

Artículo de investigación

Purificación de proteínas antigénicas obtenidas del producto de excreción y secreción de *Cotylophoron cotylophorum*.

Antigenic Proteins of excretory and secretory products purified from *Cotylophoron cotylophorum*.

Barrios N¹, López JA¹, Mujica F^{1,2}, Uzcategui J², Forlano M^{2*}.

¹ Médicos Veterinarios de ejercicio libre; ² "Unidad de Investigación de Parasitología Veterinaria", Decanato Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Barquisimeto, Venezuela. Teléfono: 0251-259 e-mail: mforlano@ucla.edu.ve.

RESUMEN

El diagnóstico de *Cotylophoron cotylophorum* por la técnica sedimentación y tamizado, es poco eficiente cuando la carga parasitaria es baja y tienen una poca sensibilidad; al diagnosticar sólo la presencia de huevos en heces. En el presente estudio se purificaron proteínas del producto de excreción – secreción de formas adultas de *C. cotylophorum* para evaluar su antigenicidad en una inmunoelectrotransferencia (Western Blot) y su uso diagnóstico en un inmunoensayo (ELISA). Los antígenos obtenidos después de 16 horas de incubación en medio Minimum Essential Eagle (MEM), de 1200 especímenes de parásitos adultos de *C. cotylophorum*, recolectados del rumen de bovinos sacrificados en el Matadero Industrial Centroccidental (MINCO), fueron purificados y concentrados por ultra filtración. Las proteínas antigénicas se identificaron en una electroforesis (SDS – PAGE) y Western Blot utilizando suero hiperinmune obtenidos de conejas inmunizadas con las proteínas purificadas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum*. Nueve bandas fueron identificadas con pesos moleculares de: 17, 24, 43, 56, 62, 76, 83, 105 y 121 KDa, y tres de estas bandas (62, 76 y 105 KDa), fueron reconocidas por el suero sanguíneo de 4 bovinos positivos por examen coprológico a *C. cotylophorum*, de las cuales la proteína de 76 kDa mostró la mayor reactividad. Los antígenos purificados pueden ser usados para desarrollar ensayos inmunoenzimáticos más sensible y específico, de gran utilidad en el diagnóstico y estudio epidemiológico de *C. cotylophorum* en Venezuela.

Palabras clave: *Cotylophoron*, proteínas, bovinos, antígeno.

ABSTRACT

To diagnose the trematode *Cotylophoron cotylophorum* by the sedimentation and sieve technique has low efficiency when the parasite burden is low, because such technique has low sensitivity to diagnose the trematode eggs in the fecal samples. The main objective of this research was to purify some proteins from the secretory and excretory products of adult stages of *C. cotylophorum* with the aim of assessing its antigenicity by immunoelectrotransferency (Western Blot technique), next those proteins were used as antigens in an enzyme link immune assay (ELISA). First, 1,200 adult *C. cotylophorum*, collected directly from bovine's rumen slaughtered at the local Matadero Industrial Centroccidental (MINCO), were incubated during 16 hours in Minimum Essential Eagle (MEM), and antigenic proteins were obtained from this MEM. Next, proteins were purified and concentrated by ultracentrifugation. An electrophoresis technique (SDS-PAGE) and a Western Blot were carried out to identify the antigenic proteins using an hyperimmune serum obtained from previously immunized rabbits with the purified proteins isolated from the excretory and secretory products of *C. cotylophorum*. Nine (9) protein bands were identified with molecular weights of: 17, 24, 43, 56, 62, 76, 83, 105, and 121 KDa, and three of these bands (62, 76, and 105 KDa) were recognized by the serum from four (4) bovines which had previously been diagnosed as positives to *C. cotylophorum* by coprologic tests. The protein with 76 KDa was the most reactive. Finally, these purified antigens may be used to develop immunoenzymatic assays with greater sensitivity and specificity, which would be very helpful tests for the diagnostic and epidemiologic study of *C. cotylophorum* in Venezuela.

Key words: *Cotylophoron*, proteins, bovines, antigens.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias afectan a los animales domésticos, como los bovinos, ovejas, cabras, búfalos, equinos, cerdos y a su vez afectan la ganancia de peso, producción y calidad de la leche, comportamiento reproductivo, calidad de la canal, estado inmunológico, morbilidad y mortalidad [1]. Los parásitos gastrointestinales son causales de una gran variedad de alteraciones directas e indirectas a nivel del abomaso, retículo, intestino e hígado, las cuales repercuten negativamente en la producción [2]. Los trematodos son parásitos que pueden afectar a los conductos biliares, intestino, venas mesentéricas, su tamaño es variable pudiendo medir desde 30 µm a 30 mm, y en su mayoría son hermafroditas [3].

