

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

ANALISIS ELECTROFORETICO
DE LOS ANTIGENOS DE
ONCHOCERCA VOLVULUS

TESIS

Presentada a la Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

Por

AXEL DIAZ DE LA ROCA

Previo a optar al Título de

MEDICO Y CIRUJANO

PLAN DE TESIS

I. INTRODUCCION

II. INVESTIGACIONES INMUNOLOGICAS SOBRE ON-
COCERCOSIS

III. OBJETIVOS

IV. JUSTIFICACIONES

V. HIPOTESIS

VI. MATERIAL Y METODOS

VII. RESULTADOS

VIII. DISCUSION

IX. CONCLUSIONES

X. RECOMENDACIONES

XI. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

La Enfermedad de Robles u Oncocercosis, es una infección del tejido subcutáneo, la piel y los ojos, debida a la presencia de vermes adultos de *Onchocerca volvulus* y microfilarias, y a la reacción alérgica del hospedero.

En Guatemala existen tres zonas o focos oncocercosos: una en el Departamento de Huehuetenango, la segunda en los departamentos de Suchitepéquez, Sololá, Chimaltenango y Escuintla, y la tercera, en los departamentos de Guatemala y Santa Rosa; en regiones boscosas, de cultivos de sombra, principalmente fincas de café. Los vectores más importantes son el *Simulium ochraceum* y le siguen el *S. metallicum* y el *S. callidum*.

En 1970 se calculaban 56,820 oncocercosos en el país, (Manzo). Lo que demuestra la importancia epidemiológica que aún conserva la oncocercosis en Guatemala.

Los mecanismos de defensa del hospedero en esta enfermedad han sido completamente estudiados, aunque existen ya varios trabajos que han aclarado algunos de sus aspectos. La dificultad en el estudio de las reacciones inmunológicas a la infección por *O. volvulus* se debe a la poca información en cuanto a los componentes antigénicos de este parásito.

El presente estudio pretende lograr la caracterización de los antígenos y anticuerpos de *Onchocerca volvulus*, utilizando la técnica de Electroforesis en Bloque, en un intento por conocer mejor la forma de la relación hospedero-parásito en esta enfermedad.

II. INVESTIGACIONES INMUNOLOGICAS SOBRE ONCOCERCOSIS

La Oncocercosis es una enfermedad que por su naturaleza, constituye un estímulo antigénico para el individuo que la alberga. Desde 1956, cuando Ridley, encontró que las pruebas de fijación del complemento, tienen valor especial para el despistaje de enfermos de oncocercosis (1); sin embargo, dos años más tarde, 1958, La O.M.S. por medio de su Comité de Expertos en Oncocercosis, demostraron que para las investigaciones epidemiológicas, no es recomendable recurrir a reacciones cutáneas practicadas con ayuda de antígenos procedentes de filarias, porque estas pruebas carecen de especificidad, (2). Más tarde, 1963 Peñalver en Venezuela, efectuó reacciones de fijación de complemento, utilizando como antígenos, extractos de nódulos y extractos de vermes de *O. guturosa* (*linealis*), el filárido del ganado, empleando extractos completos y fracciones protéicas. Y concluyó, que es necesario hacer evaluaciones cuidadosas sobre sensibilidad, especificidad, posibilidad de reacciones cruzadas en otras parasitosis, y relación con estados alérgicos. (3).

Casi simultáneamente, en 1964, Calderón en México, partiendo de *O. volvulus*, obtuvo antígenos que resultaron de baja potencia, para obtenerlos satisfactorios utilizó coadyuvantes, pero aún así, los títulos no fueron satisfactorios. Efectuó: a) La reacción de antiglobulina humana en oncocercosos antes y después de producir la reacción de Mazzotti con dietilcarbamazina; b) La precipitación en gel, usando extractos de oncocercas; c) La reacción de Boyden hecha con glóbulos rojos sensibilizados con extractos de oncocercas; d) Estudio de la inmunoadherencia, semejante a la realizada por Newson en casos de esquistosomiasis; d) Absorción comparada de sueros de oncocercosos y de en-

fermos con artritis reumatoide, usando globulina agregada según técnica de Lucasse. Concluyó, que no se pueden demostrar anticuerpos suficientemente específicos para recomendar el empleo de ellos en las reacciones mencionadas. (4).

