

**UNIVERSIDAD  
AUTONOMA DE BARCELONA**

Departamento de Genética y Microbiología  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
(Unidad Docente *Sant Pau*)

**CARACTERIZACION,  
PURIFICACION  
Y LOCALIZACION  
INMUNOHISTOQUIMICA  
DE LOS  
ANTIGENOS MAYORITARIOS  
DE  
*Echinococcus granulosus*  
ANTIGENO 5 Y ANTIGENO B**

Tesis que para optar al Grado de Doctor presenta

**Fernando Sánchez Reus**

Bajo la dirección de

**Dra. Dña. Carmen Muñoz Batet**  
Profesor Asociado de Microbiología y Parasitología Médica  
Departamento de Genética y Microbiología  
Facultad de Medicina  
(Unidad Docente de *Sant Pau*)  
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA**

Barcelona, Marzo de 1992

## **LOCALIZACION INMUNOHISTOLOGICA DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS**

Para la localización estructural y ultraestructural de los antígenos hidatídicos mayoritarios (Ag 5 y Ag B), en membranas quísticas y protoscólex de procedencia humana (ver : I.D.) se emplearon los antisueros monoespecíficos obtenidos por inmunización experimental de conejos con los antígenos parasitarios (ver : III.B.).

Previamente a la inmunolocalización, debieron realizarse estudios meramente morfológicos, con el fin de conocer las diferentes estructuras presentes en las formas larvarias de *E. granulosus* y poder así localizar a nivel estructural los antígenos mayoritarios.

## ESTUDIOS ESTRUCTURALES EN EL METACESTODO DE *E. granulosis*

### ESTRUCTURA DE *E. granulosis* POR MICROSCOPIA OPTICA

Los cortes histológicos del material parasitario fijado en formol e incluido en parafina según la metodología previamente descrita (ver : I.D.1.), son desparafinados en xilol, rehidratados en concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua, y teñidos con diferentes colorantes para su posterior observación microscópica.

La observación microscópica se realiza a diferentes aumentos, en un microscopio Dialux (LEITZ) conectado a una cámara fotográfica automática (Orthomat; LEITZ), cargada con película Ektar (KODAK) de 25 ASA de sensibilidad.

### TINCION DE HEMATOXILINA EOSINA

Es una tinción ampliamente empleada en histología, que consigue diferenciar, con buena resolución, la mayor parte de estructuras histológicas.

Se basa en la combinación de un colorante básico, la hematoxilina, que tiñe de color azul los núcleos y una solución de colorantes ácidos, la eosina-floxina, que tiñe de rosa las estructuras acidófilas (Luna 1968; McManus & Mowry 1968; Disbrey & Rack 1970).

La hematoxilina es un compuesto incoloro, que en solución se oxida y da lugar a la hemateína o fracción activa (Harris 1900), la cual, en combinación con el alumbre férrico empleado como mordiente (hematoxilina de Harris) tiñe con gran afinidad la cromatina nuclear, confiriéndole un color rojo oscuro que vira a azul y se estabiliza tras el tratamiento con un álcali débil (agua amoniacal).

La eosina y la floxina son colorantes ácidos que tiñen de rosa la sustancia fundamental del citoplasma y los diferentes corpúsculos, obteniéndose diferentes gamas de color según la proporción en componentes básicos existentes.

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Colorear con hematoxilina de Harris (Harris' hematoxylin solution; MERCK) durante 10 min.

Lavar con agua del grifo.

Diferenciar por repetidas inmersiones rápidas de las preparaciones en alcohol-ácido (etanol 70%, CIH 1%). Controlar microscópicamente, comprobando que los núcleos permanezcan teñidos y la coloración de fondo es mínima.

Lavar con agua del grifo.

Virar y estabilizar la coloración por inmersión rápida en agua amoniacal (amoníaco 0.3%).

Lavar abundantemente con agua corriente durante 10 a 20 min.

Contrastar durante unos 15 seg. en la solución de eosina-floxina.

Lavar y deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

#### TINCIÓN DE MAY-GRUNWALD - GIEMSA

Es una tinción ampliamente utilizada en hematología, conocida también como *Tinción panóptica de Pappenheim*.

Para la tinción se emplean dos soluciones colorantes complementarias, el colorante de May-Grünwald y el colorante de Giemsa, con lo que se consigue una buena diferenciación de todos los elementos de la preparación (Bessis 1972).

El colorante de May-Grünwald es una solución alcohólica que combina un colorante ácido y otro básico, la eosina y el azul de metileno (May & Grundwald 1902).

El colorante de Giemsa es una combinación de eosina y derivados del azul de metileno, principalmente azur I y azur II (Giemsa 1904).

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Colorear durante 10 min. en la solución May-Grünwald (eosina-azul de metileno en solución según May-Grünwald ;MERCK).

Lavar con agua corriente.

Colorear durante 30 min. en la solución de Giemsa (solución según Giemsa para microscopia; MERCK).

Diferenciar por repetidas inmersiones rápidas de las preparaciones en una solución acuosa de ácido acético al 0.2%.

Lavar en agua destilada.

Deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

#### *TINCION TRICROMICA DE MASSON*

En histología, el concepto de tinciones tricrómicas se reserva a los métodos tintoriales que permiten diferenciar el tejido conectivo del resto de tejidos (Disbrey & Rack 1970).

En el presente estudio se ha empleado una variante de las técnicas originales (Mallory 1900; Masson 1929), en la que se emplea el colorante verde claro para teñir las fibras de colágeno del tejido conectivo, y distinguirlas del resto de estructuras teñidas de rojo y de los núcleos que son teñidos de azul-negro por la hematoxilina (Luna 1968).

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Poner las preparaciones en una solución mordiente (solución de Bouin) durante 10 min..

Lavar con agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo.

Lavar en agua destilada.

Colorear, durante 10 min. con hematoxilina de Harris (Harris' hematoxylin solution; MERCK).

Lavar en agua destilada.

Colorear durante 2 min en la solución de fucsina y escarlata de Biebrich.

Lavar en una solución acuosa de ácido acético al 0.2%.

Decolorar durante 15 min. en una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 2.5% y ácido fosfomolibdico al 2.5%.

Lavar en una solución acuosa de ácido acético al 0.2%.

Colorear en una solución de verde claro al 2%.

Lavar en agua destilada.

Introducir durante 5 min. en una solución acuosa de ácido acético al 0.2%.

Deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

#### *TINCION DE PAPANICOLAOU*

Es un método de tinción multicromático, basado en la hematoxilina y dos colorantes de contraste (Papanicolaou 1942; Luna 1968).

La afinidad tintorial de la hematoxilina por la cromatina nuclear confiere a los núcleos un color azul, mientras que el resto de estructuras presentan una amplia variedad cromática debido a los dos colorantes de contraste.

Como contraste se emplean un colorante ácido, *orange G*, que tiñe las estructuras acidófilas de color anaranjado, y otro que contiene en solución una mezcla de colorantes ácidos y básicos, *eosin-azure 50* (EA-50 : solución alcohólica de *eosin Y*, *bismark brown*, *light green SF yellowish* y ácido fosfotúngstico), que tiñe las estructuras basófilas de color verde.

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Colorear durante 3 min. con Hematoxilina de Harris (Harris' hematoxylin solution; MERCK).

Lavar abundantemente con agua corriente

Diferenciar, por inmersión rápida de las preparaciones, en una solución acuosa de ácido clorhídrico al 0.25%

Lavar durante 5 min con agua corriente abundante. Los núcleos deben recuperar el color azul.

Dehidratar en baños con concentraciones crecientes de alcohol (50%, 70%, 80%, 96%).

Colorear durante 2 min. con Orange G (OG-6, single orange G stain; ORTHO DIAGNOSTICS).

Lavar en tres baños de alcohol de 96%.

Colorear durante 3 min con verde EA-50 (EA-50, multiple polychrome stain; ORTHO DIAGNOSTICS).

Lavar en tres baños de alcohol de 96% y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.1).

*TINCIÓN DEL ÁCIDO PERIÓDICO-SCHIFF (P.A.S.) PARA GLUCIDOS*

Es una tinción útil para demostrar la presencia de glúcidos en los tejidos, permitiendo detectar las cadenas poliméricas de estos, en especial glucógeno y glucoproteínas (Luna 1968; McManus & Mowry 1968; Disbrey & Rack 1970).

El principio de la tinción se basa en una reacción bioquímica entre el ácido periódico y los glúcidos. La inmersión de las preparaciones en una solución acuosa de ácido periódico da lugar a la destrucción oxidativa de los enlaces glicólicos de los glúcidos a nivel de los 1,2 glicoles, con la consecuente producción de grupos aldehído que son puestos de manifiesto por medio de la coloración magenta o púrpura que les confiere el reactivo de Schiff (McManus 1946; Lillie 1951).

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Oxidar las preparaciones, durante 5 min., en una solución acuosa de ácido periódico al 0.5%.

Lavar en agua destilada.

Colorear durante 15 min. con la solución de Schiff (Schiff's reagent; MERCK).

Lavar abundantemente durante 15 min. con agua corriente, hasta conseguir un viraje a color rosa.

Contracolorar durante 3 min. con Hematoxilina de Harris (Harris' hematoxylin solution; MERCK).

Lavar abundantemente con agua corriente.

Deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

*TINCION DE P.A.S. TRAS DIGESTION CON DIASTASA*

La diastasa ( $\alpha$ -amilasa) es una enzima amilolítica que digiere el glucógeno convirtiéndolo en dextrina, glucosa y maltosa. El tratamiento de las preparaciones en una solución de la enzima, previo a una tinción de P.A.S., dará lugar a una pérdida selectiva de coloración atribuible a la digestión enzimática del glucógeno (Luna 1968; McManus & Mowry 1968).

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Incubar durante 1 hora a 37 °C, en una solución de diastasa al 0.1% en tampón fosfato salino, pH 6.

Lavar en agua corriente durante 5 min.

Realizar una tinción de P.A.S. ( ver : V.A.1.e.).

*TINCION DE AZUL ALCIAN pH 2.5 PARA PROTEOGLUCANOS SULFATADOS*

El azul Alcian es una ftalocianina hidrosoluble, de color azul, que presenta una gran afinidad por los proteoglicanos sulfatados (Steedeman 1950; Luna 1968; Disbrey & Rack 1970).

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Introducir durante 3 min. en un baño mordiente de una solución acuosa de ácido acético al 3%.

Colorear durante 30 min. en una solución de azul Alcian al 1% en ácido acético al 3%.

Lavar en agua corriente durante 10 min.

Lavar en agua destilada.

Contracolorar durante 5 min. en la solución de Kernochrot.

Lavar en agua corriente durante 1 min.

Deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

#### *TINCIÓN DE KINYOUN*

Se emplea para la detección de aquellos elementos resistentes a la decoloración con una solución de alcohol ácido.

La dificultad que presentan algunas estructuras (generalmente ricas en ceras) para colorearse por la fucsina presente en la solución de Kinyoun, se acompaña, sin embargo, de una mayor dificultad para la posterior decoloración, resistiendo la decoloración por alcohol-ácido y permaneciendo coloreadas de rojo (Luna 1968).

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Colorear en la solución de Kinyoun, durante 60 min. a 60 °C.

Lavar abundantemente en agua corriente.

Diferenciar en alcohol-ácido (C1H al 1% en etanol al 70%) hasta que las preparaciones tomen un color rosa.

Lavar abundantemente en agua corriente.

Contracolorar durante 1 min. con una solución de verde claro al 2%.

Deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

*TINCIÓN ARGÉNTICA DE GOMORI - GROCCOTT*

Al igual que en el resto de tinciones argénticas, la tinción de Gomori-Grocot (G-G) (Gomori 1951; Grocott 1955) se basa en la reducción de una sal argéntica y la visualización de depósitos de plata impregnando estructuras concretas.

En la tinción de G-G, el reactivo argéntico (nitrato de plata-metenamina) es reducido y precipitado por sustancias propias del tejido, o por grupos aldehídos presentes en el tejido tras la acción del ácido crómico sobre los grupos hidroxilos de algunos polisacáridos. La adición de sales de oro supone un intercambio iónico que incrementa la coloración del precipitado obteniéndose un color negro (Luna 1968; Disbrey & Rack 1970).

Desparafinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Oxidar las preparaciones, por inmersión durante 1 hora en una solución acuosa de ácido crómico al 5%.

Lavar en agua corriente.

Introducir durante 1 min. en un baño de bisulfito sódico en solución acuosa al 1%, para eliminar el ácido crómico residual.

Lavar en agua corriente durante 5 min., seguido de cuatro baños en agua destilada.

Colorear las preparaciones con una solución reciente de metenamina argéntica, incubar a 60 °C hasta que las preparaciones adquieran un color tabaco.

Lavar en seis baños de agua destilada.

Introducir en una solución acuosa de cloruro de oro al 0.1% hasta que las preparaciones tomen un color gris (2-5 min.).

Lavar en agua destilada.

Introducir las preparaciones en una solución acuosa de tiosulfato sódico al 2% (2-5 min.), para eliminar los restos de plata no reducida.

Lavar abundantemente en agua corriente.

Contracolorar durante 30 segundos en una solución acuosa de verde claro al 0.04%.

Eliminar el exceso de colorante con agua del grifo.

Deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

#### *TINCIÓN ARGÉNTICA PARA FIBRAS DE RETICULINA*

La tinción que se refiere a continuación, sigue los mismos principios básicos descritos anteriormente para las tinciones argénticas. En la tinción se emplea una solución amoniacal de nitrato de plata para impregnar las fibras de reticulina, siguiendo la técnica original descrita por James (James 1967) con ligeras modificaciones.

Desparasinar las preparaciones en tres baños de xilol, e hidratar en baños con concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente agua destilada.

Introducir durante 10 min. en una solución mordiente de permanganato potásico al 0.25%.

Lavar en agua destilada.

Decolorar en una solución acuosa de ac. oxálico al 5%.

Lavar en tres cambios de agua destilada.

Impregnar durante 30 min. en una solución amoniacal de nitrato de plata.

Lavar en agua destilada.

Virar en una solución acuosa de formalina al 1%, hasta que las secciones adquieran un color pardo.

Introducir en una solución acuosa de cloruro de oro al 0.2%, durante 3 min..

Lavar en agua destilada.

Introducir las preparaciones en una solución acuosa de tiosulfato sódico al 5% (2-5 min.), para eliminar los restos de plata no reducida.

Lavar bien con agua corriente.

Contracolorar durante 5 min. en la solución de Kernechtrot.

Deshidratar en dos baños de alcohol de 96° y dos de alcohol absoluto.

Clarificar en dos baños de xileno y montar en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.).

#### ESTRUCTURA DE *E. granulatus* POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

La observación ultraestructural de los protoscolex se realiza sobre cortes ultrafinos de material parasitario fijado en paraformaldehído-gluteraldehído e incluido en Lowicryl® K4M, obtenidos según la metodología previamente descrita (ver : I.D.2.) y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (ver : V.B.4.c.).

