

Caracterización y análisis de la actividad antigénica de proteínas de la membrana germinal de *Echinococcus granulosus*

PRIETO, L.H.¹; FERNANDEZ, E.D.²

RESUMEN

Proteínas presentes en un extracto de membrana germinal de *Echinococcus granulosus* fueron separadas en una fase acuosa y en una fase detergente mediante el tratamiento con Triton X-114. La caracterización mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, mostró que proteínas con pesos moleculares aproximados de 102, 45, 28.5-28 y 15.5-15 kDa se presentaron en el extracto y en la fase acuosa (proteínas hidrofílicas). La caracterización inmunológica de proteínas del extracto mediante inmunotransferencia frente a suero ovino no inmunizado, frente a suero ovino inmunizado con antígenos de *E. granulosus* y frente a suero anti-inmunoglobulina ovina, mostró patrones de reactividad similares. El ensayo inmunodetección en un punto, de proteínas del extracto previamente tratadas con Triton X-114 frente a sueros humanos incubados con el detergente iónico dodecil sulfato de sodio, mostró reactividad frente a sueros humanos con equinococosis quística y no mostró reactividad frente a sueros humanos sin equinococosis quística ni frente a un suero humano infectado con la filaria *Mansonella ozzardi*.

Palabras clave: (*Echinococcus granulosus*), (membrana germinal), (proteínas), (actividad antigénica).

¹Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Bv Alte Brown (9120), Puerto Madryn, Chubut, Argentina. Tel-fax: 54-2965-472885, e-mail: lhprieto@yahoo.com.ar

²Laboratorio de Bacteriología Hospital Zonal Trelew y Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Sede Puerto Madryn y Sede Trelew, Chubut, Argentina.

Recibido: mayo 2005 - Aceptado: mayo 2006 - Versión on line: mayo 2006

InVet. 2006, 8(1): 51-58
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

51

Characterization and antigenic activity of *Echinococcus granulosus* germinal layer proteins

Abstract

Proteins present in an extract of *Echinococcus granulosus* germinal layer were separated in hydrophobic and hydrophilic phases using Triton X-114. The characterization carried out by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis showed that proteins of apparent molecular weights of 102, 45, 28.5-28 and 15.5-15 kDa were present in the extract and in the aqueous phase (hydrophilic proteins). The immunological characterization of extract proteins performed by immunoblotting against to no immunized sheep serum, against to immunized with *E. granulosus* antigens sheep serum and against to anti-sheep immunoglobulin serum, showed similar reaction patterns. The dot immunobinding assay of extract proteins after Triton X-114 treatment against to human sera incubated in the presence of sodium dodecyl sulphate ionic detergent, showed a positive reaction to cystic echinococcosis human sera. On the other hand, no reaction was observed to human sera without cystic echinococcosis and *Mansonella ozzardi* human infection serum.

Key words: (*Echinococcus granulosus*), (germinal layer), (proteins), (antigenic activity).

INTRODUCCIÓN

La equinococosis quística constituye un problema de salud pública con importantes consecuencias económicas en varios países del mundo. Esta zoonosis es causada por el cestode *Echinococcus granulosus*, cuyo ciclo de vida indirecto depende principalmente del perro (hospedador definitivo) y el ovino (hospedador intermediario). Otros potenciales hospedadores intermediarios pueden ser el bovino, el porcino, el caprino y el hombre. El metacestode (forma larval del parásito) se desarrolla en el hospedador intermediario, estando formado por dos membranas de origen parasitario, la membrana laminar externa, y la membrana germinal interna que rodea una cavidad central llena de líquido hidatídico y con cientos de protoescolices.

Antígenos derivados del líquido hidatídico han sido caracterizados y utilizados

frecuentemente en el inmunodiagnóstico de la equinococosis humana¹³. Sin embargo, se ha encontrado que la capa laminar, la membrana germinal y los protoescolices presentan antígenos comunes¹⁴, y además se han realizado estudios inmunológicos con antígenos semipurificados a partir de la capa laminar¹².

