

Parasitol. día v.25 n.1-2 Santiago ene. 2001

***Utilización de la autorradiografía en la detección de
antígenos predominantes de *Trichinella spiralis* en
tres
modelos experimentales***

MARIA ALEJANDRA MORENO CARCIA*, MARIA PATROCINIO RAMOS
DE LEON* y
JESUS MUÑOZ ESCOBEDO**

**WESTERN BLOT AUTORADIOGRAPHY IN THE DETECTION
OF
DOMINANT ANTIGENS OF *Trichinella spiralis* IN THREE
EXPERIMENTAL ANIMALS MODELS**

*In this study, the detection of dominant antigens of *Trichinella spiralis* in three experimental models (rat, mouse and rabbit), was carried out by Western Blot autoradiography (WB). Healthy animals were considered as controls. Experimental animals were infected with infective larvae of *T. spiralis*: Animals were bled before inoculation and at the fourth week post infection. The trichinella soluble antigens (AST) were obtained from muscles of experimentally infected rats. The AST were separated by reducing electrophoresis. Proteins in not stained gels were transferred to nitrocellulose paper sheets (NC), antibodies linked to NC were labeled with *Staphylococcus aureus* protein A SPA y (SPA) and the immune reactive bands were observed by autoradiography. By WB, *T. spiralis* infected animals recognized several antigenic components with a molecular weight ranging from 29 to 97 kDa, with dominant bands at 50, 47 and 45 kDa observed in 100% of studied sera. All controls were negative.*

Key words. *Trichinella spiralis*, Trichinellosis, Western Blot, Antigens.

* Centro de Biología Experimental.

** Instituto de Investigaciones Odontológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. Apartado Postal 12. C-P.: 98600. México.

INTRODUCCION

Trichinella spiralis es un nemátodo capaz de invadir e infectar los músculos de diferentes especies de mamíferos, además de infectar a humanos, por lo que es oportuno contar con un mejor conocimiento de la biología del parásito y con una metodología más apropiada de diagnóstico.

Anatómicamente, la *T. spiralis* está constituida por dos estructuras, el tubo externo formado por la cutícula y el interno por el esófago. Entre estas dos estructuras se encuentra espacio pseudocelómico. El esófago, en su parte posterior que es glandular, se encuentra constituido por esticosomas, los que corresponden a glándulas exócrinas constituidas por 45/55 esticocitos que no son más que células discoideas que tienen 5 tipos de gránulos citoplasmáticos: a 0, a 1 a 2, b y g. Estos secretan material antigénico en las primeras 30 horas post-infección y son capaces de inducir una respuesta inmune.¹⁻³ La afinidad que tienen los anticuerpos, contra los antígenos secretados por cada una de sus estructuras puede tener gran importancia, así como también la existencia de metodologías adecuadas para su detección.

El presente trabajo tuvo la finalidad de comparar en 3 modelos experimentales, la utilidad del Western blot (WB) autorradiografía en la detección de antígenos predominantes de *T. spiralis*.

MATERIAL Y METODOS

Animales experimentales: En el estudio se utilizó una población de 20 conejos hembras de 2,5 Kg de peso y de raza Nueva Zelanda, de los cuales a 10 se les administró aproximadamente 1.500 larvas infectantes de *T. spiralis* (LI) y a 10 se les mantuvo como controles aparentemente sanos. También se usaron 20 ratones Balb/c hembras de 3 meses de edad, de los cuales 10 fueron infectados con 100 LI y 10 fueron usados como controles aparentemente sanos. Así también se usaron 20 ratas Long Evans RNU hembras de 3 meses de edad, (10 se infectaron con 500 LI aproximadamente y 10 fueron mantenidas como controles aparentemente sanos).

Los animales experimentales se sangraron antes de la inoculación con LI (pre-inoculación) y a la cuarta semana post-infección.

Preparación del antígeno soluble de *T. spiralis*: Este antígeno fue obtenido a partir de larvas de músculo de rata Long Evans experimentalmente infectados con *T. spiralis*. El tejido infectado fue sometido a digestión con pepsina (10.000 U) 0,3% HCL 0,2 N e incubado a 37°C por 24 horas.⁴ La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.⁵ El extracto total fue utilizado como AST, determinando su actividad antigénica por precipitación en gel con un suero prototipo positivo y negativo.

Electroforesis de poliacrilamida: Con el AST se realizaron corridas electroforéticas preparativas en minigeles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones reductoras. Se utilizaron geles de 7x7 cm preparados con dodecil sulfato de sodio (SDS) de acuerdo a una metodología ya descrita,⁶ con una

concentración de acrilamida al 11% y la relación acrilamida-bisacrilamida fue de 1:60 en el gel separador. El tiempo de corrida, fue de 2 horas a 100 volts.