La familia Paramphistomidae son parásitos frecuentes entre los Artiodactylos (mamíferos ungulados), conforman dos subfamilias, Orthocoeliinae (Price y McIntosh, 1953) y Paramphistominae (Fischöeder, 1901), la subfamilia Paramphistominae presenta seis géneros; *Explanatum* (Fukui, 1929), *Gyganocotyle* (Nasmark, 1937) y *Ugandocotyle* (Nasmark, 1937) *Cotylophoron* (Stiles y Goldberger, 1910), *Calicophoron* (Nasmark, 1937) y *Paramphistomum* (Fischöeder, 1901) [4]. Los paramphistomos producen grandes pérdidas económicas, que podrían traducirse en la disminución de la conversión alimenticia, pérdida de peso corporal y disminución de la producción de leche [5].

Se conoce como paramphistomosis a la enfermedad parasitaria originada principalmente por dos géneros de trematodos, pertenecientes a la familia Paramphistomatidae, como son *Paramphistomum cervi* y *Cotylophoron cotylophorum*, los mismos afectan a bovinos, caprinos y ovinos. Dichos parásitos requieren de un hospedador intermediario (caracoles) los cuales deben ser acuáticos, de las Familias Lymnaeidae, Planorbidae y Bulinidae [6]. En rumiantes infectados con *C. cotylophorum* por lo general los trematodos se presentan en la primera porción del duodeno a nivel de los 30 a 60 cm, con hiperemia, necrosis y hemorragias, que conlleva a la destrucción de las vellosidades y en la mucosa abomasal se puede observar edema, hiperemia, inflamación y petequias [7].

El diagnóstico de *C. cotylophorum* se lleva a cabo través del tradicional método coproparasitológico mediante la técnica *sedimentación* y tamizado, que es un examen directo, logrando detectar los huevos del parásito en las heces del hospedador, aproximadamente a las 11 semanas post-infección, cuando el mismo se encuentra en su estado adulto en el rumen [8]. Esta técnica de diagnóstico presenta como desventaja, que resulta poco eficiente cuando la carga parasitaria es baja y prácticamente inútil durante el período prepatente de la infección, el cual corresponde al tiempo que transcurre entre la entrada

del parásito al hospedero y el momento en que sea posible observar la presencia de alguna de las formas del parásito o sus productos, en las heces [9]. Además, es preciso señalar que las pruebas coproparasitológicas para el diagnóstico de trematodos, sólo diagnostican sus estadios adultos; por lo que tienen una baja sensibilidad al diagnosticar sólo la presencia de huevos en heces, no así las formas juveniles del dístoma [10].

En la actualidad existen técnicas serológicas indirectas para diagnóstico de trematodos como *Fasciola hepatica* que afectan a los animales domésticos. La técnica de ELISA y sus variedades DOT- ELISA, DIG ELISA y FAST- ELISA presentan una alta sensibilidad, alta especificidad y versatilidad [9, 11, 12]. La técnica de ELISA indirecta tiene la ventaja de que es capaz de detectar anticuerpos de los trematodos a partir de la tercera semana post-infección en bovinos [9]. Se han aplicado otras técnicas como es la electroinmunotransferencia (EITB) o Western Blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, [13]. En relación a los paramphistomideos se ha aplicado la técnica de ELISA con antígenos somáticos para el diagnóstico de anticuerpos contra *C. cotylophorum* [14], dada la importancia que tiene la prevalencia de *Cotylophoron* sp en Venezuela y lo prolongado del ciclo evolutivo del parásito, lo cual complica el diagnóstico coproparasitológico, se hace necesario el diseño de nuevas técnicas de diagnóstico serológicas.

En Venezuela, la detección de animales infectados podría encontrarse subestimada debido al uso de técnicas directas como sedimentación y tamizado que identifica formas adultas al detectar la presencia de huevos de estos parásitos. Estas técnicas son de baja sensibilidad en aquellos casos en donde la parasitosis se encuentra en las primeras fases de la infección, no permitiendo un diagnóstico acertado para la implementación de protocolos de tratamientos eficientes. Así mismo, la paramphistomosis intestinal subclínica de los animales es probablemente más importante que los brotes ocasionales que producen mortandad, debido a que la forma migratoria del parásito tiende a insertarse en la mucosa intestinal causando la pérdida de apetito del animal, y en ocasiones a una total anorexia. Por el contrario, los trematodos adultos fijados a la mucosa del rumen originan trastornos clínicos menores que las fases juveniles migrantes [15]. En este sentido, se planteó el presente estudio para purificar proteínas antigénicas obtenidas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum*, a ser usadas en la detección de anticuerpos contra el parásito presente en el suero de bovinos infectados, y establecer un punto de partida para los estudios epidemiológicos necesarios para esta enfermedad en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de parásitos adultos

Las formas adultas de *C. cotylophorum* fueron extraídas del rumen de bovinos (Bovinae) naturalmente infectados, beneficiados en el Matadero Industrial de Barquisimeto, Estado Lara (MINCO). Se recolectaron 1200 parásitos que fueron colocados en envases con tapa, en medio Minimum Essential Eagle (MEM). Los parásitos fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS, Phosphate Buffered Saline: 137 mM de 80 g de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,8 mM de KH₂PO₄, 10 mM de Na₂HPO₄ en agua bidestilada y a pH 7,2), hasta eliminar todos los restos de pasto contenidos en el hospedador, se realizó la caracterización morfológica por: tamaño, forma, presencia de la ventosas oral, genital y acetabular, para la identificación del parásito, según clave de [16].

