

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ANALISIS DE LOS COMPONENTES ANTIGENICOS DE ESTADIOS INMADUROS DE Fasciola hepatica**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**P R E S E N T A:**  
**MVZ YAZMIN ALCALA CANTO**

**ASESORES:**

**DR. FROYLAN IBARRA VELARDE**  
**DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR**  
**DR. RODRIGO ROSARIO CRUZ**



**MEXICO, D. F.**

**2000**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

**A DIOS :** Porque siempre has estado a mi lado.

**A MIS PADRES Y HERMANOS :** Por todo su apoyo y por ser lo más valioso que tengo.

**A MI LALY :** Porque sigues estando con nosotros, brindándonos todo tu cariño.

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, los Dres. Ibarra, Tato y Rosario, por todo su apoyo y tiempo brindado a la elaboración de este trabajo, por su ejemplo y por inculcarme el espíritu de superación.

Al Dr. Héctor Quiroz y el personal del departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM por su apoyo y amistad.

A los Dres. Ramón Bautista y Zeferino García por sus valiosas aportaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Javier Flores Covarrubias, Secretario de la División de Estudios de Posgrado de la FMVZ-UNAM por su paciencia, trato amable y apoyo. ¡MIL GRACIAS!

Un agradecimiento especial para el Dr. Aldo Alberti Navarro por su amistad, compañía, valiosa colaboración, ayuda desinteresada durante mis estudios de maestría y particularmente por creer en mi.

A la Dra. Cristina Guerrero Molina, por su amistad, sugerencias y valiosos comentarios.

Al Dr. Francisco Trigo Tavera, Jefe de la División de Estudios de Posgrado de la FMVZ-UNAM por todo el apoyo que me brindó durante la elaboración de este trabajo.

A Surya Waghela, Palvi Waghela y Douglas Melendy por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Agradezco especialmente a David Cruz su invaluable amistad, sonrisa, apoyo incondicional y por seguir siendo siempre un excelente amigo.

A Norman Baldwin por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A mis profesores, especialmente al Dr. Alejandro Cruz-Reyes por su amistad, apoyo e invaluable consejos y sugerencias.

A la Dra. Texia Gorman por toda la ayuda que siempre me brindó y por sus finísimas atenciones.

A Norman Davis por su amabilidad, atención y ayuda.

# ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS UTILIZADAS .....	1
RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
I.A. GENERALIDADES .....	3
I.B. CICLO BIOLÓGICO DE <i>F. hepatica</i> .....	4
I.C. PATOLOGÍA .....	5
I.D. DIAGNÓSTICO .....	5
I.E. RESPUESTA INMUNE EN FASCIOLOSIS .....	6
I.E.1. Resistencia .....	6
I.E.2. Inmunidad Adquirida .....	6
I.E.3. Respuesta Inmune contra fases inmaduras .....	7
I.E.4. Respuesta Inmune contra fases adultas .....	8
I.E.5. Eosinofilia .....	9
I.E.6. Respuesta Inmune Humoral .....	10
I.E.7. Respuesta Inmune Celular .....	10
I.E.8. Citotoxicidad Celular Mediada por Anticuerpos (ADCC) .....	12
I.E.9. Evasión de la Respuesta Inmune .....	12
I.F. ANTECEDENTES .....	13
I.G. JUSTIFICACION .....	25
I.H. HIPOTESIS .....	25
I.I. OBJETIVOS .....	26
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
II.A. INFECCIÓN EXPERIMENTAL .....	27
II.B. PRUEBA COPROPARASITOSCÓPICA DE SEDIMENTACIÓN ..	28
II.C. ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI- <i>Fasciola</i> <i>Hepatica</i> .....	28
II.C.1. Elaboración de los antígenos de <i>F. hepatica</i> .....	28
II.C.2. Detección de anticuerpos IgG anti- <i>Fasciola hepatica</i> .....	30

II.C.3. Detección de anticuerpos IgG en sueros de ovinos con otras parasitosis al emplear los antígenos EXS y SOM .....	31
II.D. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) .....	31
II.E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	32
III. RESULTADOS .....	33
III.A. INFECCIÓN EXPERIMENTAL .....	33
III.B. PRUEBA COPROPARASITOSCÓPICA DE SEDIMENTACIÓN ...	33
III.C. ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI- <i>Fasciola</i> <i>Hepatica</i> .....	33
III.D. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) .....	34
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	36
V. CONCLUSIONES .....	46
VI. LITERATURA CITADA .....	47
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Promedio de huevos de <i>F. hepatica</i> /gramo de heces postinfección experimental.....	56
Cuadro 2: Número de ovinos infectados con <i>Fasciola hepatica</i> (n=10) cuyos sueros reconocieron diversos componentes en los antígenos de excreciones-secreciones (EXS) y somático (SOM) del estadio inmaduro de <i>F. hepatica</i> por medio de la prueba de Inmunolectrotransferencia .....	57
Cuadro 3: Componentes de los antígenos de excreciones-secreciones (EXS) y somático (SOM) del estadio inmaduro de <i>Fasciola hepatica</i> que reaccionaron con sueros de ovinos con otras parasitosis al utilizar la prueba de Inmunolectrotransferencia ....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG producidos contra el antígeno de excreciones-secreciones de los estadios inmaduros de <i>Fasciola hepatica</i> (EXS) .....	59
Figura 2: ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG producidos contra el antígeno somático de los estadios inmaduros de <i>Fasciola hepatica</i> (SOM).....	60
Figura 3: Valores medios de absorbancia de sueros positivos a helmintos parásitos al reaccionar contra los antígenos EXS y SOM de <i>Fasciola hepatica</i> .....	61
Figura 4: Componentes de los antígenos de excreciones-secreciones (EXS) y somático (SOM) del estadio inmaduro de <i>Fasciola hepatica</i> reconocidos por los ovinos infectados con <i>F. hepatica</i> y detectados por sueros de ovinos infectados con <i>Paramphistomum</i> spp al utilizar la prueba de Inmunolectrotransferencia .....	62



## RESUMEN

### ALCALÁ CANTO YAZMÍN. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES ANTIGÉNICOS DE ESTADIOS INMADUROS DE *Fasciola hepatica*. (Asesores: Dr. Froylán Ibarra Velarde, Dra. Patricia Tato Zaldívar y Dr. Rodrigo Rosario Cruz).

La fasciolosis es una enfermedad de gran impacto económico y sanitario. El objetivo de este trabajo fue identificar los componentes antigénicos presentes en los extractos protéicos del parásito inmaduro que son reconocidos por el suero de ovinos infectados experimentalmente con metacercarias de *Fasciola hepatica*, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western Blot). Se utilizaron dos preparaciones protéicas de *F. hepatica*, los productos de excreciones-secreciones (EXS) y el antígeno somático (SOM) del estadio inmaduro del trematodo, las cuales se ensayaron contra muestras de suero de ovinos obtenidas siete días antes de la exposición a la infección experimental y durante los días cero (día de la exposición a metacercarias), uno, tres, siete, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 y 84 postinfección utilizando el ELISA indirecto y la Inmunoelectrotransferencia. En el caso del antígeno EXS, se detectaron anticuerpos IgG mediante el ELISA indirecto a partir del día 28 en el 100% de los sueros ensayados. Con respecto al antígeno SOM, los anticuerpos fueron detectados por todos los sueros desde el día 14 postinfección. Adicionalmente, se incluyeron muestras de suero de ovinos infectados con *Ostertagia* spp, *Chabertia ovina*, *Moniezia* spp, *Paramphistomum* spp, *Haemonchus contortus* y *Oesophagostomum* spp. No se presentaron reacciones cruzadas en el ELISA indirecto. Los resultados obtenidos en la Inmunoelectrotransferencia permitieron encontrar seis componentes antigénicos con pesos moleculares aproximados de 17.0, 23.5, 27.7, 33.0, 43.2 y 49.5 kDa y tres proteínas inespecíficas con pesos aproximados de 12.6, 29.3 y 56.2 kDa en el EXS. Tres componentes antigénicos con pesos moleculares aproximados de 17.5, 20.5 y 23.1 kDa y una proteína inespecífica de 29.3 kDa fueron reconocidos cuando se utilizó la preparación protéica SOM. Dos componentes antigénicos (20.4 y 50.0 kDa) del extracto EXS fueron detectados por los sueros ovinos con paramfistomosis. Se encontró un componente antigénico inmunodominante (27.7 kDa) en los extractos de excreciones-secreciones. Este componente no mostró reacciones cruzadas con los sueros de ovinos infectados con otros parásitos. Se sugiere el ensayo de métodos de purificación de este antígeno inmunodominante debido a que puede ser empleado para el inmunodiagnóstico específico de fasciolosis.

Palabras clave : *Fasciola hepatica*, antígenos, inmaduros, Western Blot, ELISA, fasciolosis, excreciones-secreciones, somático, Inmunoelectrotransferencia.

## SUMMARY

### ALCALÁ CANTO YAZMÍN. ANALYSIS OF THE ANTIGENIC COMPONENTS OF *Fasciola hepatica* IMMATURE STAGES. (Advisors: Dr. Froylán Ibarra Velarde, Dr. Patricia M. Tato Zaldivar y Dr. Rodrigo Rosario Cruz).

Fasciolosis is a disease that causes significant economic and sanitary losses. The aim of this study was to identify the antigenic components of crude excretory-secretory (EXS) and somatic (SOM) antigens of the immature parasite that react with serum samples of sheep experimentally infected with metacercariae of *Fasciola hepatica* using the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (Western Blot) technique. Two protein preparations of *F. hepatica* were used, the excretory-secretory and somatic antigens of the immature stage of the trematode. These preparations were tested against sheep serum samples collected seven days before the experimental infection as well as those obtained on day zero (exposure to metacercariae), one, three, seven, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, and 84 postinfection using the indirect ELISA and the Western Blot techniques. IgG anti-EXS antibodies were detected by the indirect ELISA from day 28 on in 100% of the tested sera. When the SOM antigen was used, the antibodies were detected by all of the serum samples starting from day 14 postinfection. Furthermore, serum samples of sheep infected with *Ostertagia* spp., *Chabertia ovina*, *Moniezia* spp., *Paramphistomum* spp., *Haemonchus contortus*, and *Oesophagostomum* spp were included. No cross-reactions were observed in the indirect ELISA. The antigens were subjected to Western blot analysis. Using EXS antigens, sera from infected sheep reacted specifically with six polypeptides of estimated molecular weights of 17.0, 23.5, 27.7, 33.0, 43.2, and 49.5 kDa and three inespecific proteins weighing approximately 12.6, 29.3 and 56.2 kDa were also detected. Three antigenic components of approximately 17.5, 20.5 and 23.1 kDa and one inespecific protein of 29.3 kDa were detected when the SOM antigens were used. Two polypeptides (20.4 y 50.0 kDa) of the EXS antigens were detected by the serum samples of sheep infected with *Paramphistomum* spp. An immunodominant antigenic component (27.7 kDa) was found in the excretory-secretory antigens. This component did not cross-react with the sera from sheep infected with other parasites. This antigen would appear to be the most suitable candidate for use in the specific immunodiagnosis of fasciolosis; therefore the assay of methods for its purification is suggested.

**Keywords :** *Fasciola hepatica*, antigens, immature, Western Blot, ELISA, fasciolosis, excretory-secretory, somatic, enzyme-linked immunoelectrotransfer blot.

## **ABREVIATURAS UTILIZADAS**

**EXS** : Antígeno de excreciones-secreciones del estadio inmaduro (10 días de edad) de *Fasciola hepatica*

**SOM** : Antígeno somático del estadio inmaduro (10 días de edad) de *Fasciola hepatica*

**ELISA** : Ensayo Inmunológico Ligado a Enzimas

**IET** : Inmunoelectrotransferencia

**spi** : semanas postinfección

**kDa** : kilodaltones

# I. INTRODUCCIÓN

## I.A. GENERALIDADES

Los trematodos pertenecen al phylum Platyhelminthes, y se clasifican en los siguientes grupos: aspidogástridos, monogéneos y digéneos. Los dos primeros son básicamente ectoparásitos que presentan ciclos de vida directos y formas larvarias que asemejan adultos jóvenes. Estos trematodos no tienen un impacto económico importante, en contraste con los digéneos; los cuales presentan ciclos de vida indirectos y complejos que involucran un número diverso de tipos larvarios. Los digéneos son parásitos internos del humano, animales domésticos y silvestres; y han atraído considerablemente la atención de los helmintólogos<sup>1</sup>.

La fasciolosis es una enfermedad causada por *Fasciola hepatica*, un trematodo digéneo que en su fase inmadura migra a través del parénquima hepático y en su estadio adulto se localiza en los conductos biliares. A la fasciolosis también se le conoce comúnmente como: "Mal de botella", "Distomatosis hepática", "Palomilla o conchuela del hígado podrido" o "Caracolillo". Dentro del género *Fasciola* se encuentran dos especies: *F. hepatica* y *F. gigantica*. La primera tiene una distribución mundial y la segunda se presenta en África, varios países de Asia y en Hawaii<sup>2</sup>.

*Fasciola hepatica* es un parásito que produce anemia, pérdida severa de peso, bajos rendimientos y disminución en la producción de leche y carne, fallas reproductivas, infecciones bacterianas secundarias y pérdidas económicas por el decomiso de los hígados así como por los costos de los programas de control quimioterapéutico<sup>3</sup>. Alrededor de 250 millones de ovinos y 350 millones de bovinos se encuentran potencialmente afectados en el mundo<sup>4</sup>.

Los bovinos y ovinos son las especies más afectadas por esta enfermedad, sin embargo, existen otros huéspedes (incluyendo al humano) que pueden adquirir la parasitosis al exponerse a la fase infectante de este trematodo. La complejidad de esta enfermedad está determinado por las interacciones de varios factores, incluyendo la humedad, temperatura, un caracol del género *Fossaria* que actúa como huésped intermediario, el mamífero y el parásito<sup>1</sup>.

## I.B. CICLO BIOLÓGICO DE *F. hepatica*

El ciclo biológico comienza cuando los huevos pasan al duodeno con la bilis y salen del huésped con las heces. Para que el miracidio se desarrolle, es necesario un medio hídrico como charcos, potreros inundables, canales de curso lento, etc. El tiempo de desarrollo y el nacimiento del miracidio dependen en gran parte de la temperatura. A 26° C los miracidios eclosionan en nueve días, pero a 10°C no pueden desarrollarse. Sin embargo, permanecen viables durante un largo periodo y pueden continuar su desarrollo cuando las condiciones vuelven a ser favorables<sup>5</sup>. El miracidio que se forma al final del desarrollo embrionario dentro del huevo es un elemento ciliado. Las lluvias favorecen la eclosión o bien, ésta se presenta cuando las heces han sido depositadas en agua. Para el desarrollo posterior es necesaria la presencia de un huésped intermediario dentro de las 24 horas siguientes, que es un molusco gastrópodo de agua dulce. Los principales géneros transmisores en México son *Fossaria* y *Pseudosuccinea*<sup>4</sup>.

