

**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

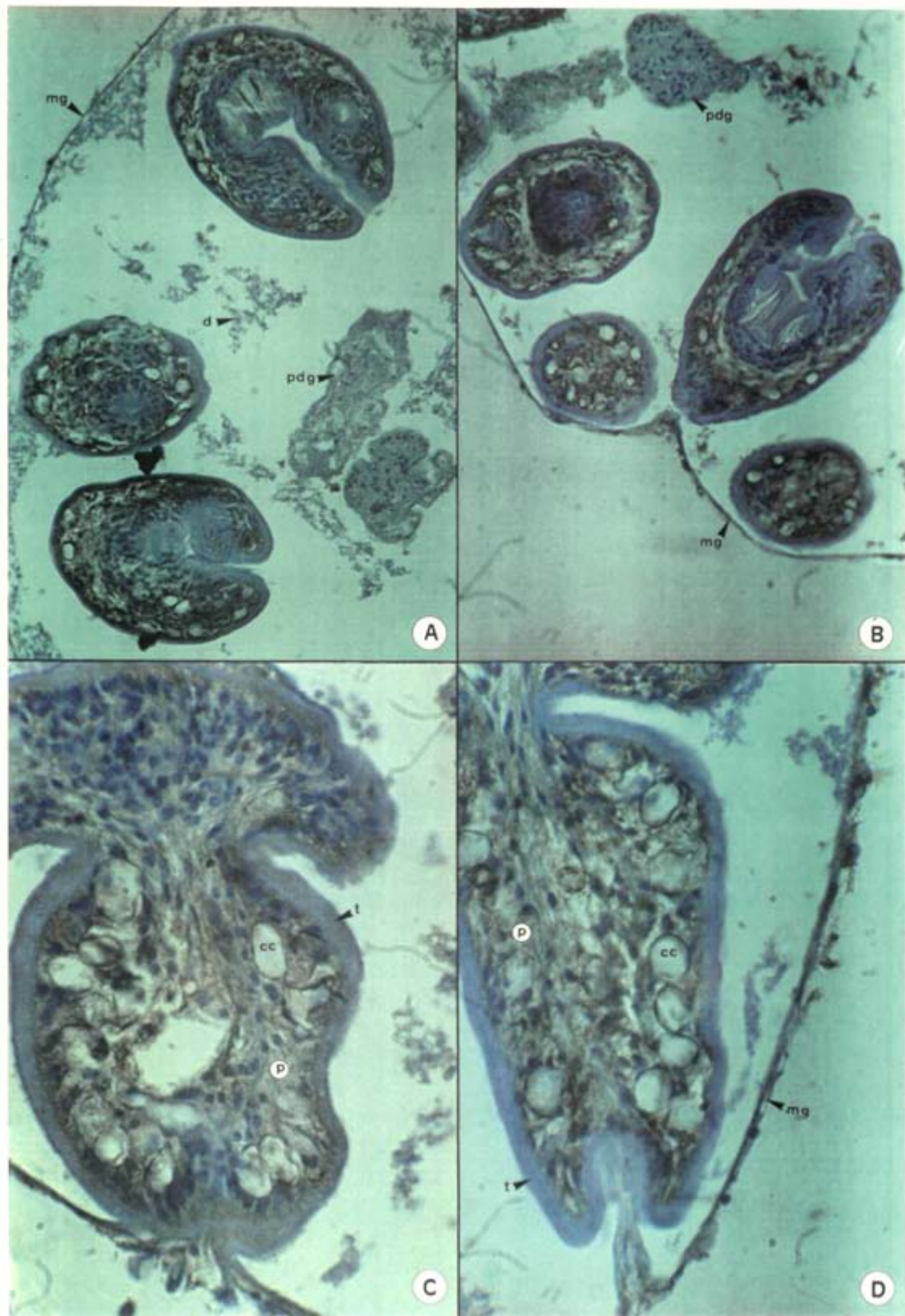


Figura 66. Localización inmunohistológica del Ag-B. A y B: 320x. C y D: 1000x. mg: membrana germinativa, d: detritus, pdg: protoscólex degenerados, t: tegumento, p: parénquima, cc: corpúsculos calcáreos.