Obtención de Controles positivos a *C. cotylophorum* de bovino

Se seleccionó una finca en el estado Falcón con una población bovina de 100 animales. Se tomó muestras de heces directamente del recto a 30 animales, las muestras fueron trasladadas en cava con geles de refrigeración a la Unidad de Investigación de Parasitología Veterinaria (UNIPV) del Decanato de Ciencias Veterinarias, UCLA, donde fueron procesadas utilizando la técnica cualitativa de sedimentación y tamizado; los animales que resultaron positivos a *C. cotylophorum* se identificaron y posteriormente se les tomó muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención del suero positivo a *Cotylophoron*. Este suero se conservó en tubos de 1,5 mL a -30°C (Revco, USA) hasta su uso en los inmunoensayos.

Obtención del antígeno de excreción y secreción de *C. cotylophorum*

Los antígenos de excreción-secreción de *C. cotylophorum* (Cc E/S), se obtuvieron mediante su cultivo in vitro, en medio Minimum Essential Eagle (MEM) (Sigma®), USA [13, 17]. Se colocaron 200 parásitos adultos por frasco de cultivo, en un total de 6 frascos de 125 cm³ (Falcon, USA), con 30 mL de medio de cultivo MEM, luego se incubaron a 37 °C durante 16 horas estufa (Precisión, Thelco, USA). Los parásitos fueron removidos del medio y el material insoluble fue centrifugado a 12000 x g durante 15 minutos (Hermle- Laortechnik, Z400, Germany) para recuperar el contenido proteico. El sobrenadante fue concentrado aproximadamente 80 veces usando filtros Amicon Ultra® 15 para centrifuga (10.000 limite peso molecular nominal). La concentración proteica se determinó empleando el método de Biuret [18]. Los

antígenos se mantuvieron a -20°C (Revco, USA), hasta su uso.

Concentración de las proteínas *C. cotylophorum*

Para determinar la concentración de proteínas, se seleccionó el método de Biuret, por ser un método específico para proteínas, con un rango de sensibilidad apropiado para determinación de proteínas antigénicas (1 a 10 kDa) y por no presentar interferencias con detergentes no iónicos, utilizados durante el proceso de extracción y purificación. Se construyó una curva a partir de una solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) a 10 mg/mL, diluido en agua a diferentes concentraciones (5, 4, 3, 2 y 1 mg/mL) y se comparó con las soluciones de proteínas del antígeno de E/S de *C. cotylophorum*. La concentración se determinó por interpolación en la curva patrón, de los valores de absorbancia a 540 nm obtenidas en un espectrofotómetro (Thermo, INC, USA).

Identificación de las proteínas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum*

La identificación se realizó por medio la técnica de SDS-PAGE en mini geles (8x7x1,5 mm, BIORAD), con una concentración de poliacrilamida al 12%, según el método descrito previamente [19]. Se mezcló 10 µL de los extractos proteicos con el buffer de corrida (60mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% glicerol, 2% dodecil sulfato de sodio (SDS), 14 mM mercaptoetanol, y 0,1% de azul de bromofenol). La corrida se llevó a cabo a 100 voltios por 40 minutos en una cámara de mini geles (BioRad Minicell, USA). El gel se sumergió 1 hora en una solución de azul de Coomassie (G-250 al 0,1 %) filtrado, con 50 % de Metanol y 10% de Ácido Acético en agua bidestilada. El gel se decoloró con una solución de metanol al 40 %, hasta ver las bandas, y se fijó en agua bidestilada. Los resultados fueron visualizados realizando una comparación de bandas con el marcador Pierce Blue Mix para proteínas (Pierce Technology, USA).

Obtención de suero hiperinmune a partir de las proteínas purificadas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum*

Se utilizaron 2 conejos hembras (*Oryctolagus cuniculus*), de 1,5 Kg, y fueron inoculadas con la proteína purificada por ultra filtración del producto de E/S de *C. cotylophorum* a una concentración de 8,5 µg/mL. Una de las conejas se utilizó como control, usando un inóculo con sólo el adyuvante. Las primeras 24 horas se observó al animal para determinar presencia de fiebre o decaimiento. Las siguientes inoculaciones se realizaron de la misma manera siguiendo el esquema de inmunizaciones como se detalla en la Tabla 1. La obtención del suero se realizó

Proteínas antigénicas de *C. cotylophorum*

directamente del corazón, el día 21 post inoculación, para obtener el suero, que se conservó a -20 ° (Revcó, USA), hasta su uso.

Días	Inóculo	Antígeno	Desangrado	Cantidad
0	Primer	AIF	0	0
7	Segundo	AIF	0	0
14	Tercer	AIF	0	0
21	Cuarto	0	X	10 ml

AIF (adyuvante incompleto de Freund's)

Tabla 1. Esquema de inmunizaciones con las proteínas purificadas del producto de E/S de *C. cotylophorum*.