Craig² ha sugerido dirigir las investigaciones hacia antígenos de la membrana germinal y de protoescolices por su potencial inmunodiagnóstico. Así, nuestro objetivo fue caracterizar y analizar la actividad antigénica de proteínas obtenidas de la membrana germinal de *E. granulosus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material parasitario

La membrana germinal fue obtenida de un quiste presente en hígado ovino, lavada varias veces con buffer fosfato salino ([pH = 7.4],

NaCl 8 g‰, KCl 0.2 g‰, Na₂HPO₄·2H₂O 1.45 g‰ ó Na₂HPO₄ 1.16 g‰ y KH₂PO₄ 0.2 g‰) y almacenada a -20°C hasta la preparación del extracto.

Preparación del extracto

En un mortero con pilón, 1 g de membrana germinal fue triturado junto con vidrio molido y 2.5 ml de buffer A (Tris-HCl 0.24 g% [pH = 8.1-8.2], NaCl 0.8 g%, EDTA 1mM, azida sódica 0.01g% y urea 8M), y centrifugado a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante (extracto) fue recuperado y almacenado a 4°C.

Determinación cuantitativa de las proteínas presentes en el extracto

Se realizó por el método de Lowry adaptado por Scopes¹¹. La curva de calibración se obtuvo mediante análisis de regresión a partir de la absorbancia a 630 nm de soluciones con 25, 50, 100, 200 y 500 µg/ml de albúmina bovina sérica.

Separación de las proteínas del extracto en una fase acuosa y en una fase detergente mediante el tratamiento con una solución de Triton X-114

La urea del extracto fue removida por diálisis frente a buffer A sin urea. La concentración de proteínas del extracto dializado fue ajustada a 2 mg/ml con una solución de Triton X-114 al 2% en buffer A sin urea previamente incubada a 0°C durante 15 min. Esta dilución fue incubada 12 min a 0°C agitándola suavemente con la mano cada 3 min, y centrifugada a 10000 rpm y 27°C durante 15 min en una centrifuga refrigerada. Cada fase fue transferida a un nuevo tubo y almacenada a 4°C.

Resolución de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Las muestras para SDS-PAGE se prepararon a partir del extracto, de la fase acuosa y de la fase detergente. Estas soluciones fueron diluidas a la mitad con buffer diluyente de muestra (500 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, 120 µl de buffer Tris-HCl 1.0 M [pH = 6.8], 200 µl de glicerina, 50 µl de azul de bromofenol al 0.2%, 130 µl de H₂O y urea 9M), tratadas con β-mercaptoetanol hasta una concentración final del 5% y calentadas en agua a 100°C durante 3 min. La electroforesis fue realizada por el sistema de buffer discontinuo de Lamli⁷ con modificaciones de Harlow y Lane⁴, en un gel con 1 mm de espesor y una concentración de acrilamida del 15% (acrilamida-bisacrilamida 29.2:0.8). Se utilizó un minisistema de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN II, BIO-RAD) y la electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente durante 45 min, con un voltaje inicial de 150 V (30 mA) y un voltaje final de 180 V (15 mA). Finalizada la electroforesis el gel fue fijado 1 h en metanol - ác. acético - agua destilada (40:10:50), coloreado 2 h con 0.25% P/V de Azul de Coomassie en metanol - ác. acético - agua destilada (45:10:45) y decolorado 3 h con metanol - ác. acético - agua destilada (20:10:70). Todas las incubaciones se realizaron con agitación y a temperatura ambiente.