Western Blot: El AST, fue separado por PAGE, los geles no teñidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (NC) de acuerdo al método descrito por Towbin et al,⁷ utilizando una cámara de minitrasblot-cell (Bio-Rad), a 15 volts, durante toda la noche a 4 °C. Las proteínas fueron reveladas por 5 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 X100 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 dilución 1: 200, con PTX-ASB toda la noche, en agitación suave. Se lavaron por 5 ocasiones con solución de lavado GB (Tritón X-100 0,5%, trietanolamida 50 mM pH 7,4, NaCL 100 mM, EDTA 1 mM pH 7,4, SDS 1 mM, H₂O), en agitación moderada, durante 10 minutos cada intervalo; posteriormente se agregó PTX-ASB por 15 minutos en agitación. 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 nuevamente con solución de GB, finalmente fueron montadas y secadas. Las bandas inmunorreactivas se observaron por autorradiografía utilizando película Kodak XAR5 en cassettes con pantalla intensificadora, incubándose por 16 horas a -70 °C.

Radiomarcaje: El marcaje de SPA con I₁₂₅ (Yodo radioactivo) se hizo por la técnica de cloramina T,⁸ para la detección de antígenos.

Se determinó que el valor óptimo en cpm para producir una buena señal en la autorradiografía era de 30.000 a 90.000 cpm.

RESULTADOS

Características del AST obtenido de larvas de *T. spiralis* alcanzó una concentración proteica de 2,4 mg/ml, por la técnica de Bradford, probado con un suero testigo positivo mostró una reacción de precipitación por inmunodifusión doble a las 24 horas. Al titularlo, mediante diluciones progresivas del antígeno se encontró reacción inmune hasta la dilución de 1:32, por PAGE, mostró 5 bandas proteicas con pesos moleculares de 69 kDa, 52 kDa, 45 kDa, 42 kDa y 38 kDa, con el predominio de la de 45 kDa.

Electroforesis de poliacrilamida, Western blot y autorradiografía: Se analizaron 60 muestras por esta técnica, 30 sueros problemas y 30 controles.

Los sueros de los animales infectados reconocieron varios componentes antigénicos cuyo rango fue de 29-97 kDa, la reactividad predominante fue a un triplete de 50 kDa, 47 kDa y 45 kDa en el 100% de los sueros estudiados ([Figura 1](#)).

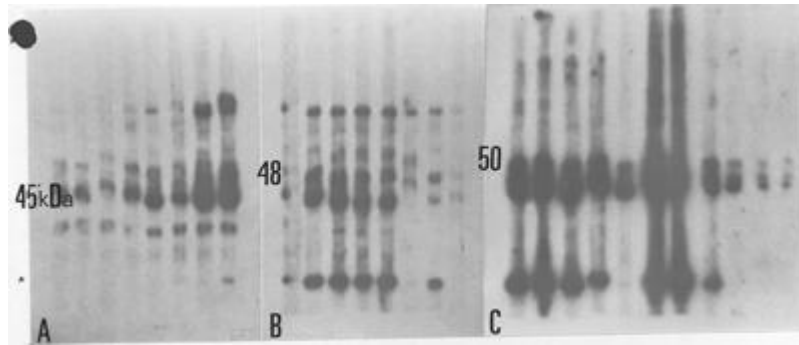


Figura 1. Autorradiografía de los tres modelos experimentales, A. Rata, B.- Ratón y C.- Conejo, en la cual se observa el predominio del triplete de 45, 47 y 50 kDa.

DISCUSION

Las características moleculares demuestran el reconocimiento de varias fracciones antigénicas con rango de 29 kDa a 97 kDa, siendo la más prominente la de 45 kDa que probablemente corresponda a un antígeno inmunodominante del parásito.

Se observó que en los 3 modelos es homogénea la respuesta; se encontró el mismo patrón de bandeos.

En *T. spiralis* el mismo hospedero actúa como huésped intermediario y definitivo, albergando transitoriamente al parásito adulto y a la larva recién nacida, y por largos periodos a la L1. Para que la *T. spiralis* complete su ciclo vital, es preciso que otro huésped ingiera carne que contenga larvas enquistadas. Cada estadio de su ciclo de vida posee características particulares tanto estructurales como bioquímicas e inmunológicas. En los últimos años los estudios se han enfocado a la caracterización de antígenos de la L1 ya que estos probablemente estén involucrados en la inducción de inmunidad protectora. Anatómicamente los elementos involucrados en desencadenar la respuesta inmune son el tubo externo formado por la cutícula y el interno por el esófago. El cual mediante sus esticocitos secreta material antigénico en las primeras 30 horas posinfección y son capaces de inducir una respuesta inmune.¹ Despommier definió que los esticocitos secretan antígenos con un peso molecular de 37 kDa, 48 kDa, y 50/55 kDa. Al utilizar antígenos de los gránulos secretorios como inmunógenos obtuvo altos niveles de protección. El mismo reporta que en la formación de la célula nodriza se secreta un antígeno de 43 kDa.^{1,2}