En el momento en que el miracidio entra en contacto con el caracol, empieza a girar sobre su eje mayor, y penetra a éste por medio de la acción histolítica de una secreción del miracidio. Éste se desprende de los cilios que lo cubren durante el proceso de penetración, y una vez dentro del caracol se transforma en esporoquiste, el cual crece en el sistema digestivo del caracol y da origen a un número muy grande de redias, las cuales se trasladan hasta el hepatopáncreas y producen una generación de redias hijas, las cuales llegarán por último a la fase de cercarias. De un solo miracidio se pueden producir hasta 600 cercarias, que son expulsadas del caracol y una vez que se encuentran en el exterior, requieren de un medio acuático, ya que son organismos nadadores. Si las condiciones de temperatura son óptimas, el tiempo que tarda el miracidio desde que penetra hasta que sale del caracol en forma de cercaria es de cinco semanas. La cercaria nada hasta cualquier superficie firme, que por lo general es una planta y se adhiere a ella. Inmediatamente forma un quiste, pierde la cola y se transforma en metacercaria. Para que la metacercaria pueda infectar a un huésped definitivo debe de transcurrir un periodo mínimo de dos a tres días después de haberse enquistado. El mamífero adquiere la infección por la ingestión de la metacercaria que se encuentra enquistada en la pastura<sup>6</sup>.

---

<sup>4</sup> Comunicación personal de Alejandro Cruz-Reyes (marzo 1999)

La fase infectante se desenquista en el intestino delgado y emigra activamente a través de la pared intestinal hasta la cavidad peritoneal y de ahí se translada al hígado. Migra por el tejido hepático por un periodo aproximado de seis semanas, después del cual entra a los conductos biliares, dentro de los cuales alcanza su estadio de adulto<sup>7</sup>.

### **I. C. PATOLOGÍA**

La patogenicidad depende del número de metacercarias ingeridas y su infectividad. La infección se puede presentar en forma crónica y aguda. La forma crónica pocas veces llega a tener consecuencias fatales y se debe a la presencia de los parásitos adultos en los conductos biliares; el hígado presenta fibrosis y colangitis hiperplástica. En los bovinos se presenta calcifilaxis, es decir, calcificación de los conductos biliares. La forma aguda, que es casi exclusiva de los borregos, es causada por el tránsito sin rumbo de las fasciolas inmaduras por el hígado. La lesión característica es una hepatitis traumática<sup>6</sup>. Los signos clínicos que se presentan en la forma aguda son casi inaparentes. En animales muy afectados se puede observar depresión, anorexia, aislamiento, fatiga y ascitis. En la forma crónica se manifiesta la anemia, edema submandibular y en casos extremos la enfermedad degenera produciendo mortalidad<sup>8</sup>.

### **I. D. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico tradicional de *Fasciola hepatica* se realiza a través del examen coproparasitológico<sup>9</sup>. La inspección microscópica del sedimento de materia fecal permite observar los huevos de *F. hepatica*. Sin embargo, en la fase aguda y prepatente de la enfermedad, la infección no puede confirmarse debido a que la presencia de huevos del trematodo en el huésped definitivo es inconstante<sup>10</sup>. La baja sensibilidad de este método requiere de numerosos análisis seriados. En bovinos el diagnóstico coproparasitológico de fasciolosis solamente puede realizarse después de las 8-10 semanas postinfección<sup>11</sup>.

La necesidad de implementar un método alternativo de diagnóstico más sensible ha fomentado el desarrollo de técnicas inmunológicas, particularmente las que permiten detectar antígenos de excreciones-secreciones, debido a que tienen un alto potencial para el inmunodiagnóstico<sup>7,12</sup>.

Los métodos que emplean antígenos de excreciones-secreciones permiten diagnosticar la presencia de éstos durante el periodo prepatente. Dichos antígenos pueden ser detectados por medio de técnicas como el ELISA de captura o de doble anticuerpo<sup>13</sup>.

Sin embargo, la complejidad antigénica de *F. hepatica* determina la existencia de algunos problemas relacionados con reacciones inespecíficas o de reacciones cruzadas demandando la necesidad de proceder a la selección de los componentes antigénicos más adecuados y su posterior purificación<sup>14</sup>. Es importante señalar que *Fasciola hepatica* comparte antígenos con otros parásitos como *Dicrocoelium dendriticum*, *Taenia saginata*, *Paragonimus westermani*, *Chlonorchis sinensis*, *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *Trichinella spiralis* y *Ascaris lumbricoides*<sup>15</sup>.

## I.E. RESPUESTA INMUNE EN FASCIOSIS

### I.E.1. Resistencia

Se considera alta en cerdos, moderada en bovinos, equinos, ratas y humanos. Y se considera baja en ovinos y ratones<sup>8</sup>.

Esto puede estar relacionado con el fenómeno de calcifilaxis que se presenta en el caso de los bovinos, y que no ocurre en los ovinos<sup>16</sup>. Sandeman y Howell (1981) mencionan que existe una variación importante con respecto a la respuesta inmune hacia fasciolosis de acuerdo con la especie afectada<sup>17</sup>.

### I.E.2. Inmunidad Adquirida<sup>8</sup>

Modelo bovino:

ETAPA	s.p.i.*	ANTICUERPOS	ENZIMAS	OBSERVACIONES
1	2-3	Aparece IgM y en menor grado IgG	Aumento de SDH*	Invasión hepática
2	3-5	Aumento IgG	Aumenta GLDH*	

\* s.p.i.: semanas postinfección

\* SDH: sorbitol deshidrogenasa

\* GLDH: Glutamato dehidrogenasa

ETAPA	s.p.i.*	ANTICUERPOS	ENZIMAS	OBSERVACIONES
3	5-6	Disminuye IgG	Disminuye AST <sup>†</sup>	Reducción del crecimiento de los parásitos en el hígado. Menor producción de Ag excreciones-secreciones
4	7-8	Aumento IgG1	Aumenta GLDH <sup>†</sup> y de GGT <sup>‡</sup>	Parásitos en conductos biliares. Antígenos de excreciones-secreciones vertidos al torrente sanguíneo
5	8-12	Aumento IgG1. Aparece IgA	Disminuye GGT	Signos clínicos. Aparecen linfocitos, macrófagos, eosinófilos, céls. cebadas y céls. plasmáticas. Autocuración y Calcifilaxis.

\* s.p.i.: semanas postinfección

† GLDH: Glutamato dehidrogenasa

‡ AST: Aspartato aminotransferasa

§ GGT: Gamma-glutamil transpeptidasa

La autocuración consiste en que los parásitos son expulsados (hasta el 85%) o se mueven a nuevos lugares en el tracto biliar debido a que el sistema inmune del bovino actúa de nuevo contra *Fasciola*<sup>8</sup>.

### I.E.3. Respuesta Inmune contra fases inmaduras

En 1974, Lang demostró que la duración de la migración hepática realizada por las formas juveniles era responsable de la inmunidad adquirida, ya que se pensaba que era la edad del helminto el factor que determinaba la adquisición de protección contra la enfermedad<sup>18</sup>.

En un estudio realizado por Van Milligen y sus colaboradores (1998) se demostró que después de la infección oral con metacercarias, las formas juveniles recién desenquistadas (NEJ) se encuentran a todo lo largo del intestino.



La protección contra *F. hepatica* se expresa en el intestino delgado por completo, y existe una protección mínima en el colon. Es importante señalar que la protección no se induce por la penetración del intestino, sino por la migración de los parásitos a través de la cavidad peritoneal, del hígado o de ambos.

Por lo tanto, para desarrollar una vacuna contra este parásito, deben usarse antígenos de formas inmaduras tempranas (reconocidas por el sistema inmune a las dos semanas postinfección) y el antígeno no debe ser presentado a la mucosa del intestino (como en la vacunación oral) sino que debe ser inyectado dentro de la cavidad peritoneal<sup>19</sup>.

En ratas sensibilizadas, las formas inmaduras recién desenquistadas son cubiertas por anticuerpos en el lumen intestinal. Los anticuerpos son principalmente de la clase IgG e IgM, siendo IgA e IgE menos frecuentes. Está claro que los trematodos son cubiertos por anticuerpos tan pronto como emergen de su quiste metacercarial. Se involucran todo tipo de anticuerpos, aunque IgA e IgE aparecen de manera menos regular<sup>20</sup>. Al someter los parásitos inmaduros al suero de ratas infectadas y con alta resistencia, se observó que éste es destruido en cuestión de horas<sup>21</sup>.

Durante la fase aguda de la infección en ovinos se observan túneles migratorios en el parénquima hepático, provocando lesiones que contienen neutrófilos, eosinófilos, linfocitos (células T CD4<sup>+</sup> en las lesiones subcapsulares), macrófagos y hepatocitos. Los canales portales se ven engrosados y hay infiltración de leucocitos<sup>22</sup>.

#### **I.E.4. Respuesta Inmune contra fases adultas**

En hígado de ovinos puede observarse una proporción mayor de CD8<sup>+</sup> que de CD4<sup>+</sup>. Las células B se localizan en los folículos y se observan muchas células gamma-delta-TCR<sup>+</sup> en las estrias fibróticas<sup>22</sup>. En bovinos, se observan eosinófilos, macrófagos, linfocitos, células cebadas, células plasmáticas y anticuerpos IgG1 e IgA en mucosa de conductos biliares. Van Milligen (1998) demostró que los eosinófilos, células cebadas de la mucosa, IgE y la peroxidasa endógena aumentan en el yeyuno de ratas Wistar inmunes de cuatro semanas después de la infección con respecto a ratas susceptibles<sup>19</sup>.

### I.E.5. Eosinofilia

Milbourne y Howell (1997) demostraron que la eosinofilia se presenta tanto en ratas como en ratones atímicos después de la infección con *Fasciola hepatica* (metacercarias) o inoculación con antígenos de excreciones-secreciones. La eosinofilia que se observó fue menos pronunciada que aquella que ocurre en ratas y ratones normales, lo cual indica que existen factores dependientes e independientes de células T que pueden contribuir a esta respuesta.

La inyección de metacercarias no resulta en eosinofilia bajo condiciones normales. Sin embargo, la inyección de antígenos de excreciones-secreciones en ratones y ratas normales provocó un número elevado de eosinófilos. Por lo tanto, estos investigadores concluyen que la infección por *F. hepatica* o la inoculación de antígenos de excreciones-secreciones estimula eosinofilia independiente de células T. Sin embargo, se desconoce la fuente de la estimulación. El parásito podría estar produciendo un antígeno que actúa sobre la médula ósea provocando la diferenciación eosinofílica. Para probar esto, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-interleucina 5 (IL-5) en cultivo de células precursoras de eosinófilos y se observó que la acción estimuladora de los antígenos de excreciones-secreciones sobre la maduración de los eosinófilos fue parcialmente bloqueada. Por lo tanto, se sugiere que los antígenos de excreciones-secreciones podrían actuar directamente. Las hipótesis derivadas de este estudio son dos<sup>23</sup>:

1. *F. hepatica* produce una molécula que estimula la eosinofilia independiente de células T, y
2. Los antígenos de excreciones-secreciones podrían interactuar con células productoras de IL-5 en médula ósea, lo cual produce eosinofilia indirectamente.

Por otro lado, Chauvin (1995) reportó anteriormente que la eosinofilia está correlacionada con la fase migratoria de formas inmaduras y posteriormente hay otro pico que corresponde al momento en que las formas adultas llegan a los conductos biliares. Esta respuesta bifásica puede deberse a la reducción del número de eosinófilos circulantes debida a la migración de los eosinófilos de la sangre al hígado (eosinófilos numerosos en lesiones hepáticas)<sup>24</sup>.

Lo anterior podría explicar parcialmente la falta de resistencia de ovinos contra *F. hepatica*.

En estos animales, la activación de linfocitos es similar a la observada en ratas o bovinos, en donde una respuesta específica contra un antígeno se observa entre la segunda y la cuarta semana postinfección<sup>24</sup>.

Posteriormente, Cervi (1996) demostró la actividad inmunosupresora de los antígenos de excreciones-secreciones sobre la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH)<sup>27</sup>.

En 1997, la misma autora reportó que el efecto supresor inducido por estos antígenos fue parcialmente abolido al añadir catalasa o superóxido dismutasa (SOD) a un cultivo de linfocitos con mitógeno. Esto probó la presencia de peróxido de hidrógeno y oxígeno en el fenómeno de supresión. Este sistema supresivo es independiente de prostaglandinas y del óxido nítrico ya que la adición de sus inhibidores no restituyó la respuesta proliferativa<sup>28</sup>.

Estos estudios acerca de inmunosupresión utilizando antígenos de excreciones-secreciones o antígeno completo (somático) del parásito permiten establecer conclusiones. La inmunosupresión es una característica común de infecciones crónicas. En el pasado, el término era aplicado para describir la reducción en la respuesta inmune asociada con la aparición de células "supresoras" CD8. Sin embargo, con los rápidos avances en el campo de la biología de las citocinas, los procesos inmunoregulatorios se describen con respecto a la acción de moléculas de citocinas. En modelos murinos, se postuló la estimulación de la respuesta Th2 en animales con fasciolosis<sup>28</sup>.

Clery (1996) demostró en un estudio realizado con bovinos adultos infectados crónicamente con *F. hepatica* la falta de secreción de interferón gamma por los linfocitos tratados con mitógeno. Esto demostró la falta de respuesta Th1. El tipo de respuesta presente (Th2) lleva a la cronicidad<sup>29</sup>.

### **I.E.8. Citotoxicidad Celular Mediada por Anticuerpos (ADCC)**

Es posible que los eosinófilos participen en la defensa contra *F. hepatica* en ovinos, ya que en la fasciolosis en ratas se observan altos niveles de eosinófilos involucrados en ADCC en asociación con IgE. El alto nivel de IgM anti-excreciones-secreciones podría modular la ADCC en ovinos. Sin embargo, estos autores sugieren que se realicen más estudios. En rumiantes, los eosinófilos y anticuerpos se adhieren a los trematodos, pero no son capaces de matarlos<sup>24</sup>.