Sueros utilizados

De pacientes del Hospital Zonal Trelew (Chubut) se obtuvieron sueros humanos con equinocosis quística N° 1, 2, 3 y 4 reactivos por ensayo inmunoabsorbente unido a un enzima (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent

Assay) y positivos por inmunotransferencia e inmunolectroforesis frente a antígenos de *E. granulosus* derivados del líquido hidatídico ovino, y un suero humano con equinocosis quística N° 5 no reactivo por ELISA y negativo por pruebas suplementarias pero portador de un quiste hidatídico confirmado quirúrgicamente. Además se utilizaron sueros humanos sin equinocosis quística N° 6 y 7 pertenecientes a donantes de sangre de la Provincia de Entre Ríos, un suero humano infectado con la filaria *Mansonella ozzardi*, un suero ovino no inmunizado y libre de infección hidatídica, y un suero ovino inmunizado con antígenos de *E. granulosus* derivados del líquido hidatídico ovino, inoculados semanalmente por vía intramuscular con adyuvante de Freund completo durante 7 semanas.

Inmunotransferencia

Proteínas del extracto fueron resueltas mediante SDS-PAGE como se describió previamente, en un gel con 0.75 mm de espesor y una concentración de acrilamida del 13%. Los componentes resueltos fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (tamaño del poro 0.2 µm) por el método semi-seco descrito por Kyhse-Andersen⁶, sin agregar SDS al buffer de transferencia ([pH = 9.2], metanol 20%, Tris 48 mM y glicina 39 mM). La transferencia se realizó en un equipo Semi-Dry Blotter (SIGMA-ALDRICH) con un voltaje de 21 V durante 40 min y a temperatura ambiente. Para la detección inmunológica, una tira de nitrocelulosa (control) fue incubada en buffer B (Tris 0.01 M [pH = 7.4], NaCl 8 g‰, KCl 0.2 g‰, Tween 20 0.2%, leche descremada 2 g% y azida sódica 0.01 g%) y otras dos tiras fueron incubadas con suero ovino no inmunizado y suero ovino inmunizado con antígenos de *E. granulosus* respectivamente, diluidos 1:3000 en buffer B durante 30 min. Posteriormente, las

tres tiras fueron lavadas 4 veces (3 min. cada lavado) con buffer C (Tris 0.01 M [pH = 7.4], NaCl 8 g‰, KCl 0.2 g‰, Tween 20 0.2%), incubadas con suero de burro anti-inmunoglobulina (anti-IgG) ovina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma Immuno Chemicals A-5187) diluido 1:1000 en buffer B durante 30 min, y nuevamente lavadas 4 veces con buffer C. Para revelar la actividad enzimática las tiras fueron incubadas durante 8 min con una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- fosfato y azul de nitrotetrazolio en Tris 0.1 M [pH = 9.5], dimetilformamida, azida sódica 0.01g % y Cl₂Mg 0.5 mM (BCIP/NBT). Todas las incubaciones y lavados se realizaron con agitación y a temperatura ambiente.

Inmunodetección en un punto (Dot Immunobinding Assay)

Se realizó esencialmente por el procedimiento de Richard Hawkes, Niday y Gordon⁵. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa (tamaño del poro 0.2 mm) y por cuadrado se sembró 2 µl de extracto previamente diluido a la mitad con una solución de Triton X-114 al 2% en buffer A sin urea. Las tiras fueron incubadas frente a un determinado suero humano (1:100) junto con suero ovino no inmunizado (1:50) en buffer B sin SDS y en buffer B con 0.05% y con 0.1% de SDS durante 15 min. Como control, dos tiras fueron incubadas frente a suero ovino normal (1:50) en buffer B sin SDS y en buffer B con 0.05% de SDS respectivamente. Luego, todas las tiras fueron lavadas 4 veces con buffer C (3 min por lavado), incubadas frente a suero de cabra anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina (GENELABS® DIAGNOSTICS) (1:1000) junto con suero ovino no inmunizado (1:50) en buffer B durante 10 min, lavadas otras 4 veces con buffer C, e incubadas con la solución sustrato BCIP/NBT. Todas las incubaciones y lavados se

realizaron con agitación y a temperatura ambiente.

RESULTADOS

La concentración de proteínas presentes en el extracto fue de 4.1 mg/ml.