La visualización se realiza en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-800), conectado con un dispositivo de fotografía automática que permite la obtención de placas fotográficas (Electron Microscope Film, 9x12; KODAK). La observación se realiza a diferentes aumentos (2.000-50.000) con un voltaje constante de 100 kV.

## INMUNOLocalIZACION DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS

### PREPARACIONES HISTOLOGICAS

La inmunolocalización de los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* (Ag 5 y Ag B), se realizó sobre preparaciones histológicas de material parasitario.

Las membranas quísticas y los protoscolex de procedencia humana, fueron obtenidos según la metodología previamente descrita (ver: I.A.3.).

Para la inmunolocalización por microscopia óptica, se emplearon preparaciones histológicas de material parasitario fijado en formol e incluido en parafina (ver: I.D.1.).

Para la inmunolocalización por microscopia electrónica se emplearon cortes ultrafinos de protoscolex fijados en paraformaldehído-glutaraldehído e incluidos en Lowicryl\* K4M (ver: I.D.2.)

### ANTISUEROS EMPLEADOS

Los antisueros monoespecíficos frente a los diferentes antígenos parasitarios mayoritarios (Ag 5 y Ag B), se obtuvieron por inmunización experimental de conejos con los componentes polipeptídicos antigénicos separados por SDS-PAGE, según se ha descrito previamente (ver: III.B.1.a.(2)).

El antisero frente a las proteínas parasitarias presentes en el líquido hidatídico se obtuvo por la inmunización de conejos con líquido hidatídico purificado por métodos físico-químicos (ver: III.B.1.a.(1) (b)).

Los antisueros anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa o con biotina fueron adquiridos comercialmente (anti rabbit IgG (H+L)(gt) HRP conj 1q; ICN BIOMEDICALS, cod 61-202-3) (anti rabbit IgG (H+L)(gt) Biotina

(≥2mg) Affin Iq; ICN BIOMEDICALS, cod 61-670-1), al igual que los antisueros de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo marcados con oro coloidal de 10 nm (swine anti rabbit immunoglobulins gold conjugated; Dakopatts, cod G386) y el suero no inmunes de cabra (goat serum (normal); DAKOPATTS).

#### CONSERVACION DE LOS SUEROS.

Los sueros no inmunes de cabra y cerdo, así como los antisueros marcados con oro coloidal, se conservan, según indicaciones de la casa comercial, en nevera a 4°C.

Los antisueros específicos y los antisueros marcados con peroxidasa o biotina, convenientemente alicuotados, se conservan congelados a -20°C, sin diluir o diluidos al 1/10 en el correspondiente tampón.

#### INMUNOLOCALIZACION POR MICROSCOPIA OPTICA

Las preparaciones histológicas, son tratadas convenientemente, e incubadas con los anticuerpos mono y poliespecíficos. La reacción se revela por la adición de un segundo anticuerpo marcado y se evidencia con la precipitación de un compuesto cromógeno.

Los protocolos de inmunolocalización por microscopía óptica que han sido empleados en el presente trabajo, se encuentran resumidos al final del apartado (Tab VI, VII).

En ambos protocolos, los diferentes pretratamientos, los lavados en soluciones tampón o similares y el deshidratado se han realizado por inmersión de las preparaciones en los reactivos, disponiéndose estas en cestillas e introduciendo el conjunto en las correspondientes cubetas (VIDRA-FOC).

Los bloques y las incubaciones con los diferentes anticuerpos se han realizado en cámara húmeda, aplicando los antisueros directamente sobre el tejido.

Antes de iniciar el proceso es conveniente numerar las preparaciones y delimitar el tejido con un lápiz diamante (Fig 17-A).

Antes de depositar los antisueros se elimina el exceso de líquido del baño anterior, primero por decantación y seguidamente absorbiéndolo en un *tissue* de papel (Fig 17-B), procurando no tocar el tejido ni dejarlo sucio.

Seguidamente se deposita el antisuero procurando que forme menisco con el círculo dibujado por el lápiz diamante (Fig 17-C) y se colocan las preparaciones en una cámara húmeda (Fig 17-D) situada sobre una mesa plomada.

Todas los lavados e incubaciones se han realizado a temperatura ambiente.

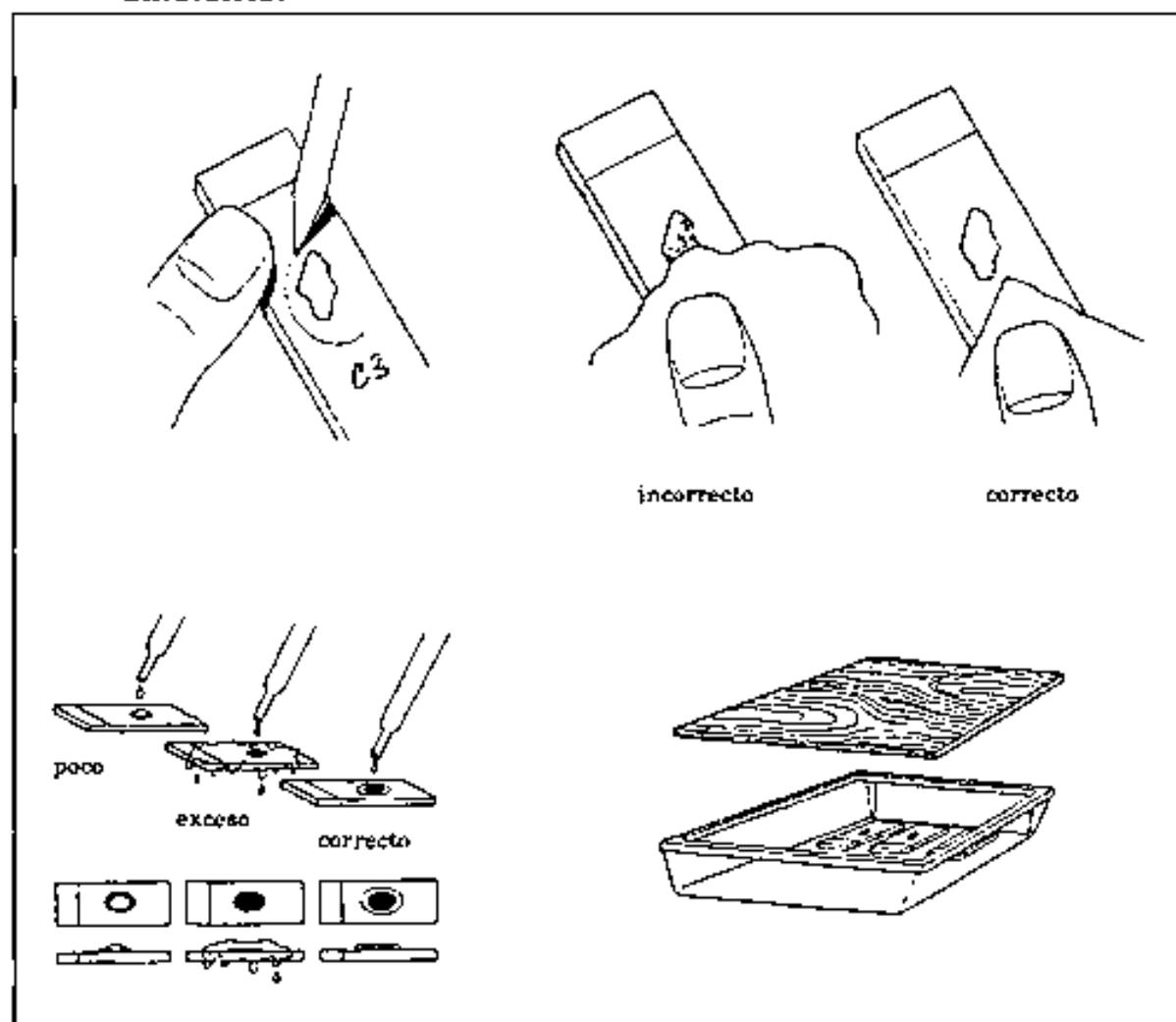


Figura 17. Aplicación de los antisueros sobre las preparaciones (ver explicación en texto).

#### **PRETRATAMIENTO DE LAS SECCIONES HISTOLOGICAS**

Antes de iniciar la reacción inmunohistoquímica, las preparaciones histológicas son desparafinadas con el fin de conseguir una superficie hidrófila. Las reacciones inespecíficas son evitadas inhibiendo la actividad peroxidásica endógena. Los epítomos antigénicos son desenmascarados por tratamientos con detergentes y las posibles uniones inespecíficas bloqueadas con suero no inmune.

**Desparafinado de las secciones.** La eliminación de la parafina e hidratación de las preparaciones confiere a estas unas propiedades hidrófilas que permiten la penetración de los anticuerpos y consecuentemente facilitan la reacción antígeno-anticuerpo.

El desparafinado e hidratado se efectúa por inmersión de las preparaciones en baños de xilol y concentraciones decrecientes de alcohol.

Las preparaciones se desparafinan por inmersión en tres baños de 10 minutos de xileno. Es conveniente la renovación frecuente del xileno para eliminar mejor cualquier resto de parafina de las preparaciones, que daría lugar a la aparición de una tinción de fondo.

La hidratación de las preparaciones se realiza por inmersión durante 5 min en baños sucesivos de alcohol a concentraciones decrecientes (100°, 96°, 70°, 50°) y finalmente un baño de 5 min en agua destilada.

#### **Bloqueo de la actividad peroxidásica endógena de los tejidos.**

Ciertos tejidos puedan presentar actividad peroxidásica endógena o actividad pseudoperoxidásica (hemoglobina) (Fahimi 1979), lo que obliga al tratamiento de las preparaciones para neutralizar de forma irreversible dicha actividad enzimática y evitar que actúe sobre el cromógeno dando de lugar a tinción de fondo, aunque gran parte es ya neutralizada con la fijación.

Neutralizar la actividad peroxidásica endógena por inmersión de las preparaciones durante 30 min en un baño de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3 % en agua destilada (solución extemporánea) (Palacin 1984).

Lavar en tres baños de 5 min de Tris-Salino (TS; Tris 20 mM, ClNa 0.13 M, pH 7.6).

**Desenmascaramiento de los determinantes antigénicos.** En el proceso de fijación con formaldehído se producen puentes de unión cruzados entre los componentes proteicos dificultando la penetración de los anticuerpos y pudiendo enmascarar algunos antígenos.

El tratamiento con saponina permite la liberación de parte de estas proteínas y facilita la penetración de los anticuerpos al permeabilizar las células por su acción sobre el colesterol de las membranas (Goldenthal, Hedman, Chen, *et al.* 1985).

Las preparaciones se permeabilizan por inmersión durante 30 min en un baño de saponina al 0.05% en agua destilada (solución extemporánea).

Lavar en tres baños de 5 min de TS.

**Bloqueo de las uniones inespecíficas.** El bloqueo para evitar las posibles uniones inespecíficas entre las inmunoglobulinas específicas y componentes estructurales de la preparación, se consigue al incubar las preparaciones con suero no inmune del mismo animal del que procede segundo anticuerpo.

Incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min, con 160  $\mu$ l de suero de cabra no inmune diluido al 1/10 en TS y adicionado de BSA al 5%.

Antes de incubar con los antisueros decantar la preparación, no lavar.

#### INCUBACION CON LOS ANTISUEROS

La incubación con los antisueros específicos obtenidos experimentalmente en conejos (ver: III.B.) y la detección de estos mediante conjugados heterólogos anti-inmunoglobulinas de conejo, precisa del estudio previo de las diluciones de trabajo óptimas para los tiempos de incubación seleccionados.

Dilución de los antisueros y titulación. La dilución de los antisueros y su posterior titulación nos permite escoger aquella combinación de diluciones más altas con las que se consigue un mayor contraste entre las zonas positivas específicas y la coloración de fondo.

Se realizan diluciones dobles progresivas de los antisueros, empleando TS como diluyente de los antisueros específicos y TS-gelatina (TS, gelatina 0.75%) para los conjugados.

Se incuban las preparaciones con 80  $\mu$ l de las diferentes diluciones de antisueros y conjugados, enfrentando cada dilución de un antisuero con la totalidad de las del conjugado, y viceversa.

Se valora la tinción específica y el color de fondo con una escala del 0 al 4 +, y se escogen como diluciones óptimas de trabajo aquellas con las que se obtiene una mayor intensidad de tinción específica con la mínima coloración de fondo.

Tiempo de incubación y marcha de la reacción.

La incubación de las preparaciones con el primer anticuerpo (antisueros específicos anti-antígenos parasitarios) convenientemente diluido en TS se prolonga durante toda la noche, y es seguida de tres lavados de 5 min en TS-gelatina.

Se realiza un nuevo bloqueo con suero no inmune (ver: V.B.3.a.(4)), y se procede seguidamente a una incubación de 30 min con los conjugados anti-inmunoglobulinas convenientemente diluidos en TS-gelatina. Posteriormente se lavan las preparaciones en tres baños de 5 min de TS-gelatina.

#### TECNICAS INMUNOQUIMICAS DE DETECCION

Para el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo se emplearon a lo largo de la experiencia técnicas de inmunoperoxidasa indirecta y de avidina biotina (Fig 18).

Inmunoperoxidasa indirecta. La reacción antígeno anticuerpo se revela tras la incubación de las preparaciones con un segundo anticuerpo heterólogo conjugado con peroxidasa.

**Avidina-biotina.** Se basa en la afinidad no inmune de la avidina (glicoproteína de la clara de huevo) por la biotina (vitamina del complejo B).

Los anticuerpos específicos son reconocidos por anticuerpos heterólogos conjugados con biotina, la posterior incubación de las preparaciones con el complejo avidina-biotina-peroxidasa permite la detección y amplifica la reacción (Hsu, Raine & Fanger 1981a; Hsu, Raine & Fanger 1981b) (Fig. 18).

El complejo avidina-biotina-peroxidasa se prepara, según indicaciones del fabricante (ABC kit, Vectastain<sup>®</sup>; Vector Laboratories), diluyendo la avidina en TS, añadiendo seguidamente la peroxidasa biotinilada y dejando reposar 30 min.

Las preparaciones se incuban durante 30 min en cámara húmeda con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, y seguidamente se lavan en tres baños de TS.