### **I.E.9. Evasión de la Respuesta Inmune**

1. Cambios en el glicocálix: Dos días después de la infección, las formas juveniles presentan un arreglo distinto de antígenos al huésped, lo cual les permite tener tiempo suficiente para alcanzar la seguridad del hígado antes de que se produzca la respuesta inmune al nuevo repertorio de antígenos. Se demostró previamente que la infección por formas juveniles recién desenquistadas (NEJ) genera una respuesta distinta de isotipo en el nódulo linfático. Por ejemplo, IgE en el nódulo linfático hepático comparado con IgA en el mesentérico. Esto podría ser otro nivel de evasión de la respuesta inmune<sup>30</sup>.
2. Proteasas: *F. hepatica* secreta cisteinil endopeptidasas, una de las cuales la catepsina tipo- L-proteasa de 27.5 kDa (CL1) es secretada durante todos los estadios de desarrollo. Esta enzima es capaz de hidrolizar las inmunoglobulinas del huésped y puede prevenir la adhesión *in vitro* de eosinófilos a NEJ. La catepsina L2 (CL2) tiene un peso molecular de 29 kDa y se ha purificado de los antígenos de excreciones-secreciones. Esta proteasa difiere de CL1 en su secuencia N-terminal y especificidad por sustratos fluorogénicos sintéticos, pH y sensibilidad a la inhibición. Esta enzima hidroliza el fibrinógeno de tal modo que produce un coágulo de fibrina y puede prevenir el sangrado excesivo en puntos donde se alimenta en los conductos biliares<sup>31</sup>.
3. Extractos fosfosalinos de adultos de *F. hepatica* inhibieron tanto la vía clásica como la alterna del complemento en suero de bovinos y humanos normales de manera dosis dependiente<sup>32</sup>.

4. Los antígenos de excreciones-secreciones inhiben la producción de superóxido en neutrófilos estimulados de ovinos y humanos<sup>33</sup>.
5. Migración más rápida de las formas juveniles en hígado de ovinos durante la segunda infección<sup>22</sup>.

## I.F. ANTECEDENTES

Las especies del género *Fasciola* generan distintos componentes antigénicos durante diferentes estadios de su desarrollo en los huéspedes mamíferos. La identificación y caracterización de estos componentes es de importancia fundamental para preparar antígenos adecuados para el diagnóstico serológico y para su uso en preparaciones vacunales contra fasciolosis. Los organismos biológicamente complejos tales como los helmintos parásitos contienen muchas sustancias que poseen un alto potencial antigénico. Estos antígenos pueden dividirse en dos amplias categorías, somático y metabólico. Los antígenos somáticos son aquellos asociados a los tejidos del organismo, mientras que los metabólicos son los productos de excreciones y secreciones liberados por el organismo hacia su ambiente<sup>34</sup>. Estos antígenos difunden hacia la circulación del huésped cuando los parásitos inmaduros se encuentran migrando en el parénquima hepático y obstruyendo los conductos biliares pequeños<sup>8</sup>.

Arriaga *et al* en 1983 evaluaron pruebas de diagnóstico inmunológico utilizando los antígenos somático y metabólico de *F. hepatica* adultas de bovino y compararon los resultados entre los diferentes métodos empleados<sup>35</sup>.

Con el fin de identificar los antígenos de interés diagnóstico, se han realizado estudios que consisten en fraccionar los componentes de antígenos somáticos y de excreciones-secreciones de distintos estadios de *F. hepatica*, haciéndolos reaccionar con sueros de animales infectados con el parásito, por medio de inmunoprecipitación, marcando los antígenos radioactivamente<sup>36</sup>.

De este modo se pueden separar los antígenos de acuerdo con su tamaño en geles de poliacrilamida y transferirlos a papel de nitrocelulosa. Santiago *et al* en 1986 detectaron un antígeno proteico de 62 kDa a las cinco semanas postinfección y tres antígenos de 38, 40 y 44 kDa predominaron a las nueve semanas postinfección, lo cual hace suponer la presencia de múltiples antígenos con potencial diagnóstico<sup>37</sup>.

En 1988, estos investigadores demostraron que los componentes somáticos con un peso molecular de 30 a 38 kDa son reconocidos por sueros tanto de bovinos como de ovinos y los componentes de 56, 64 y 69 kDa solamente por los sueros de bovinos, concluyendo que las diferencias en los patrones de reconocimiento antigénico podrían estar relacionadas con la resistencia que presentan los bovinos a la infección<sup>38</sup>. Ese mismo año Hillyer y Soler de Galanes identificaron un antígeno de los productos de excreciones-secreciones de *F. hepatica* con un peso molecular de 17 kDa, el cual tiene valor inmunodiagnóstico<sup>39</sup>.

En 1989, Raymond y Hillyer sugieren que la detección de antígenos circulantes en suero de animales con fasciolosis resulta ventajosa sobre la detección de anticuerpos, ya que la antigenemia es indicativa de infección reciente y activa. Estos autores desarrollaron un ELISA para la detección de antígenos circulantes de *F. hepatica* en ratas infectadas experimentalmente, utilizando suero hiperinmune contra antígenos de excreciones-secreciones como anticuerpos de captura, la prueba se comparó con un ELISA para la detección de anticuerpos para determinar la utilidad en el diagnóstico. En este estudio se detectó la infección a la primera semana postinfección y la máxima detección de antígenos circulantes se manifestó a la tercera semana postinfección<sup>40</sup>.

En un estudio realizado por Espino *et al* (1990) se detectaron antígenos circulantes en humanos con fasciolosis, usando un anticuerpo monoclonal contra antígenos circulantes de excreciones-secreciones de *F. hepatica* como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal acoplado a peroxidasa para identificar los antígenos circulantes. Los resultados de este estudio permitieron demostrar que no existió reacción cruzada con antígenos de *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides*, *Schistosoma mansoni*, *Giardia lamblia*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa* y *Mansonella pestans* en sueros de 28 pacientes infectados con *F. hepatica* y de 80 con otras parasitosis<sup>41</sup>. En otros estudios, El-Bahi y Malone (1992) reportan un antígeno de 26 kDa que puede consistir de un componente estable de productos de excreciones-secreciones y/o de antígenos relacionados con el tegumento del helminto<sup>42</sup>.

Ruiz-Navarrete *et al* en 1993 reportaron la presencia de un polipéptido predominante de 25 a 30 kDa en la fase aguda y crónica de la enfermedad en conejos, bovinos y ovinos<sup>43</sup>. Ese mismo año, Silva *et al* observaron grupos de bandas sensibles y específicas presentes en pacientes con fasciolosis<sup>44</sup>.

Los pesos moleculares aproximados fueron de 96-109, 75-84, 49-50, 38-40, 30-33 y 16-26 kDa. En 1994, Gorman *et al* en 1994 demostraron la presencia de proteínas con pesos aproximados de 26-28, 35-36, 54 y 64 kDa en el antígeno somático de adultos de *F. hepatica*, el cual fue reconocido por suero de ovinos infectados. En el extracto somático de formas juveniles se detectaron tres bandas de 16, 20 y 22-23 kDa. En los productos de excreciones-secreciones de estadios adultos fueron reconocidas bandas de 16, 22-23, 26-28, 35-36 y 56-58 kDa<sup>14</sup>. Qureshi *et al* en 1995 demostraron que la banda de 15 kDa detectada en los antígenos de excreciones-secreciones de *Fasciola hepatica* puede ser utilizada para el diagnóstico específico del parásito, ya que permite diferenciar entre infecciones causadas por *Fascioloides magna* y *Fasciola hepatica*<sup>45</sup>. Itagaki *et al* en ese mismo año encontraron antígenos del extracto somático de especímenes de estadios adultos de *Fasciola hepatica* con pesos aproximados de 64-52, 38-28, 17, 15, 13 y 12 kDa que fueron reconocidos por los sueros de bovinos tanto en la etapa temprana como tardía de la enfermedad. Dos antígenos de más de 160 kDa fueron detectados por los sueros únicamente en la fase temprana de la infección (antes de la sexta semana postinfección). De acuerdo con estos autores, los polipéptidos de 64-52 kDa pueden ser antígenos útiles para el serodiagnóstico de la fasciolosis bovina<sup>46</sup>. Chauvin *et al* en 1995 utilizaron antígeno de excreciones-secreciones de adultos de *F. hepatica* y los ensayaron contra sueros de ovinos infectados. Obtuvieron bandas de 12, 15, 20, 24, 27, 28.5, 30, 41, 51, 56, 69 y 156 kDa, y caracterizaron aquellas proteínas que no fueron específicas<sup>24</sup>. Ese mismo año Guobadia y Fagbemi demostraron que el polipéptido de 17 kDa es específico de la infección por *Fasciola gigantica* en ovinos<sup>47</sup>. Rodríguez y Hillyer en 1995 realizaron un estudio con el objeto de determinar el tiempo de aparición de antígenos de excreciones-secreciones en suero de ovinos por medio del ELISA utilizando metacercarias de *Fasciola hepatica* y cercarias de *S. mansoni*. Se concluyó que la infección con *S. mansoni* indujo una respuesta anamnésica a los epitopos comunes compartidos entre los dos géneros de trematodos. Es decir, los niveles de anticuerpos dirigidos contra los productos de excreciones-secreciones de *F. hepatica* en los ovinos infectados primero con *S. mansoni* y desafiados con *F. hepatica* fueron más elevados que aquéllos infectados únicamente con *F. hepatica*.

Además, a pesar de que la exposición única a *S. mansoni* indujo niveles de anticuerpos que produjeron reacción cruzada con los antígenos de *F. hepatica*, el grupo

infectado con *S. mansoni* primero y con *F. hepatica* después, tuvo niveles de anticuerpos anti-*F. hepatica* constantemente en aumento a través de las 10 semanas en que se estudió la infección<sup>48</sup>.

Este resultado se respalda por el hecho de que el grupo que produjo los niveles más elevados de anticuerpos anti-*F. hepatica*, tuvo la mitad de helmintos recuperados que el grupo que recibió una infección utilizando solamente *F. hepatica*<sup>48</sup>.

En 1996, Sampaio-Silva *et al* utilizaron un antígeno de excreciones-secreciones de *F. hepatica* y obtuvieron dos componentes de 25 y 27 kDa que fueron reconocidos por todos los sueros (n=20) de humanos con fasciolosis<sup>49</sup>. En 1997 Hammami *et al* demostraron la presencia de dos antígenos de 57 y 29 kDa con una especificidad de 100% y sensibilidad de 79 y 93% respectivamente en muestras de suero de humanos con fasciolosis<sup>7</sup>. Ese mismo año, Córdova *et al* identificaron dos antígenos de 26 y 25 kDa en el extracto somático de adultos<sup>50</sup>.

Posteriormente, Abdel -Rahman *et al* en 1998 desarrollaron un anticuerpo monoclonal para la detección de un coproantígeno de 26-28 kDa de *F. hepatica* en heces de bovinos infectados<sup>51</sup>. Se han caracterizado parcialmente antígenos presentes en suero de caprinos infectados con *F. hepatica* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de inmunoprecipitados obtenidos por contrainmunolectroforesis. Se encontraron dos polipéptidos prominentes de aproximadamente 70 a 85 kDa en una línea de la precipitina y en la otra línea la banda de 70 kDa estuvo ausente<sup>52</sup>.

Se ha establecido que los antígenos derivados de estadios inmaduros de *F. hepatica* inducen la inmunidad protectora más significativa al desafío en la rata<sup>30</sup>. El estudio de los eventos de reconocimiento inmune temprano contra los estadios juveniles de *F. hepatica* es de crucial importancia también para el entendimiento del rechazo inmune y de procesos de evasión. Sin embargo, debido a su tamaño diminuto y a la complejidad de su ciclo de vida, los estadios inmaduros de los trematodos parásitos son típicamente difíciles de estudiar. La forma inmadura o juvenil recién desenquistada (NEJ) que emerge del quiste de la metacercaria dentro del intestino del huésped no parece presentar cambios morfológicos obvios durante su migración desde el intestino hasta el peritoneo e hígado. Sin embargo, se ha demostrado claramente que existen diferencias en los perfiles proteicos del NEJ y de estadios juveniles del parásito recuperados hasta seis días después de la exposición de ratones a metacercarias del trematodo<sup>30</sup>.



A la fecha, no se conoce cuáles son las señales que inducen los cambios antigénicos en el NEJ. El hecho de que para el día cuatro postinfección tanto los estadios peritoneales como hepáticos han cambiado sus patrones antigénicos sugiere que la penetración hepática no es una señal necesaria para el cambio de antígenos. Después de dos días de infección, el parásito inmaduro puede presentar un arreglo diferente de antígenos a su huésped, lo cual le da suficiente tiempo para llegar a la seguridad del hígado antes de que la respuesta inmune pueda reaccionar al nuevo repertorio antigénico. En un estudio se generaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra los NEJ, y se presentó una reacción altamente específica contra este estadio. En contraste a este resultado, un anticuerpo monoclonal generado contra un antígeno de adultos reaccionó contra todos los estadios<sup>30</sup>.

Sin embargo, este antígeno, mientras estaba presente en los NEJ no fue presentado al sistema inmune por los NEJ durante la infección, ya que no fue detectado con sondas de células secretoras de anticuerpos del nódulo linfático mesentérico poco tiempo después del desafío, o por los monoclonales generados por estos nódulo linfáticos mesentéricos. Por lo tanto es probable que los antígenos compartidos entre el adulto y los estadios NEJ, que podrían ser inmunógenos fuertes debido a su continua presencia durante la infección, no se exponen durante las fases tempranas de la enfermedad<sup>30</sup>.

La inmunomodulación específica de estadio puede ocurrir en ovinos infectados con *Fasciola hepatica*. Se ha reportado la respuesta suprimida del sistema inmune, básicamente la disminución en la proliferación de linfocitos en huéspedes parasitados<sup>28</sup>. Dicha inmunosupresión ocurre a intervalos que corresponden a las fases de crecimiento y migración de *F. hepatica* en el parénquima hepático. Las respuestas proliferativas de los linfocitos de ovinos infectados con *F. hepatica* correspondientes a las fases de maduración (dentro de los conductos biliares) e iniciación de la producción de huevos fueron normales, pero se presentó una subsecuente supresión utilizando fitohemaglutinina. Desde las semanas 12 a 14 postinfección se observaron respuestas de normales a aumentadas. Estos cambios en la respuesta inmune pueden estar representando cambios en los productos del metabolismo del parásito, como sustancias de actividad inmunomoduladora o secreción de productos que pueden actuar como activadores policlonales<sup>28</sup>.