La resolución mediante SDS-PAGE mostró para el extracto en condiciones de reducción proteínas con un peso molecular aproximado de 102, 64.5, 45, 28.5, 15.5 y 11.5 kDa, para la fase acuosa en condiciones de reducción proteínas con 102, 62.5, 45, 28 y 15 kDa, y para la fase detergente en condiciones de reducción proteínas con 69 y 29.5 kDa.

En la inmunotransferencia, el suero ovino no inmunizado, el suero ovino inmunizado con antígenos de *E. granulosus* y el suero anti-IgG ovina conjugada con fosfatasa alcalina reconocieron antígenos del extracto con un peso molecular aproximado de 129, 99, 56, 43, 38, 34, 26 14 y 11 kDa (foto 1).

En la inmunodetección en un punto de antígenos del extracto previamente tratado con Triton X-114, los sueros humanos con equinococosis quística incubados sin SDS, con 0.05% y con 0.1% de SDS mostraron reactividad (foto 2). De los sueros humanos sin equinococosis quística incubados sin SDS solo uno mostró reactividad (Nº 7), pero cuando dichos sueros fueron incubados con 0.05% de SDS ninguno mostró reactividad (foto 3). El suero humano infectado con la filaria incubado con 0.05% de SDS mostró una débil reactividad, sin embargo, dicha reactividad desapareció al incubar el suero con 0.1% de SDS (foto 4).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El uso de una solución de Triton X-114 y de una centrifuga refrigerada, nos provee de un método sencillo y rápido para la separación de

proteínas de acuerdo a sus características hidrofílicas e hidrofóbicas. Además, si comparamos la temperatura a la cual se produce la separación de fases del Triton X-100 (64°C), un detergente comúnmente usado, con la del Triton X-114 (20°C), este último es conveniente para aislar proteínas en condiciones nativas¹.

El análisis mediante SDS-PAGE nos permite determinar que las proteínas con un peso molecular aproximado de 102, 45, 28.5-

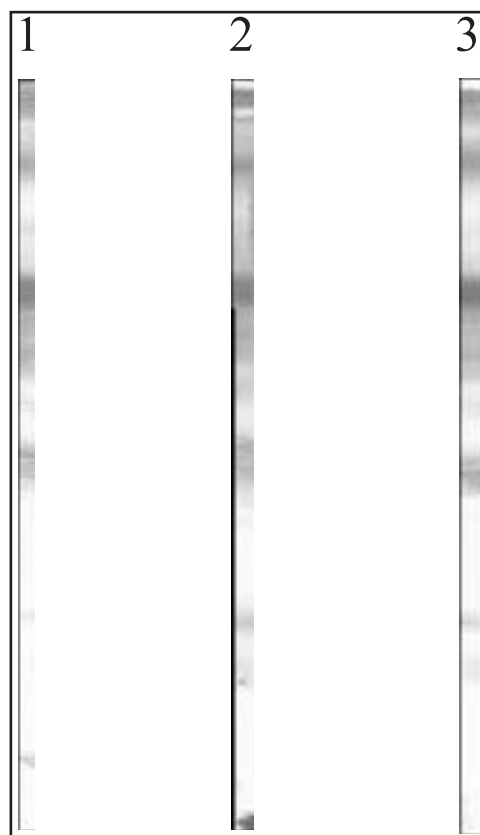


Foto 1. Reactividades obtenidas en la inmunotransferencia frente a suero ovino no inmunizado (tira 1), suero ovino inmunizado con antígenos de *E. granulosus* (tira 2), y suero anti-IgG ovina conjugada con fosfatasa alcalina (tira 3).