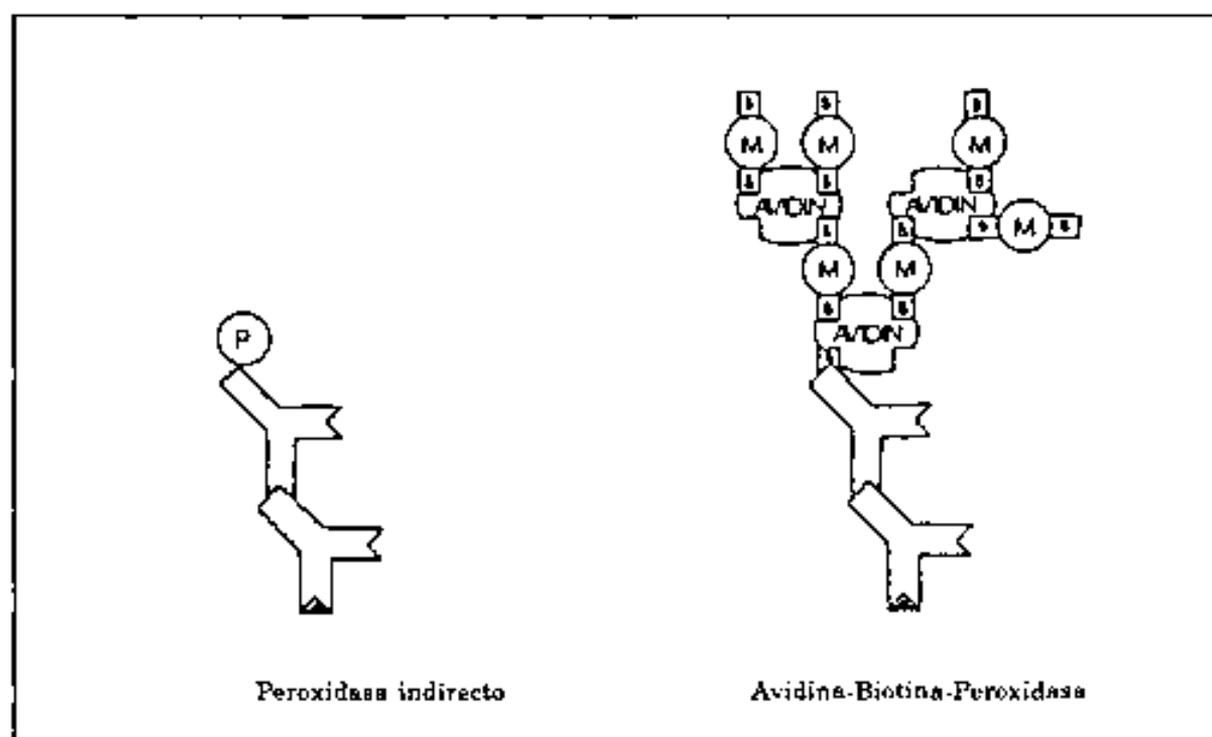


Figura 18. Esquema de las reacciones antígeno anticuerpo en las técnicas de peroxidasa indirecta y avidina-biotina-peroxidasa. AVIDIN: avidina, B: biotina y M: peroxidasa.

Ambas técnicas basan el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo en la acción enzimática de la peroxidasa de rábano picante. La peroxidasa forma con el sustrato  $H_2O_2$  el complejo peroxidasa- $H_2O_2$  que reacciona sobre un cromógeno capaz de ceder electrones y dar lugar a una molécula coloreada que precipita localmente de forma insoluble y puede ser observada a microscopía óptica (Farr & Nakane 1981).

Incubar las preparaciones durante unos 5 min en una solución de DAB (3,3 diaminobenzidina tetrahydrochlorido) al 0.03%, y  $H_2O_2$  al 0.03% en Trizma base 50 mM, pH 7.6.

Preparar la solución inmediatamente antes de la incubación, y seguir la marcha de la reacción por control microscópico, variando el tiempo de incubación en función de la intensidad de la reacción.

Lavar con agua durante 5 min.

#### CONTRACOLORACION Y MONTAJE DE LAS PREPARACIONES

Para identificar mejor la localización de los precipitados coloreados se realiza un tinción de contraste, que confiere al fondo de la preparación un color diferente al proporcionado por el cromógeno.

Incubar las preparaciones durante unos 15 segundos con hematoxilina de Harris (Harris' hematoxylin solution; MERCK) previamente filtrada, lavar con agua y seguidamente sumergir durante 10 min. en un baño de agua corriente.

Finalmente se montan las preparaciones en resina sintética (D.P.X.-E.X.L.I.), previa deshidratación de estas por inmersión en baños a concentraciones crecientes de alcohol y clarificación en xileno.

#### BATERIA DE CONTROLES

Con el fin de asegurar la fiabilidad de la reacción, en cada batería de preparaciones son procesados simultáneamente los siguientes controles :

Control negativo. Como control negativo se emplean preparaciones de tejido hepático humano sano.

Control de conjugado. La sustitución del primer anticuerpo por tampón, permite evaluar la existencia de uniones inespecíficas entre los tejidos y el conjugado.

Control de peroxidasa endógena. La sustitución del primer y segundo anticuerpo por tampón permite valorar el correcto bloqueo de la peroxidasa endógena de los tejidos

Control de especificidad. El control de especificidad se lleva a cabo sustituyendo el primer anticuerpo por suero no inmune de la misma especie animal.

La marcha de la reacción se valora, en función de los controles previos, según se expone en la tabla VIII.

#### **OBSERVACION MICROSCOPICA**

La observación microscópica se realiza a diferentes aumentos, en un microscopio Dialux (LEITZ) conectado a una cámara fotográfica automática (Orthomat; LEITZ), cargada con película Ektar (KODAK) de 25 ASA de sensibilidad.

- 1- Desparafinar las preparaciones
  - tres baños de 10 min. en xileno
  - un baño de 5 min. en alcohol de 96°
  - un baño de 5 min. en alcohol de 70°
  - un baño de 5 min. en alcohol de 50°
  - un baño de 5 min. en agua destilada
  
- 2- Eliminar la actividad peroxidásica endógena de los tejidos.
  - incubar durante 30 min. en una solución acuosa de  $H_2O_2$  al 3%
  - lavar en tres baños de 5 min en Tris-salino
  
- 3- Desentmascaramiento de los determinantes antigénicos
  - incubar no mas de 30 min. en una solución reciente de saponina al 0.05% en agua destilada
  - lavar en tres baños de 5 min en Tris-salino
  
- 4- Bloquear con suero no inmune de la misma especie animal que la del segundo anticuerpo
  - incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min., con suero de cabra al 1/10 en Tris-salino y BSA al 5%
  - decantar la preparación, eliminar el sobrenadante, no lavar.
  
- 5- Incubar con el primer anticuerpo
  - incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, toda la noche, con el antisuero diluido en Tris-salino
  - lavar en tres baños de 5 min. en Tris-salino-gelatina
  
- 6- Bloquear con suero no inmune (repetir 4)
  
- 7- Incubar con el segundo anticuerpo
  - incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min., con anti-IgG-peroxidasa diluido en Tris-salino-gelatina
  - lavar en tres baños de 5 min en Tris-salino
  
- 8- Detección de la actividad peroxidásica
  - incubar con DAB- $H_2O_2$  durante 5 min.
  - lavar con agua durante 5 min.
  
- 9- Contracolorar
  - incubar durante 15 seg. con hematoxilina de Harris filtrada
  - lavar con agua
  - lavar con agua corriente durante 10 min.
  
- 10- Deshidratar
  - sumergir en un baño de alcohol de 70°
  - sumergir en un baño de alcohol de 96°
  - sumergir en un baño de alcohol de 100°
  - sumergir en tres baños de xileno
  
- 11- Montar con DPX

Tabla VI. Protocolo de inmunohistoquímica, Peroxidasa indirecta.

- 1- Desparafinar las preparaciones
  - tres baños de 10 min. en xileno
  - un baño de 5 min. en alcohol de 96°
  - un baño de 5 min. en alcohol de 70°
  - un baño de 5 min. en alcohol de 50°
  - un baño de 5 min. en agua destilada
- 2- Eliminar la actividad peroxidásica endógena de los tejidos.
  - incubar durante 30 min. en una solución acuosa de  $H_2O_2$  al 3%
  - lavar en tres baños de 5 min en Tris-salino
- 3- Desenmascaramiento de los determinantes antigénicos
  - incubar no mas de 30 min. en una solución reciente de saponina al 0.05% en agua destilada
  - lavar en tres baños de 5 min en Tris-salino
- 4- Bloquear con suero no inmune de la misma especie animal que la del segundo anticuerpo
  - incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min., con suero de cabra al 1/10 en Tris-salino y BSA al 5%
  - decantar la preparación, eliminar el sobrenadante, no lavar.
- 5- Incubar con el primer anticuerpo
  - incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, toda la noche, con el antisuero diluido en Tris-salino
  - lavar en tres baños de 5 min. en Tris-salino-gelatina
- 6- Bloquear con suero no inmune (repetir 4)
- 7- Incubar con el segundo anticuerpo (preparar el ABC-reagent)
  - incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min., con anti-IgG-biotinizado diluido en Tris-salino-gelatina
  - lavar en tres baños de 5 min en Tris-salino
- 8- Reacción avidina biotina peroxidasa
  - incubar en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min. con el ABC-reagent
  - lavar entres baños de 5 min. en Tris-salino
- 9- Detección de la actividad peroxidásica
  - incubar con DAB- $H_2O_2$  durante 5 min.
  - lavar con agua durante 5 min.
- 10- Contracolorar
  - incubar durante 15 seg. con hematoxilina de Harris filtrada
  - lavar con agua
  - lavar con agua corriente durante 10 min.
- 11- Deshidratar
  - sumergir en un baño de alcohol de 70°
  - sumergir en un baño de alcohol de 96°
  - sumergir en un baño de alcohol de 100°
  - sumergir en tres baños de xileno
- 12- Montar con DPX

Tabla VII. Protocolo de inmunohistoquímica. Avidina-biotina-peroxidasa

CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	CONTROL ESPECIFICIDAD	MUESTRA PROBLEMA	
negativo	negativo	negativo	negativo	ERROR TECNICO
positivo	positivo	positivo	positivo	TINCION INESPECIFICA POR PEROXIDASA ENDOGENA O UNION PROTEINA-PROTEINA
positivo	positivo	negativo	pos/neg	CONTROL NEGATIVO INCORRECTO
negativo	negativo	negativo	positivo	CONTROL POSITIVO INCORRECTO
positivo	negativo	positivo	positivo	TINCION INESPECIFICA MUESTRA PROBLEMA
positivo	negativo	negativo	negativo	MUESTRA PROBLEMA NEGATIVA
positivo	negativo	negativo	positivo	MUESTRA PROBLEMA POSITIVA

Tabla VIII. Valoración de la marcha de la reacción, en función de la presencia de marcaje en los diferentes controles

#### INMUNOLocalIZACION POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las secciones ultrafinas, son tratadas convenientemente, e incubadas con los anticuerpos mono y poliespecíficos. La reacción se revela por la adición de un segundo anticuerpo marcado con oro coloidal (Faulk & Taylor 1971; Horisberger & Rosset 1977), y se evidencia por microscopia electrónica al visualizar las partículas electrodensas correspondientes al marcador.

El protocolo de inmunolocalización por microscopia electrónica, empleado en el presente trabajo, se encuentra resumido en la tabla IX.

#### PRETRATAMIENTO DE LAS SECCIONES ULTRAFINAS

Antes de la incubación con los antisueros, las secciones ultrafinas montadas sobre rejillas de oro, deben ser hidratadas, y bloqueadas convenientemente con el fin de evitar al máximo la aparición de reacciones inespecíficas.

El hecho de haber empleado en la inclusión un medio polar, Lowicryl® K4M, hace innecesaria su eliminación para llevar a cabo la reacción inmunohistoquímica.

Hidratado de las secciones. Las preparaciones son hidratadas en tampón PBS 0.1M (pH 7.3), adicionado de glicina 0.1M (PBS-glicina) con el fin de bloquear los posibles grupos aldehídos del fijador que puedan permanecer activos.

El proceso de hidratación se realiza por flotación sobre una gota de tampón depositada en un fragmento de Parafilm®.

Se realizan dos baños de 5 min. cada uno, y el exceso de tampón se elimina por capilaridad manteniendo en contacto el canto de la rejilla con un papel de filtro, pero evitando que la preparación se llegue a secar.

**Bloqueo de las uniones inespecíficas.** El bloqueo para evitar las posibles uniones inespecíficas entre las inmunoglobulinas específicas y componentes estructurales de la preparación, se consigue incubando las preparaciones con una solución de ovoalbumina.

El bloqueo se realiza por flotación sobre una solución de ovoalbumina al 1% en tampón PBS 0.1M (pH 7.3), durante 30 min, en cámara húmeda, a temperatura ambiente.

Antes de incubar con los antisueros eliminar el exceso de solución de bloqueo por capilaridad, no lavar.

#### *INCUBACION CON LOS ANTISUEROS*

Al igual que ocurría en la inmunolocalización para microscopía óptica, la incubación con los antisueros específicos obtenidos experimentalmente en conejos (ver : III.B.) y la detección de estos mediante conjugados heterólogos anti-inmunoglobulinas de conejo, precisa del estudio previo de las diluciones de trabajo óptimas.

**Dilución de los antisueros y titulación.** La dilución de los antisueros y su posterior titulación nos permite escoger aquella combinación de diluciones más altas con las que se consigue un mejor marcaje y un mínimo de uniones inespecíficas.

Se realizan diluciones dobles progresivas de los antisueros, empleando como diluyente tampón PBS 0.1M - ovoalbúmina 1%, pH 7.3.

Se incuban las preparaciones por flotación sobre 20  $\mu$ l de las diferentes diluciones de antisueros y conjugados, enfrentando cada dilución de un antisuero con la totalidad de las del conjugado, y viceversa.

Se valora el marcaje específico y el de fondo con una escala del 0 al 4 +, y se escogen como diluciones óptimas de trabajo aquellas con las que se obtiene una mayor marcaje específico con el mínimo fondo.

**Tiempo de incubación y marcha de la reacción.**

La incubación de las preparaciones con el primer anticuerpo (antisueros específicos anti-antígenos parasitarios) es seguida del lavado de las preparaciones en PBS-glicina.

Incubar por flotación las preparaciones con los antisueros convenientemente diluidos en PBS 0.1M- ovoalbúmina 1%, pH 7.3, a temperatura ambiente durante dos horas.

Realizar un primer lavado rápido mediante pulverización del tampón sobre la preparación (*jet wash*), y a continuación realizar tres lavados de 5 min. por flotación sobre la solución tampón PBS-glicina.

Eliminar el exceso de tampón por capilaridad.

Seguidamente se procede a una incubación de 30 min con los conjugados anti-inmunoglobulinas marcados con oro coloidal.

Centrifugar los conjugados anti-inmunoglobulinas durante 10 min. a 800 g, para eliminar los posibles agregados de oro que puedan haberse formado.

Diluir los conjugados convenientemente en PBS 0.1M - ovoalbúmina 1%, pH 7.3 y escoger las diluciones de trabajo entre el conjunto de aquellas que por espectrofotometría tengan a una longitud de onda de 520 nm una absorbancia comprendida entre 0.2 y 0.4.

Posteriormente se lavan las preparaciones.

Realizar un primer lavado por pulverización en tampón PBS-glicina.

Efectuar por flotación dos lavados de 5 min. en tampón PBS-glicina seguidos de tres lavados de 5 min. en tampón PBS 0.1M, pH 7.3.

Finalmente lavar por pulverización con agua destilada.

### CONTRASTADO DE LAS PREPARACIONES

Debido a la gran electrodensidad de las partículas de oro, es posible efectuar coloraciones de contraste que permitan visualizar mejor la ultraestructura de las preparaciones.