La respuesta inmune en ovinos con fasciolosis ha sido estudiada por varios investigadores. Por ejemplo, Movsesijan *et al* en 1975 reportaron niveles de inmunoglobulinas IgG dirigidos contra antígenos presentes en el tracto digestivo de *F. hepatica* en corderos experimentalmente infectados. Se observaron niveles séricos de IgG1 que aumentaban y disminuían sincrónicamente a la actividad de anticuerpos. La reducción de las concentraciones de IgG1 y los valores de títulos de anticuerpos durante la infección crónica puede ser parcialmente explicada por la disminución de la estimulación antigénica por parte del parásito, y parcialmente por una pérdida de inmunoglobulina en la bilis<sup>53</sup>. Posteriormente, Sandeman y Howell en 1981 indicaron que una vez que los parásitos se han establecido en los conductos biliares pueden ocurrir fluctuaciones en los niveles tanto de enzimas como de anticuerpos. Estas fluctuaciones en la respuesta de anticuerpos sugieren que existe una estimulación antigénica esporádica aunque los trematodos estén situados dentro de los conductos biliares, en donde pueden estar considerados como aislados del sistema inmune<sup>17</sup>.

Podría ser posible que la exposición periódica del huésped a los antígenos del parásito ocurriera a través de lesiones en la pared del conducto biliar causadas por la actividad de alimentación de los helmintos adultos o por la obstrucción física de los conductos<sup>17</sup>. La respuesta de anticuerpos durante la infección primaria siguió un patrón similar a las que se había descrito previamente. Sin embargo, los niveles de anticuerpos medidos durante el desafío permanecieron relativamente bajos hasta la necropsia. La falta de respuesta anamnésica después de una segunda exposición a los antígenos de estadios inmaduros sugiere que la respuesta durante este periodo fue suprimida. Esta aparente supresión podría ser el resultado de muchos factores. Primero, los adultos pueden liberar un agente inmunosupresor. Segundo, los estadios inmaduros de la infección secundaria o los adultos establecidos pueden secretar suficiente antígeno para causar una caída persistente en el nivel de anticuerpos libres. Esto podría llevar a la formación de complejos inmunes que causan la supresión de respuestas de linfocitos T y B. De este modo, la liberación de antígenos de los adultos podría resultar en la supresión de respuestas de anticuerpos contra antígenos de estadios juveniles. La caída de los niveles de anticuerpos en suero durante el desafío fue asociado con la incapacidad del suero post-desafío para impedir la viabilidad de parásitos inmaduros<sup>17</sup>.

En contraste, el suero de una infección primaria con un alto título de anticuerpos tuvo un efecto de deterioro sobre la viabilidad de los trematodos. De acuerdo con Sandeman, el hecho de que el suero de ovinos infectados tenga el potencial para dañar parásitos parece paradójico en el contexto de la incapacidad de esta especie para resistir el desafío<sup>17</sup>. Otros autores obtuvieron resultados similares en sus trabajos<sup>24,54</sup>.

Por consiguiente, el ovino se considera un huésped susceptible a fasciolosis, en el cual no se presenta una respuesta inmune secundaria. Es por ello que se han realizado numerosos trabajos para poder determinar las características de la respuesta inmune en ovinos con fasciolosis y de ese modo conocer cuáles son los mecanismos que no permiten que se monte una respuesta inmune protectora durante una segunda infección. Los antígenos de excreciones-secreciones han sido ampliamente estudiados en este sentido. Para ello se han obtenido estos productos metabólicos mediante el cultivo *in vitro*. Los helmintos mantenidos en un medio libre de proteínas podrían estar utilizando sus reservas endógenas de nutrientes para mantener procesos metabólicos esenciales, y, si ese fuera el caso, se encontrarían en un estado completo de catabolismo. Bajo estas circunstancias, sus productos de excreciones-secreciones podrían diferir de aquéllos que resultan de procesos metabólicos normales *in vitro*<sup>34</sup>.

Sin embargo, la identidad inmunológica que se ha observado en estudios de inmunodifusión entre el antígeno metabólico obtenido *in vitro* y aquél presente en la bilis de un conejo con una fasciolosis patente sugiere que esto no es posible<sup>34</sup>. Esta evidencia de que los antígenos metabólicos producidos *in vitro* comparten propiedades inmunológicas con los productos naturales es de interés debido al posible uso del antígeno producido *in vitro* para poder lograr estudios de inmunodiagnóstico o inmunoprofilaxis. Lehner y Sewell afirman que el uso de antígenos metabólicos para estimular la inmunidad protectora es preferible sobre los antígenos somáticos<sup>34</sup>.

Las investigaciones acerca de la fuente de productos de excreciones-secreciones antigénicos o inmunoregulatorios han identificado las superficies cuticulares y tegumentarias de algunos nematodos y trematodos respectivamente como fuentes importantes de productos de excreciones-secreciones. Otras moléculas de excreciones-secreciones son liberadas a través de órganos especializados<sup>55</sup>.

De acuerdo con Bryant, el cambio activo de antígenos de superficie puede ser una fuente importante de antígenos parasitarios para el sistema inmune en una forma en la cual pueden ser procesados por células presentadoras de antígeno, macrófagos y algunas células B para presentación a células T cooperadoras (CD4). Los productos de excreciones-secreciones de nematodos, trematodos y cestodos contribuyen a la inmunoevasión a través de mecanismos como el cambio de células y ligandos de superficie, alteración de la función de linfocitos, macrófagos y granulocitos y modulación del complemento y otras respuestas inflamatorias del huésped<sup>55</sup>. En algunos sistemas huésped-parásito, los antígenos de excreciones-secreciones pueden inducir respuestas protectoras para el huésped y esta fuente de antígenos protectores ha sido utilizada en la vacunación exitosa contra infecciones helmínticas, particularmente contra nematodos tricúridos y metacestodos de cestodos parásitos<sup>60</sup>.

De los productos de excreciones-secreciones se han purificado antígenos específicos, tales como el f2 que fue evaluado en una prueba de hemaglutinación y los resultados demostraron que el f2-HA fue útil para la predicción del éxito quimioterapéutico en fasciolosis bovina<sup>57</sup>.

Asimismo, El-Bahi *et al* en 1992 detectaron un antígeno a partir de bilis y heces de bovinos infectados con *F. hepatica*. Este antígeno de 26 kDa es un componente estable de los productos tanto de excreciones-secreciones como del tegumento del helminto y los autores sugieren que tiene un potencial uso en el diagnóstico de fasciolosis, ya que ofrece ventajas como accesibilidad de muestreo, discriminación entre infecciones previas y actuales, y posible semi-cuantificación de cargas parasitarias<sup>42</sup>.

Cervi *et al* (1996) demostraron que los productos de excreciones-secreciones de *F. hepatica* adultos están involucrados en la supresión de las respuestas inmunes celulares. En ese estudio se observó que en la inoculación de fracciones de los productos de excreciones-secreciones obtenidos a partir de la elución de proteínas separadas en geles de poliacrilamida, los componentes entre 12 y 23 kDa activamente indujeron supresión de la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada hacia los antígenos del parásito<sup>27</sup>.

Los antígenos de excreciones-secreciones también han sido utilizados en el diagnóstico temprano de fasciolosis, y con ellos se ha podido establecer la presencia de la infección tan pronto como seis días después de la exposición de bovinos a metacercarias mediante una prueba de competencia para seguir la cinética de la infección<sup>58</sup>.

Estudios anteriores demostraron que el estadio inmaduro de *F. hepatica* libera una enzima proteolítica del tipo de papaina o catepsina-B que se une a las inmunoglobulinas del ratón, rata, conejo y ovino *in vitro*. Esta unión es parcial, pero es capaz de hacer menos efectivo el sistema de defensa del huésped<sup>59</sup>. Los estadios invasivos de *F. hepatica* liberan estas proteasas al medio en el cual están mantenidas. En un estudio realizado en 1996 por Berasain *et al*, se investigó la interacción de los productos de excreciones-secreciones de *F. hepatica* con dos cistein-proteasas (CL1 y CL2) purificadas a partir de estos productos. Los antígenos de excreciones-secreciones contenían actividad colagenolítica, mas no elastinolítica. La fibronectina y laminina fueron degradados por productos de excreciones-secreciones y por CL1 y CL2. Estos resultados indicaron que las cistein-proteasas secretadas por el trematodo pueden estar involucradas en el proceso de invasión tisular realizado por el parásito<sup>60</sup>.

Estas dos catepsin-L-proteasas también han sido involucradas en la nutrición del parásito y en su protección del ataque del sistema inmune. Para conocer el potencial inmunoproláctico de estas proteasas se han realizado ensayos vacunales en bovinos. Los resultados demostraron que las catepsinas podrían formar la base de una vacuna molecular que no solamente reduciría la carga parasitaria, sino que también prevendría la transmisión de la fasciolosis<sup>61</sup>.

Se han realizado estudios vacunales en bovinos y ovinos utilizando antígenos purificados (proteína fijadora de ácidos grasos -FABP-, glutatión-S-transferasa, catepsinas, hemoglobina), los cuales han demostrado que se pueden lograr altas reducciones en cargas parasitarias (31-72%) y en producción de huevos (69-98%), lo cual eleva la posibilidad realista de que el control inmunológico de *F. hepatica* es un objetivo comercial que se puede lograr. La combinación de vacunas también ha sido posible<sup>62</sup>.

Estudios recientes han demostrado la resistencia de la raza de ovinos indonesios de cola delgada , "Indonesian Thin Tail (ITT)", a *F. gigantica*, ya que esta raza ha exhibido resistencia innata (o rápidamente adquirida) a la infección y adquiere un nivel más alto de resistencia después del desafío primario<sup>63</sup>.

Estudios iniciales sugieren que esta resistencia puede estar determinada por un gene. Los ovinos raza Merino también adquieren resistencia a *F. gigantica*. En contraste, los animales ITT y Merino no exhiben resistencia a *F. hepatica*. Estos resultados sugieren que existen diferencias fundamentales entre estas dos especies de *Fasciola* en la biología de sus interacciones con el sistema inmune de los ovinos<sup>63</sup>.

Con respecto a la respuesta inmunoprotectora en ovinos, algunos autores han demostrado que existe una disminución en la fecundidad de los helmintos mediante la vacunación de ovinos con cistein-proteasas purificadas, pues al ser administradas a los animales, se presentó una disminución en la cuenta de huevos del parásito en heces<sup>64</sup>.

Piacenza *et al* (1999) reportaron la respuesta inmunoprotectora que se presentó en ovinos vacunados con catepsin L proteasas y con leucin-aminopeptidasas purificadas de *F. hepatica*. En ese trabajo los ovinos fueron significativamente protegidos (78%) contra el desafío con metacercarias al ser vacunados con las catepsin L proteasas junto con leucin-aminopeptidasas, y aquéllos que recibieron las leucin-aminopeptidasas alcanzaron hasta un 89% de protección<sup>65</sup>.

La caracterización y purificación de antígenos parasitarios pueden ser utilizadas en varios estudios. Fagbemi *et al* (1995) produjeron anticuerpos contra un antígeno específico (88 kDa) de *Fasciola gigantica*<sup>66</sup>. Asimismo, Díaz *et al* (1998) caracterizaron parcialmente un epitopo de los productos de excreciones-secreciones de estadios adultos de *Fasciola hepatica* reconocido por el anticuerpo monoclonal ES78<sup>10</sup>. Por otro lado, Krailas *et al* en 1999 identificaron tres anticuerpos circulantes en el suero de bovinos naturalmente infectados con *F. gigantica* y encontraron que dos de ellos reaccionaban específicamente contra moléculas antigénicas del extracto del tegumento. El tercer anticuerpo reaccionó con una molécula de 26-28 kDa presente en los antígenos de excreciones-secreciones de estadios adultos. Los autores consideran que el antígeno de 66 kDa es un candidato para inmunodiagnóstico y vacunas<sup>67</sup>.

Con el objeto de medir los anticuerpos producidos contra *F. hepatica*, se han utilizado, entre otros, los siguientes métodos:

- a. **Radioinmunoensayo y ELISA:** Son técnicas excelentes para medir la respuesta séricas de anticuerpos. Existen muchas variantes de cada uno, por ejemplo, se han tenido excelentes resultados utilizando tanto el DIG-ELISA como método de diagnóstico<sup>68</sup> como el dot-ELISA<sup>69</sup>.

Se han realizado también diversos estudios utilizando productos de excreciones-secreciones de *F. hepatica* como antígeno en el ELISA<sup>70,71</sup>. El método de ELISA también se ha utilizado en humanos para que puedan ser tratados antes del desarrollo de la patología hepática, minimizando así la morbilidad debida a la fasciolosis<sup>72</sup>. Con el objeto de facilitar la operación, reproducibilidad, cuantificación y aplicación en campo del ELISA, se desarrolló el FAST-ELISA (Falcon Assay Screening Test : F.A.S.T.<sup>®</sup>), el cual incorpora la característica de estandarización interna contra un suero de calibración de referencia. Este ensayo se ha utilizado para detectar anticuerpos contra *Schistosoma mansoni*<sup>73</sup>. Hillyer y Soler de Galanes, en 1991 llevaron a cabo los estudios iniciales de diagnóstico de fasciolosis utilizando este método<sup>74</sup>.

**b. Inmunolectrotransferencia (IET):** La técnica de inmunolectrotransferencia descrita por Towbin *et al* en 1979 es uno de los métodos más útiles con que se cuenta para el análisis antigénico. Combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia o ausencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida. En el primer caso, bajo las condiciones empleadas, las proteínas se separan según sus pesos moleculares, lo que permite su identificación. Posteriormente las proteínas separadas son electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) en donde se unen a los grupos reactivos de éstas, quedando inmovilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con sus anticuerpos<sup>75</sup>.

El patrón que se obtiene en el papel es una copia del patrón de separación del gel. Es necesario en esta fase bloquear los sitios reactivos del papel que quedan libres con alguna proteína que no interfiera para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos que se emplean después. En la siguiente etapa, la membrana de NC se hace reaccionar con los anticuerpos problema, los cuales se unirán a sus antígenos correspondientes inmovilizados en el papel. Para poner de manifiesto esta reacción antígeno-anticuerpo se puede agregar un segundo anticuerpo unido a una enzima. Dependiendo del tipo de reactivo inmunológico que se emplee para hacer visible la reacción se puede identificar la clase de respuesta inmunológica del huésped (IgM, IgG, IgA, IgE)<sup>76</sup>.

Si el antígeno se separa electroforéticamente y se adhiere a papel de nitrocelulosa, es posible monitorearlo con este método, ya que los componentes antigénicos son reconocidos por animales expuestos al agente<sup>75</sup>.