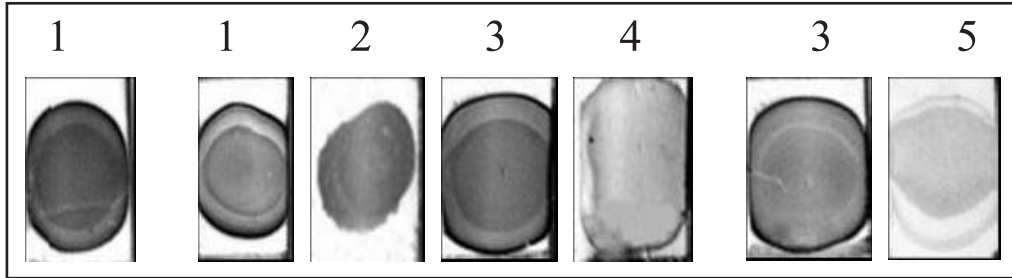


Foto 2. Reactividades obtenidas en el ensayo inmunodetección en un punto frente a sueros humanos con equinocosis quística. De izquierda a derecha, suero N° 1 sin SDS, sueros N° 1, 2, 3 y 4 con 0.05% de SDS, y sueros N° 3 y 5 con 0.1% de SDS.

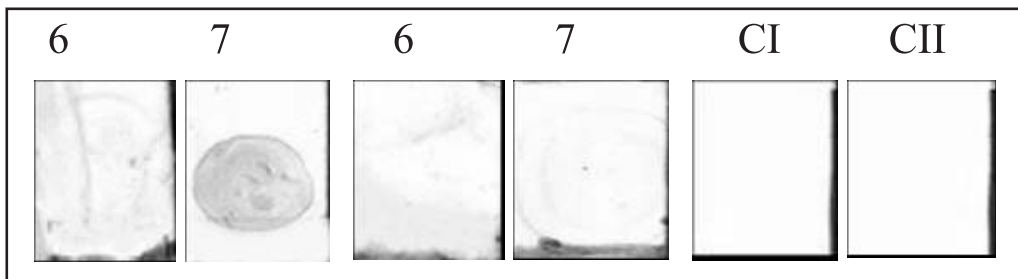


Foto 3. De izquierda a derecha, reactividades obtenidas en el ensayo inmunodetección en un punto frente a sueros humanos sin equinocosis quística N° 6 y 7 sin SDS, con 0.05% de SDS, y frente a suero anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina en tiras previamente incubadas en buffer B sin SDS (CI) y en buffer B con 0.05% de SDS (CII).

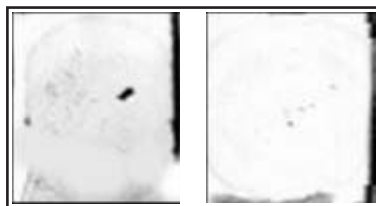


Foto 4. Reactividades obtenidas en el ensayo inmunodetección en un punto frente a suero humano infectado con la filaria en presencia de 0.05% de SDS (izquierda) y de 0.1% de SDS (derecha).

28 y 15.5-15 kDa, presentes en el extracto y en la fase acuosa, corresponden a proteínas hidrofílicas.

Los patrones de reactividad similares obtenidos en la inmunotransferencia estarían indicando que, en todas las incubaciones, el suero anti-IgG ovina conjugada con fosfatasa alcalina reconoce antígenos del extracto con diferentes pesos moleculares. Una explicación de estos hechos podría encontrarse en la hipótesis que sugiere que cambios metabólicos del parásito llevarían a la unión de antígenos parasitarios con moléculas del hospedador formando complejos moleculares estables con diferentes características inmunoquímicas (como la migración electroforética y diferente inmunogenicidad) que podrían proteger al parásito de la respuesta inmune del hospedador^{8,9}. Esta y otras hipótesis fueron propuestas por Pezzella y col.⁸ para explicar los diferentes patrones obtenidos al comparar antígenos parasitarios del líquido hidatídico ovino y del líquido hidatídico humano. Posteriormente, los mismos investigadores encontraron que un antígeno parasitario se encontraba estrechamente relacionado con la albúmina humana presente en el líquido hidatídico humano, y mencionan a la hipótesis descrita anteriormente como la que mejor explica sus resultados⁹. Además señalan que al separar componentes del hospedador antes de aislar antígenos parasitarios del líquido hidatídico, la sensibilidad de las reacciones inmunológicas obtenidas con estos antígenos es menor que si utilizamos como antígeno líquido hidatídico total. Por otro parte, Rickard y col.¹⁰ encontraron que IgG ovina normal (IgG de suero ovino no inmunizado y libre de infección hidatídica) se unía inespecíficamente a antígenos del parásito. En nuestra investigación encontramos una nueva evidencia de la hipótesis predicha, ya que los resultados indican una

asociación entre moléculas parasitarias e IgG ovina que determinan en conjunto antígenos con diferentes pesos moleculares.