En 1966 nos encontramos con tres aportes importantes, Woodruff, consideró que las reacciones de fijación del complemento y las de sensibilidad de la piel, "tienen considerable valor diagnóstico, particularmente en pacientes con infecciones ligeras, en los cuales es difícil o imposible demostrar microfilarias". (5). - Luis Gutiérrez Villegas, fue el primero que realizó reacciones de fijación del complemento en sueros de oncocercosos. (6). Salazar Mallén, Escobar Gutiérrez y Calderón, estudiaron previamente la composición porcentual de los grupos sanguíneos O, A, B, y AB en habitantes de la zona oncocercótica de Oaxaca, para encontrar que en el grupo O hubo menos oncocercosos que lo calculado, y que en el grupo A había más oncocercosos que lo previsto. Explicaron que *O. volvulus* contiene un antígeno heterófilo del tipo A de los enfermos. (7).

Un poco más tarde, 1969, Alfred A. Buck, Robert I. Anderson, Kazuyoshi Kawata y James C. Hitchcock Jr., en estudios efectuados en pacientes oncocercosos en la República de El Chad, encontraron que las microfilarias en la orina se encuentran asociadas estrechamente a la intensidad de las infecciones cutáneas, determinadas por conteo de microfilarias en raspado de piel, y con la distancia de las residencias de los habitantes del Río Lin, el único habitat permanente para el *Simulium damnosum* en el área. (8).

En la década de los setenta, Vargas 1973, sugirió, el uso de anticuerpos marcados con radioisótopos que se fijaran en los oncocercosos, fuente de antígenos, uso de ultrasonido y centelleograma. (9). Un año después 1974, Daniel Luis Vargas, efec-

tuó estudios de fijación del complemento, eosinofilia, pruebas de alergia cutánea y el relativo a que la Oncocercosis forma un antígeno heterófilo correspondiente al tipo A de los grupos sanguíneos. Propuso la utilización de anticuerpos marcados con material radiactivo para localizar filarias u oncocercomas de difícil localización. (10).

Finalmente, en 1975, Maselli y González, encontraron que los extractos de filaria y microfilaria son capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos precipitantes tanto en organismo humano como en animales de experimentación. Estudiaron 50 pacientes y encontraron únicamente dos reacciones de precipitación positivas, por lo que consideraron que el método de precipitación en gel de agar para el diagnóstico de Oncocercosis no es práctico, porque reporta muchos resultados falsos negativos. Demostraron, que existen anticuerpos contra *O. volvulus* en pacientes con Oncocercosis. (11).

III. OBJETIVOS

Por medio de la Técnica de Electroforesis en Bloque se intenta lograr la caracterización de antígenos y anticuerpos de *Onchocerca volvulus*.

IV. JUSTIFICACIONES

Dada la importancia epidemiológica de la Oncocercosis y la escasa investigación en el campo inmunológico de esta enfermedad, se justifica la realización del presente estudio, que esperamos contribuya a comprender la enfermedad y su posible control inmunológico.

V. HIPOTESIS

"La caracterización de antígenos y anticuerpos de *Onchocerca volvulus*, si es posible por la técnica de Electroforesis en Bloque".

VI. MATERIAL Y METODOS

Obtención de extracto de *O. volvulus*: Los oncocercomas fueron proporcionados por la Brigada Nacional Anti-Oncocercosis, estos nódulos fueron disecados en el Laboratorio Multidisciplinario de Fase II, de la Facultad de Ciencias Médicas. De los nódulos se extrajeron las filarias adultas y microfilarias, una vez separadas, se procedió utilizando la técnicas de Conrath (12), modificada por nosotros, de la siguiente manera:

- a. A 6.5 ml. de Fosfato sódico de Barbitol, pH 7.4 se agregaron 130 mg. de parásito desecado en frío.
- b. Se trituraron los parásitos hasta que únicamente pequeñas piezas de cutícula quedaron intactas.
- c. Se decantó la suspensión del antígeno en un tubo de ensayo con tapa de rosca.
- d. Se lavó el triturado con 2 ml. de fosfato sódico de barbitol pH 7.4 y se agregó a la suspensión.
- e. Se incubó a 4°C. por 18 horas.
- f. Se calentó en un baño de agua a 56°C por 4 horas.
- g. Se centrifugó a 5,000 RPM por 30 minutos.
- h. Se distribuyó la solución del sobrenadante opalescente en cantidades alícuotas.