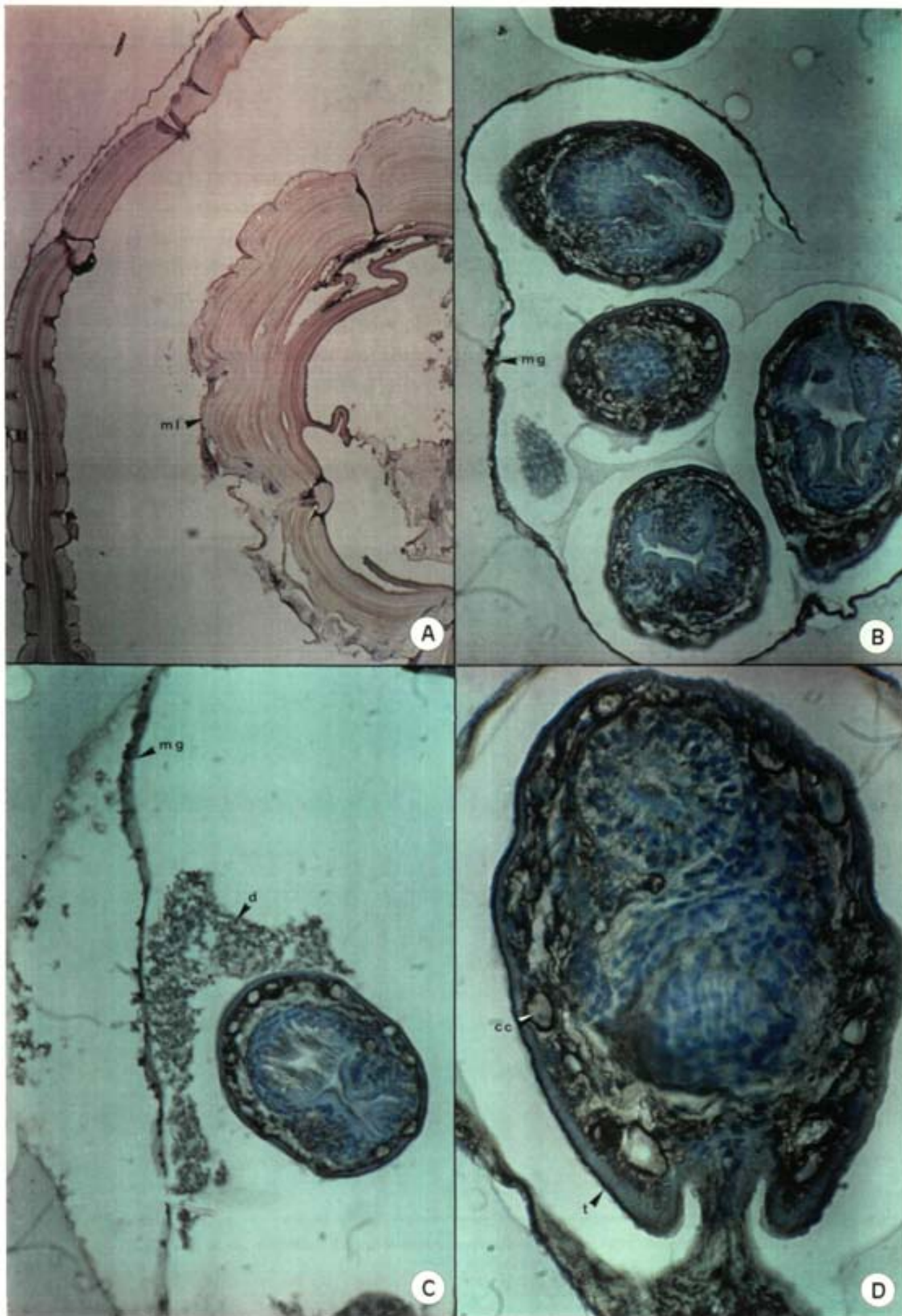


Figura 67. Inmunolocalización con el Anti-AgP. A: vesícula hija, 40x. B y C: protoscólex y vesícula prolifera, 320x. D: protoscólex, 1000x. ml: membrana laminar. mg: membrana germinativa. d: detritus. cc: corpúsculos calcáreos. t: tegumento.