Incubar durante 15 min. en una solución acuosa de acetato de uranilo al 2% y seguidamente 2 min. en la solución de Reynolds.

Lavar por pulverización con agua destilada.

### BATERIA DE CONTROLES

Con el fin de asegurar la fiabilidad de la reacción, en cada batería de preparaciones son procesados simultáneamente los siguientes controles :

Control de conjugado. La sustitución del primer anticuerpo por tampón, permite evaluar la existencia de uniones inespecíficas entre los tejidos y el conjugado.

Control de especificidad. El control de especificidad se lleva a cabo sustituyendo el primer anticuerpo por suero no inmune de la misma especie animal.

La marcha de la reacción se valora, en función de los controles previos, según se ha expuesto en la tabla VIII.

### OBSERVACION MICROSCOPICA

La visualización se realiza en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-800), conectado con un dispositivo de fotografía automática que permite la obtención de placas fotográficas (Electron Microscope Film, 9x12, KODAK). La observación se realiza a diferentes aumentos (2.000-50.000) con un voltaje constante de 100 kV.

- 1- Hidratar las preparaciones
  - Lavar por flotación en dos baños de 5 min. en tampón PBS glicina.
  - Decantar la preparación y eliminar el exceso de tampón por capilaridad.
  
- 2- Bloquear las uniones inespecíficas
  - Incubar por flotación, en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min., en tampón PBS-ovoalbúmina.
  - Decantar la preparación y eliminar el exceso de tampón por capilaridad.
  
- 3- Incubar con el primer anticuerpo
  - Incubar por flotación, a temperatura ambiente, durante 2 h., con el antisuero diluido en PBS- ovoalbúmina.
  - Realizar un lavado por pulverización (jet wash) en tampón PBS-glicina.
  - Decantar la preparación y eliminar el exceso de tampón por capilaridad.
  
- 4- Incubar con el segundo anticuerpo (centrifugar los conjugados durante 10 min. a 800 g.)
  - Incubar por flotación, a temperatura ambiente, durante 30 min., con el conjugado diluido en PBS-ovoalbúmina.
  - realizar un lavado por pulverización (jet wash) en tampón PBS-glicina.
  - lavar por flotación en tres baños de 5 min. en tampón PBS.
  - realizar un lavado por pulverización (jet wash) en agua destilada.
  
- 5- Contrastar las preparaciones.
  - incubar por flotación, durante 2 min., en la solución de Reynolds.
  - realizar un lavado por pulverización (jet wash) en agua destilada.

Tabla IX. Protocolo de inmunohistoquímica. Inmunolocalización por microscopía electrónica.

# **RESULTADOS**

- I OBTENCION Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARASITARIO
  
- II CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE *E. granulosus*
  - A. Separación de los componentes proteicos del líquido hidatídico
    - 1. concentración proteica óptima para SDS-PAGE
    - 2. identificación de los componentes polipeptídicos del líquido hidatídico
      - a. tinciones proteicas en SDS-PAGE
        - (1) condiciones no reductoras
        - (2) condiciones reductoras
      - b. elución y reducción de los componentes polipeptídicos
      - c. perfil electroforético de la albúmina y las inmunoglobulinas
  - B. Identificación de las proteínas inmunogénicas
    - 1. inmunoreactividad con sueros de pacientes afectados de hidatidosis
      - a. condiciones no reductoras
      - b. condiciones reductoras
    - 2. inmunoreactividad con sueros de donantes sanos
    - 3. inmunoreactividad con sueros de pacientes afectados de otras parasitosis

### III OBTENCIÓN DE ANTISUEROS POR INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL EN CONEJOS

#### A. Purificación de las fracciones antigénicas

##### 1. purificación físico química de los antígenos mayoritarios

#### B. Obtención de antisueros : cinética de producción de anticuerpos y estudio de la especificidad

##### 1. antisuero anti líquido hidatídico

###### a. hemaglutinación indirecta

###### b. inmunoelectroforesis

###### c. *immunoblot*

##### 2. antisuero anti antígenos parasitarios mayoritarios

###### a. inmunoelectroforesis

###### b. *immunoblot*

##### 3. antisuero anti antígeno S

###### a. hemaglutinación indirecta

###### b. inmunoelectroforesis

###### c. *immunoblot*

##### 4. antisuero anti antígeno B

###### a. hemaglutinación indirecta

###### b. inmunoelectroforesis

###### c. *immunoblot*

#### C. Purificación de los antisueros

##### 1. separación de la fracción inmunoglobulinica

##### 2. cromatografía de afinidad

**IV DESARROLLO DE PROTOSCOLEX CULTIVADOS IN VITRO,  
PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION****A. Procesamiento de la arena hidatídica**

1. obtención de protoscólex
2. mantenimiento de protoscólex in vitro
  - a. valoración de la viabilidad
  - b. cambios morfológicos
    - (1) proceso de evaginación de los protoscólex
    - (2) proceso de diferenciación en dirección quística
    - (3) alteraciones estructurales comunes

**B. Desarrollo in vitro de *E. granulosus***

- a. vesiculización de los protoscólex
- b. vesiculización del polo posterior de los protoscólex
- c. vesículas libres
- d. vesículas con múltiples protoscólex

**C. Estudio de la producción de antígenos de secreción-excreción**

1. obtención y preparación de los sobrenadantes
  - a. concentración por ultrafiltración
  - b. concentración por precipitación
2. análisis electroforético e inmunológico del sobrenadante
  - a. SDS-PAGE
  - b. *immunoblot*
  - c. *dot-blot*

**V LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOLÓGICA DE LAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS**

- A. Estructura de *E. granulosus* por microscopía óptica**
  - 1. estructura del quiste hidatídico
  - 2. reacción de los tejidos del hospedador
  - 3. estructura de las vesículas prolíferas
  - 4. estructura de los protoscólex
  
- B. Estructura de *E. granulosus* por microscopía electrónica**
  - 1. ultraestructura de las vesículas prolíferas
  - 2. ultraestructura de los protoscólex
    - a. tegumento
    - b. sistema muscular
    - c. sistema osmorregulador
    - d. corpúsculos calcáreos
  
- C. Inmunolocalización de las fracciones antigénicas por microscopía óptica**
  - 1. titulación de los antisueros
  - 2. localización inmunohistológica
    - a. inmunolocalización del antígeno 5
    - b. inmunolocalización del antígeno B
    - c. inmunolocalización con el antisuero anti antígenos parasitarios mayoritarios
    - d. controles

- D. Inmunolocalización de las fracciones antigénicas por microscopía electrónica
  - 1. titulación de los antisueros
  - 2. localización inmunohistológica
    - a. inmunolocalización del antígeno 5 y del antígeno B en las vesículas prolíferas
    - b. inmunolocalización del antígeno 5 y del antígeno B en los protoscólex
    - c. inmunolocalización con el antisuero anti antígenos parasitarios mayoritarios
    - d. controles

## **OBTENCION Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARASITARIO**

Los resultados concernientes a este apartado son un paso previo para la realización de los apartados siguientes. En el material y métodos solo se expone la metodología para la obtención de un material antigénico que, procesado de una u otra forma permite la posterior obtención de unos resultados. Es por ello, que para mejor comprensión, los resultados de la obtención y procesamiento del "material parasitario", son tratados en el contexto de los otros apartados.

## **CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE *E. granulosus***

Los componentes proteicos del líquido hidatídico se han separado por SDS-PAGE, y se han caracterizado en función de su peso molecular.

Las proteínas inmunogénicas de *E. granulosus* se han reconocido por inmunoblot, empleando sueros de pacientes afectados de hidatidosis.

## SEPARACION DE LOS COMPONENTES PROTEICOS DEL LIQUIDO HIDATIDICO

Los componentes proteicos del líquido hidatídico, se han separado por SDS-PAGE, empleando geles analíticos al 8 y al 12%, y geles en gradiente del 5 al 20%.

### CONCENTRACION PROTEICA OPTIMA PARA SDS-PAGE

La siembra simultánea de una misma muestra de líquido hidatídico a diferentes concentraciones, ha permitido estandarizar la cantidad de proteína que debe cargarse para conseguir una máxima resolución con una mínima pérdida de bandas minoritarias :

En los geles analíticos con capacidad para diez muestras se siembran 30  $\mu$ g de proteína total por canal, y 60  $\mu$ g en los geles preparativos.

En el caso de emplear todo el gel para sembrar una única muestra, los geles analíticos se cargan con 500  $\mu$ g de proteína total y los preparativos con 1 mg.

### IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES POLIPEPTIDICOS DEL LIQUIDO HIDATIDICO

Los componentes polipeptídicos del líquido hidatídico se han identificado en función de su peso molecular.

### TINCIONES PROTEICAS EN SDS-PAGE

Las tinciones proteicas de azul coomassie y nitrato de plata (Fig 19 y 20) han permitido la visualización de los componentes polipeptídicos presentes en el líquido hidatídico, y el cálculo de su peso molecular tanto en condiciones reductoras como no reductoras.

#### Condiciones no reductoras

Tras la separación en geles al 8%, los componentes polipeptídicos, presentes en diferentes muestras de líquido hidatídico, se distri-

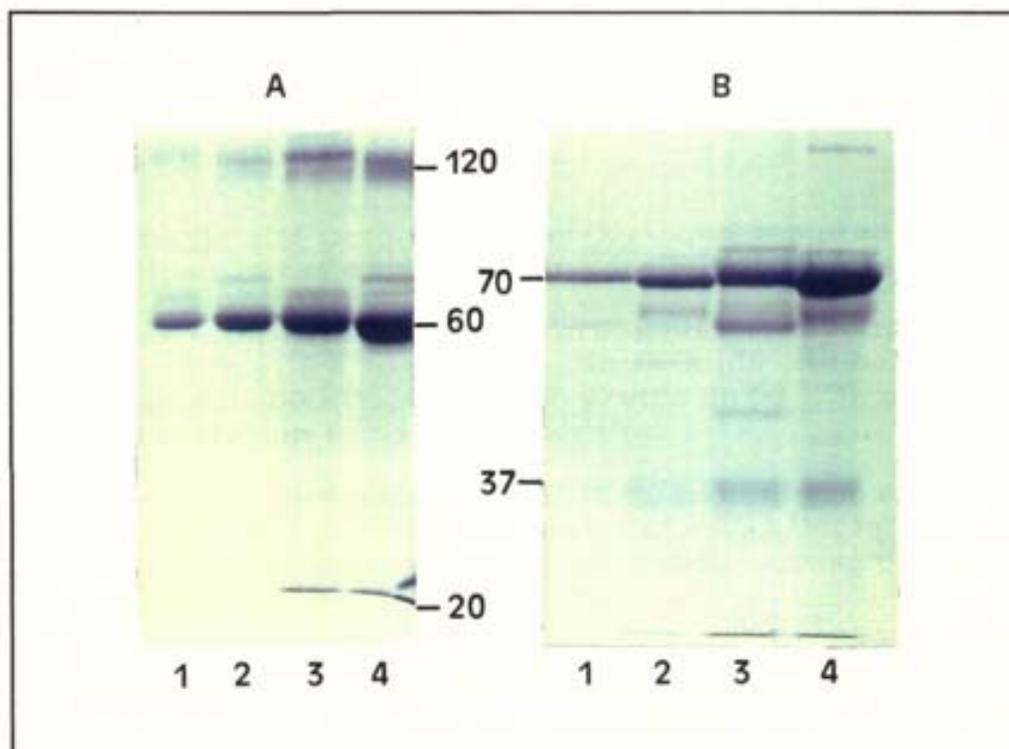


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. 1 y 3: líquido hidatídico ovino, 2 y 4: líquido hidatídico humano. A: condiciones no reductoras y B: condiciones reductoras. Tinción con CBB R-250.

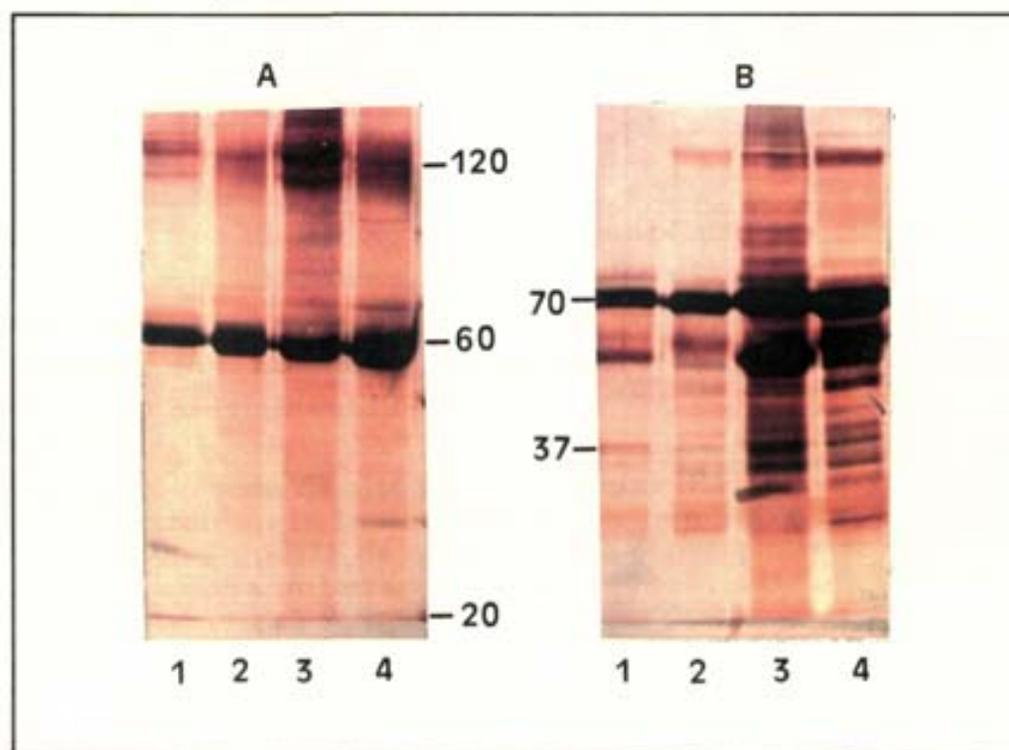


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. 1 y 3: líquido hidatídico ovino, 2 y 4: líquido hidatídico humano. A: condiciones no reductoras y B: condiciones reductoras. Tinción con nitrato de plata.

buyen claramente agrupados en tres zonas (Fig 19A y 20A) que reúnen las proteínas mayoritarias :

Zona de alto peso molecular (Z1), que comprende bandas polipeptídicas con un PM que oscila entre 160 y 120 kDa.

Zona intermedia (Z2), que agrupa polipéptidos de PM comprendido entre 70 y 50 kDa, destacando una banda mayoritaria de 60 kDa, una de 65 y, otra de 56 kDa mucho mas evidente con la tinción argéntica.

Zona de bajo peso molecular (Z3), en el que se encuentran polipéptidos de PM igual o inferior a 25 kDa, localizada en el frente de migración electroforético cuando se emplean geles de poliacrilamida al 8%.