En 1993 Silva *et al* utilizaron antígenos de excreciones-secreciones de *Fasciola hepatica* y aplicaron inmunolectrotransferencia, encontrando grupos de bandas sensibles y específicas correspondientes a pesos moleculares aproximados de 96-109; 75-84; 49-50, 38-40, 30-33 y 16-26 kDa<sup>44</sup>. Posteriormente, este grupo de investigación en 1994 llevó a cabo la detección de antígenos de interés diagnóstico en infecciones animales por *F. hepatica* en el cual se caracterizaron o identificaron antígenos somáticos de adultos, juveniles y productos de excreciones-secreciones<sup>14</sup>. En 1997 realizaron inmunodiagnóstico de fasciolosis en caballos y cerdos utilizando este método<sup>78</sup>.



## I.G. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo estudia los antígenos de excreciones-secreciones y somáticos de parásitos inmaduros y su reacción con sueros de animales infectados con el trematodo. El estudio de los antígenos parasitarios es útil para poder optimizar el inmunodiagnóstico. En estudios futuros podrían purificarse antígenos inmunodominantes y específicos del estadio inmaduro de *Fasciola hepatica*, lo cual sería útil para diagnosticar infecciones cuando los parásitos juveniles están migrando a través del hígado antes de que se presenten el daño hepático y las pérdidas económicas asociadas a ello<sup>48</sup>. Las decisiones para la intervención terapéutica o para la implementación de medidas de control podrían basarse en este diagnóstico. Es decir, la detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de *F. hepatica* en la fase aguda de la enfermedad mediante técnicas inmunológicas permitirá aumentar la sensibilidad y especificidad de dichos métodos de diagnóstico al evitar las reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos. De esta manera, podrán realizarse estudios epidemiológicos y programas de control quimioterapéutico eficaces para controlar esta parasitosis en zonas endémicas.

## I.H. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que el perfil proteico de las formas juveniles recién desenquistadas de *Fasciola hepatica* es claramente distinto de aquél que presentan las formas adultas<sup>30</sup>.

El hecho de que tanto los estadios peritoneales como hepáticos cambian sus patrones antigénicos sugiere que el parásito inmaduro puede presentar un arreglo diferente de antígenos a su huésped, lo cual le da suficiente tiempo para llegar a la seguridad de los conductos biliares antes de que la respuesta inmune pueda reaccionar al nuevo repertorio antigénico. Sin embargo, se han reportado estudios que demuestran que los estadios juveniles obtenidos a los 21 días postinfección y los adultos poseen antígenos compartidos<sup>77</sup>. Por lo tanto es probable que existan antígenos compartidos entre el adulto y los estadios inmaduros, los cuales pueden ser inmunógenos dominantes que exhiban una presencia continua durante la infección.

Lo anterior puede ser observado al estudiar la cinética de producción de anticuerpos IgG dirigidos contra antígenos específicos del estadio inmaduro de *Fasciola hepatica*.

### **I.1. OBJETIVOS**

- 1) Determinar la presencia de animales positivos a anticuerpos IgG anti-*Fasciola hepatica* mediante el Ensayo Inmunológico Ligado a Enzimas (ELISA) indirecto utilizando las preparaciones protéicas de los antígenos de excreciones-secreciones y somático del estadio inmaduro de *F. hepatica*.
- 2) Detectar reacciones cruzadas entre los sueros de animales infectados con *Ostertagia* spp, *Chabertia ovina*, *Moniezia* spp, *Paramphistomum* spp, *Haemonchus contortus* y *Oesophagostomum* spp y los de animales infectados experimentalmente con *F. hepatica* mediante el ELISA indirecto.
- 3) Identificar mediante el método de inmunoelectrotransferencia (IET) los componentes antigénicos de los extractos somático y de excreciones-secreciones del estadio inmaduro de *F. hepatica*.
- 4) Determinar por medio de IET los componentes antigénicos, tanto de la preparación protéica del antígeno de excreciones-secreciones como del antígeno somático, que son reconocidos por los sueros de animales infectados experimentalmente con *F. hepatica*
- 5) Determinar por medio de IET la reacción cruzada de los antígenos anteriores con los sueros de ovinos infectados con otros parásitos

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### II.A. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

El trabajo de campo fue realizado en el Municipio de Apaseo el Alto, Guanajuato en una explotación sin antecedentes de fasciolosis. El clima que predomina es templado subhúmedo con lluvias en verano, es decir, de acuerdo con el Código Köpen es un clima C(w<sup>0</sup>)(w). La temperatura media anual oscila entre los 18 y 22°C. El promedio mínimo de temperatura se registra en el mes de enero con 13.5° y el máximo corresponde al mes de mayo con 23.7°C. La precipitación pluvial promedio es de 685 mm<sup>78,79</sup>.

Se utilizaron 15 ovinos raza Pelibuey hembras de cuatro meses de edad con un peso promedio de 25 kg. Las heces de los 15 animales fueron examinadas antes de la infección experimental mediante la técnica de flotación para detectar la presencia de coccidias y huevos de cestodos y nematodos. Asimismo, se llevó a cabo la técnica de sedimentación de materia fecal para excluir a los animales que presentaran huevos de trematodos en heces<sup>80</sup>. Es importante señalar que ninguno de los animales de la explotación los presentó. Por lo tanto, en el estudio solamente se utilizaron animales que no habían estado expuestos a *Fasciola hepatica*. Posteriormente todos los animales fueron sometidos a un tratamiento con fármacos antiprotozoarios (Decoquinato a razón de 50 ppm en alimento) y antihelmínticos (Fenbendazol a razón de 5mg/kg de peso vivo por vía oral y Triclabendazol a razón de 10mg/kg de peso vivo por vía oral).

Una semana después del tratamiento, los animales fueron divididos en tres grupos (n=5). Los ovinos del Grupo A recibieron cada uno *per os* 150 metacercarias de *Fasciola hepatica* (Baldwin Aquatics, Inc. Monmouth, OR, USA) administradas mediante una sonda siliconada<sup>▲</sup>. Los ovinos del Grupo B recibieron cada uno *per os* una cápsula de gelatina que contenía 150 metacercarias de *F. hepatica*<sup>\*</sup>. La viabilidad de las metacercarias fue determinada mediante su examinación microscópica. Los cinco ovinos del grupo C no fueron infectados y fungieron como testigos.

---

▲ Comunicación personal de Laura Cervi (abril 1999)

\* Comunicaciones personales de Norman Davis y Norman Baldwin (abril 1999)

Se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena yugular de los 15 animales en tubos vacutainer sin anticoagulante siete días antes de la infección experimental (día -7), el día de la infección (día 0), 24 horas postinfección (día 1), el día 3, día 7 (1 spi), día 10, día 14 (2 spi) y posteriormente cada siete días hasta el día 84 (12 spi).. Estas muestras fueron identificadas y transportadas en refrigeración al laboratorio en donde fueron procesadas. El suero se separó por centrifugación y se guardó en viales a -20°C.

## **II.B. PRUEBA COPROPARASITOSCÓPICA DE SEDIMENTACIÓN<sup>80</sup>**

Las heces de los 15 animales fueron examinadas para determinar la presencia de huevos de *F. hepatica* desde la 8ª hasta la 12ª semana postinfección (spi) de acuerdo con el método propuesto por Chauvin *et al* (1995)<sup>24</sup>.

## **II.C. ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI- *Fasciola hepatica* .**

La detección de anticuerpos contra *F. hepatica* se realizó por medio de un ELISA indirecto de acuerdo con el método descrito por Hillyer *et al* (1985)<sup>81</sup> y de Santiago *et al* (1986)<sup>82</sup>.

### **II.C.1. Elaboración de los antígenos de *F. hepatica***

Fueron elaboradas las preparaciones protéicas de los antígenos de excreciones-secreciones y somático de *Fasciola hepatica* de diez días de edad. El antígeno de excreciones-secreciones de formas inmaduras fue obtenido de acuerdo con métodos descritos anteriormente<sup>38,47,48,83</sup> con modificaciones específicas\*. Los especímenes inmaduros fueron obtenidos a partir de cinco corderos de ocho semanas de edad infectados experimentalmente cada uno con 150 metacercarias. Los animales fueron sacrificados a los 10 días post-exposición a las metacercarias. El hígado se cortó en pequeños cubos, los cuales se agitaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) a 37°C. El líquido fue cuidadosamente examinado y allí se encontraron los parásitos.

---

\* Comunicaciones personales de Texia Gorman (1999) y David Cruz (2000)

Los trematodos juveniles intactos y vivos fueron lavados cuatro veces con SSAF 0.01 M, pH 7.2, a temperatura ambiente durante una hora para remover trazas de sangre y bilis. Posteriormente se procedió a su incubación (1 helminto/5 ml) en SSAF, pH 7.2 a 37°C durante cinco horas. La solución SSAF fue suplementada con 0.25 mg de leupeptina por mililitro para inhibir proteasas. El sobrenadante fue centrifugado a 4°C a 10,000 g durante una hora para eliminar el material particulado.

El sobrenadante con los productos de excreciones-secreciones fue recolectado y filtrado (0.20µm, 10 kDa Aerodisc). Se determinó su concentración protéica mediante el método descrito por Lowry<sup>84</sup> utilizando albúmina sérica bovina como estándar (SIGMA). La cantidad de proteína fue de 0.59 mg/ml. El antígeno de excreciones-secreciones de estadios inmaduros de *F. hepatica* fue denominado EXS y almacenado a -20°C hasta su uso.

Con respecto al antígeno somático, para su elaboración se obtuvo el extracto crudo de fasciolas juveniles (SOM) de acuerdo con métodos reportados anteriormente<sup>14,60,83</sup>. Para ello se recolectaron parásitos del hígado de cinco corderos de ocho semanas de edad infectados experimentalmente cada uno con 150 metacercarias a los diez días postinfección.

Los especímenes recolectados fueron lavados cuatro veces en 0.05M SSAF (pH 7.2) y homogeneizados (1 helminto/ml de SSAF suplementada con leupeptina) en un omnixer (Sorvall) con 10 ciclos por 0.5 minutos a 4°C. Después se les aplicó ultrasonido tres veces durante 60 segundos en un sonicador (Marius) a una amplitud de cinco. Se obtuvo el extracto al dejar los parásitos macerados durante toda la noche en 100 ml de SSAF suplementada con 100 U/ml de penicilina sódica, 100 U/ml de nistatina y 0.25 mg/ml de estreptomocina a 4°C. La suspensión fue centrifugada a 10,000g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado (0.20µm, 10 kDa Aerodisc). La concentración protéica fue determinada mediante el método de Lowry<sup>84</sup> y ésta fue de 0.7 mg/ml. El antígeno, denominado SOM fue almacenado a -20°C hasta su uso.

### **II.C.2. Detección de anticuerpos IgG anti-*Fasciola hepatica***

Se llevaron a cabo dos ELISA's indirectos, uno utilizando la preparación protéica EXS y otro empleando el antígeno SOM.

La concentración óptima de ambos antígenos determinada mediante titulación fue de 8.5 µg/ml. El antígeno en cada caso, se diluyó en una solución amortiguadora de carbonatos 0.05M, pH 9.6 y 100 µl de cada antígeno fueron acoplados a placas para microtitulación de fondo plano (Immulon, Dynatech Labs. Inc.). Se utilizó una placa para el EXS y una para el SOM. Cada preparación protéica fue incubada durante 1 hora a 37°C y después durante toda la noche a 4°C. Fueron realizados tres lavados de 5 minutos cada uno con 0.3% SSAF-Tween-20. Como primer anticuerpo, se adicionaron a los pozos 100 µl de suero de los ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*, un testigo positivo, un testigo negativo y una muestra testigo o control. Todos los sueros se utilizaron diluidos 1:200 en SSAF con 0.1% Tween-20. Los sueros fueron incubados durante una hora a 37°C.

Después de tres lavados utilizando SSAF-Tween 20, se adicionó el segundo anticuerpo: 100 µl de anti-IgG de ovino conjugado con fosfatasa alcalina (rabbit anti-sheep IgG whole molecule alkaline phosphatase conjugate – SIGMA) a una dilución 1:1000 en 0.3% SSAF-Tween 20. Las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C y lavadas 3 veces. Como cromógeno se utilizó *p*-Nitrofenil Fosfato disódico (pNPP, SIGMA prod. no. N2765), diluyendo una tableta de 10 mg de éste en 2.5 ml de agua y se aforó a 10 ml con amortiguador de dietanolamina al 10%, pH 9.8. Se añadieron 100µl de pNPP y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, para detener la reacción se utilizó 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> @50µl por pozo, y después se determinaron los valores de absorbancia espectrofotométricamente en un lector de ELISA a 490 nm (Dynatech Labs Inc.). Se consideró positiva una muestra individual cuando su valor de absorbancia fue igual o mayor al punto de corte del ELISA. Éste fue calculado como el promedio más dos veces la desviación estándar de la densidad óptica a 490 nm del suero de ovinos libres de *Fasciola hepatica* (antes de la infección experimental).

### II.C.3. Detección de anticuerpos IgG en sueros de ovinos con otras parasitosis al emplear los antígenos EXS y SOM

Con el objeto de verificar si con el ELISA indirecto estandarizado para detección de anticuerpos IgG anti-EXS y anti-SOM de *Fasciola hepatica* se podían detectar anticuerpos en sueros de ovinos con otras parasitosis; adicionalmente se probaron las muestras de suero de animales negativos a *Fasciola hepatica* pero infectados con *Ostertagia* spp, *Chabertia ovina*, *Haemonchus contortus*, *Moniezia* spp, *Paramphistomum* spp y *Oesophagostomum* spp.

### II.D. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

La IET fue realizada de acuerdo con el método descrito por Tsang *et al* (1983)<sup>85</sup> con modificaciones menores<sup>86,87</sup>. Se llevó a cabo la IET para cada antígeno por separado. Las preparaciones protéicas EXS y SOM, así como los marcadores comerciales de peso molecular (Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers Amersham Pharmacia 2.35-46 kDa) se separaron mediante electroforesis de gradiente en geles de poliacrilamida al 12% (Hoefer Electrophoresis Unit and Power Supply) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) y beta mercaptoetanol. Al término de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa (Bio-Rad, 0.45 µm) a una intensidad de 0.1 amperes durante 10.5 horas. Posteriormente se transfirieron a 0.6 amperes durante dos horas. Las hojas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con gelatina y TBST pH 7.6. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron en agitación continua con los sueros (diluidos a 1/100 en TBST/gelatina) obtenidos antes de la infección con *Fasciola hepatica*, después de la infección con *F. hepatica*, testigos, muestras control, sueros de animales infectados con *Ostertagia* spp, *Chabertia ovina*, *Haemonchus contortus*, *Moniezia* spp, *Paramphistomum* spp y *Oesophagostomum* spp. Después de dos lavados con TBST y TBS (cinco minutos por lavado), las tiras de nitrocelulosa fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgG de ovino marcado con fosfatasa alcalina (SIGMA) diluido 1:75000 en agitación continua durante dos horas a temperatura ambiente. Después de dos lavados en TBST y dos lavados en TBS, se agregó el sustrato para el desarrollo del color (bromo-cloro-indolil-fosfato y azul de tetrazolio, SIGMA).