CONTROLES

La sustitución del primer anticuerpo por suero no inmune diluido al 1/500 en TS (control de especificidad) o la sustitución por tampón (control de conjugado) y, la sustitución del primer y segundo anticuerpos por tampón (control de peroxidasa endógena) dieron resultados completamente negativos (Fig 68) no existiendo pues uniones inespecíficas entre los antisueros y el tejido, ni restos de actividad peroxidásica endógena tras el bloqueo de esta.

Los controles negativos empleando tejido hepático sano no detectaron reacciones cruzadas.

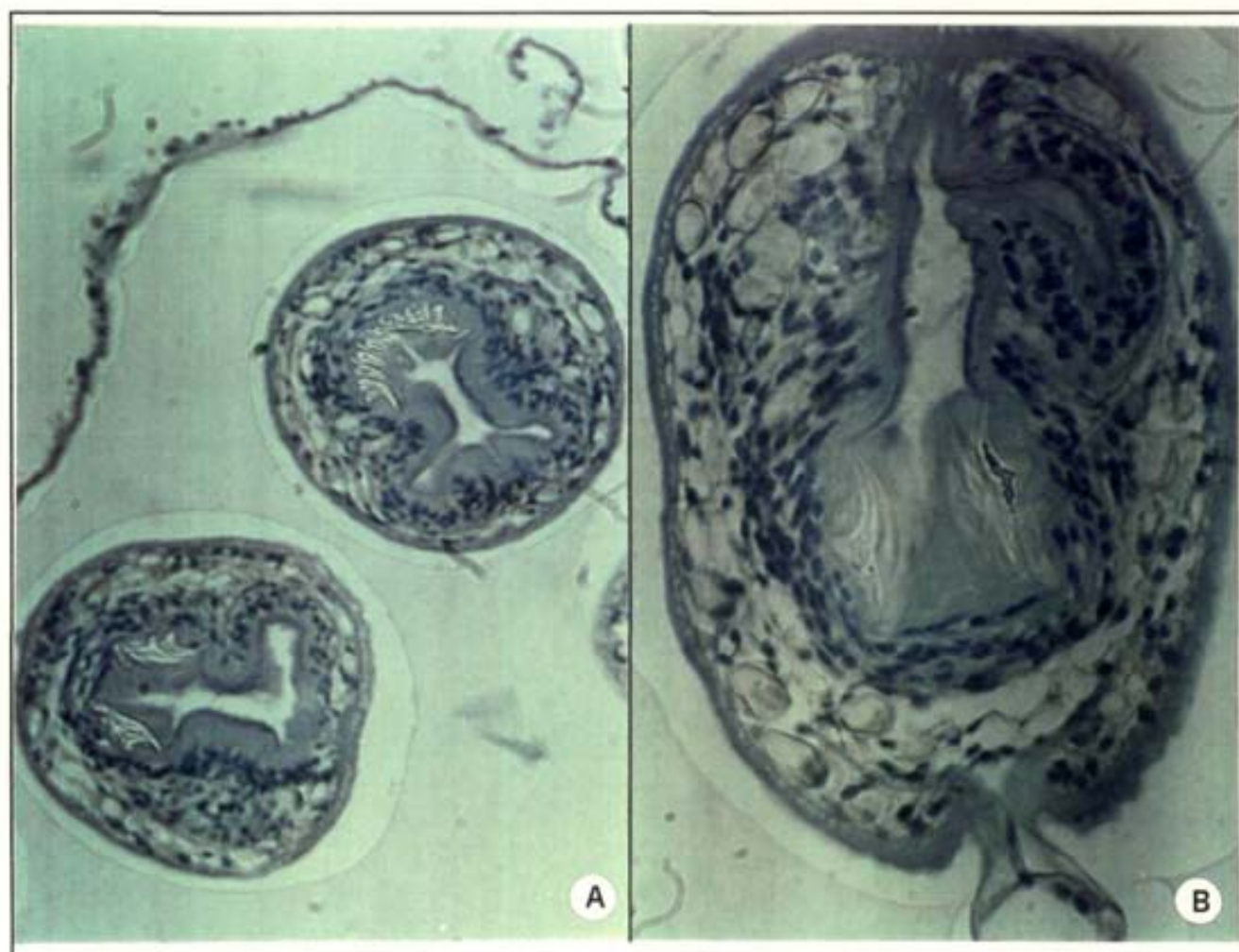


Figura 68. Control de especificidad. A: protoscolex y vesículas prolíferas, 320x. B: protoscolex, 1000x.