Para la caracterización de la zona de bajo peso molecular (Z3) se preciso de geles mas densos que permitiesen una mayor resolución de los componentes polipeptídicos con PM  $\leq$  25 kDa :

La separación electroforética en geles de poliacrilamida al 12%, así como en geles con gradiente lineal entre el 5 y el 20% (Fig 21), ha permitido diferenciar en la zona de bajo peso molecular (Z3) tres componentes polipeptídicos de 24, 16 y 8 kDa.

#### Condiciones reductoras

La separación de los componentes polipeptídicos en condiciones reductoras, conseguidas mediante el tratamiento de las muestras con 2-mercaptoetanol (2-Me), evidencia (Fig 19B y 20B) modificaciones notables en el perfil electroforético de las diferentes zonas previamente referidas :

En la zona de alto peso molecular (Z1), destaca una disminución en la intensidad de las bandas, e incluso perdida de gran parte de ellas, siendo especialmente evidente en aquellas muestras cuya Z1 era, en condiciones no reductoras, menos intensa.

En la zona intermedia (Z2) destaca la desaparición de las bandas de 65 y 56 kDa y la aparición de una banda mayoritaria de 70 kDa y otra más debil de 55 kDa. En algunas de las muestras se observa como la banda de 60 kDa permanece inalterada sin modificar su PM, pero con una marcada perdida de intensidad.

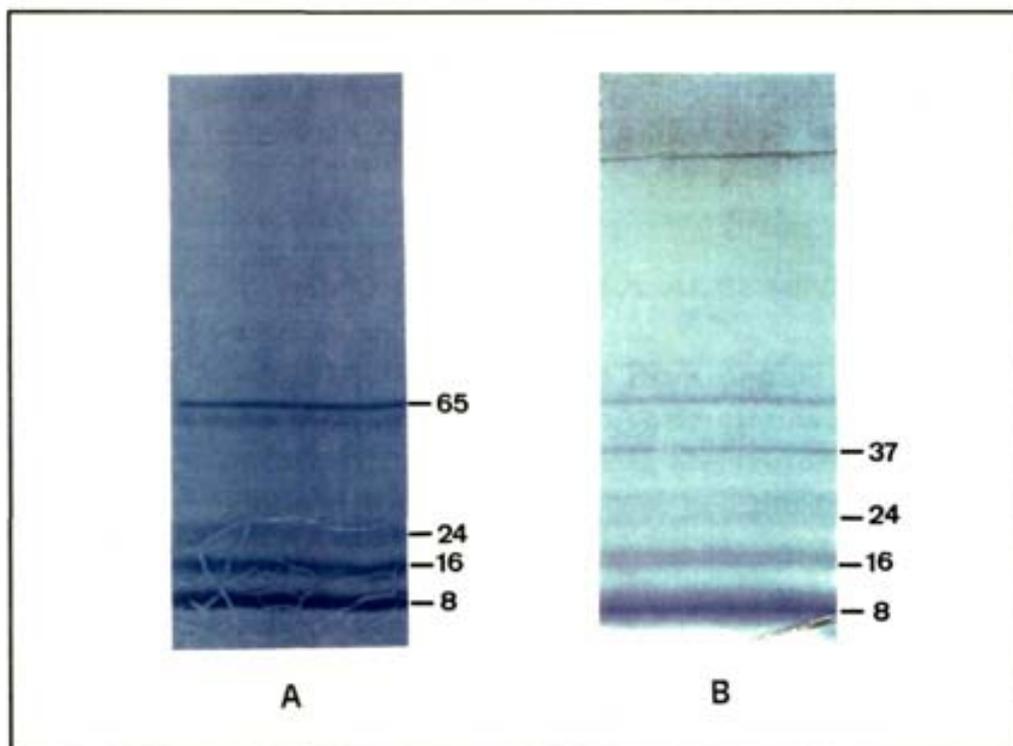


Figura 21. Electroforesis de líquido hidatídico ovino en gel con gradiente del 5-20%. A: condiciones no reductoras y B: condiciones reductoras. Tinción con CBB R-250.

Los cambios en la zona de bajo peso molecular (Z3), no pueden ser detectados cuando se emplean geles al 8%, pero en geles al 12% y geles con gradiente del 5 al 20% se observa como las tres bandas de bajo peso molecular (24, 16 y 8 kDa) no se modifican al cambiar las condiciones (Fig 21).

Tan solo comentar el bandeo que se observa entre Z2 y Z3, más evidente con la tinción argéntica, y destacar entre este una banda especialmente evidente de 37 kDa.

#### *ELUCION Y REDUCCION DE LOS COMPONENTES POLIPEPTIDICOS*

La elución de las proteínas presentes en las diferentes zonas de un gel al 8% procesado en condiciones nativas, y su posterior reducción y separación por SDS-PAGE, ha permitido establecer, inicialmente, la equivalencia de los diferentes componentes polipeptídicos en condiciones reductoras y no reductoras.

La zona de alto peso molecular (Z1), que comprende proteínas con PM entre 160 y 120 kDa, tras el tratamiento con 2-Me da lugar a dos bandas de 55 y 28 kDa.

La zona intermedia (Z2), en la que destacan las bandas de 65, 60 y 56 kDa, da lugar, en condiciones reductoras, a una banda de 70 kDa, una de 37 kDa y a un continuo de pequeñas bandas minoritarias entre ambas.

#### PERFIL ELECTROFORETICO DE LA ALBUMINA Y LAS INMUNOGLOBULINAS

El estudio mediante SDS-PAGE de inmunoglobulinas de conejo y seroalbúmina bovina (Fig 22), en condiciones reductoras y no reductoras, permitió conocer el perfil electroforético de la fracción inmunoglobulinica y la albúmina, proteínas que, procedentes del hospedador, suelen encontrarse presentes en el líquido hidatídico, y enmascarar los componentes parasitarios.

Las inmunoglobulinas, en condiciones no reductoras presentan pesos moleculares comprendidos entre 160 y 120 kDa, mientras que en condiciones reductoras dan lugar a dos bandas de 55 y 28 kDa.

La seroalbúmina bovina, en condiciones reductoras, da lugar a un múltiple bandeo entre 70 y 30 kDa y presenta un incremento en el PM de su banda mayoritaria, pasando de 60 a 70 kDa.

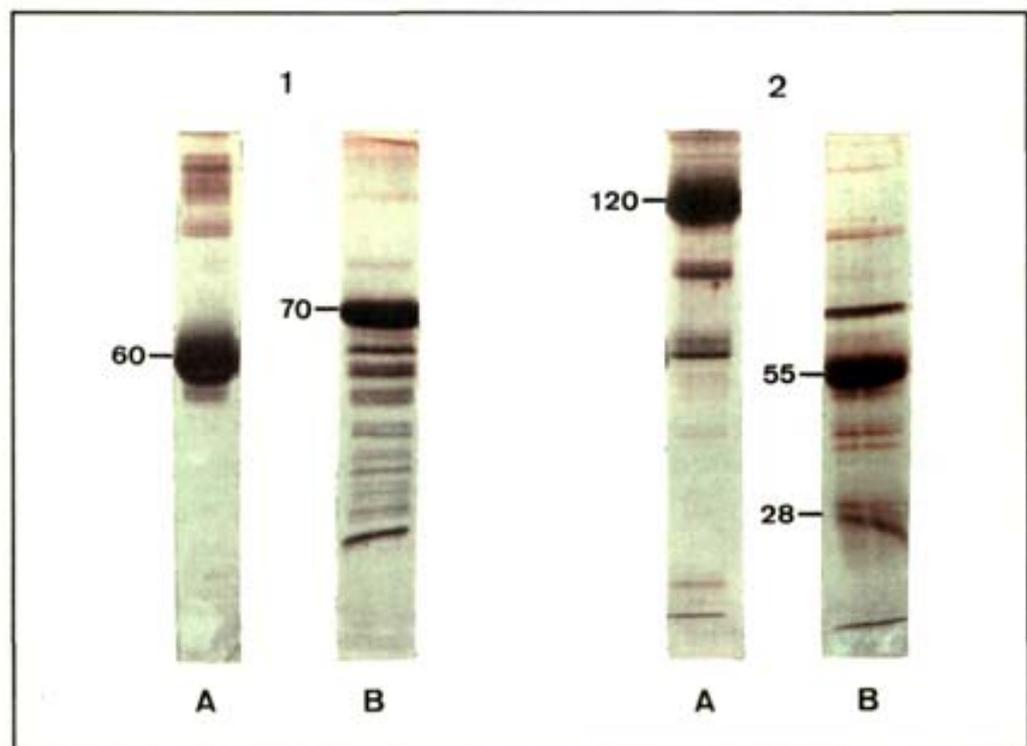


Figura 22. Electroforesis en gels al 8%. 1: seroalbúmina bovina y 2: fracción inmunoglobulinica. A: condiciones no reductoras y B: condiciones reductoras. Tinción con nitrato de plata.

## IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS

La inmunoreactividad de los componentes polipeptídicos del líquido hidatídico, se ha estudiado por inmunoblot con sueros de pacientes afectos de hidatidosis, donantes sanos y pacientes afectos de otras parasitosis.

### INMUNOREACTIVIDAD CON SUEROS DE PACIENTES AFECTOS DE HIDATIDOSIS

La incubación con los 19 sueros de pacientes afectos de hidatidosis ha permitido evidenciar las proteínas inmunoreactivas presentes en el líquido hidatídico.

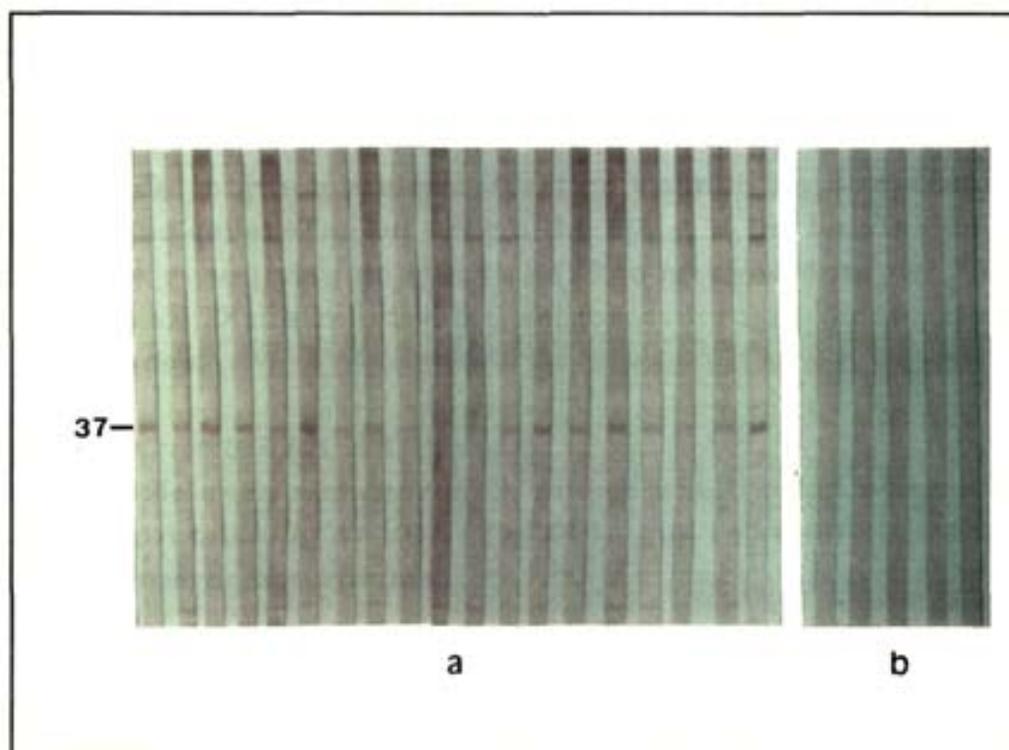
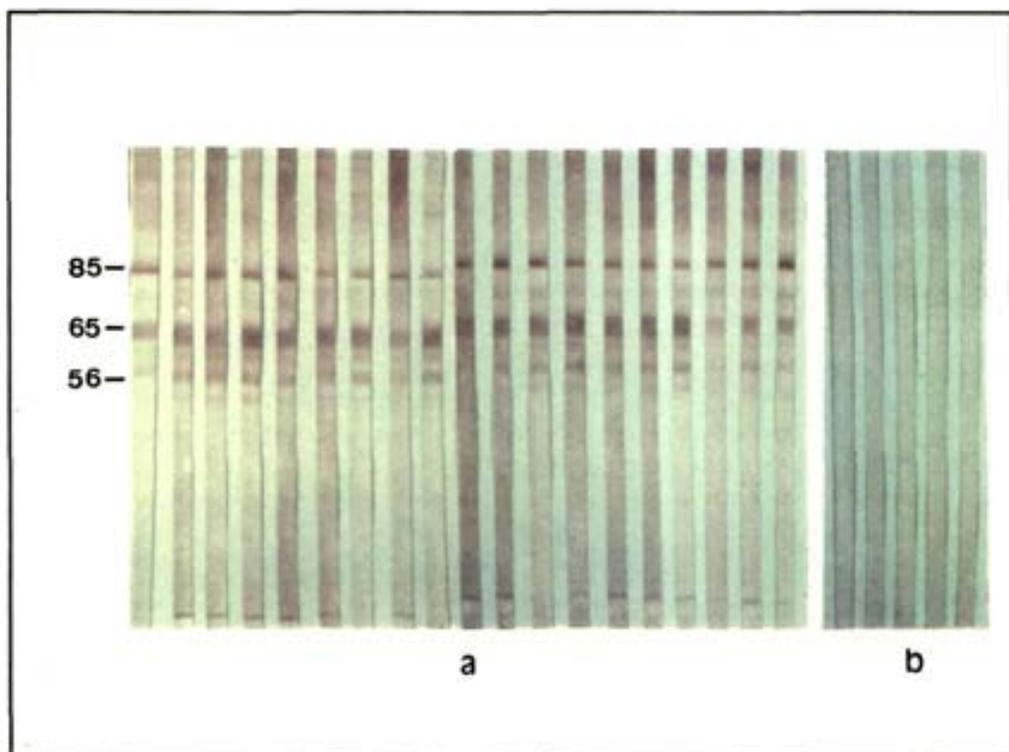
Se han obtenido reacciones positivas con proteínas comprendidas en un amplio rango de pesos moleculares. La reactividad observada, lo ha sido tanto sobre el antígeno tratado en condiciones no reductoras como en el tratado en condiciones reductoras, pero el perfil presenta variaciones en cuanto al PM de las bandas proteicas reconocidas (Fig 23A y 23B).

### CONDICIONES NO REDUCTORAS

La mayor reactividad en condiciones no reductoras se ha obtenido en la zona intermedia (Z2), y concretamente con las proteínas de 65 y 56 kDa (Fig 23A), que son reconocidas por la totalidad de los sueros estudiados.

Entre la zona de alto peso molecular (Z1) y la zona intermedia (Z2) destaca la reactividad que presenta una proteína de 85 kDa, la cual no se identificó en geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie o nitrato de plata frente a la cual todos los sueros estudiados son inmunoreactivos.