El manejo de las conejas se realizó bajo las Normas del código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT en el capítulo tres [20].

Determinación la antigenicidad de las proteínas purificadas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum*

Las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa de 0,45 mm utilizando el método descrito por [21], modificado. Los geles obtenidos por SDS-PAGE de los extractos proteicos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa humedecidas con tampón de transferencia (25 mM de Tris-HCl, 20% de metanol y agua bidestilada). La transferencia se realizó a 100 voltios y 150 mA durante 30 min a 4°C (MiniCell BIO-RAD). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 3% en buffer TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4) en agitación durante 30 min a temperatura ambiente y lavada con TBS-Tween 20 por 5 min. Se incubaron por 45 minutos en agitación con el suero de bovinos positivos a *C. cotylophorum* y suero de conejo inoculado con el extracto proteico de los productos de E/S de *C. cotylophorum*, diluidos 1/50 en TBS-Tween (TBS pH 7,5, 0,05% Tween 20; 1% gelatina). Las membranas se lavaron tres veces con buffer (TBS, pH 7,5, 0,05% Tween 20) e incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario (anti-IgG bovino y anti-IgG conejo conjugado a Peroxidasa) diluidos en TBS-Tween con una dilución 1/ 1500. Las membranas se lavaron 3 veces y se les añadió una mezcla fresca de 10 mL al 0,3% de 4-cloro-1-naftol en metanol y 50 mL de TBS con 30 ml de 30% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las reacciones se detuvieron sumergiendo las membranas en agua destilada. El revelador usado para el suero bovino y de conejo se preparó a base de una solución colorimétrica de 5-bromo-4-cloro-3-indolil phosphate/Nitroblue Tetrazolium (BCIP/NBT) (BIO RAD).

RESULTADOS

Obtención de proteínas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum*

Las proteínas del producto de E/S de *C. cotylophorum*, se obtuvo del sobrenadante producto del cultivo de 1200 especímenes del parásito en 6 frascos de cultivo (200 por frasco) en medio mínimo esencial (MEN), los cuales fueron recolectados de bovinos beneficiados en el matadero municipal (MINCO). La concentración de las proteínas totales se realizó con la construcción de una gráfica patrón usando proteínas de concentración conocida para obtener el valor por interpolación de los valores de absorbancia a longitud de onda de 545 nm, según se describe para el método de Biuret. El contenido de proteínas en la muestra, se estimó en 1,7 µg/mL, y al multiplicarlo por el factor de dilución igual a 10 (dilución que se usó para la medición de la absorbancia, 1:10), la concentración de proteínas totales del producto de E/S de *C. cotylophorum* purificado, se calculó en 17 µg/mL (Figura 1), donde se construyó una curva patrón con diluciones de albúmina de suero bovino (BSA), preparado a 28 mg/mL, en agua bidestilada. Las concentraciones usadas fueron 5, 4, 3, 2 y 1 mg/mL y se comparó con la absorbancia de las proteínas del antígeno de secreción y excreción de *C. cotylophorum*, diluido 1:10 en agua bidestilada. La concentración se determinó por interpolación de los valores de absorbancia a 540 nm con un espectrofotómetro (UV LAB, Uvitec, USA), usando el software UV Lab según especificaciones de la casa fabricante.

Identificación de proteínas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum*

El análisis del preparado antigénico de los productos de E/S de *C. cotylophorum* en una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie, permitió corroborar la efectividad de la purificación, así como caracterizar las diferentes proteínas presentes en el preparado, basado en los pesos moleculares de cada proteína y la intensidad de cada banda. Se pudo observar un patrón de corrida de proteínas desde los 10 a 200 kDa aproximadamente (Figura 2).

Determinación de la antigenicidad de las proteínas purificadas

Las proteínas antigénicas del producto de E/S de *C. cotylophorum* fueron determinadas con el suero hiperinmune de conejo inmunizado con el extracto proteico purificado de *C. cotylophorum*, en un Western Blot. Se observó la presencia de bandas comprendidas en un rango de peso molecular entre 17 y 121 kDa. El revelado inmunoenzimático del Western Blot permitió detectar nueve bandas con los siguientes pesos moleculares: 17, 24, 43, 56, 62, 76, 83, 105 y 121 kDa

(Figura 3 y Figura 4), carriles 3 y 4. El suero de 4 bovinos positivos a *C. cotylophorum* por diagnóstico coparásitológico fue comparado con el suero hiperinmune de conejo en la Western Blot y lograron reconocer solo tres bandas, 62, 76 y 105 KDa, de las nueve que reconoció el suero de conejo inmunizado, ninguno logró reconocer las bandas de 17, 24, 43, 56, 83 y 121 KDa (Figura 3), carriles 6, 7, 8 y 9). El suero

de conejo inoculados con las proteínas purificadas de *C. cotylophorum* y los sueros de bovinos positivos al parásito, coincidieron en identificar 3 bandas (62, 76 y 105 KDa), en el Western Blot, lo cual demuestra su capacidad como marcador antigénico para ser usado en una prueba diagnóstica.