	Anti-5	Anti-B	Anti-AgP
Vesículas hijas			
germinativa	+	+	+
laminar	n	n	+
Vesículas proliferas			
germinativa	+	+	+
contenido	n	n	+
Protoscólex			
tegumento	n	n	+
parénquima	+	+	+
ventosas	n	n	n
corp. calcáreos	n	n	+
ganchos	n	n	n
pedículo	+	+	+
formas alteradas	+	n	+

Tabla XV. Inmunolocalización con los anticuerpos Anti-5, Anti-B y Anti-AgP en protoscólex, vesículas proliferas y vesículas hijas de *E. granulosus* de procedencia humana. Resultados obtenidos por microscopía óptica.

INMUNOLocalIZACION DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

La obtención de secciones ultrafinas de protoscólex y vesículas prolíferas de *E. granulosus* de procedencia humana y la aplicación de técnicas de inmunolocalización por microscopía electrónica, han permitido, mediante la incubación con los antisueros mono y poliespecíficos empleados en el apartado anterior (Anti-5, Anti-B y Anti-AgP), localizar a nivel ultraestructural los antígenos mayoritarios de *E. granulosus*.

TITULACION DE LOS ANTISUEROS

Las diluciones de los antisueros se seleccionan en función de los resultados obtenidos en una tabla de titulación elaborada de igual modo a como se ha expuesto en el apartado de inmunolocalización por microscopía óptica.

Las diluciones de trabajo escogidas tras la titulación de los antisueros mono y poliespecíficos y del conjugado, se exponen en la tabla XVI.

ANTISUEROS	dilución óptima
Antisuero anti-Ag 6 (purificado).....	1/8
Antisuero anti-Ag B.....	1/2000
Antisuero anti antígenos parasitarios mayoritarios	1/5000
Conjugado anti-Ig de conejo marcado con oro coloidal obtenido en cerdo (DAKO).....	1/50

Tabla XVI. Diluciones empleadas en la inmunolocalización por microscopía electrónica.

LOCALIZACION INMUNOHISTOLOGICA

Tras la incubación con los antisueros (ver material y métodos), la localización de los antígenos a nivel ultraestructural, se objetiva tras el examen de las secciones a microscopía electrónica, y la visualización de las partículas esféricas electrodensas de 10 nm de diámetro, correspondientes al oro coloidal empleado como marcador del conjugado.

El conjunto de los resultados obtenidos en la inmunolocalización a microscopía electrónica, se encuentran resumidos en la tabla XVII.

INMUNOLOCAIZACION DEL ANTIGENO 5 Y DEL ANTIGENO B EN LAS VESICULAS PROLIFERAS

La distribución a nivel ultraestructural del Ag 5 y del Ag B en las vesículas prolíferas es idéntica, en concordancia con las observaciones realizadas a nivel de microscopía óptica.

Ambos antígenos se encuentran asociados a la pared de la cavidad quística (membrana germinativa), y no se observa ningún marcaje en los "detritus" que forman parte del contenido de ésta.

El marcaje se observa sobre la superficie externa de la pared quística, localizándose en la región conectiva o paragerminal asociado específicamente a espacios no contrastados presentes en esta región (Fig 69). No se aprecia la presencia de ninguno de los dos antígenos a nivel de la región germinativa de la pared quística, encontrándose tanto el citoplasma sincitial como el perinuclear y las estructuras nucleares libres de marcaje específico (Fig 69).