En la zona de alto peso molecular (Z1) se observa una reactividad difusa que no permite diferenciar bandas concretas.



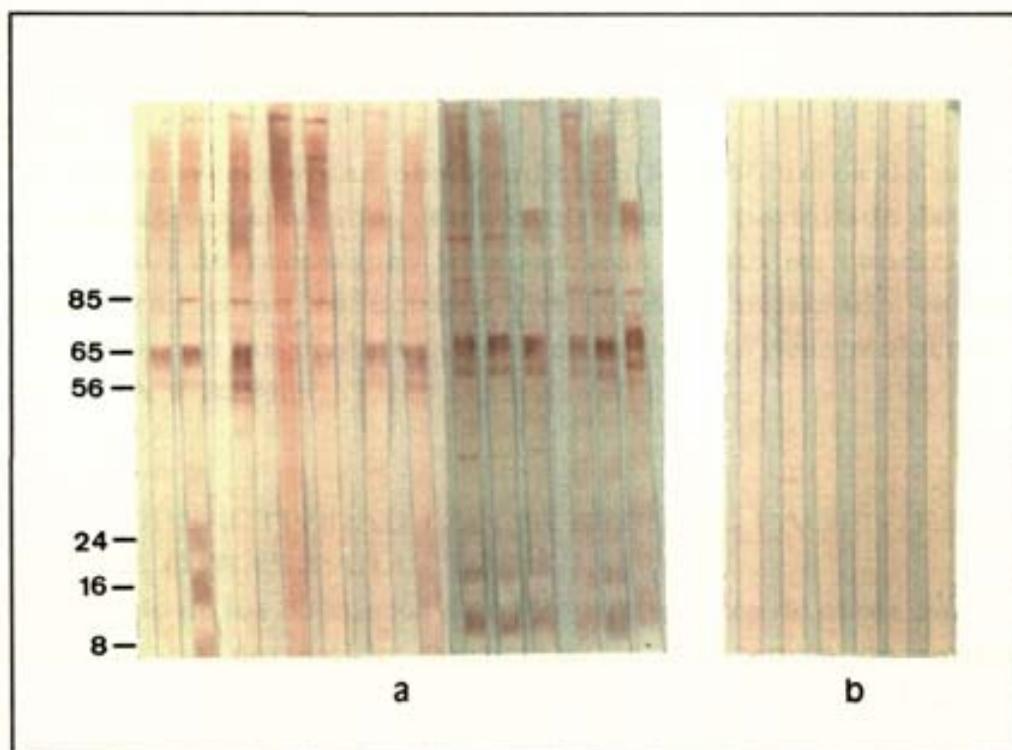


Figura 24. Patrón de reactividad el líquido hidatídico ovino. A: condiciones no reductoras y B: condiciones reductoras. a: sueros de pacientes afectados de hidatidosis y b: sueros de donantes sanos. Proteínas transferidas de geles en gradiente 5-20%.

Aunque con menor frecuencia, también se evidencia reacción en la zona de bajo peso molecular (Z3), asociándose la reactividad al frente de migración electroforético cuando se han transferido proteínas separadas en un gel del 8% y, a las bandas de 24, 16 y 8 kDa si se parte de geles al 12% o en gradiente del 5 al 20% (Fig 24A). Dicha reactividad se observo en 14 de los 19 sueros estudiados.

#### CONDICIONES REDUCTORAS

En condiciones reductoras la mayor reactividad se asocia a la banda proteica de 37 kDa (Fig 23B), que es reconocida por 18 de los 19 sueros estudiados.

En la zona de alto peso molecular (Z1) se observa una reactividad difusa muy tenue.

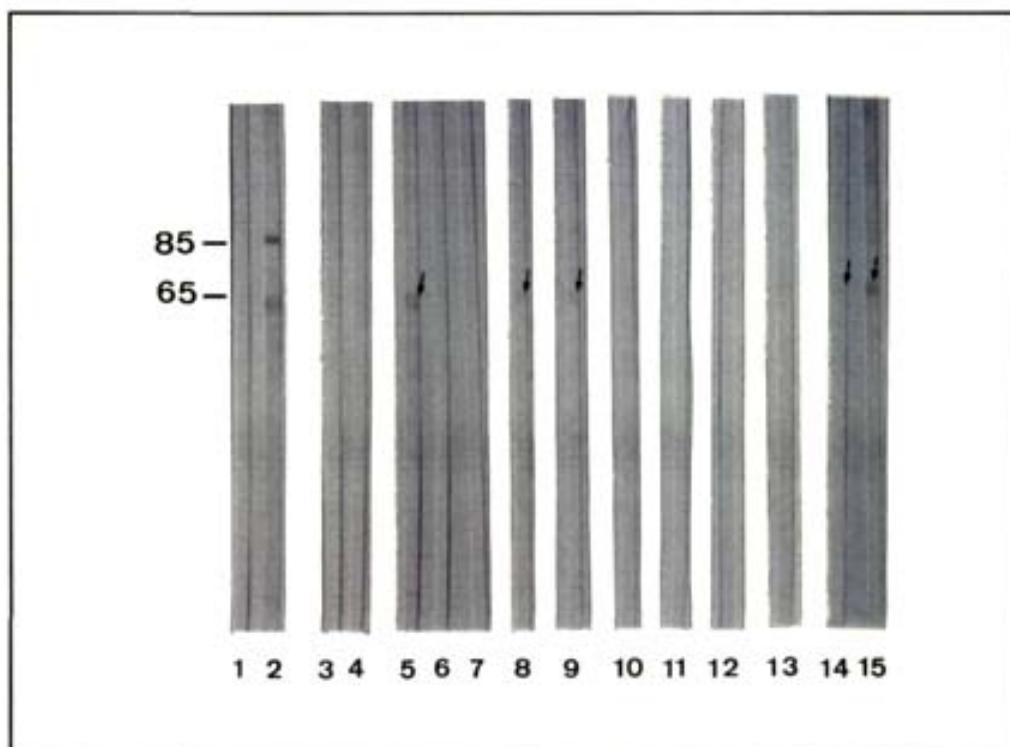
La reactividad en la zona de bajo peso molecular (Z3) no difiere con respecto a las condiciones no reducidas (Fig 23B y 24B).

### INMUNOREACTIVIDAD CON SUEROS DE DONANTES SANOS

La inmunoreactividad observada con los 25 sueros de pacientes seronegativos escogidos como controles, ha permitido detectar la existencia de reacciones inespecíficas, tanto en condiciones no reductoras como reductoras, habiéndose mostrado reacciones positivas con las proteínas de la zona de alto peso molecular (Z1) (Fig 23A y 23B).

### INMUNOREACTIVIDAD CON SUEROS DE PACIENTES AFECTOS DE OTRAS PARASITOSIS

El estudio de los 33 sueros de pacientes afectados de otras parasitosis (Fig 25) ha permitido comprobar la existencia de reacciones cruzadas, asociándose tan solo a las bandas de 65 kDa, en condiciones no reductoras, y 37 kDa en condiciones reductoras.



**Figura 25.** Patrón de reactividad del líquido hidatídico en condiciones no reductoras revelado con sueros de pacientes afectados de otras parasitosis. 1: control negativo; 2: control positivo; 3 y 4: *Schistosoma* spp.; 5,6 y 7: *T. trichiura*; 8: *S. stercoralis*; 9: *L. loa*; 10: *T. gondii*; 11: *L. donovani*; 12: *E. histolytica*; 13: *Plasmodium* spp.; 14: *E. vermicularis* + *N. americanus*; 15: *T. trichiura* + *A. lumbricoides* + *N. americanus* + *D. perstans*.

Cinco de los 13 sueros estudiados de pacientes afectados de nematodiasis presentaron reactividad con la banda polipeptídica de 65 kDa, estos sueros correspondían a: un enfermo con *T. trichiura*, uno con *S. stercoralis*, uno con *L. loa* y dos con polinematodiasis.

No se observó ninguna reactividad con los sueros de los 3 pacientes con infecciones por trematodos.

Tan solo un enfermo con paludismo, de entre las 17 protozoosis, presentó reactividad con la banda de 65 kDa.

Todos los sueros que presentaron reactividad con la banda de 65 kDa en condiciones no reductoras, lo hicieron también con la de 37 kDa en condiciones reductoras.

### **OBTENCION DE ANTISUEROS POR INMUNIZACION EXPERIMENTAL EN CONEJOS**

Los antígenos parasitarios mayoritarios se purificaron por técnicas de precipitación físico química y sus componentes polipeptídicos se separaron mediante SDS-PAGE.

Por inmunización experimental en conejos se obtuvieron antisueros poliespecíficos dirigidos contra el líquido hidatídico y contra los antígenos parasitarios mayoritarios, y antisueros monoespecíficos frente al Ag 5 y frente al Ag B.

## PURIFICACION DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS

### PURIFICACION FISICO QUIMICA DE LOS ANTIGENOS MAYORITARIOS

Cuando el líquido hidatídico concentrado se dializa contra un tampón de baja fuerza ionica la albúmina (fracción I) permanece en suspensión y la mayoría del antígeno parasitario precipita junto con las inmunoglobulinas. La fracción globulínica (fracción II) se elimina por precipitación en una solución de sulfato de amonio al 40%, mientras que los componentes parasitarios permanecen en solución (fracción III).

El rendimiento de la purificación en cada uno de sus pasos se muestra en la tabla X.

	LH ovino	LH humano
Volumen inicial	?	48ml
Proteína total	2.9 mg	4.7 mg
Fracción I	1.2 mg (47%)	2.0mg (46%)
Fracción II	-	-
Fracción III	0.5 mg (17%)	1.5 mg (35%)

Tabla X. Rendimiento de la purificación de los antígenos mayoritarios.

En la figura 26 se muestra el patrón por SDS-PAGE en geles con gradiente del 5 al 20%, de las diferentes fracciones del líquido hidatídico humano, en condiciones no reductoras, obtenidas tras la purificación.

En la fracción de la albúmina (fracción I), se observa, en condiciones no reductoras, una banda mayoritaria de peso molecular aproximado de 60 kDa, que se acompaña de un complejo proteico situado entre 120 y 160 kDa y una banda de 16 kDa (Fig 26.3).

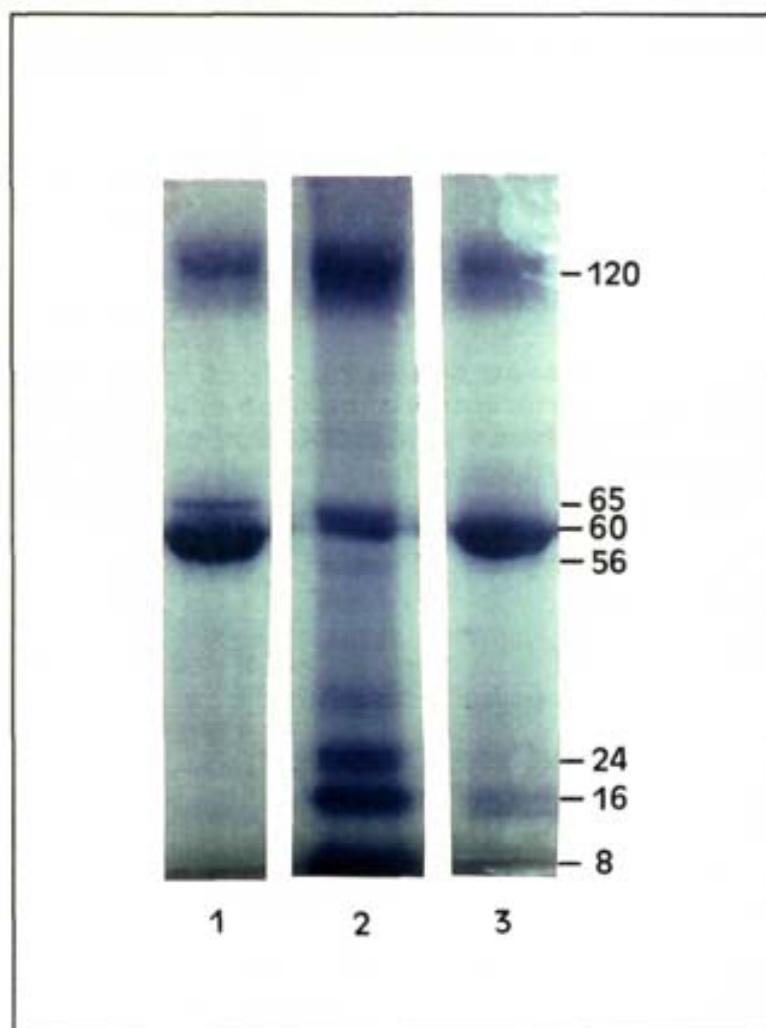


Figura 26. SDS-PAGE en condiciones no reductoras de las diferentes fracciones del líquido hidatídico. 1: antígeno bruto, 2: componentes parasitarios y fracción globulínica y 3: fracción de la albúmina.

Las proteínas parasitarias mayoritarias (fracción III), recuperadas del precipitado, se visualizan en el gel acompañadas de la fracción globulínica (fracción II). Por tinción con azul Coomassie se observa una zona de alto peso molecular que comprende proteínas de entre 120 y 160 kDa, una banda de 65 kDa que se acompaña de una banda minoritaria de 56 kDa, y un complejo de bandas de bajo peso molecular, estimadas en 32, 24, 16 y 8 kDa (Fig 26.2). Tras la precipitación con sulfato de amonio, se observa como prácticamente desaparecen las proteínas de 120-160 kDa.

El tratamiento de las diferentes fracciones con 2-Me, supone una serie de cambios en los PM previos y la aparición de nuevas bandas:

En la fracción albumínica (fracción I) se observa, un aumento de PM en la banda mayoritaria que pasa de 60 a 70 kDa y la aparición de unas bandas minoritarias de 55 y 28 kDa. El complejo proteico de 120-160 kDa desaparece, y la banda de 16 kDa no se modifica.

En la fracción de proteínas parasitarias (fracción III) se observa, en condiciones reductoras, la pérdida de las proteínas de 65 y 56 kDa, y la aparición de una banda de 37 kDa. No se observa modificación alguna en las proteínas de 32, 24, 16 y 8 kDa.

## OBTENCION DE ANTISUEROS : CINETICA DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS Y ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD

El control de inmunización, de los animales de experimentación inoculados con las diferentes fracciones antigénicas, se realizó semanalmente mediante técnicas de hemaglutinación indirecta e inmunolectroforesis, la especificidad de los antisucros obtenidos se estudio por inmunoblot.

### ANTISUERO ANTI LIQUIDO HIDATIDICO

Se obtuvo mediante la inoculación de conejos con el sobrenadante del líquido hidatídico ovino centrifugado.

### HEMAGLUTINACION INDIRECTA

El estudio cinético mediante hemaglutinación indirecta, revela títulos superiores al título diagnóstico (1/128) a partir de la segunda semana de inmunización, aumentando progresivamente hasta alcanzar una titulación máxima de 1/20.480 en la sexta y séptima semana, momento en el cual el animal es sacrificado.

