

EFFECTO MITOGENICO DE LOS ANTIGENOS SOMATICO Y DE EXCRECIONES/ SECRECIONES DE *Fasciola hepatica* ADULTA SOBRE LINFOCITOS NORMALES DE RATON BALB/C ^a

Carlos R. Bautista Garfias ^b

Mayolo Garrido Pérez ^c

RESUMEN

Se evaluó la capacidad mitogénica de los antígenos somático (AS) y de excreciones/secreciones (ES) de *Fasciola hepatica* adulta en linfocitos normales de ratón BALB/c. Se ensayaron concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 µg/ml de cada uno de los antígenos, así como 2 µg/ml de Concanavalina A (Con A) y 200 µg/ml de Lipopolisacárido (LPS) en linfocitos. Estos, fueron mantenidos en cultivo por 72 horas y la proliferación se midió determinando las cuentas por minuto, después de pulsar las células con timidina tritiada, en un contador de centelleo. Con el ES se observó efecto mitogénico a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml ya que presentaron índices de estimulación (I.E.) de 2.9, 3.2 y 3.7 respectivamente; y con el AS sólo a la concentración de 10 µg/ml (I.E. = 2.4). La Con A y el LPS mostraron I.E. de 108.8 y 13.6 respectivamente. Los resultados sugieren que el antígeno ES de *F. hepatica* adulta pudiera funcionar como activador policlonal de linfocitos, contribuyendo a que el parásito evada la respuesta inmune del huésped.

PALABRAS CLAVE: Antígenos de *Fasciola hepatica*, Inmunosupresión, Linfoproliferación.

Tec. Pecu. Mex. Vol.33 No.1, (1995)

Fasciola hepatica es un parásito que como otros emplea diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped, llegando en ocasiones a parasitar al huésped durante varios años sin que exista un mecanismo inmunitario capaz de eliminar al trematodo, como es el caso de los ovinos. En fasciolosis se han descrito varios mecanismo de inmunoevasión, entre los que destacan la inmunosupresión, depleción de los niveles normales de complemento, recambio de antígenos de superficie y antigenicidad compartida con el huésped (1).

Por otro lado, para desarrollar métodos inmunológicos de control, es menester comprender los mecanismos que utilizan los

parásitos para evadir la respuesta inmune. En este sentido, se ha demostrado que ovinos parasitados en forma natural por *F. hepatica*, presentan complejos inmunes circulantes, los cuales han sido involucrados en la inmunosupresión del huésped (2). Similarmente, ratones NIH, inoculados por vía intraperitoneal durante siete días seguidos con antígeno de excreciones/secreciones de *F. hepatica* adulta, presentan una respuesta inmune deprimida determinada por medio de la cuantificación de células formadoras de placa (prueba de Cunningham) a un antígeno timo-dependiente (eritrocitos de carnero), en comparación con la de animales inoculados de manera semejante, con solución salina fisiológica (3). En un trabajo similar, pero en ratones CD1 inoculados por vía intraperitoneal con glicocálix de *F. hepatica* adulta, se observó una respuesta deprimida en el título de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero, en comparación con la de animales

a Recibido para su publicación el 31 de octubre de 1994.

b Proyecto Fasciolosis. Departamento de Inmunología, INIFAP-SAGDR, México, D.F. Dirección actual: CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP-SAGDR, A. P. 206 CIVAC 62500, Estado de Morelos, México.

c Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D. F.

tratados con solución salina (4). En este orden, también se observó una respuesta inmune primaria disminuida a eritrocitos de pollo en ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica* a diferencia de la respuesta observada en animales no infectados (5). Otro mecanismo de inmunoevasión de los parásitos es la activación policlonal de linfocitos, que se ha descrito en algunas enfermedades parasitarias, como paludismo y tripanosomiasis (6) el cual no se conoce bien en las infecciones por *F. hepatica*.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si los antígenos somático (AS) y de excreciones/secreciones (ES) de *F. hepatica* adulta tienen efecto mitogénico inespecífico en linfocitos normales de ratón.