Después de 20 minutos se añadió agua destilada para detener la reacción. Se observaron las bandas, se trazó la curva estándar semilogarítmica para el peso molecular comercial y se interpolaron las movilidades relativas observadas para cada banda en cada gel. De ese modo se obtuvo el peso molecular aproximado.

## **II.E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis<sup>88</sup> para una comparación global entre los dos grupos de animales infectados y el grupo testigo, y los valores de  $P$  que fueron iguales o menores que 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.



### III. RESULTADOS

#### II.A. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Para confirmar el establecimiento de los parásitos sexualmente maduros en los conductos biliares, se realizó la técnica coproparasitoscópica de sedimentación para la observación de huevos de *Fasciola hepatica* en las heces de los tres grupos experimentales como se indica a continuación.

#### II.B. PRUEBA COPROPARASITOSCÓPICA DE SEDIMENTACIÓN

En el Cuadro 1 se puede observar que el diagnóstico coproparasitoscópico de fasciolosis mediante la técnica de sedimentación fue positivo a partir de la 8ª semana postinfección experimental en tres animales del grupo A y en cuatro del grupo B. A las nueve spi todos los animales fueron positivos. Después de la 10ª semana postinfección, los valores medios de excreción de huevos de *F. hepatica* se elevaron hasta 15 veces en comparación con la novena semana. Se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los dos grupos infectados en relación con la cantidad de huevos eliminados; ya que la cantidad eliminada de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces en el grupo infectado con cápsulas fue aproximadamente el superior al doble de la cantidad desde la semana 9 postinfección con respecto al grupo infectado con sonda. En las heces del grupo testigo no se encontraron huevos del parásito.

#### II.C. ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI- *Fasciola hepatica* .

Las muestras de suero de los dos grupos de ovinos infectados con *Fasciola hepatica* y del grupo testigo obtenidas durante el día -7, 0, 1, 7, 10 y las semanas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 postinfección fueron ensayadas en placas de ELISA utilizando por separado la preparación EXS y la del antígeno SOM. Adicionalmente se incluyeron muestras de sueros de ovinos no infectados con *F. hepatica*, pero con infección confirmada con otros helmintos parásitos : *Ostertagia* spp, *Chabertia ovina*, *Haemonchus contortus*, *Moniezia* spp, *Paramphistomum* spp y *Oesophagostomum* spp

En la Figura 1 se observa que los animales del grupo B fueron considerados positivos a fasciolosis a partir del día 14 postinfección (2 spi). Este grupo alcanzó su nivel medio de absorbancia máximo el día 77 (11 spi), el cual fue de 1.128. Los ovinos del grupo A fueron considerados positivos a partir del día 28 (4 spi). Su nivel medio de absorbancia máximo (0.934) fue alcanzado también el día 77 (11 spi).

El punto de corte ( $0.169 + 3 \cdot 0.043$ ) fue igual a 0.299. Se presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos infectados con respecto al grupo testigo.

En relación con el antígeno SOM, puede observarse en la Figura 2 que los animales de los dos grupos infectados fueron considerados positivos a fasciolosis a partir del día 14 (2 spi). Ambos grupos presentaron su nivel medio máximo de absorbancia el día 42 (6 spi), el cual fue de 0.898 en el grupo A y 1.298 en el grupo B.

El punto de corte ( $0.165 + 3 \cdot 0.021$ ) fue igual a 0.228. Se observó diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre estos dos grupos con respecto al testigo. Asimismo, entre los grupos A y B se presentó una correlación positiva como puede verse en la misma figura.

Con respecto a la inclusión de sueros de animales positivos a otras parasitosis, en la Figura 3 se muestran los valores medios de absorbancia, los cuales se mantuvieron por debajo de los puntos de corte tanto del antígeno EXS como del SOM. Se incluyeron testigos positivos y negativos a *Fasciola hepatica*, y se observó que los testigos positivos presentaron valores medios de absorbancia superiores al punto de corte.

#### **III.D. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)**

En el Cuadro 2 y la Figura 4 se puede observar que cuando se utilizó el antígeno EXS los sueros de los 10 ovinos infectados detectaron 6 proteínas específicas con pesos moleculares aproximados de 17.0, 23.5, 27.7, 33.0, 43.2 y 49.5 kDa. La proteína de aproximadamente 43.2 kDa fue detectada por tres de diez sueros el día 14, y por siete de diez sueros desde el día 28 hasta el 84 postinfección. La proteína de 27.7 kDa fue reconocida por dos de diez sueros el día 10 postinfección y el día 14 por siete de diez. El día 28 fue detectada por nueve de diez sueros y a partir del día 49 postinfección fue reconocida por todos los sueros de los animales infectados.

La proteína de un peso aproximado de 17.0 kDa fue detectada por el 50% de los sueros desde el día 14 postinfección, por el 80% a partir del día 56 y por el 90% después del día 77. Las otras tres proteínas tuvieron reconocimientos inferiores al 50% durante el transcurso de la infección experimental.

En el cuadro 2 y figura 4 se observa asimismo que al utilizar el antígeno EXS se detectaron tres proteínas inespecíficas (12.6, 29.3 y 56.2 kDa) desde el día -7. La proteína de 29.3 kDa fue reconocida por los diez sueros de los animales infectados desde antes de la infección experimental hasta el día 84 postinfección (12 spi).

Continuando con ese mismo cuadro y figura cabe señalar que cuando se utilizó el antígeno SOM se detectaron tres proteínas con pesos moleculares aproximados de 17.5, 20.5 y 23.1 kDa. La proteína de 17.5 kDa fue reconocida por siete de los diez sueros de los animales infectados desde el día 42 y posteriormente por los diez sueros desde el día 56 postinfección (8 spi). Las otras dos proteínas fueron detectadas por el 100% de los sueros también a partir del día 56.

Asimismo, se presentó una proteína con un peso molecular aproximado de 29.3 kDa que fue detectada por los sueros de los diez ovinos desde el día -7, es decir, antes de la infección experimental y el reconocimiento fue constante hasta el día 84 (12 spi).

Con respecto a las reacciones cruzadas, en el Cuadro 3 y en la Figura 4 puede observarse que los sueros de los ovinos positivos a *Paramphistomum* spp detectaron dos componentes con pesos moleculares aproximados de 20.4 y 50.0 kDa cuando se utilizó el antígeno EXS. Al utilizar el antígeno SOM no se presentaron reacciones cruzadas.

#### IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se han utilizado numerosos métodos inmunológicos para el diagnóstico de la fasciolosis. Sin embargo, la naturaleza compleja de las preparaciones antigénicas utilizadas en dichos métodos puede conducir a problemas de reacciones cruzadas, lo cual implica que existe la necesidad de obtener componentes antigénicos purificados. Se han realizado estudios que consisten en fraccionar los componentes de antígenos somáticos y de excreciones-secreciones de distintos estadios de *F. hepatica*, haciéndolos reaccionar con sueros de animales infectados con el parásito. Por un lado, Lehner (1980) reporta que en general, para estimular inmunidad protectora los antígenos somáticos de helmintos han fallado; sin embargo, para su uso en el inmunodiagnóstico, el mismo autor afirma que sus estudios no proporcionaron evidencia de que el antígeno metabólico sea preferible al somático para seguir la respuesta serológica de animales infectados por medio de técnicas como la inmunodifusión o el ELISA<sup>34</sup>.

Otros autores, como Santiago y Hillyer (1988) han utilizado ambas preparaciones antigénicas para el diagnóstico de fasciolosis en ovinos y bovinos<sup>38</sup>. Cornelissen *et al* (1992) reportaron que el ELISA con antígenos somáticos es más específico que con antígenos excreciones-secreciones<sup>83</sup>. El-Bahi *et al* (1992) utilizaron extracto somático para demostrar la presencia de un antígeno estable en bilis y heces<sup>42</sup>. Maleewong *et al* en 1996 utilizaron tanto extracto somático como antígenos de excreciones-secreciones de adultos de *F. gigantica* en el serodiagnóstico de fasciolosis gigantea<sup>89</sup>.

Córdova *et al* (1997) utilizaron el antígeno somático en un estudio de antígenos inmunodominantes en fasciolosis humana y demostraron que las cistein-proteasas purificadas a partir de estos antígenos son altamente sensibles y específicas para el serodiagnóstico<sup>50</sup>.

En el presente trabajo se utilizaron las dos preparaciones antigénicas, es decir, el extracto somático (SOM) y los productos de excreciones-secreciones (EXS) del parásito inmaduro. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el incremento en los niveles de absorbancia comenzó a presentarse después de la semana dos postinfección al utilizar la preparación SOM y después de la semana cuatro al utilizar el antígeno EXS. Esto puede deberse a que los antígenos somáticos del parásito se exponen durante más tiempo al sistema inmune.

Santiago y Hillyer en 1988, demostraron que en los ovinos el aumento en los niveles de anticuerpos no son evidentes sino hasta después de la semana cuatro postinfección al utilizar preparaciones antigénicas (tanto del extracto crudo como de los productos de excreciones-secreciones) obtenidas de estadios adultos de *F. hepatica*. Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con lo documentado por estos autores, ya que cuando fue utilizado el antígeno SOM, se detectaron anticuerpos IgG a partir de la segunda semana postinfección<sup>38</sup>.

Estas diferencias pueden deberse a la manera en que se realizan los ELISAs en términos de la preparación del antígeno y su concentración protéica.

En un estudio realizado en 1991, Hillyer y Soler de Galanes obtuvieron títulos importantes de anticuerpos a partir de la semana dos postinfección al utilizar preparaciones antigénicas de excreciones-secreciones mediante un ensayo inmunológico más sensible, el FAST-ELISA<sup>74</sup>.

Santiago y Hillyer en 1988 reportaron que los valores de absorbancia aumentaron hasta cinco veces los valores normales del suero al utilizar antígenos de excreciones-secreciones de adultos alrededor de la octava spi; y demostraron un incremento menos dramático en los valores medios de absorbancia al utilizar el antígeno somático (3.5 veces lo normal). En este estudio los títulos de anticuerpos aumentaron hasta casi seis veces los valores del suero de ovinos no infectados en la octava semana postinfección al utilizar el antígeno EXS y cuando fue utilizado el SOM el aumento fue de aproximadamente de siete veces los valores medios de absorbancia del suero de ovinos no expuestos a metacercarias del parásito<sup>38</sup>.

No se midieron anticuerpos contra la gran cantidad de parásitos con los cuales podrían existir reacciones cruzadas debido a que no se han estandarizado ensayos serológicos para todos ellos. Por consiguiente, no se puede afirmar que todos los anticuerpos eran específicos.

No se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los niveles medios de absorbancia a 490 nm observados al ensayar los sueros de animales testigos contra ambas preparaciones antigénicas. Este resultado coincide con las observaciones documentadas en parásitos adultos por Cornelissen *et al* (1992).

Este autor prefiere el uso del extracto somático de adultos, ya que menciona que es más específico, a pesar de que no observaron diferencias entre los títulos de anticuerpos inducidos por ambas preparaciones antigénicas<sup>63</sup>.

Maleewong *et al* en 1996 compararon ambas preparaciones antigénicas obtenidas a partir de adultos y no encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos en el ELISA para el serodiagnóstico de fasciolosis gigantea en humanos, pues ambos antígenos resultaron ser efectivos<sup>60</sup>.

Zimmerman *et al* en 1982 demostraron que los valores de ELISA indirecto para el diagnóstico de fasciolosis en ovinos no se relacionan con la magnitud de la infección, prácticas de manejo o infecciones cocurrentes por nematodos<sup>60</sup>. Por otro lado, Martínez *et al* en 1996 indicaron que el ELISA indirecto que emplea antígenos de excreciones-secreciones obtenidos a partir de adultos es sensible y específico, además de ser un método de diagnóstico temprano de anticuerpos específicos en fasciolosis caprina<sup>71</sup>.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ELISA indirecto, se sugiere la purificación de los antígenos inmunodominantes de estadios inmaduros del parásito para estandarizar ensayos diagnósticos que permitan la detección temprana de la enfermedad.

Se sugiere también realizar estudios con sueros positivos a otros parásitos para conocer la especificidad del ensayo al utilizar el SOM. Gorman<sup>\*</sup> indica que los antígenos somáticos inducen alta antigenicidad, pero ofrecen menor especificidad. Asimismo, afirma que los antígenos de excreciones-secreciones son más precoces.

Se llevó a cabo el ELISA indirecto en este trabajo para detectar la presencia de anticuerpos contra las preparaciones protéicas empleadas con el fin de probar los sueros ovinos en la inmunoelectrotransferencia después de tener la certeza de que los animales habían producido anticuerpos contra *F. hepatica*. Sin embargo, para optimizar el diagnóstico de la enfermedad se sugiere el empleo de ensayos inmunológicos que detecten antígenos en lugar de aquéllos que detecten anticuerpos, ya que éstos no se consideran indicativos de una infección activa. Además, los resultados de la inmunoelectrotransferencia que a continuación se discutirán, dan consistencia a esta sugerencia debido a que cuando se detectan anticuerpos en vez de antígenos, no es posible diagnosticar la enfermedad en fases tempranas.

---

\* Comunicación personal (marzo 2000)

Por consiguiente, a pesar de que el ELISA indirecto empleado en el presente estudio demostró ser altamente sensible, se sugiere utilizar métodos de detección de antígenos debido a que la medición de antígenos circulantes como parámetro de infección activa puede ser de uso potencial en el manejo de la enfermedad clínica. En el caso de infecciones parasitarias, particularmente aquéllas que involucran parásitos que invaden tejidos, se requieren tratamientos terapéuticos tempranos, ya que una vez que los parásitos se han establecido en los órganos o vísceras blancos, es muy difícil eliminarlos<sup>48</sup>. Se han desarrollado técnicas de diagnóstico directo para demostrar la presencia del parásito, como la detección de antígenos de excreciones-secreciones en heces mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales<sup>42,91,92</sup>. Sin embargo, estas técnicas no detectan la infección durante el periodo de migración<sup>58</sup>.

Por lo tanto, sería de gran utilidad el desarrollo de una técnica sensible y específica que detectara la presencia de los trematodos en el animal parasitado a través del proceso de migración, particularmente debido a que las infecciones prepatentes son las que causan las pérdidas clínicas y económicas significativas.