### INMUNOELECTROFORESIS

Mediante inmunolectroforesis (Fig 27) se observa, en la segunda semana de inmunización, la aparición de tres bandas de precipitación, una de las cuales, en la tercera semana, presenta reacción de identidad con el arco 5 de Capron.

El número de bandas de precipitación alcanza un máximo de siete en la quinta semana, momento en el que se detecta la presencia de un arco de precipitación idéntico al descrito por Oriol para el Ag B.

En las semanas siguientes, el número de bandas y su identidad, no se modifica.

### INMUNOBLOT

El patrón de reactividad observado por *inmunoblot*, se mantiene constante desde que se evidencia la producción de anticuerpos específicos (Fig 28) en la segunda semana postinoculación.

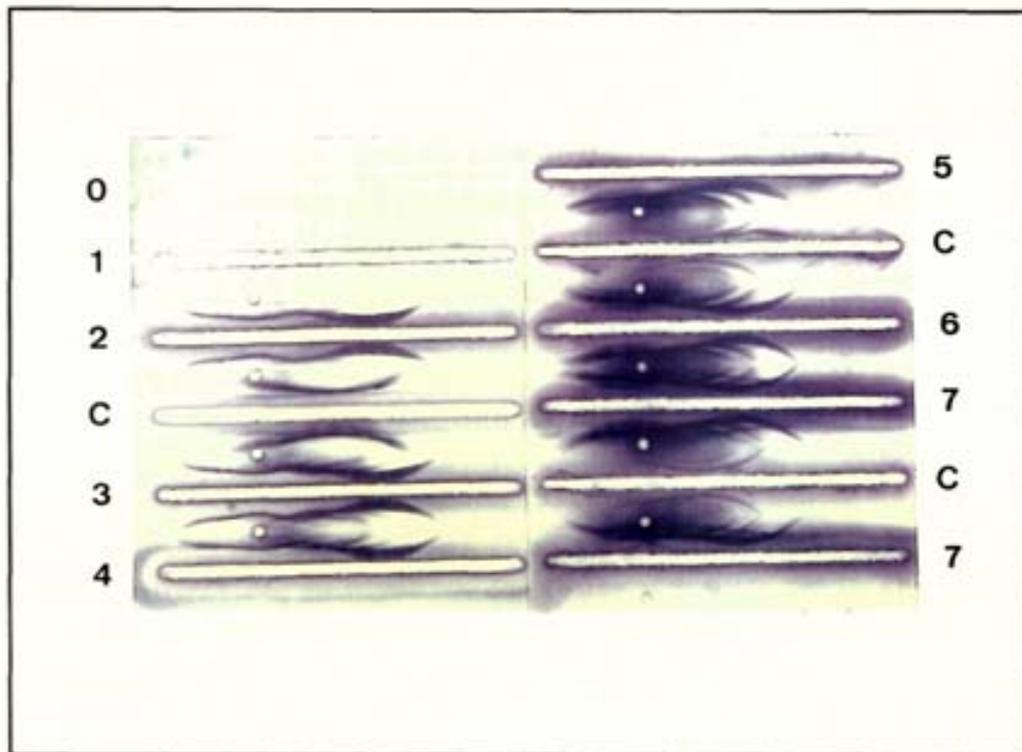


Figura 27. Estudio de la cinética de producción de anticuerpos anti líquido hidatídico. Inmunoelectroforesis. C: control positivo (suero humano), 0: pre-inmunización, 1-7: semanas postinmunización.

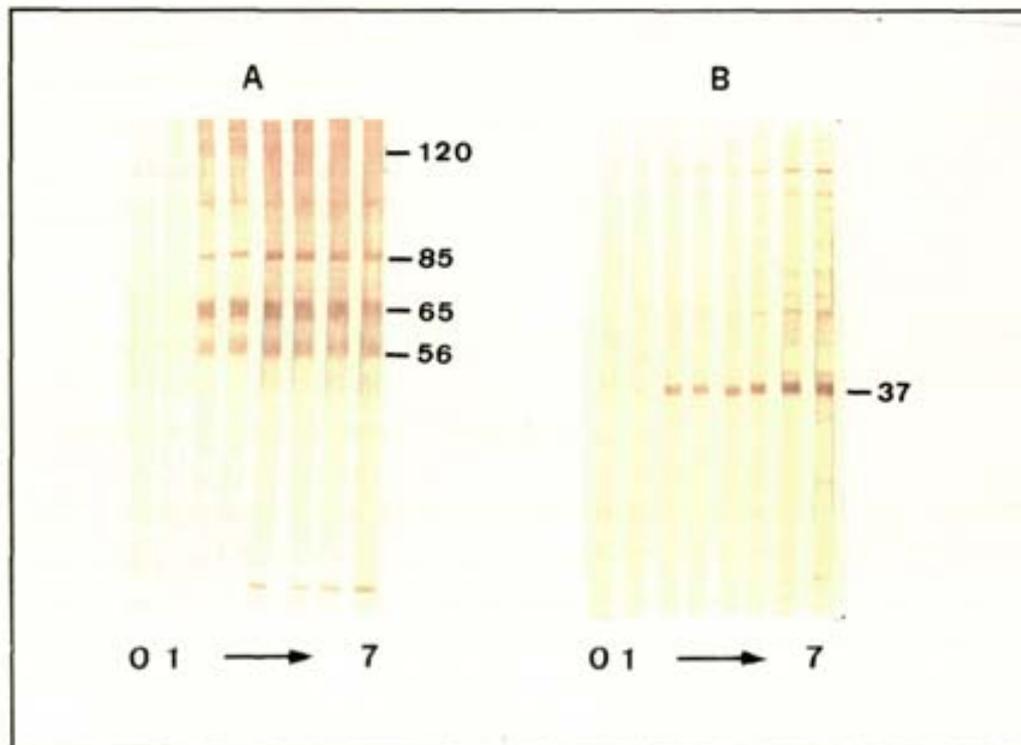


Figura 28. Estudio de la cinética de producción de anticuerpos anti líquido hidatídico. *Immunoblot*. A: condiciones no reductoras, B: condiciones reductoras, 0: preinmunización, 1-7: semanas postinmunización. Geles al 8%.

Cuando se estudia la reactividad de los antisuecos sobre las transferencias de líquido hidatídico purificado, tratado en condiciones no reductoras y separado en geles al 8%, se observa como reconoce el complejo proteico de 160-120 kDa, las bandas proteicas de 85, 65 y 56 kDa, y el frente de migración electroforético. Al trabajar en condiciones reductoras la mayor reactividad se observa con la banda proteica de 37 kDa, aunque también son reconocidas algunas bandas de alto peso molecular y el frente de migración.

La reactividad observada con el frente de migración electroforético, aunque es evidente a partir de la segunda semana postinoculación, no alcanza su máxima intensidad hasta la cuarta.

La reactividad frente a la albúmina no puede ser valorada al emplear como antígeno líquido hidatídico parcialmente purificado por precipitación a baja carga iónica.

#### ANTISUERO ANTI ANTIGENOS PARASITARIOS MAYORITARIOS

Se obtuvo mediante la inoculación de conejos con los antígenos parasitarios mayoritarios, purificados del líquido hidatídico mediante métodos físico-químicos.

#### INMUNOELECTROFORESIS

En la tercera semana de inmunización se observa la aparición de un arco de precipitación muy débil, que no presenta reacción de identidad con el suero control.

La producción de anticuerpos contra los antígenos mayoritarios se hace evidente en la cuarta semana, apreciándose a partir de esta la aparición de dos arcos de precipitación que presentan identidad con el arco 5 de Capron y el arco del Ag B.

### INMUNOBLOT

La reactividad por *immunoblot* se empieza a detectar a partir de la tercera semana, aunque es a partir de la cuarta cuando esta se hace mas evidente y se pueden identificar la totalidad de las bandas que serán reconocidas por el antisuero obtenido (Fig 29).

Empleando antígenos purificados por precipitación a baja carga iónica separados en geles al 12% en condiciones no reductoras, el antisuero reconoce las bandas proteicas de 65, 56, 32, 24, 16 y 8 kDa, y en condiciones reductoras las de 37, 24, 16 y 8kDa.

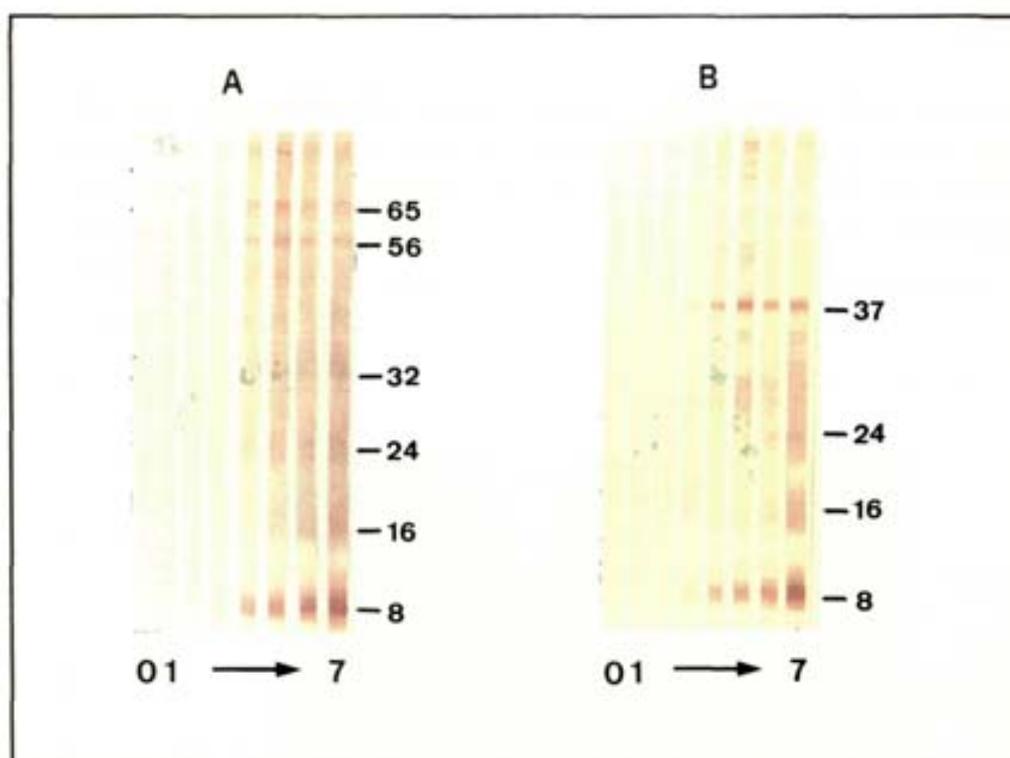


Figura 29. Estudio de la cinética de producción de anticuerpos anti antígenos parasitarios mayoritarios. *Immunoblot* sobre antígeno purificado. A: condiciones no reductoras y B: condiciones reductoras 0: preinmunización, 1-7: semanas postinmunización.

### ANTISUERO ANTI ANTIGENO 5

Para la obtención de antisueros anti-Ag 5, se inmunizaron conejos con la banda proteica de 65 kDa, recortada de un gel al 12% en la que se habían separado, en condiciones no reductoras, las fracciones proteicas del líquido hidatídico.

*HEMAGLUTINACION INDIRECTA*

La producción de anticuerpos específicos anti-Ag 5, fue prácticamente indetectable por hemaglutinación indirecta.

Tan solo uno de los dos conejos inmunizados, en la octava semana postinoculación, dio lugar a títulos iguales al considerado diagnóstico (1/128).

*INMUNOELECTROFORESIS*

Por inmunolectroforesis se visualizan, a partir de la cuarta semana postinoculación, tres arcos de precipitación (Fig 30).

De los tres arcos de precipitación obtenidos, uno presenta reacción de identidad con el arco 5 de Capron, otro posee una morfología y disposición idénticas a las del arco de precipitación obtenido al enfrentar los antisueros anti-Ag 5 un con suero ovino (Fig 30), y en el tercero no se ha podido establecer ninguna identidad por IEF.

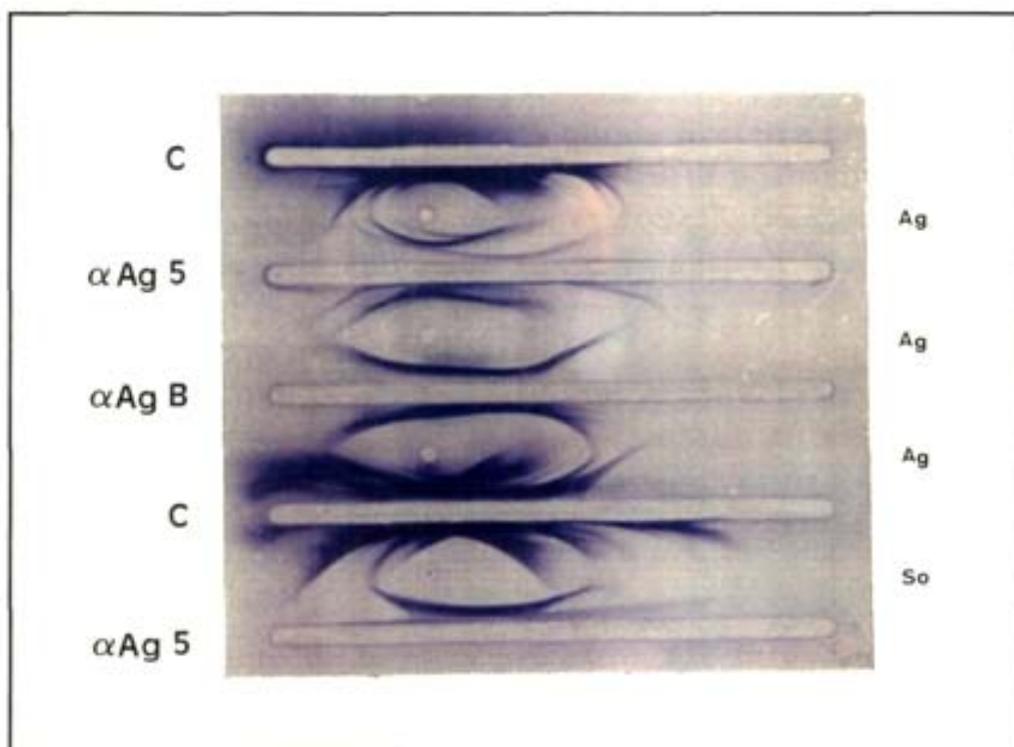


Figura 30. Inmunolectroforesis de los antisueros anti Ag 5 y anti Ag B. C: control positivo (anti líquido hidatídico). Ag: antígeno hidatídico. So: suero ovino.

#### INMUNOBLOT

Por *immunoblot*, los conejos inmunizados con la banda proteica de 65 kDa, muestran reactividad con las bandas proteicas de 65, 60 y 56 kDa desde la segunda-tercera semana postinoculación (variaciones según el animal que se estudie).

Cuando se estudia la reactividad sobre antígenos procesados en condiciones reductoras, se observa que esta es de aparición mas tardía, iniciándose en la tercera-cuarta semana con el reconocimiento de la banda de 70 kDa, y no completándose el patrón de reactividad hasta la quinta-sexta semana en la que también se observa el reconocimiento de una proteína de 80 kDa y otra de 37 kDa.