FIGURA 1. Curva patrón con diluciones de albúmina de suero bovino (BSA), para determinar la concentración de proteínas.

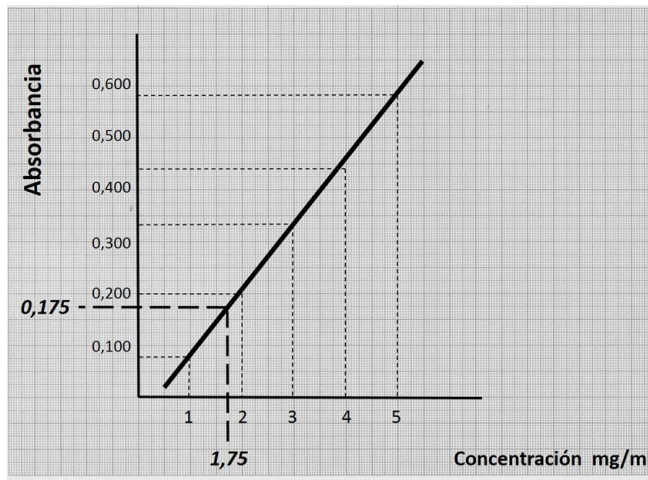
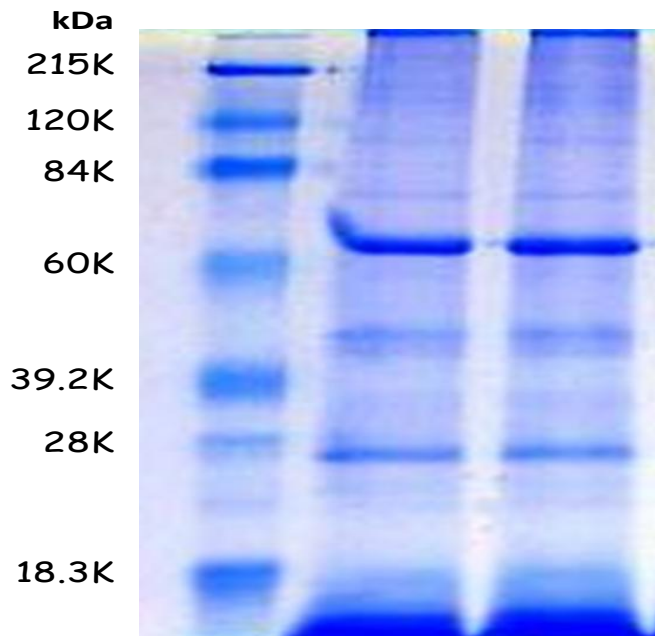


FIGURA 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% teñido con Azul de Coomassie. Donde se evidencia un patrón de corrida de proteínas desde los 10 a 200 kDa aproximadamente



Proteínas antigénicas de *C. cotylophorum*

FIGURA 3. Western Blot de las proteínas purificadas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum* usando suero de conejo inmunizado. En el carril 1, se muestra el marcador de peso (PIERCE), a concentración recomendada por el fabricante; en el carril 2, se muestra las proteínas totales teñidas con azul de Coomassie; el carril 3 y 4, muestran las bandas de proteínas que reaccionan con los anticuerpos específicos presentes en el suero de conejo inmunizado. Se muestran los valores de peso molecular (kDa) del marcador de las proteínas y las bandas obtenidas.

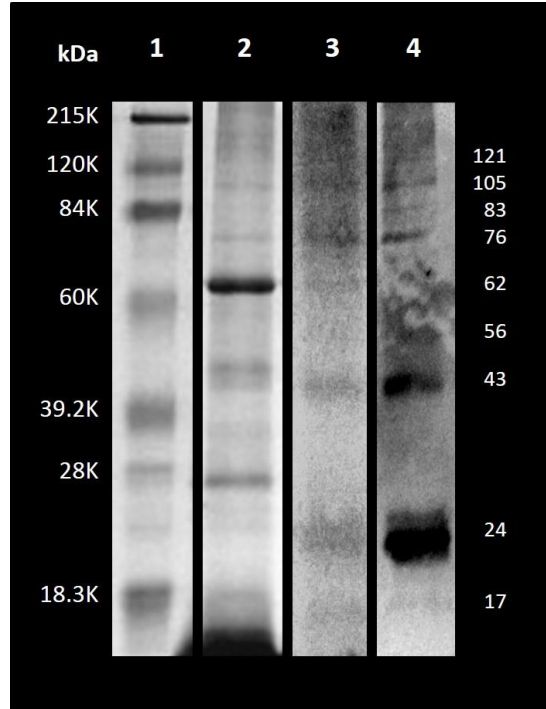
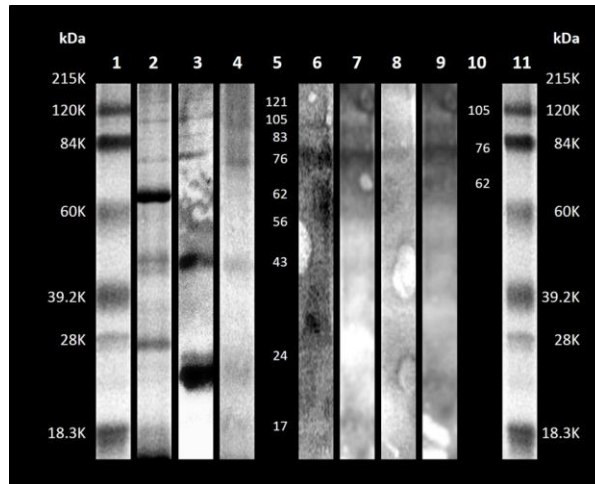