Con respecto a los resultados obtenidos en la técnica de inmunoelectrotransferencia, se concluye que los componentes del antígeno de excreciones-secreciones de estadios juveniles del parásito son reconocidos en los primeros días después de la infección, a diferencia de los que están presentes en el antígeno somático; ya que en el caso de estos últimos, fue posible detectarlos a partir de la sexta semana postinfección. Sin embargo, únicamente un componente antigénico (27.7 kDa) fue reconocido por todos los sueros de los animales infectados al utilizar el EXS, mientras que al emplear el SOM todos los sueros detectaron los tres componentes antigénicos presentes en el SOM a partir de la semana ocho postinfección.

Este resultado obtenido en el presente estudio indica que el reconocimiento de los antígenos presentes en el EXS puede considerarse precoz, por ejemplo, a los diez días postinfección el antígeno de 27.7 kDa fue reconocido por dos de los diez sueros infectados, a los 14 días por el 70% de los sueros y a partir de la séptima semana postinfección (spi) el reconocimiento fue del 100%. Con respecto a los otros componentes antigénicos presentes en el EXS, se observó una banda de 43.2 kDa que fue detectada por el 70% de los sueros infectados desde la cuarta semana.

En la segunda spi, un componente antigénico de aproximadamente 17 kDa fue detectado por la mitad de los sueros. Los componentes antigénicos de 23.5, 33 y 49.5 kDa siempre fueron detectados por el 50% o menos de los sueros, por lo que no pueden considerarse inmunodominantes.

Con respecto al antígeno somático de estadios inmaduros, los tres componentes antigénicos fueron reconocidos por el 100% de los sueros a partir de la octava spi. Por consiguiente, los tres antígenos son inmunodominantes, pero detectables en una fase tardía de la enfermedad, la cual coincidió con el inicio de detección de huevos del trematodo en heces.

Los antígenos detectados por los sueros ovinos infectados con metacercarias de *F. hepatica* en el presente estudio se encuentran dentro de límites mínimo y máximo reportados en diferentes trabajos de investigación. La comparación de los pesos moleculares de las proteínas detectadas en este trabajo con datos publicados es difícil debido a que se utilizan diferentes métodos para el cálculo del peso molecular.

Con respecto al componente antigénico inmunodominante de 27.7 kDa detectado en este estudio, Santiago y Hillyer (1988) reportan polipéptidos antigénicos de excreciones-secreciones dentro de límites de 23 a 30 kDa que son reconocidos durante toda la duración de la infección tanto por ovinos como por bovinos con fasciolosis primaria<sup>38</sup>. El-Bahi *et al* (1992) mencionan un antígeno diagnóstico estable de 26 kDa presente en bilis y heces de bovinos infectados con este trematodo<sup>42</sup>. Esta proteína se encuentra en los productos de excreciones-secreciones y no presenta reacción cruzada con otros parásitos. En otro estudio, Silva *et al* (1993) seleccionaron grupos de bandas presentes en el suero de pacientes con fasciolosis<sup>44</sup>.

Uno de los intervalos que mencionan es el de 16-26 kDa, al utilizar un antígeno de excreciones-secreciones de formas inmaduras. También mencionan el intervalo de 30-33, 38-40 y 49-50 kDa. Las fracciones de 16-26 kDa se presentaron en 10 de los 12 pacientes estudiados<sup>44</sup>. Ruiz-Navarrete *et al* et 1993 demostraron que los sueros de ovinos infectados reaccionaron notablemente contra un componente de 23-27 kDa presente en los productos de excreciones-secreciones de fasciolas adultas a partir de la semana seis postinfección<sup>43</sup>. Gorman *et al* ese mismo año reportaron el reconocimiento de fracciones de 26-28 kDa y una proteína de 16 kDa en sueros de ovinos infectados<sup>83</sup>.



En 1994, estos mismos autores realizaron un estudio de fasciolosis ovina, y al utilizar antígenos de excreciones-secreciones de adultos se detectaron varias bandas, de las cuales es importante señalar las de 16 y 26-28 kDa. Ésta última fue reconocida por nueve de 10 animales infectados, y junto con las bandas de 35-36 y 56-58 kDa, representan fracciones blanco para su posterior uso en inmunodiagnóstico de la fasciolosis de acuerdo con los autores<sup>14</sup>.

El antígeno mencionado en el presente trabajo (27.7 kDa) se encuentra también incluido dentro del intervalo que mencionan Chauvin *et al* (1995), quienes observaron 17 polipéptidos reconocidos por sueros ovinos con fasciolosis, entre los cuales se encontró una proteína de 27 kDa del antígeno de excreciones-secreciones de adultos que fue inmunodominante a partir de la sexta semana postinfección, cuando fue reconocida por el 100% de los sueros de ovinos infectados. Sin embargo, fue desde la tercera spi cuando fue detectada por uno de cinco sueros. A las cuatro spi por dos de cinco, y a las cinco spi por tres ovinos<sup>24</sup>. Piacenza *et al* en 1997 demostraron que las dos moléculas inmunogénicas conocidas como catepsinas-L que son reconocidas tanto en las fases tempranas como tardías del proceso infeccioso, son capaces de inducir una respuesta humoral específica lo suficientemente fuerte para neutralizar, cuando menos parcialmente, su actividad enzimática. Una de estas enzimas, la proteasa catepsina-L uno (CL1) tiene un peso molecular aproximado de 27.5 kDa y es secretada (antígeno de excreciones-secreciones) por todos los estadios del parásito en desarrollo. De acuerdo con estos investigadores, esta proteasa es capaz de unirse a las inmunoglobulinas del huésped y puede prevenir la adhesión *in vitro* de los eosinófilos a los estadios juveniles recién desenquistados. La CL2 que tiene un peso molecular aparente de 29 kDa ha sido recientemente purificada de los productos de excreciones-secreciones de adultos de *F. hepatica* y puede provocar coágulos de fibrina, por lo que se postula que puede prevenir el sangrado excesivo en sus puntos de alimentación en los conductos biliares. Córdova *et al* en 1997 demostraron que un componente de 26 kDa presente en los productos de excreciones-secreciones de trematodos adultos corresponde a una cistein-proteasa<sup>65</sup>.

En cuanto al antígeno de 17 kDa, en un estudio realizado por Hillyer y Soler de Galanes en 1988, se menciona que una banda de 17 kDa presente en el antígeno de excreciones-secreciones de *F. hepatica* es un excelente candidato para el inmunodiagnóstico de fasciolosis aguda y crónica, ya que fue reconocida por todos los sueros de pacientes humanos sospechosos o con fasciolosis confirmada<sup>39</sup>. Guobadia y Fagbemi en 1995 demostraron que los ovinos infectados reconocen específicamente un polipéptido de 17 kDa presente en el antígeno de excreciones-secreciones de adultos de *Fasciola gigantica*, el cual fue reconocido a las seis spi<sup>47</sup>. Ese mismo año, Qureshi *et al* reportan un antígeno de aproximadamente 15 kDa de los productos de excreciones-secreciones de adultos de *Fasciola hepatica* que puede ser utilizado para el diagnóstico específico de especie para diferenciarlo de *Fascioloides magna*<sup>45</sup>. Sampaio-Silva *et al* (1996) también mencionan proteínas de pesos aproximados de 16.4 y 27 kDa usando antígeno de excreciones-secreciones para diagnóstico de fasciolosis en humanos<sup>49</sup>. Cervi *et al* en 1996 reportaron que los componentes antigénicos de los productos de excreciones-secreciones de estadios adultos de *F. hepatica* con un peso molecular entre 12 y 23 kDa inducen activamente supresión de la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) hacia los antígenos del parásito<sup>27</sup>.

Con respecto al empleo de antígenos somáticos, Ruiz-Navarrete *et al* en 1993 encontraron en el extracto somático de adultos un componente de 20-23 kDa reconocido por suero de ovinos infectados con *F. hepatica* después de la sexta semana postinfección<sup>43</sup>. Gorman *et al* (1994) utilizaron el extracto somático tanto de estadios adultos como de juveniles. Los ovinos infectados reconocieron una banda de 26-28 kDa (nueve de 10 animales) en la fase patente de la enfermedad. En el caso de formas juveniles, fueron reconocidos tres antígenos de bajo peso molecular correspondientes a 16, 20 y 22-23 kDa, las que sólo fueron observadas en sueros de ovinos cursando la etapa patente de la infección<sup>14</sup>.

Los componentes antigénicos encontrados en el presente trabajo (17.5, 20.5 y 23.1 kDa) poseen pesos similares a los reportados por Gorman *et al*, sin embargo, las frecuencias fueron distintas, ya que a partir de la octava spi las tres proteínas fueron reconocidas por el 100% de los animales; mientras que en el trabajo de Gorman, las bandas de 20 y 22-23 kDa fueron detectadas por el 50 % de los ovinos<sup>14</sup>.

Itagaki *et al* (1995) reportan un polipéptido de 17 kDa del antígeno somático de estadios adultos que es reconocido por sueros de bovinos infectados tanto en los estadios tempranos como tardíos de la enfermedad<sup>46</sup>. En el presente trabajo, una banda que se encuentra alrededor de este peso molecular fue detectada a partir de la sexta spi.

De acuerdo con los resultados documentados por Tkalcevic *et al* en 1996, el perfil proteico de las formas juveniles recién desenquistadas (0-10 días postinfección) es claramente distinto de aquél que presentan las formas juveniles aisladas a partir de cavidad peritoneal e hígado, aunque una banda dominante de aproximadamente 49 kDa se hizo evidente a través de todos los estadios de desarrollo. Tkalcevic *et al* realizaron sus estudios mediante el desenquistamiento *in vitro* y pruebas de inmunoelectrotransferencia en animales de laboratorio<sup>30</sup>. En el presente estudio se encontró un polipéptido que podría estar incluido en este intervalo de masa molecular (49.5 kDa en el EXS), pero su detección mostró una baja sensibilidad; ya que fue reconocido por el 40% o menos de los sueros. Además, cabe señalar que en este estudio el desenquistamiento no se realizó *in vitro*, sino a través de la recuperación a la necropsia de los estadios inmaduros de 10 días de edad de *F. hepatica*.

El papel de las proteínas inespecíficas encontradas tanto en el EXS como en el SOM, particularmente la proteína de 29.3 kDa que fue reconocida en ambos antígenos, debe ser estudiado, ya que es un blanco importante de la respuesta inmune humoral. Cabe señalar que Hammami *et al* en 1997 encontraron 11 bandas antigénicas usando suero de pacientes con fasciolosis y consideró un antígeno inmunodominante la banda de 29 kDa, con una especificidad de 100% una sensibilidad de 93%<sup>7</sup>.

Con respecto a reacciones cruzadas, se detectaron dos bandas de aproximadamente 20.4 y 50.0 kDa que presentaron reacción cruzada entre *F. hepatica* y *Paramphistomum* spp. Esta reacción puede deberse a que ambos parásitos son trematodos y por lo tanto guardan una relación filogenética estrecha. Además, los productos de excreciones-secreciones de especies filogenéticamente relacionadas son muy parecidos debido a que son el producto final de rutas metabólicas que tienen como función principal la excreción de metabolitos producidos por los procesos catabólicos del organismo; por lo tanto, dos especies filogenéticamente relacionadas comparten algunas rutas metabólicas y por lo tanto eliminan metabolitos similares.

En conclusión, el sistema inmune detecta componentes (en ambas especies aunque sean diferentes), que son producidos por la misma ruta metabólica como semejantes. Por lo tanto se observa cierto grado de reacción cruzada\*. Este resultado coincide con la reactividad cruzada reportada entre *F. hepatica* y *Paramphistomum* spp por Guobadia y Fagbemi en 1995, quienes además demostraron la presencia de reacciones cruzadas entre estos dos helmintos y *Dicrocoelium* spp<sup>47</sup>.

En el presente trabajo se demostró que el componente antigénico con un peso molecular aproximado de 27.7 kDa detectado en los antígenos de excreciones-secreciones de estadios inmaduros de *F. hepatica* es específico, ya que no presentó reacción cruzada con los sueros ovinos positivos a otras parasitosis.

Se han asociado numerosos antígenos con el parásito durante su fase de migración<sup>14,43,45</sup>. Sin embargo, el patrón antigénico cambia rápidamente después de la infección<sup>30</sup>. La cinética de detección antigénica demuestra un reconocimiento tardío del extracto somático y de productos de excreciones-secreciones de estadios inmaduros de *Fasciola hepatica*, lo cual indica que se comparten antígenos comunes entre los estadios juveniles y adultos del parásito.

Se sugiere que los antígenos específicos detectados en el EXS en el presente trabajo, así como las tres proteínas detectadas en el SOM sean purificados para preparar con ellos algún anticuerpo policlonal monoespecífico e incluso uno monoclonal que permita implementar una técnica mediante la cual se podría obtener el diagnóstico de esta parasitosis en fases tempranas de la infección para que pueda ser implementado a tiempo un tratamiento quimioterapéutico oportuno y evitar así las pérdidas provocadas por este trematodo.

La propiedad más importante de la fasciolosis causada por *F. hepatica* en ovinos y caprinos es la falta de evidencia de que estos animales (que representan huéspedes susceptibles) adquieren inmunidad contra este parásito<sup>94</sup>. La infección puede persistir hasta por 11 años, y no hay reacción del huésped hacia la presencia del trematodo<sup>95</sup>. En los bovinos, la infección puede durar hasta un año y los parásitos son generalmente inmovilizados y eliminados durante su migración a través del hígado.

---

\* Comunicación personal de Rodrigo Rosario Cruz (febrero 2000)

Las infecciones experimentales en ratas inmunocompetentes y atímicas indican que la resistencia es inespecífica a nivel de la barrera intestinal, mientras que la inmunidad específica opera extraintestinalmente<sup>94</sup>. Se ha demostrado que la destrucción del tegumento de parásitos inmaduros se produce por la presencia de neutrófilos y macrófagos<sup>96</sup>.

Además, hay que tener en consideración que los cambios antigénicos en el glicocáliz de *Fasciola hepatica* son muy rápidos, como lo han demostrado varios trabajos, entre los que resaltan los realizados por Duffus y Franks en 1980 y 1981, quienes reportaron que a pesar de que se obtuvieron inmunoglobulinas específicas IgG1 dirigidas contra el tegumento de estadios juveniles, no se observó reacción de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos; ya que los complejos antígeno-anticuerpo formados en el glicocáliz eran eliminados al medio junto con éste<sup>97,98</sup>. La incapacidad de anticuerpos específicos o del complemento para destruir parásitos juveniles ha sido explicado por el rápido y continuo cambio de glicocáliz como un modo de inmunoevasión por parte del trematodo<sup>30,99</sup>.

Por otro lado, Con respecto al método de infección, se han ensayado diversos procedimientos como bolos de gelatina<sup>100,101</sup> que de acuerdo con los autores, resultan ser fáciles y efectivos, además de causar mínimo estrés al animal. Otros protocolos de infección utilizan cápsulas<sup>24</sup>, tiras de celofán<sup>58</sup> y jeringas o cánulas; estas últimas para infectar roedores<sup>19</sup>.