La caracterización antigénica de *O. volvulus* se investigó

utilizando el método de electroforesis en bloque, descrito por Kunkel y Slater. (13). Se procedió de la siguiente manera:

A. Preparación del polvo de Pevikon:

1. Se lava con agua desionizada 4 veces; después que el material ha sedimentado, se decanta el supernadante.
2. Se lava 2 veces el Pevikon sedimentado con Barbitol diluido 1:2 (1 parte de Barbitol 0.1 M pH 8.6 + 1 parte de agua desionizada).
3. Luego se descarta todo el supernadante, dejando únicamente el Pevikon sedimentado.

B. Preparación del Bloque de Pevikon:

1. Se corta una pieza de parafilm, que puede encajar dentro de la bandeja a utilizarse, se dejan dos alas para cubrir el bloque una vez esté preparado, esto es para impedir que se seque durante la reacción.
2. Se colocan electrodos de papel estaño en los extremos, deben ser de 3/4 de pulgada, al tope del parafilm.
3. Se vierte el Pevikon con la ayuda de una espátula. Se asegura que esté bien distribuido y que la superficie esté lisa.
4. Oportunamente se seca con papel filtro.

C. Preparación de la Muestra:

Se dializa la muestra con Barbital toda una noche, en cuarto frío. Se utilizan 4 cm. del bloque para una muestra de 1-2 ml.

D. Aplicación de la Muestra:

Se corta un canal de 1 cm. de ancho a través del bloque, pero dejando algo de material cerca de las paredes, después con un poco de material removido y la muestra, se forma una pasta espesa y se aplica al canal.

E. Lugar de Aplicación de la Muestra:

Ya que el Pevikon no está cargado, el lugar de aplicación debe ser muy cerca del extremo negativo de la bandeja (10 cm.). Después de aplicada la muestra, se cubre el bloque con una capa de parafilm, se coloca en posición y principia inmediatamente la carrera de migración.

La reacción se hace en cuarto frío. Se trabaja la muestra a 200 volts. por 18 horas.

Después de la Migración:

1. Se abre la capa de parafilm.
2. Cuidadosamente se remueve el parafilm y se coloca un pedazo de papel o cartón marcado en secciones de 2 cm. Se cortan secciones de 2 cm. y se coloca cada una de ellas en un tubo de teflón.
3. A cada fracción se agregan 4 ml. de Fosfato sódico de Bar

bital pH 8.6, luego se centrifugan a 2,000 RPM por 10 minutos. Los sobrenadantes se extraen con pipetas de Pasteur, y se guardan numerados en viales, (pequeños frascos con tapa de rosca), en refrigeración.

Determinación de Proteínas:

Para el efecto se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu (14), a cada tubo de ensayo, se agrega:

- a. 2.0 ml. de una mezcla de: 100 ml. 2% Na_2CO_3 en NaOH 0.1 N
(preparado en el momento, en el orden dado) 1 ml. 2% de Tartrato de Sodio
1 ml. 2% de CuSO_4
- b. 0.2 ml. de Reactivo de Fenol, diluido 1:3 con Agua Destilada.
- c. 2 gotas de cada fracción de los eluatos del Bloque de Pevikon.

Se mezcla bien invirtiendo los tubos. Se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente, y se lee la densidad óptica en un Espectrofotómetro a 700 mu

Nota: 2% CuSO_4 : 1.56 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml. de Agua destilada.

2% Tartrato de Sodio: 2.37 g de $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml. de Agua Destilada.

Inmunodifusión Simple:

Para pruebas de control, se utilizó la Técnica de Inmunodifusión simple. Para lo cual se prepararon placas de Ochtelony con solución de Agar Noble al 1%, que son las que se utilizan corrientemente en la Técnica de Inmunodifusión en Gel de Agar.