FIGURA 4. Western Blot de las proteínas purificadas del producto de excreción y secreción de *C. cotylophorum* usando suero de bovinos. En los carriles 1 y 11, se muestran los marcadores de peso (PIERCE) según especificaciones del fabricante; en el carril 2, se muestra las proteínas totales teñidas con azul de Coomassie; el carril 3 y 4, muestran las bandas de proteínas que reaccionan con los anticuerpos específicos presentes en el suero de conejo inmunizado. El carril 5 muestra los valores en KDa de las bandas inmunoreaccionantes; los carriles 6, 7, 8 y 9, muestran las bandas inmunoreactivas usando el suero de bovinos positivos al examen coprológico. El carril 10, muestra los valores de las bandas reactivas con el suero bovino. Los carriles señalados como PM muestran los valores de peso molecular del marcador de las proteínas.



DISCUSIÓN

El perfil antigénico de las proteínas de E/S de *C. cotylophorum*, reveló al Western Blot, usando sueros hiperinmunes de conejos, nueve componentes inmunoreactivos con pesos moleculares estimados de 17, 24, 43, 56, 62, 76, 83, 105 y 121 kDa. Los componentes antigénicos con mayor inmunoreacción fueron los antígenos de 24 y 43 kDa, datos similares al encontrado en diferentes aislados de *Fasciola hepatica* en humanos y ovejas, de diferentes regiones geográficas [22, 23, 24]. Se han considerado para uso en diagnóstico serológico las bandas de 17 y 23 kDa detectadas con sueros de humanos positivos a fasciolosis y no con los sueros de otras parasitosis [13, 25, 26]. En estudios realizados en ratas, se encontró que la banda de 23 kDa se detectaba en los sueros desde la primera semana de infección con *Fasciola hepatica* y se mantenía aún después de iniciada la ovoposición [27].

También se ha encontrado que aplicando la electroinmunotransferencia usando antígenos de E/S de *Fasciola hepatica*, se detectaron dos polipéptidos antigénicos, uno de 17 kDa y otro de 63 kDa; sin embargo, este último presentó reactividad cruzada con otras parasitosis, lo que sugiere que el antígeno de 17 kDa identificado con sueros de pacientes con más de un año de infección. Esta proteína representa un excelente candidato para el diagnóstico de la fasciolosis aguda y crónica, y pudiera ser específico para esta parasitosis [26]. Aunque en el presente estudio se logró evidenciar una banda de 17 kDa para *C. cotylophorum*, la misma no reviste importancia inmunitaria para su uso diagnóstico.

En este estudio se encontró que la banda de 24 kDa evidenció una mayor inmunoreactividad cuando se utilizó el suero hiperinmune de conejo, sin embargo, esta banda no se evidenció cuando se usó el suero de bovinos naturalmente infectados. Escalante et al. en el 2011 [13], encontraron una banda de 23 kDa en todos los sueros que dieron reacción serológica positiva a *Fasciola hepatica*, mientras que otros trabajos reportan una banda de 24 kDa, que podría ser la misma, diferenciándose por la determinación de los pesos moleculares. Esta banda es producto de excreción-secreción de *F. hepatica*, propia del tegumento del parásito que parece formar parte de las células tegumentales y gránulos tipo 1 y tipo 2 (T1 y T2) presentes en los estadios inmaduros y adultos del trematodo, respectivamente [27, 28], lo que indica que esta proteína es una de las más importantes en la respuesta inmune para *F. hepatica* [30]. Los resultados de este estudio coinciden con la inmunodominancia del polipéptido de 24 kDa cuando es reconocido por el suero hiperinmune producido en conejo, pero no evidencia utilidad en el diagnóstico al utilizarlo con sueros proveniente de animales naturalmente

