEZ E, SÁNCHEZ K. Enteroparasitosis en niños de Sinup, Cascas-La Libertad. En: IIICong Peruano Parasit, Arequipa 1997; p: 17.
- 14.- RODRÍGUEZ H, MARTÍNEZ E. Prevalencia de Helmintos intestinales en escolares de nivel primario de Quillabamba-Cuzco. En: III Cong Peruano Parasit, Arequipa 1997; p: 10.
- 15.- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem 1976; 72: 248-54.
- 16.- MARGNI R. Inmunología e Inmunquímica 4ª ed. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1990.
- 17.- MAYZELS R M, BLAXTER M L. Parasite Antigens Parasite Genes. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 1991.
- 18.- TSANG V C W. Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot Technique (Western Blot) for human T. Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated virus (HTLV-/Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control. Atlanta. Immunology series NI5. Procedural Guide. 1986.
- 19.- ECHENIQUE C G, MAGRO H M. Estudio de *Ascaris lumbricoides* en fase larvaria. Acta Bioquím Clin Ltinoam 1997; 31: 23-7.
- 20.- LAPAGE G. Parasitología Veterinaria Compañía Editorial Continental S.A. México. D.F. México. 1971.
- 21.- MASSARA C L, COSTA H M, SOUZA D W, et al. Viability of *Ascaris lumbricoides* eggs eliminated after anti-helminthic therapy. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86: 233-7.
- 22.- Knox D P, Kennedy M W. Proteinases released by the parasitic larval stages of *Ascaris suum*, and their inhibition by antibody. Mol Biochem Parasitol 1988; 28: 207-16.
- 23.- CHAPELL A L. Physiology of parasites. Edit. Thompson Litho Ltd, Gran Bretaña. 1980.
- 24.- ESPINO A. Mantenimiento *in vitro* de adultos de *Fasciola hepatica*. Obtención de antígenos de excreción-secreción. Rev Sal Anim 1988; 10: 287-293.

Agradecimiento: Al Dr. Armando Gonzáles, profesor de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo en la sonificación de las larvas pulmonares de *Ascaris suum*.