Suero de Conejo-Anti-Oncocerca:

El suero de conejo-anti-oncocerca, fue proporcionado por el Dr. Alejandro Samayoa, y se obtuvo inmunizando conejos con un extracto de oncocerca similar al empleado en el presente trabajo.

VII. RESULTADOS

En la presente investigación se encontró, que los extractos de *O. volvulus* obtenidos en el laboratorio, son susceptibles de análisis, utilizando el método de la electroforesis en bloque.

En la Gráfica No. 1, se puede observar, que el contenido protéico de este extracto se separa en 5 fracciones localizadas en los eloatos 2, 6, 11, 13 y 16 del bloque de Pevikon.

Este análisis repetido en dos oportunidades arrojó los mismos resultados, es decir que en ambas oportunidades se obtuvieron curvas colorimétricas similares, lo que comprueba la confiabilidad del método.

En el análisis inmunológico de las fracciones de la electroforesis en Bloque, se encontró, que las porciones antigénicas del extracto, migraron hacia el cátodo, concentrándose principalmente en la fracción No. 16. Con la foto No. 1, se puede observar, bandas de precipitación entre la fracción No. 16 y el suero de conejo-anti-oncocerca, que se colocó en los pocitos opuestos a cada una de las diferentes fracciones.

La fracción rica "en antígenos" (Fracción No. 16), se reaccionó con el suero de pacientes oncocercosos, encontrando reacciones positivas en un total de 24 sueros utilizados, (100%).

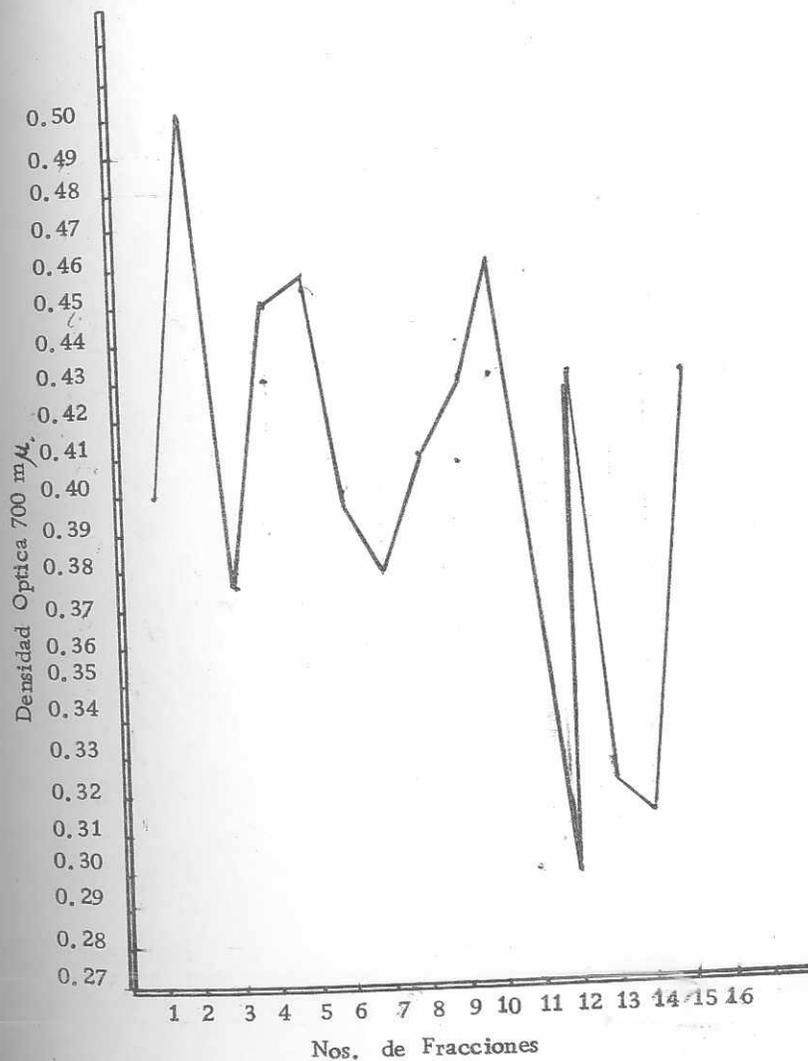
En la foto No. 2, se ilustra un grupo de sueros de pacientes oncocercosos en los pocitos periféricos, y, la fracción rica en antígenos en el centro, en la cual se observan claras bandas de precipitación en todos los casos, lo que demuestra que esta reacción también ocurre en humanos.