infectados (positivos al examen coproparasitológico). Esta observación puede deberse al recambio tegumentario que sufre el parásito durante su desarrollo dentro del huésped, el cual es utilizado como un importante mecanismo de evasión inmunitaria del parásito, tal y como se estudió en *F. hepatica* [31, 32]. Para el diagnóstico de *F. hepatica* se han descrito los polipéptidos de 17 kDa y 23 a 28 kDa como específicos, a diferencia de los de mayor peso molecular, para los cuales se reporta reacción cruzada con sueros de animales infectados con *Schistosoma mansoni* y *Trichinella spiralis* [24, 33]. Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos por [24], demostraron que la mejor preparación entre tres ensayadas, tanto por ELISA como por Western Blot, es la compuesta de moléculas mayores de 50 kDa, retenidas cuando son ultrafiltradas con la membrana YM-50. En el presente trabajo de investigación los polipéptidos de 62, 76 y 105 kDa, son los únicos reconocidos por los sueros de bovinos infectados naturalmente, especialmente la proteína de 76 kDa que presenta una mayor inmunoreactividad, por lo que podríamos suponer que resultan mejores antígenos para el diseño de una prueba serológica. Este antígeno inmunodominante de 76 kDa, también fue detectado al usar el suero de conejos pero en menor proporción. Una posible explicación para esta observación puede ser el recambio que ocurre en las diferentes proteínas contenidas en los gránulos secretores durante el tránsito del parásito inmaduro y el adulto, así como las diferencias encontradas en el reconocimiento de diferentes grupos de bandas según el curso de la infección [31, 34]. Estudios donde se evaluó la detección de proteínas de excreción y secreción usando sueros de individuos en fase aguda y crónica, infectados con *Trypanosoma cruzi*, *Fasciola hepatica*, *Leishmania* y *Toxoplasma gondii*, demostraron que el reconocimiento de proteínas de diferentes pesos moleculares puede depender del estadio de la infección [35, 36, 37, 38, 39]. Futuros estudios utilizando las proteínas fraccionadas de E/S de *C. cotylophorum*, pueden ayudar a determinar la utilidad diagnóstica de cada proteína en una prueba serológica.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se logró purificar antígenos de E/S de *C. cotylophorum*, y por Western Blot se identificaron nueve componentes inmunoreactivos con pesos moleculares estimados de 17, 24, 43, 56, 62, 76, 83, 105 y 121 kDa, usando sueros hiperinmunes de conejos. Los tres antígenos 62, 76 y 105 kDa, inmunoreactivos con el suero de bovinos positivos al examen coproparasitológico a *C. cotylophorum*, podrían utilizarse en el desarrollo de pruebas diagnósticas para describir áreas enzoóticas en

Venezuela, así como también, probar su capacidad como antígenos inmunizantes en las diferentes especies animales susceptibles..

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA) por el apoyo financiero a través del proyecto 005-VE-2012, y al Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chavez K, Queila S, Olivares R, Montiel N. Prevalencia de distomatosis hepática en fincas del distrito Mara del estado Zulia. *Vet Trop* 1979; 4(1): 52-63.
- [2] Marquez D. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Rev CORPOICA* 2003; 4(1): 55-71.
- [3] García I, Muñoz B, Aguirre A, Polo I, García A, Refoyo P. Manual de laboratorio de Parasitología. Introducción a los Helmintos. Trematodos. Reduca (Biología). *Serie Parasitología* 2008; 1(1): 67-93.
- [4] Sanabria R, Romero J. Review and update of paramphistomosis. *Helminthologia* 2008; 45(2): 1-5.
- [5] Khatoun N, Mujib B, Mirza S. Histological changes in the liver of buffaloes by digenetic trematode *Paramphistomun cervi*. *Pakistan J Biol Sc* 2003; 6(17): 1540-1543.
- [6] Muro A, Ramajo M. Parafistomosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo FA. (Eds). *Parasitología Veterinaria* 2002; 3ª Edición, Madrid: McGraw-Hill Interamericana. p. 225-228.
- [7] Singh D, Lakra P. Pathologic changes in naturally occurring *Cotylophoron cotylophorum* infection in cattle. *Am J Vet Res* 1971; 32: 659-663.
- [8] Benedek L. Examination of liver fluke eggs with sedimentation technique. *Allatorov Lapak*, 1946; 66:139-140.
- [9] Ibarra F, Montenegro N, Vera Y, Boulard C, Quiroz H, Bautista C, Vázquez C. DIG-ELISA: Estandarización y evaluación serodiagnóstica en fasciolosis bovina experimental y natural. *Vet Méx* 1997; 28(1): 7-12.
- [10] Torrel P. Detección de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ovinos y bovinos mediante un método de ELISA. *Rev Invest Pec IVITA*. 1997; 6(1): 74-78.
- [11] Hillyer G, De Galanes S, Rodríguez J, De Lagrava, M, Ramírez S, Bryan R. Use of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST ELISA) and the Enzyme-linked Immunotransfer Blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 603-609.
- [12] Cordova M, Reategui L, Espinoza JR. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(1): 54-57.
- [13] Escalante H, Davelois K, Ortiz P, Rodríguez H, Díaz E, Jara C. Estandarización de la técnica de Western Blot para el diagnóstico de la Fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. *Rev Per Med Exp Salud Públ* 2011; 28(3): 454-61.
- [14] Higueta E, Muñoz D, Marín M, Velásquez L. Aproximación al diagnóstico serológico de la infección causada por *Cotylophoron* sp en Colombia. *Rev Colomb Cs Pec* 2007; 20: 4-6.
- [15] Dorchies P, Lacroux C, Levasseur G, Alzieu J. La paramphistomose bovine *Bull. Group Tech. Vét* 2002; 13:13-16.
- [16] Alarcón E, Velásquez L. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rionegro, Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cs Pec* 2009; 22:168-177.
- [17] Sarimehmtoglu, H. Application of Western blotting for the immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle using excretory/secretory antigens. *Turkish J Vet Anim Sci* 2002; 26: 1061-1065.
- [18] Fine J. The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine. *Bioch J* 1935; 29(3): 799-803.
- [19] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970; 227:680-685.
- [20] FONDO NACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (FONACIT). Norma para utilización de animales en investigación. En: Código de Bioética y Bioseguridad. Capítulo 3. Tercera edición. Caracas, Venezuela, 2009; p. 33-35.
- [21] Tsang V, Peralta J, Simons A. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Meth Enzymol* 1983; 92: 377-391.
- [22] Ruiz M, Arriaga C, Bautista C, Morilla A. *Fasciola hepatica*: characterization of somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. *Rev Latinam Microbiol* 1993; 35(3): 301-307.
- [23] Sampaio M, Da Costa J, Da Costa A, Pires M, Lopes S, Castro A, Monjour L. Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(2): 146-148.
- [24] Colmenares C, Méndez L, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B. Antígeno excreción-secreción de *Fasciola hepatica*: ultrafiltración y aplicación en