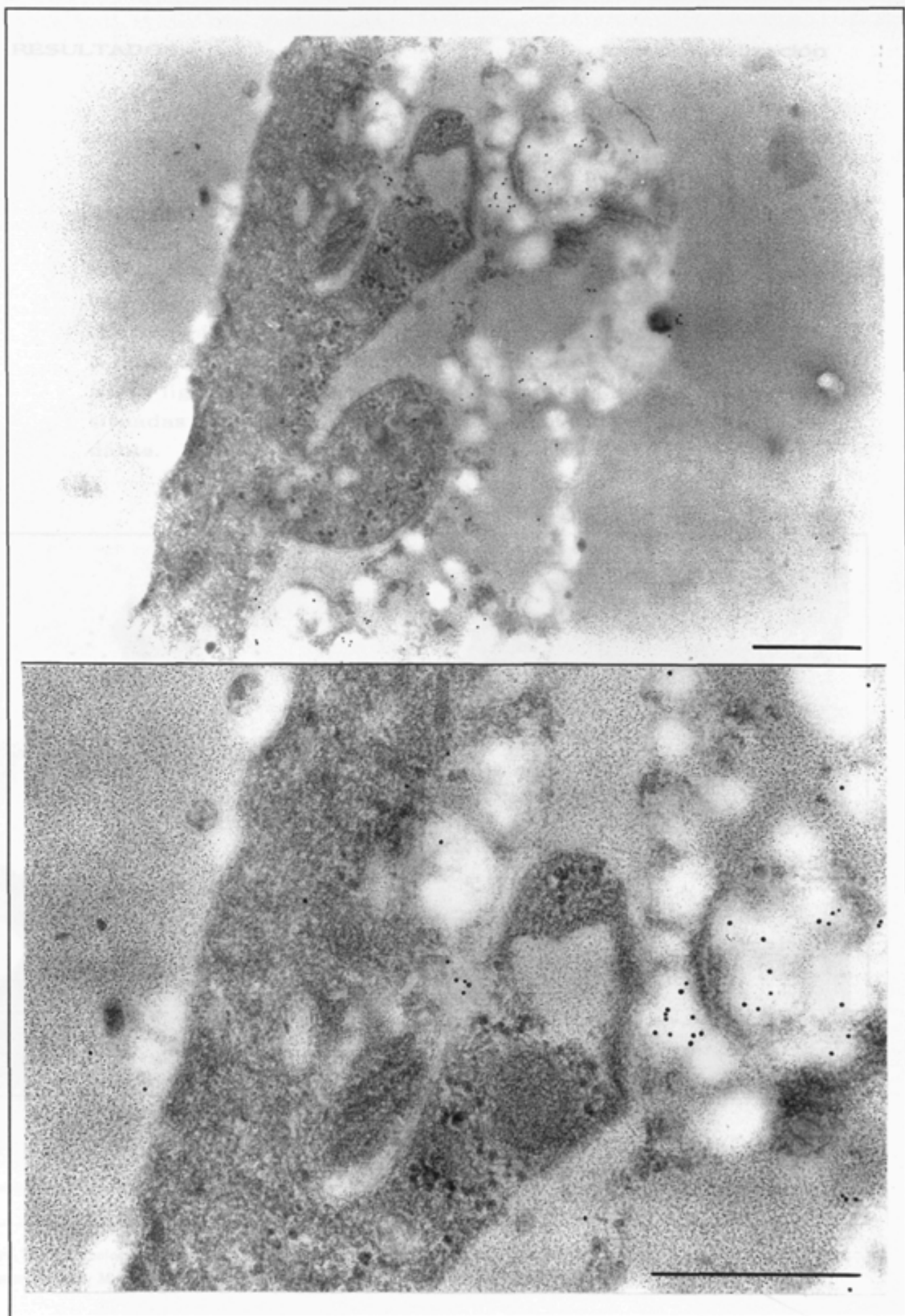


Figura 69. Inmunolocalización de los antígenos parasitarios (Ag 5 y Ag B) en las vesículas proliferas. Antisuero Anti-B. Barra 0,5 μ m.

*INMUNOLocalIZACION DEL ANTIGENO 5 Y DEL
ANTIGENO B EN LOS PROTOCOLEX*

Tanto el Ag 5 como el Ag B se localizan ultraestructuralmente en los espacios intercelulares del parénquima parasitario, observándose una alta densidad de marcaje en áreas sin contraste no estructuradas (Fig 70), no asociadas con ninguna estructura celular concreta, distribuidas por todo el parénquima.

En la figura 71 pueden verse varias áreas electrontranslucidas situadas fuera de la membrana citoplasmática de la célula colindante.