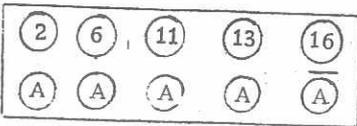
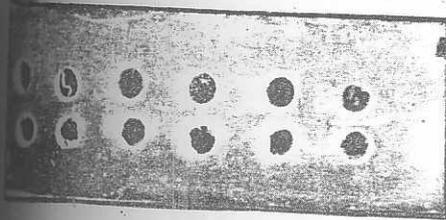
Para asegurarnos de la pureza del extracto de *O.* elaborado, es decir de su carencia de proteína humana, que pudo contaminarlo en el proceso de disección de los oncocercomas, se reaccionó con suero de conejo-anti-humano y un suero humano X, foto No. 3, en la cual se puede apreciar claramente que únicamente existen bandas de precipitación con los pocitos en los cuales se depositó el suero humano X, o sea arriba y abajo, en el centro suero de conejo-anti-humano y a derecha e izquierda el extracto de oncocerca elaborado.

La foto No. 4, ilustra bandas de precipitación muy evidentes, en el centro se depositó suero de conejo-anti-oncocerca y en la periferie cuatro pocitos conteniendo el extracto elaborado. La nitidez de la reacción es evidente.

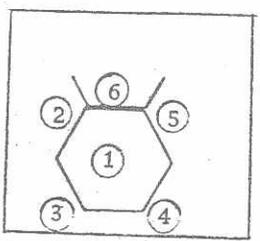
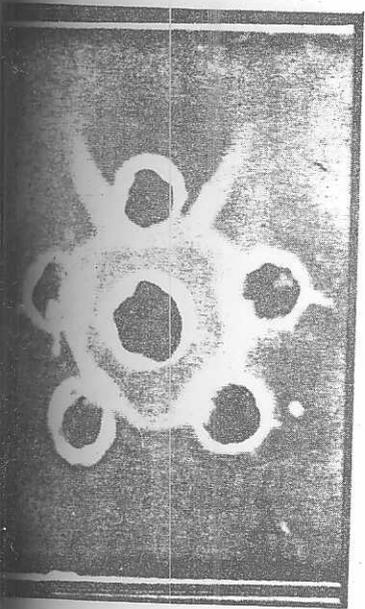
En la foto No. 5, se ilustra todo el aparato utilizado para la reacción de Electroforesis en Bloque, la fuente de poder, la bandeja utilizada, con sus respectivos electrodos conectados a la primera.

Curva Colorimétrica de las Fracciones obtenidas de la electroforesis del extracto de *Onchocerca*

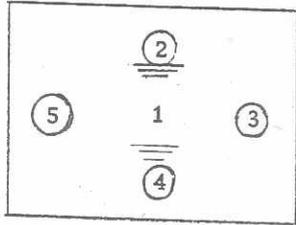
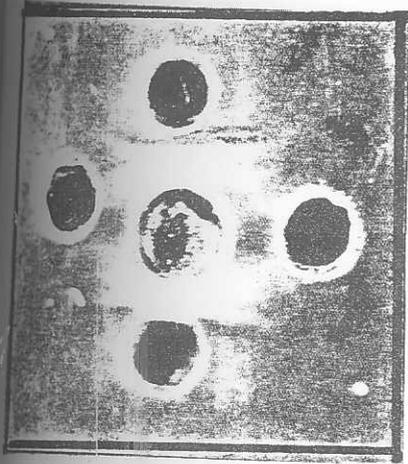