En el ensayo inmunodetección en un punto, los sueros humanos con equinococosis quística incubados sin SDS, con 0.05% y con 0.1% de SDS mostraron reactividad frente a antígenos del extracto previamente tratados con Triton-X114, mientras que los sueros humanos sin equinococosis quística incubados con 0.05% de SDS y el suero humano infectado con la filaria incubado con 0.1% de SDS, no mostraron reactividad. Analizando las distintas concentraciones de SDS utilizadas y teniendo en cuenta que el SDS inhibe interacciones antígeno-anticuerpo inespecíficas³, se deduce que la concentración de SDS adecuada para llevar a cabo esta prueba es del 0.1%; y en función de los resultados obtenidos, la técnica descrita podría tener aplicación como prueba serológica en la equinococosis humana.

Este estudio, además de contribuir al análisis de las actividades antigénicas del parásito como al análisis de la respuesta anticuerpo del humano y el ovino, podría ser útil en el mejoramiento de las pruebas inmunológicas, ya que las deficiencias en la sensibilidad y especificidad de las pruebas convencionales persisten en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. BORDIER, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256 (4): 1604-1607.
2. CRAIG, P.S.-Inmunodiagnosis of Echinococcus granulosus and a comparison of techniques for diagnosis of canine echinococcosis. En Andersen, F.L.; Ouhelli, H.; Kachani, M. (ed.) -Compendium on cystic echinococcosis. Brigham Young University, Print Services. USA, 1997, pag 85-118.
3. DIMITRIADIS, G. J. 1979. Effect of Detergents on

- Antibody-Antigen Interaction. *Anal. Biochem.* 98: 445-451.
4. HARLOW, E.; LANE, D. (ed.) Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA, 1999.
 5. KYHSE-ANDERSEN, J. 1984. Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocelulosa. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10: 203-209
 6. HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. 1982. A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119: 142-147.
 7. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 8. PEZZELLA, M.; GALLI, C.; VULLO, V.; ZENNARO, F.; DELIA, S.; SORICE, F. 1984a. Echinococcus granulosus antigens: comparative analysis of human, bovine and ovine hydatid fluids. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (5): 549-551.
 9. PEZZELLA, M.; GALLI, C.; DELIA, S.; VULLO, V.; ZENNARO, F.; LILLINI, E.; SORICE, F. 1984b. Fractionation and characterization of hydatid fluid antigens with identification of antigen similar to human serum albumin. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 821-826.
 10. RICKARD, M.D.; HONEY, R.D.; BRUMLEY, J. L.; MITCHELL, G.F. 1984. Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease II. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using various antigens. *Pathology* 16: 211-215
 11. SCOPES, R.K. (ed.) Protein purification principles and practice. 3rd Edition. Springer Verlag. New York, USA, 1997.
 12. TAHERKHANI, H.; ROGAN, M.T. Immunological Studies on the semi purified laminated layer of Echinococcus granulosus antigen prepared by affinity chromatophy. XXth International Congress of Hidatidologi. Kusadasi, TURKEY, 2001, pag. 228.
 13. THOMPSON, R.C.A.-Biology and Systematics of Echinococcus. En Thompson, R.C.A.; Lymbery, A.J. (ed.) -Echinococcus and Hydatid Disease. CAB International. Wallingford, UK, 1995, pag. 1-37
 14. VARELA-DÍAZ, V.M.; TORRES, J.M. 1977 Antigenic characterisation of Echinococcus granulosus cysts. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 56: 303-309.