#### ANTISUERO ANTI ANTIGENO B

La banda proteica de 16 kDa, separada en un gel al 12%, fue escogida como inmunógeno para la obtención de antisuecos frente al Ag B.

#### HEMAGLUTINACION INDIRECTA

La inmunización de conejos con la banda proteica de 16 kDa, dio lugar a títulos de hemaglutinación indirecta positivos a partir de la tercera semana postinoculación (1/1024), alcanzandose un título máximo de 1/20.480 en la sexta y séptima semanas.

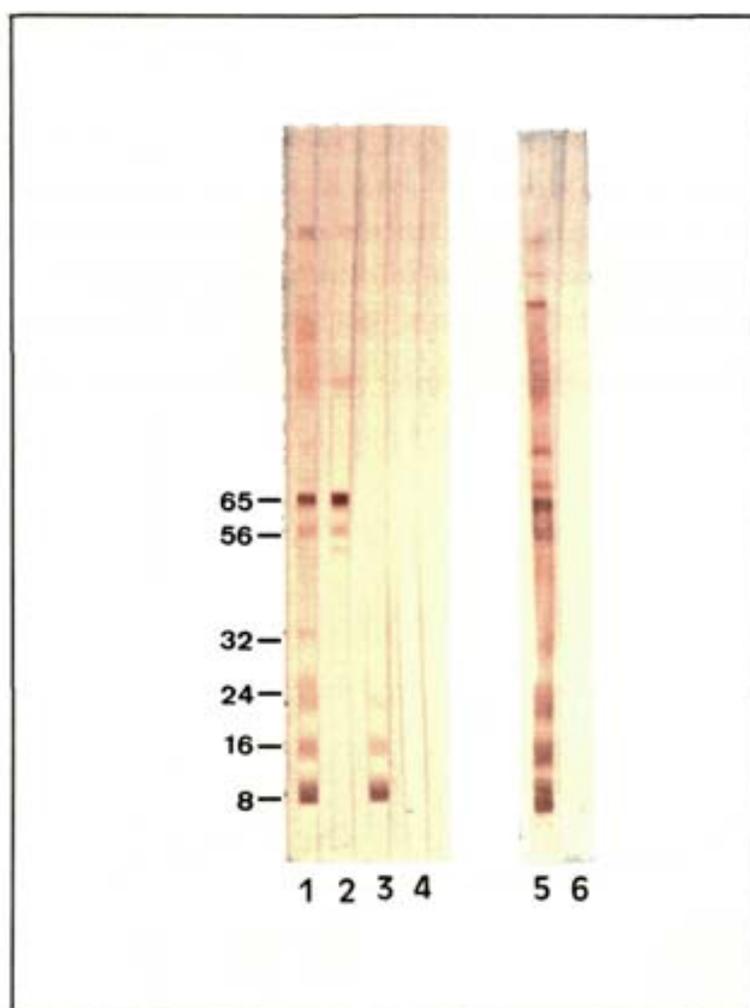
#### INMUNOELECTROFORESIS

En la tercera semana postinoculación, se aprecia la aparición de una banda de precipitación, que se mantiene en solitario hasta de la obtención de los antisuecos, y que se relaciona con la descrita para el antígeno B (Fig 30).

#### INMUNOBLOT

El reconocimiento de bandas proteicas por *immunoblot* se hace evidente a partir de la tercera semana postinoculación, y tanto el patrón de reactividad como la cinética de aparición de anticuerpos es idéntico cuando se estudia sobre antígenos tratados en condiciones no reductoras y reductoras.

La primera banda proteica que es reconocida es la de 16 kDa, aunque posteriormente serán también reconocidas las bandas de 8, 24 y 32 kDa, destacando la gran reactividad que se evidencia frente a la banda de 8 kDa al final de la inmunización (Fig 31).



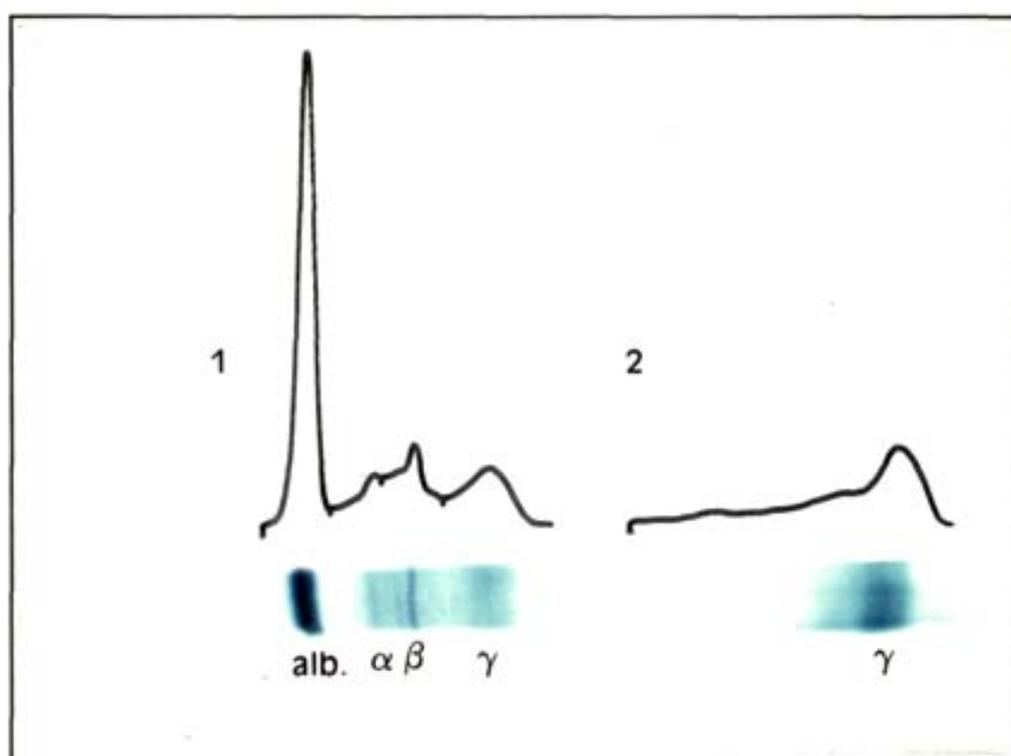
**Figura 31.** Patrón de reactividad por *immunoblot* de los antisueros obtenidos. 1: anti antígenos parasitarios, 2: anti Ag 5 (purificado), 3: anti Ag B, 4: suero de conejo no inmune, 5: control positivo humano y 6: control negativo humano.

## PURIFICACION DE LOS ANTISUEROS

El estudio de la especificidad del antisuero obtenido frente al antígeno 5 demostró, por inmunoblot, el reconocimiento inespecífico de una proteína con el PM y las características de la albúmina además del Ag 5. Los anticuerpos inespecíficos fueron eliminados del antisuero anti-Ag 5 por cromatografía de afinidad.

### SEPARACION DE LA FRACCION INMUNOGLOBULINICA

El fraccionamiento de los sueros de conejo mediante tres precipitaciones consecutivas en sulfato de amonio al 35% consigue separar la fracción inmunoglobulinica, recuperandose en el precipitado cerca del 75 % de las inmunoglobulinas de suero.



**Figura 32.** Separación de la fracción inmunoglobulinica por precipitación con sulfato de amonio. 1: suero total 2: fracción inmunoglobulinica. Perfil fotodensitométrico.

En la figura 32 se muestra, comparativamente, el perfil fotodensitométrico de las diferentes fracciones globulínicas pre-

sentes en el suero y en el precipitado, después de haber sido separadas mediante electroforesis de zona sobre acetato de celulosa. La integración del perfil densitométrico y la valoración porcentual de las diferentes fracciones, demuestra un marcado incremento en el porcentaje de la fracción gamma globulínica presente en el precipitado (59 %) respecto al porcentaje presente en el suero total (18 %), incremento que se acompaña de una gran reducción en el porcentaje del resto de fracciones, especialmente la albúmina.

#### CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Mediante cromatografía de afinidad se consiguen eliminar del antisuero anti-Ag 5 las inmunoglobulinas dirigidas contra proteínas del hospedador, las cuales se unen a la matriz de sefarosa sensibilizada con suero ovino.

Tras la incubación de la solución de inmunoglobulinas totales con el inmunoabsorbente, las inmunoglobulinas específicas permanecen en solución y la mayoría de ellas son recuperadas en el sobrenadante. El resto se recoge por lavados sucesivos del gel con tampón PBS-salino.

Tubo 0	2.112	Tubo 9	0.931	Tubo 18	0.206
Tubo 1	1.501	Tubo 10	0.883	Tubo 19	0.168
Tubo 2	1.421	Tubo 11	0.827	Tubo 20	0.139
Tubo 3	1.214	Tubo 12	0.762	Tubo 21	0.107
Tubo 4	1.159	Tubo 13	0.656	Tubo 22	0.110
Tubo 5	1.061	Tubo 14	0.541	Tubo 23	0.081
Tubo 6	1.010	Tubo 15	0.437	Tubo 24	0.056
Tubo 7	0.967	Tubo 16	0.399	Tubo 25	0.043
Tubo 8	0.947	Tubo 17	0.259	Tubo 26	0.050

Tabla XI. Valores de absorbancia a 280 nm de las diferentes alícuotas del tampón PBS-salino empleado en el lavado del gel.

En la tabla XI pueden verse los valores de absorbancia a 280 nm obtenidos para las diferentes alícuotas, de tampón PBS-salino, recogidas durante el lavado de la columna. Las alícuotas que presentan absorbancias inferiores 0.500 son despreciadas.

Después de varios lavados sin que se detecte la eliminación de cantidades significativas de inmunoglobulinas, se procede a la elución de las inmunoglobulinas adsorbidas dirigidas contra proteínas del hospedador.

Las diferentes alícuotas de tampón obtenidas, se agrupan, respetando su orden cronológico de obtención, en base a la cuantificación espectrofotométrica de las inmunoglobulinas presentes :

*Pool 1.* Inmunoglobulinas del sobrenadante: es la fracción de inmunoglobulinas específicas que se recupera por centrifugación tras la incubación del antisuero con el inmunoadsorbente. Corresponde al tubo 0 de la tabla XI. Posee una concentración de inmunoglobulinas de 1.56 mg/ml, siendo la fracción mas rica.

*Pool 2.* Inmunoglobulinas del lavado: agrupa las inmunoglobulinas que se recuperan en las primeras alícuotas de tampón PBS-salino empleado para lavar el gel de sefarosa. Se corresponde con los tubos 1-9 de la tabla XI (los tubos 10-15 no se incluyen por tener una concentración de inmunoglobulinas excesivamente baja). Posee una concentración de inmunoglobulinas de 0.84 mg/ml.

*Pool 3.* Agrupa todas aquellas alícuotas de tampón PBS-salino que presentan absorbancias inferiores a 0.500. Abarca desde el tubo 16 hasta que se añade el tampón glicina.

*Pool 4.* Inmunoglobulinas adsorbidas: corresponde a la fracción de inmunoglobulinas eluidas del gel tras la adición del tampón glicina.

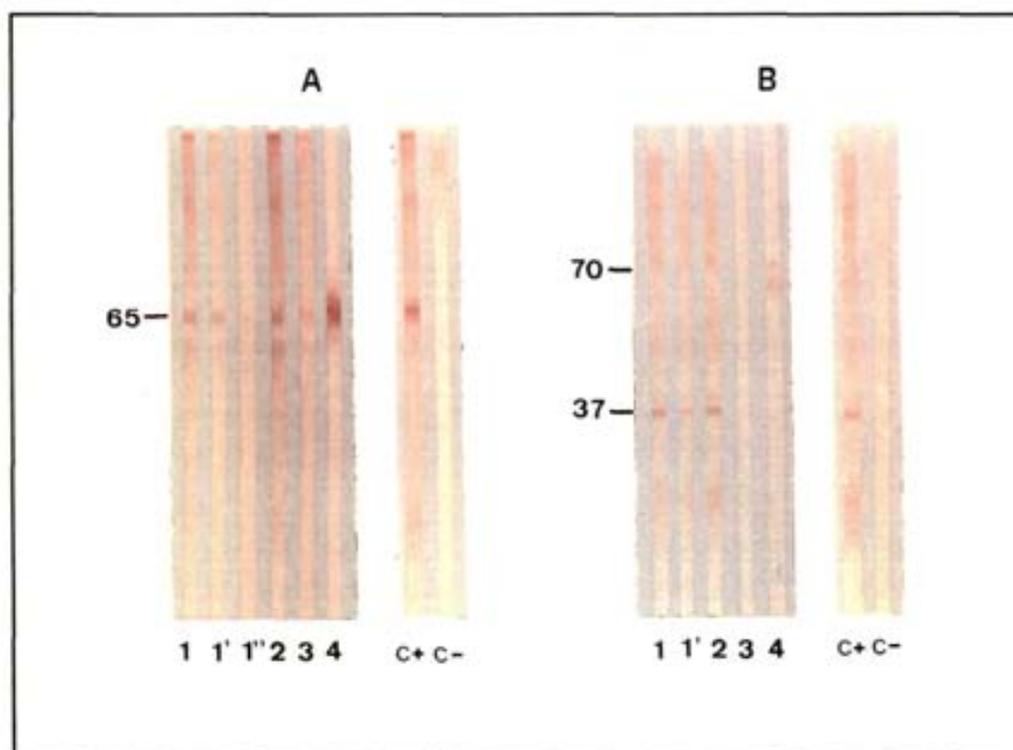


Figura 33. Patrón de inmunoreactividad por *immunoblot* de los diferentes *pools* obtenidos en la cromatografía de afinidad. A: condiciones no reductoras y B: condiciones reductoras. 1: *pool* 1 (1/50); 1': *pool* 1 (1/100); 1'': *pool* 1 (1/500); 2: *pool* 2 (1/10); 3: *pool* 3; 4: *pool* 4.

En la figura 33 se muestra el patrón de inmunoreactividad por *immunoblot* de los diferentes *pools* obtenidos en la cromatografía de afinidad. Destaca la falta de reactividad del *pool* 3 y la monoespecificidad de las diferentes fracciones inmunoglobulínicas purificadas (*pools* 1 y 2).

La inmunoreactividad de los *pools* 1 y 2 es idéntica y se corresponde con el perfil electroforético descrito para el Ag 5. Ambos *pools* incubados sobre antígenos tratados en condiciones no reductoras, reconocen de una forma clara una banda proteica de 65 kDa y mucho más débilmente una banda de 56 kDa, mientras que en condiciones reductoras reconocen una única banda de 37 kDa.

La reactividad del *pool* 4 sobre el antígeno no reducido es muy similar a la anterior, reconociendo una banda proteica de 60-65 kDa, pero en condiciones reductoras reconoce una banda de 70 kDa. Este patrón de reactividad se corresponde con el del perfil electroforético descrito previamente para la albúmina (II.A.2.c.).