Se establecieron cultivos de linfocitos de bazo de ratón normal BALB/c, previamente estandarizados (datos no mostrados), en placas de cultivos celulares de 96 pozos (Nunc, Dinamarca), utilizando medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con HEPES, conteniendo aminoácidos no esenciales, piruvato, glutamina y antibióticos (penicilina, 100 UI/ml y estreptomycinina 100 µg/ml) y 10% de suero fetal bovino. Se sembraron 1×10^6 células/pozo. Se utilizaron como testigos linfocitos sin tratar y células tratadas con Concanavalina A (ConA) (Sigma, Missouri, USA) lipopolisacárido (LPS) (Sigma, Missouri, USA) a concentraciones de 2 µg y 200 µg/ml, respectivamente. También se ensayaron dosis de 10, 50, 100, 250 y 500 µg/ml de los antígenos AS y ES de *F. hepatica*, obtenidos de acuerdo a los métodos descritos, utilizando antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina, 100 µg/ml (7). La cantidad de proteína se determinó utilizando el método de Bradford (8). En ensayos previos de linfoproliferación (datos no mostrados) se observó que ambos antígenos, a concentraciones mayores a 500 µg/ml, fueron tóxicos para los linfocitos. Se efectuaron cuatro réplicas de cada uno de los tratamientos. Los cultivos

fueron incubados a 37 C durante 72 horas en una estufa con 5% de CO₂ y ambiente humidificado; al término de las cuales, los linfocitos fueron pulsados con [³H] timidina (Amersham International, 1 µCi/pozo) de acuerdo al método descrito (9) y se determinó la incorporación de ésta (cuentas por minuto: c.p.m.) en un contador de centelleo (Mark III).

Los resultados obtenidos indicaron que el antígeno ES fue mitogénico a concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml, pues indujeron un índice de estimulación (I. E.) de 3.7, 3.2 y 2.9 respectivamente; mientras que con el AS solo hubo linfoproliferación a una concentración de 10 µg/ml (I.E. de 2.4) (Cuadro 1). A este respecto, se considera que existe estimulación de los linfocitos cuando el I. E. es igual o mayor a 1.5 (9). Los linfocitos tratados con 2 µg/ml de Con A (mitógeno de linfocitos T) (10) y con 200 µg/ml de LPS (mitógeno de linfocitos B) (10) presentan índices de estimulación de 108.8 y de 13.6, respectivamente. Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que los antígenos de *F. hepatica*, básicamente los ES, además del efecto citotóxico para linfocitos y la inhibición de células adherentes a fasciolas juveniles en presencia de suero inmune (11), tienen también un efecto similar a un activador policlonal de linfocitos como lo es el LPS (6), lo que explicaría en parte el porqué los ovinos infectados con *F. hepatica*, a pesar de montar una respuesta inmune específica (por ejemplo, produciendo anticuerpos anti *Fasciola* que no son protectores) éstos son susceptibles a infecciones repetidas (12). En este sentido, la activación policlonal de linfocitos del huésped se ha demostrado en infecciones por protozoarios y helmintos (13) y también se ha señalado que en muchas de éstas (principalmente las causadas por protozoarios) ocurre tanto una activación policlonal como una inmunodepresión (14). Los resultados obtenidos en el presente estudio y la información anterior,

CUADRO 1
EFFECTO DE LOS ANTIGENOS SOMATICO (AS) Y DE EXCRECIONES/SECRECIONES
(ES) DE *Fasciola hepatica* ADULTA SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE
BAZO DE RATON BALB/c *.

TRATAMIENTO	n	cuentas por minuto (c.p.m.)**	
		Promedio ± Error Estándar	INDICE DE ESTIMULACION (I.E)***
Sin tratamiento	4	1442.5 ± 88	--
LPS 299 µg/ml	4	19567.7 ± 1956.6	113.6
Con A 2 µg/ml	4	157011.5 ± 10574	108.8
ES 500 µg/ml	4	941 ± 75.7	0.65
ES 250 µg/ml	4	2059.7 ± 149.6	1.43
ES 100 µg/ml	4	4142.5 ± 987.5	2.87
ES 50 µg/ml	4	4574.2 ± 563.2	3.17
ES 10 µg/ml	4	5407 ± 1359	3.75
AS 500 µg/ml	4	385.5 ± 108	0.26
AS 250 µg/ml	4	1337.5 ± 271	0.92
AS 100 µg/ml	4	1371 ± 30.3	0.95
AS 50 µg/ml	4	1414.2 ± 55	0.98
AS 10 µg/ml	4	3450 ± 429.5	2.39

* 1 x 10⁶ células/pozo

** Se determinó la incorporación de timidina tritiada a las 72 horas de iniciados los cultivos.

*** c.p.m. experimental
c.p.m. control

complementan las observaciones en las que se demostró la presencia de complejos inmunes circulantes (2) y una inmunodepresión a antígenos timodependientes en borregos infectados con *F. hepatica* (5) y en ratones inoculados con antígenos de este trematodo (3). Se sugiere llevar a cabo estudios más detallados para determinar el o los factores de los antígenos de *F. hepatica* responsables del efecto mitogénico informado en este estudio ya que, hasta la fecha, no existe información al respecto.