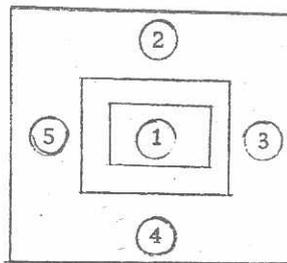
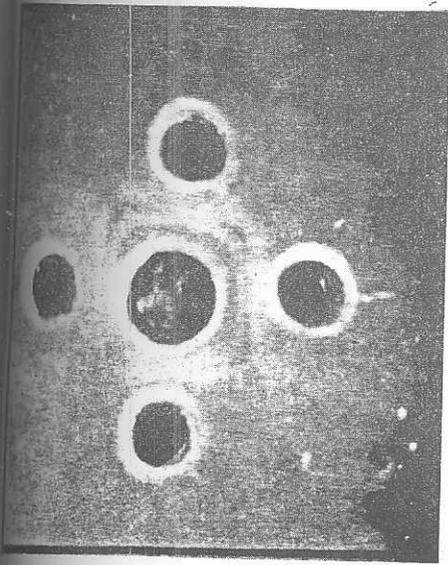
Esquema de Foto No. 1.
 Investigación de Antígenos
 en diferentes fracciones
 (2, 6, 11, 13 y 16), utilizán-
 do suero de Conejo anti-on-
 cocerca (pozos con letra A).



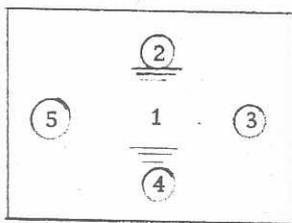
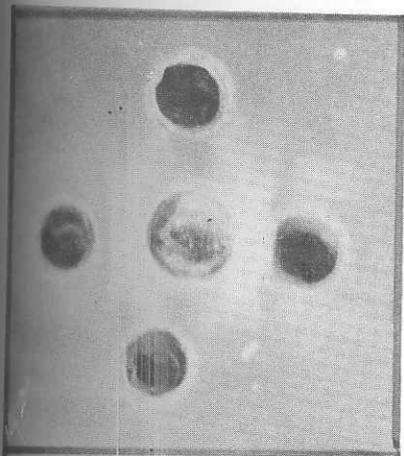
Esquema de Foto No. 2.
 Bandas de precipitación entre
 (1) fracción rica en antígenos
 y (2, 3, 4 y 5), sueros de pa-
 cientes Oncocercosos; (6) sue-
 ro de Conejo Anti-oncocerca.



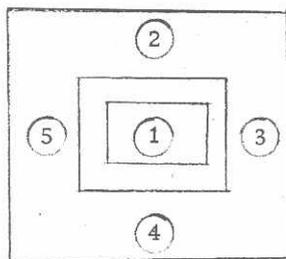
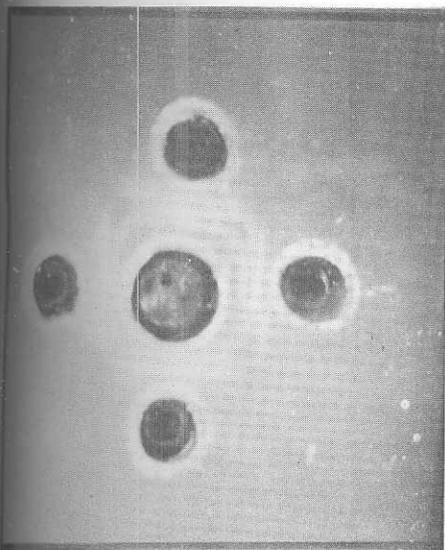
Esquema de Foto No. 3
 Bandas de precipitación
 entre (1) Conejo anti-hu
 mano y (2 y 4) suero hu
 mano X, (3 y 5) extrac-
 to de Oncocerca.



Esquema de Foto No. 4.
 Bandas de precipitación
 entre (1) suero de Cone-
 jo anti-oncocerca y (2,
 3, 4 y 5) extracto de
 Oncocerca.



Esquema de Foto No. 3
Bandas de precipitación
entre (1) Conejo anti-hu
mano y (2 y 4) suero hu
mano X, (3 y 5) extrac
to de Oncocerca.



Esquema de Foto No. 4.
Bandas de precipitación
entre (1) suero de conejo
anti-oncocerca y (2, 3, 4
y 5) extracto de oncocer
ca.