Un autor, encontró que los antígenos mayores de 60-120 kDa corresponden a cutícula,⁹ así como otro, describe que estos antígenos de cutícula, son secretados en los esticocitos alfa.¹⁰

Por otra parte, se ha demostrado por WB, que la respuesta inmune en humanos es inducida por antígenos de 30-105 kDa, siendo inmunodominantes los de 45 y 42 kDa.^{11, 12} También se ha encontrado en sueros de pacientes con trichinellosis, un triplete de 45, 47 y 50 kDa, en forma predominante y en menor proporción,

bandas de 68, 76 y 97 kDa.¹³

Basados en las observaciones de otros autores y nuestros propios resultados podemos establecer que la inmunogenicidad de estos antígenos es alta y de gran utilidad para el diagnóstico de trichinellosis de varias especies animales.

RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la detección de antígenos predominantes de *Trichinella spiralis* en 3 modelos experimentales (Rata, ratón y conejo), mediante Western blot (WB) autorradiografía.

A los animales experimentales se les administró larvas infectantes del parásito y se sangraron pre-inoculación y a la cuarta semana postinfección. El AST (Antígeno soluble de *Trichinella*) se obtuvo a partir de larvas de músculo de rata experimentalmente infectadas. Con el AST se realizaron corridas electroforéticas en condiciones reductoras, los geles no teñidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (NC), los anticuerpos unidos a papel de NC se marcaron con Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA) y las bandas inmunorreactivas se observaron por autorradiografía.

En WB se encontró que los animales de las tres especies, infectados con *T. spiralis* reconocen varios componentes antigénicos con rango de peso molecular de 29-97 kDa con predominio de un triplete de 50 kDa, 47 kDa y 45 kDa en el 100% de los sueros estudiados.

REFERENCIAS

- 1.- DESPOMMIER D D, FRASER S N, RALPH S. Changes in Nurse all nudel during synchronosis infection with *Trichinella spiralis*. J Parasitol 1991; 77: 290-5.
- 2.- DESPOMMIER D D, MULLER M. The stichosome and its secretion granules in the Mature Muscle Larvae of *Trichinella spiralis*. J Parasitol 1976; 62: 775-85.
[[Medline](#)]
- 3.- TAKAHASHI Y, UNO T, MIZUNO N et al. Morphological study of the stichocyte granules of *Trichinella spiralis* muscle larvae. J Parasitot 1989; 77: 21-9.
- 4.- DEL RIO A, HERRERA R M, HERRERA R. Triquinosis experimental 1. Extracción de antígenos y procedimientos para detectar anticuerpos. Arch Inv Med 1986; 17: 359-67.
- 5.- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
[[Medline](#)]
- 6.- LAEMMII U K, FAVRE M. Maturation of the head of bacteriophage TA 1

DNA packing events. J Mol Biol 1973; 80: 5757.

7.- TOWBIN H T, STAHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76: 4350.

8.- MARIER R, JANSEN M, ANDRIOLE V T. A new method for measuring antibody using radiolabeled protein A in solid-phase radioimmunoassay. J Immunol Meth 1979; 28: 41.

9.- COX G N. Molecular and Biochemical aspects of Nematode collagens. J Parasitol 1992; 78: 1-15.

[[Medline](#)]

10.- WRIGHT K A, HONG H. Characterization of the accessory layer of the cuticle of muscle larvae of *Trichinella spiralis*. J Parasitol 1988; 74: 440-51.

11.- CHAPA-RUIZ R, SALINAS TOBON M R, MARTINEZ R M et al. Diagnosis of human triquinosis by indirect enzyme linked immunoserbent assay. Rev Lat Amer Microbiol 1989; 31: 136-9.

12.- CHAPA-RUIZ R, SALINAS T R, AGUILAR DK J, MARTINEZ M R. Recognition of *Trichinella spiralis* muscle tarvae antigens by sara from human infected with this paraste and its potential use in diagnosis. Rev Lat Amer Microbiol 1992; 34: 95-9.

13.- MUÑOZ M E. Disección molecular de antígenos de *Trichinella spiralis*. Estudio en triquinosis humana. Tesis para obtener el grado de Maestría en Biología Experimental. Zacatecas, Zac. 1993; 1-36.

© **2007 Sociedad Chilena de Parasitología**

Casilla 50470, Santiago 1, Chile.

Fax: (56-2) 5416840



halcaino@abello.dic.uchile.cl, tgorman@abello.dic.uchile.cl