En el presente trabajo se expusieron los animales a metacercarias del parásito mediante una sonda siliconada (Grupo A) y cápsulas de gelatina (Grupo B). No se observó diferencia significativa en los valores de absorbancia de ambos grupos infectados al ensayar los sueros contra las dos preparaciones antigénicas de *F. hepatica*. Sin embargo, el manejo de los ovinos fue más limpio, sencillo y rápido cuando se utilizaron las cápsulas como método de infección.

El reconocimiento y entendimiento de la inmunobiología de la infección por *Fasciola hepatica* permite el desarrollo de programas de investigación acerca del control quimioterapéutico de esta trematodosis y de resistencia a antihelmínticos; así como del control genético de la inmunidad del huésped, patología, resistencia genética a la infección, diagnóstico y control de la infección a través de la vacunación.

## V. CONCLUSIONES

Este estudio ha demostrado que existe un número de componentes antigénicos en el estadio inmaduro de *Fasciola hepatica* que podrían ser seleccionados para su futura purificación y aplicación en el diagnóstico de fasciolosis. Entre ellos, destaca el antígeno inmunodominante de 27.7 kDa presente en los productos de excreciones-secreciones del parásito inmaduro. Este componente es particularmente prometedor debido a que es reconocido específicamente por el suero de todos los animales infectados; lo cual lo hace un candidato adecuado para su utilización en el inmunodiagnóstico de esta enfermedad.

**CUADRO 1**

<b>Promedio de huevos de <i>F.hepatica</i> / gramo de heces postinfección experimental</b>					
<b>Grupo</b>	<b>SEMANA 8</b>	<b>SEMANA 9</b>	<b>SEMANA 10</b>	<b>SEMANA 11</b>	<b>SEMANA 12</b>
<b>A (sonda)</b>	2.8 ± 1.0	3 ± 2.41	3.3 ± 2.78	49.19 ± 27.5	91.46 ± 70.2
<b>B (cápsula)</b>	6 ± 2.17	8 ± 3.24	9 ± 5.1	96.6 ± 45.2	201.46 ± 173.62
<b>Testigo</b>	0	0	0	0	0

CUADRO 2

Número de ovinos infectados con <i>Fasciola hepatica</i> (n=10) cuyos sueros reconocieron diversos componentes en los antígenos de excreciones-secreciones (EXS) y somático (SOM) del estadio Inmaduro de <i>F. hepatica</i> por medio de la prueba de Inmunoelctrotransferencia																	
DÍAS POSTINFECCIÓN																	
EXS (kDa)	-7	0	1	3	7	10	14	21	28	35	42	49	50	63	70	77	84
17	-	-	-	-	-	-	5	5	5	6	7	7	8	8	8	9	9
23.5	-	-	-	-	-	-	2	3	3	3	3	4	5	5	5	5	5
27.7	-	-	-	-	-	2	7	7	9	9	9	10	10	10	10	10	10
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2	2
43.2	-	-	-	-	-	-	3	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7
49.5	-	-	-	-	-	-	2	2	2	3	4	4	4	4	4	4	4
Inesp*																	
12.6	4	4	4	4	4	4	4	6	6	6	6	8	8	8	8	8	8
29.3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
56.2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
SOM (kDa)																	
17.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	10	10	10	10	10
20.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	10	10	10	10	10
23.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	10	10	10	10	10
Inesp*																	
29.3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

\* Inesp : Proteínas inespecíficas reconocidas antes de la infección experimental por los grupos de ovinos expuestos a metacercarias de *F. hepatica*



**CUADRO 3**

<b>Componentes de los antígenos de excreciones-secreciones (EXS) y somático (SOM) del estadio inmaduro de <i>Fasciola hepatica</i> que reaccionaron con sueros de ovinos con otras parasitosis al utilizar la prueba de Inmunoelectrotransferencia</b>	
<b>EXS (kDa)</b>	<b>HELMINTOS PARÁSITOS</b>
20.4	<i>Paramphistomum</i> spp
50.0	<i>Paramphistomum</i> spp
<b>SOM (kDa)</b>	----
Ninguno	----

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

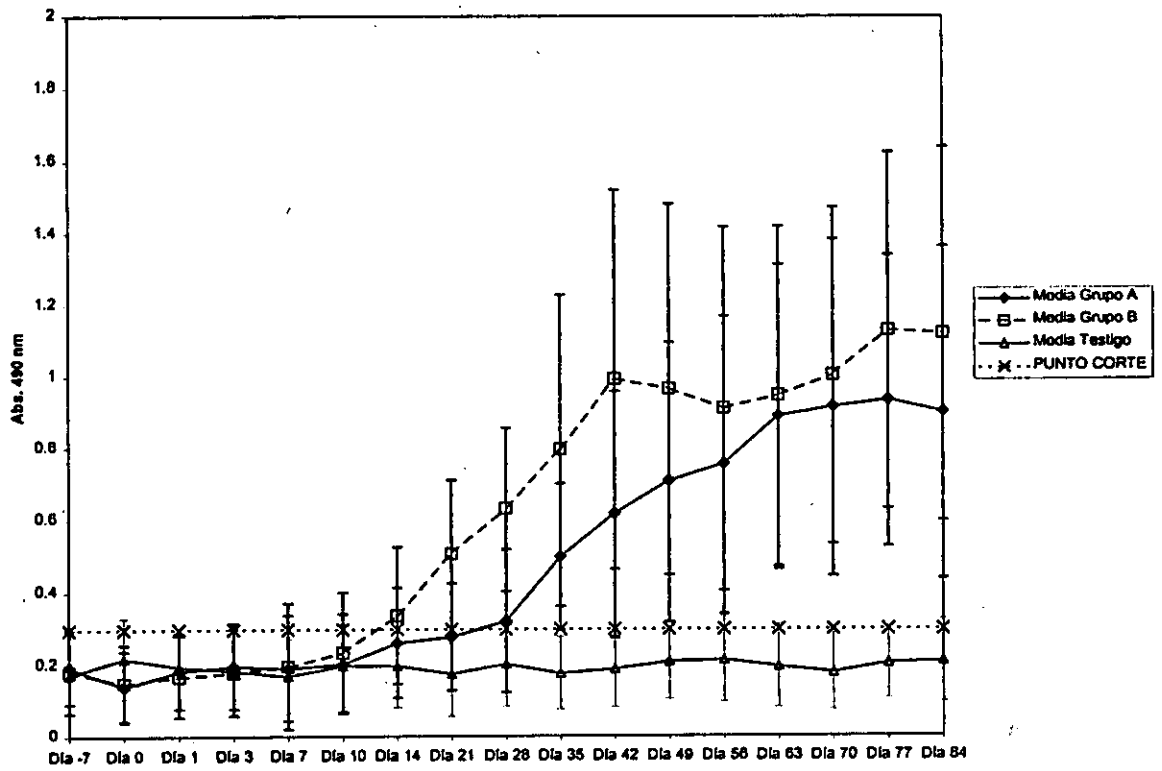
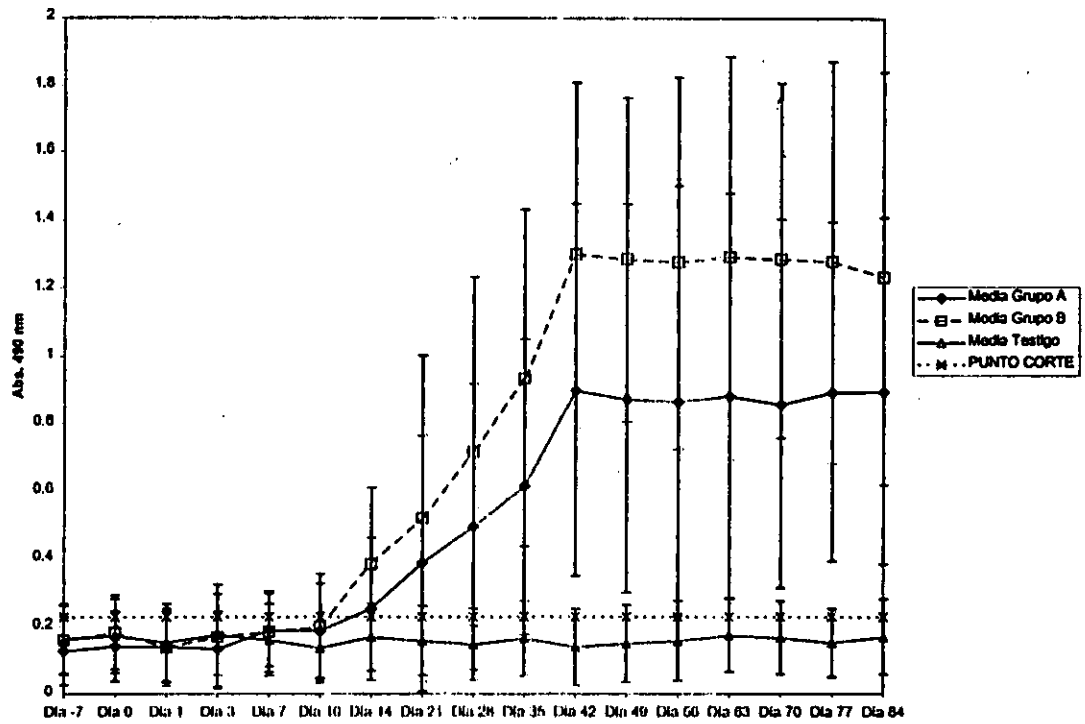


Figura 1. ELISA Indirecto para la detección de anticuerpos IgG producidos contra el antígeno de excreciones-secreciones de los estadios inmaduros de *Fasciola hepatica* (EXS)



**Figura 2. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG producidos contra el antígeno somático de los estadios inmaduros de *Fasciola hepatica* (SOM)**

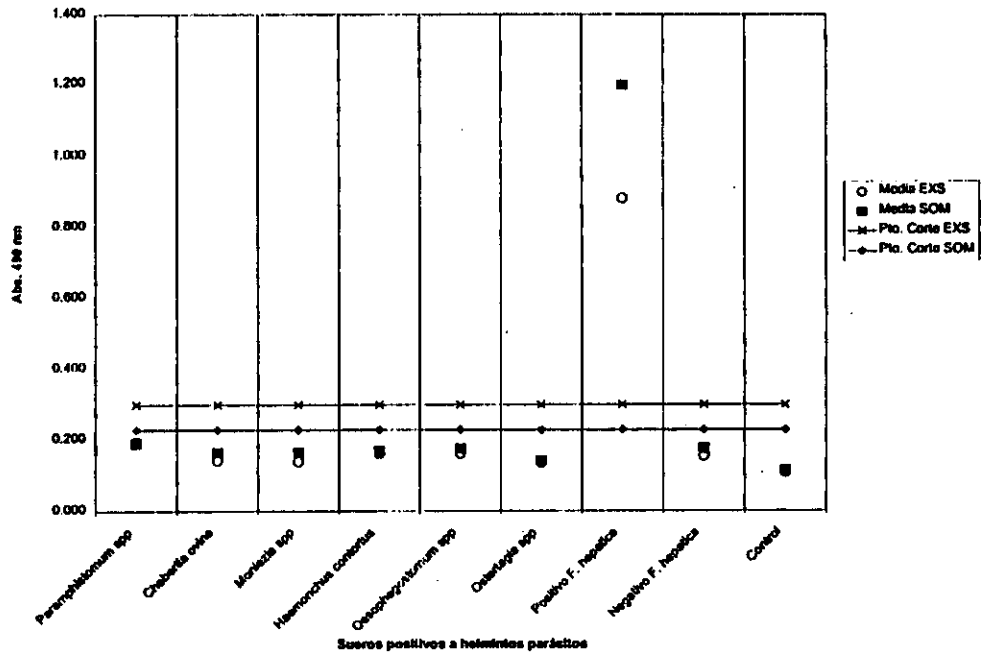
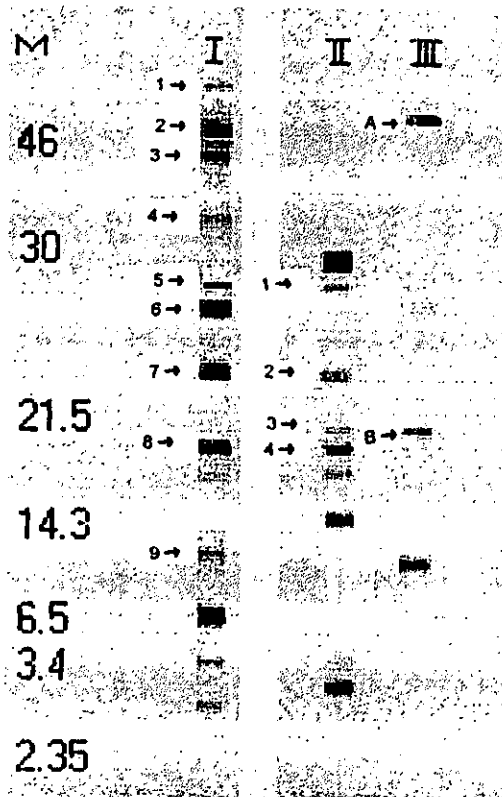


Figura 3. Valores medios de absorbancia de sueros positivos a helmintos parásitos al reaccionar contra los antígenos EXS y SOM de *Fasciola hepatica*



**Figura 4.** Componentes de los antígenos de excreciones-secreciones (EXS) y somático (SOM) del estadio inmaduro de *Fasciola hepatica* reconocidos por los ovinos infectados con *F. hepatica* y detectados por sueros de ovinos infectados con *Paramphistomum* spp al utilizar la prueba de Inmunolectrotransferencia

M = Pesos moleculares del marcador comercial

I = Componentes antigénicos reconocidos en el EXS por ovinos de los Grupos A y B

- |               |               |
|---------------|---------------|
| 1. 56.2 kDa * | 6. 27.7 kDa   |
| 2. 49.5 kDa   | 7. 23.5 kDa   |
| 3. 43.2 kDa   | 8. 17.0 kDa   |
| 4. 33.0 kDa   | 9. 12.6 kDa * |
| 5. 29.3 kDa * |               |

II = Componentes antigénicos reconocidos en el SOM por ovinos de los Grupos A y B

1. 29.3 kDa \*
2. 23.1 kDa
3. 20.5 kDa
4. 17.5 kDa

III = Componentes antigénicos del EXS reconocidos por sueros de ovinos infectados con *Paramphistomum* spp

- A. 50.0 kDa
- B. 20.4 kDa

\* Proteínas inespecíficas