inmunodiagnóstico. Acta Bioquímica Clín Latinam 2007; 41 (2): 259-266.

[25] Espino, A., Borges, A., Duménigo, B. Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. Pan Am J Public Health 2000; 7(4): 225-231.

[26] Hillyer GV, Soler de Galanes M, Delgado Azañero E. Immune diagnosis of human fasciolosis in children from Cajamarca, Peru. Parasitol al Día 2001; 25 (3-4): 21-25.

[27] Diaz A, Li-Elias O, Otero O, Garcia C, Espino AM. Identificación, mediante Western blot, de inmunógenos de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. Rev Cub Med Trop 1998; 50:12-17.

[28] Miranda, M., García Z. Aislamiento e identificación in situ de antígenos de *Fasciola hepatica*. Vet Méx 1994; 25(3): 267-271.

[29] Knobloch J. Human fascioliasis in Cajamarca/Perú. II. Humoral antibody response and antigenemia. Trop Med Parasitol 1985; 36(2): 91-93.

[30] Cornejo H, Oblitas F, Cruzado S, Quispe W. Evaluación de una prueba de ELISA con antígeno metabólico de *Fasciola hepatica* para el diagnóstico de fasciolosis humana en Cajamarca, Perú. Rev Per Med Experm Salud Pública 2010; 27(4): 569-574.

[31] Hanna R. *Fasciola hepatica*: an immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. Experm Parasitol 1980a; 50: 155-170.

[32] Hanna R. *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for the protection against host immunity. Experm Parasitol 1980b; 50:103-114.

[33] Fredes F, Alarcón J, Ilabaca P, Alcaíno H. Evaluación diagnóstica de dos proteínas purificadas de *Fasciola hepatica* mediante ELISA en fasciolosis ovina. Parasitol Latinam 2003; 58:148-151.

[34] Gomes, Y.; Pereira, V.; Nakazawa, V.; Rosa, D.; Barros, M.; Ferreira, A.; Silva, E., Ogatta, S.; Krieger, M. y Goldenberg, S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96:497-501.

[35] Nakazawa M, Rosa D, Pereira V, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Neves MD, Barros DS, Abath FGC and Gomes YM. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas Disease, Clin Diag Lab Immunol 2001; 8(5): 1024-1027.

[36] Santarém N, Silvestre R, Tavares J, Silva M, Cabral S, Maciel J and Cordeiro-da-Silva. 2007. Immune response regulation by *Leishmania* secreted and nonsecreted antigens. J Biomed Biotechnol 2007; 85154. <http://doi.org/10.1155/2007/85154>

[37] De Almeida MA, Ferreira MB, Planchart S, Terashima A, Maco V, Marcos L, Gotuzzo G, Sánchez

E, Náquira C, Scorza JV and Incani RN. Preliminary antigenic characterisation of an adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected human sera. Rev Instit Med Trop São Paulo 2007; 49(1): 31-35.

[38] Barbosa PR, Ferreira AW. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. Rev Socied Brasil Med Trop 2008; 41(2): 142-147.

[39] Marcilla, JE De la Rubia, J. Sotillo, D. Bernal, C. Carmona, Z. Villavicencio, D. Acosta, J. Tort, FJ. Bornay, JG. Esteban, and R. Toledo. Leucine Aminopeptidase Is an Immunodominant Antigen of *Fasciola hepatica* Excretory and Secretory Products in Human Infections. ClinVacc Immunol 2008; 15(1): 95-100.