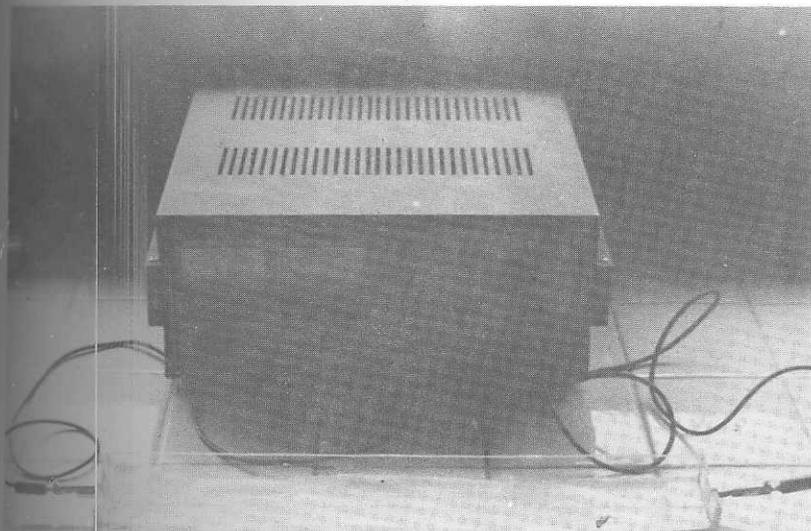


Foto No. 5.

Aparato de Electroforesis en Bloque,
la fuente de poder, la bandeja utili-
zada con sus respectivos electrodos.

VIII. DISCUSION

El presente trabajo contribuye al análisis de antígenos de *Onchocerca volvulus*. El hecho de que el extracto de *O. volvulus* se separe electroforéticamente, facilita el aislamiento de fracciones ricas en antígeno para su estudio posterior. Aunque sabemos que en el fraccionamiento realizado, la fracción rica en antígeno contiene otros componentes que se comportan electroforéticamente igual.

El uso de suero de conejo-anti-oncocerca, facilita la identificación de las fracciones que contienen la mayor cantidad de antígenos, el hecho de utilizar suero de conejo anti-oncocerca, en esta reacción, podría adversarse, pensando que el conejo identifica antígenos en una forma diferente que el humano. Sin embargo, utilizando nuestra fracción rica en antígenos encontramos anticuerpos precipitantes contra los mismos en el 100% de los pacientes oncocercosos.

Este hallazgo en humanos es diferente del reportado por Maselli y González (15), quienes encontraron anticuerpos precipitantes contra la oncocercosis en un porcentaje muy bajo de pacientes. Creemos que la purificación del antígeno por el método de la electroforesis en bloque, es la responsable del aumento considerable de reacciones positivas encontradas.

El hallazgo de que se mejora la calidad antigénica de un extracto al fraccionarlo, por medio de la electroforesis en bloque, facilita a la vez, la evaluación de anticuerpos en pacientes oncocercosos, que aparentemente no tienen nódulos.

Antes de descartar, si estos hallazgos tienen la importan-

cia que creemos, deben hacerse estudios posteriores para establecer la especificidad de la reacción, ya que algunos autores han descrito reacciones cruzadas, principalmente con parásitos intestinales.

IX. CONCLUSIONES

1. Los extractos de *Onchocerca volvulus* pueden ser analizados utilizando el método de la Electroforesis en Bloque de Pevikon, con lo cual se comprueba la hipótesis formulada.
2. En el análisis antigénico de los extractos de *O. volvulus*, se puede utilizar suero de conejo-anti-oncocerca, como un indicador de antigenicidad.
3. El fraccionamiento de antígenos de *Onchocerca* por el método descrito, permite obtener una fracción rica en antígenos, que aumenta considerablemente el porcentaje de reacciones serológicas positivas en pacientes oncocercosos.
4. El método de la inmunodifusión simple en gel de Agar, utilizando antígenos de *O. volvulus*, puede ser de utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad en individuos sospechosos, que no tengan nódulos aparentes.

X. RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones, se sugiere:

1. Efectuar estudios para establecer la especificidad de la reacción.
2. Que se continúe trabajando con las fracciones que se obtuvieron, especialmente que se trate de inducir inmunidad con la fracción rica en antígenos experimentalmente.
3. Para encontrar puntos de cruce de inmunidad, podría efectuarse electroforesis en bloque a extractos de helmintos intestinales y trabajarlos por inmunodifusión con las fracciones de oncocerca.
4. Siendo la oncocercosis una enfermedad endémica en Guatemala, creemos necesario crear programas de investigación continuada, que tiendan a erradicar esta enfermedad de nuestro medio.

XI. BIBLIOGRAFIA

- 1 Ridley, D.S., y Stott, G.J.: J. Trop. Med. Hyg. 64: 297, 1961.
- 2 O.M.S.: Comité de Expertos en Oncocercosis. Segundo Informe. Tech. Rept. Ser. No. 335, 1966.
O.M.S.: Les Enquetes Epidemiologiques sur l'Onchocercose. O.M.S.-M.H.P.-P.A. 24-60, 1958.
- 3 Peñalver, L.M.: La enfermedad de Robles en Venezuela. Analogías y diferencias de la oncocercosis en Guatemala y Venezuela. Bol. Sanit. Guat. Año 38. Junio-Diciembre. 57:105-113, 1963.
- 4 Calderón, M.S.: Estudios inmunológicos en la Oncocercosis, Salud Pública de México. 6 (4):553-559. 1964.
- 5 Woodruff, A. W.: Assesmente Method and Techniques - Morbidity-non-Ophthalmic. WHO/Oncho/66. 40. 1966.
- 6 Daniel Luis Vargas
Prensa Médica Mexicana.
Año XXXIX, Nos. 3-4,
Marzo-abril 1974, pp 215-219.
- 7 Daniel Luis Vargas
Prensa Médica Mexicana

Año XXXIX, Nos. 3-4, Marzo-abril 1974, pp 215-219.

- 8 Alfred A. Buck, Robert I. Anderson, Kazuyoshi Kawata, and James C. Hitchcock, Jr.
Onchocerciasis: Some new epidemiologic and clinical findings. Results of an Epidemiologic Study in the Republic of Chad.
Reprinted from the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 18, No. 2 March 1969 pp. 217-230.
- 9 Vargas, L.: El uso de anticuerpos marcados en el diagnóstico de oncocercomas. El diagnóstico de lugar del oncocercoma. Prensa Med. Mex. 38:394-396, 1973
- 10 Vargas, L.: El uso de anticuerpos marcados en el diagnóstico de oncocercomas. El diagnóstico de lugar del oncocercoma. Prensa Med. Mex. 38:394-396, 1973
- 11 Roberto Maselli y Frey González.
Inmunidad en Oncocercosis.
Revista del Colegio Médico de Guatemala
Sept.-Dic. 1975
- 12 H.G. Kunkel, and R.J. Slater, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 80, 42 (1952).
Methods in immunology and immunochemistry
Volume II
Physical and Chemical Methods.
Hans J. Muller-Eberhard and C. Kirk Osterland.
1968 Academic Press New York and London.
- 13 Handbook of Microtiter Procedures
Edited by Theodore B. Conrath.

Director Clinical and Research applications Laboratory
Cooke Engineering Company, Alexandria, Va.
Dynatech Corporation, Cambridge, Mass. 1972.

- 14 Handbook of Microtiter Procedures
Edited by Theodore B. Conrath.
Director Clinical and Reserch Applications Laboratory
Cooke Engineering Company, Alexandria, Va.
Dynatech Corporation, Cambridge, Mass. 1972.
- 15 Roberto Maselli y Frey González.
Inmunidad en Oncocercosis.
Revista del Colegio Médico de Guatemala.
Sept.-Dic. 1975.

Adl. de la Roca

Axel Díaz de la Roca

Br:

R. Maselli

Dr. Roberto Maselli

Asesor

Eduardo Pérez Guisasaola

Dr. Eduardo Pérez Guisasaola

Revisor

Julio de León

Dr. Julio de León

Director de Fase III

Rafael A. Castillo R.

Dr. Rafael A. Castillo R.

Secretario General

Vo.Bo.

Rolando Castillo Montalvo

Dr. Rolando Castillo Montalvo

Decano