MITOGENIC EFFECT OF SOMATIC AND EXCRETIONS/SECRETIONS ANTIGENS FROM *Fasciola hepatica* ON NORMAL BALB/c MICE LYMPHOCYTES.

SUMMARY

The mitogenic capacity of somatic (S) and excretions/secretions (ES) antigens from adult *Fasciola hepatica* was evaluated in normal BALB/c spleen lymphocytes. Concentrations of 10, 50, 100, 250 and 500 µg/ml from each antigen and 2 µg/ml of Concanavalin (Con A) and 200 µg/ml of lipopolysaccharide (LPS) were tested in BALB/c spleen lymphocytes. Mouse lymphocytes were cultured for 72 hours and the proliferation was measured in a scintillation counter by determining radioactivity in labeled DNA, after pulsing the cells with [³H] thymidine. The ES showed mitogenic effect at concentrations of 100, 50 and 10 µg/ml having stimulation indexes (S. I.) of 2.9, 3.2 and 3.7 respectively; whereas S antigen showed stimulation only at a concentration of 10 µg/ml (S.I. of 2.4). The Con A and LPS controls responses were 108.8 and 13.6 S. I. respectively. These results suggest that the ES antigen from adult *F. hepatica* may act as a polyclonal activator of lymphocytes, contributing to the evasion of the host immune response by the parasite.

KEY WORDS: *Fasciola hepatica* antigens, Immunosuppression, Linfoproliferation.

REFERENCIAS

1. Bautista G C R. Inmunología de la fascioliasis. En: Morilla A (ed.) Inmunología Veterinaria. Editorial DIANA. México 1989: 242-261.
2. Arriaga C, Ruíz N A, Gómez A, Fraire M, Bautista C R, Morilla A. Complejos inmunes circulantes en ovinos infectados con *Fasciola hepatica*. Rev. Lat. amer. Microbiol. 1987; 29:127.
3. Lebrlja A, Bautista G C R, Morilla G A. Efecto inmunosupresor de *Fasciola hepatica* y sus extractos en roedores. Memoria de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D. F. 1984; p. 245.
4. Martínez C M A. Comparación de los efectos biológicos de los productos de parásitos con los de algunas lectinas vegetales. Tesis Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mor. 1991:44.
5. Bautista G C R, Orozco A M, Morales B E. Modulación de la respuesta de anticuerpos a eritrocitos de pollo en ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*. Rev. Méx. Parasitol. 1988; 1:14.
6. Bloom B R. Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. Nature 1979; 279 (5708):21.
7. Bautista G C R, Morilla A. Métodos de obtención de antígenos. En Morilla A, Bautista G C R (eds.) Manual de Inmunología. Editorial DIANA, México 1986: 37-42.
8. Bradford M M. A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248.
9. Morilla A. Transformación blastoide o incorporación de timidina tritiada. En: Morilla A, Bautista G C R (eds.) Editorial DIANA, México, D. F. 1986:351-361.
10. Kristensen F, Kristensen B, Lazary S. The lymphocyte stimulation test in Veterinary Immunology. Vet. Immunol. Immunopathol. 1982; 3:203.
11. Goose J. Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. Nature 1978; 275:216.
12. Rickard M D, Howell M J. Comparative aspects of immunity in fascioliasis and cysticercosis in domesticated animals. En: Symons L E A, Donald A D, Dineen J K (eds.) Biology and Control of Endoparasites. Sydney: Academic Press, 1982: 343:373.
13. Terry R, Hudson K. Immunodepression in parasitic infections. En: Frank W (ed.) Immune Reactions to Parasites. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1982: 125-139.
14. Lambert P H, Goldman M, Rose L. Immune complexes, polyclonal B cell activation and idiotypic interactions in protozoan diseases. En: Frank W (ed.) Immune Reactions to Parasites. Stuttgart: Gustav Fischer verlag, 1982: 117-124.