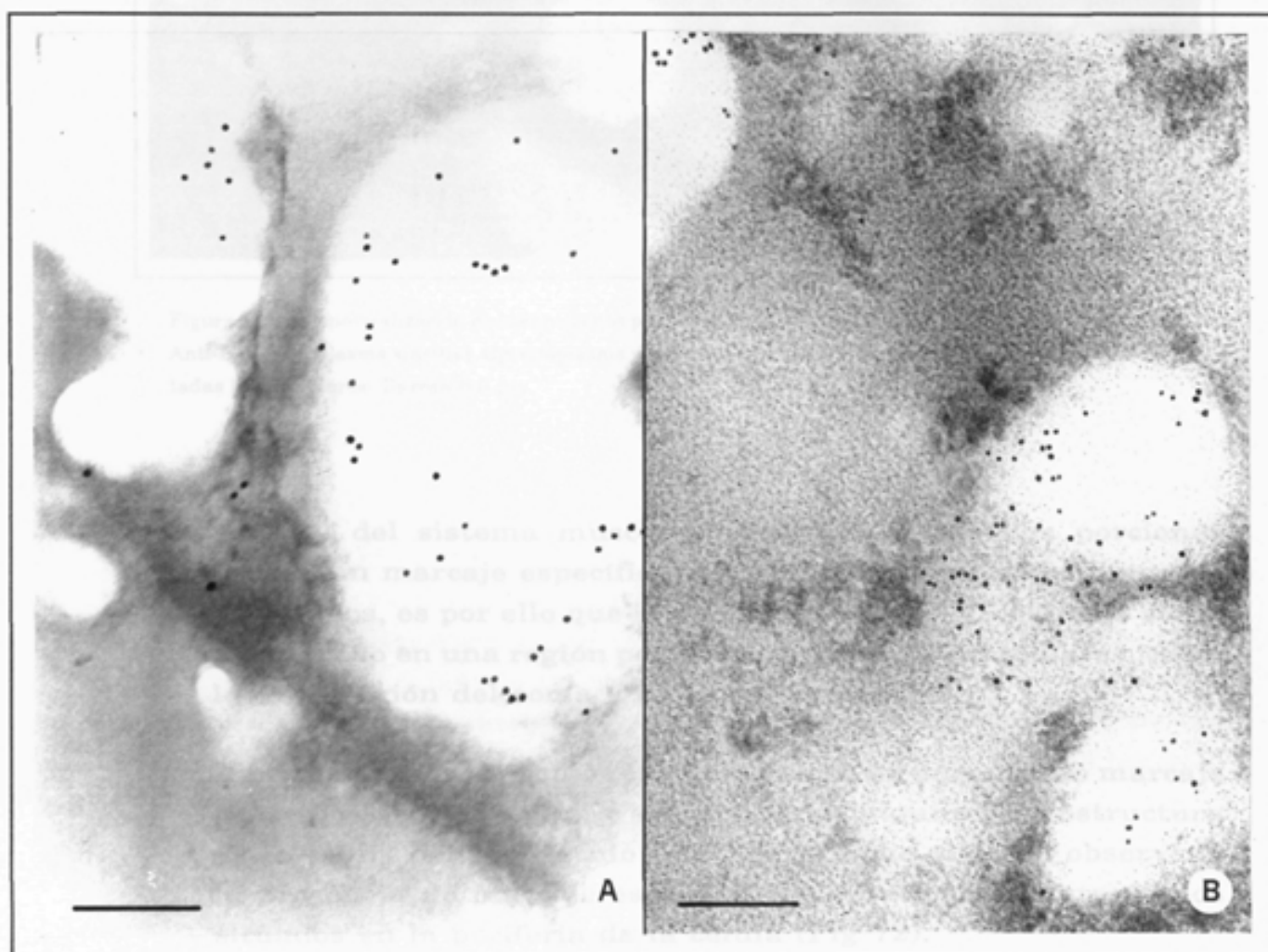


Figura 70. Inmunolocalización de los antígenos parasitarios (Ag 5 y Ag B) en los protocólex. A: antisuero Anti-5. B: antisuero Anti-B. Marcaje en áreas intercelulares no contrastados del parénquima parasitario. Barra 0,2 μ m

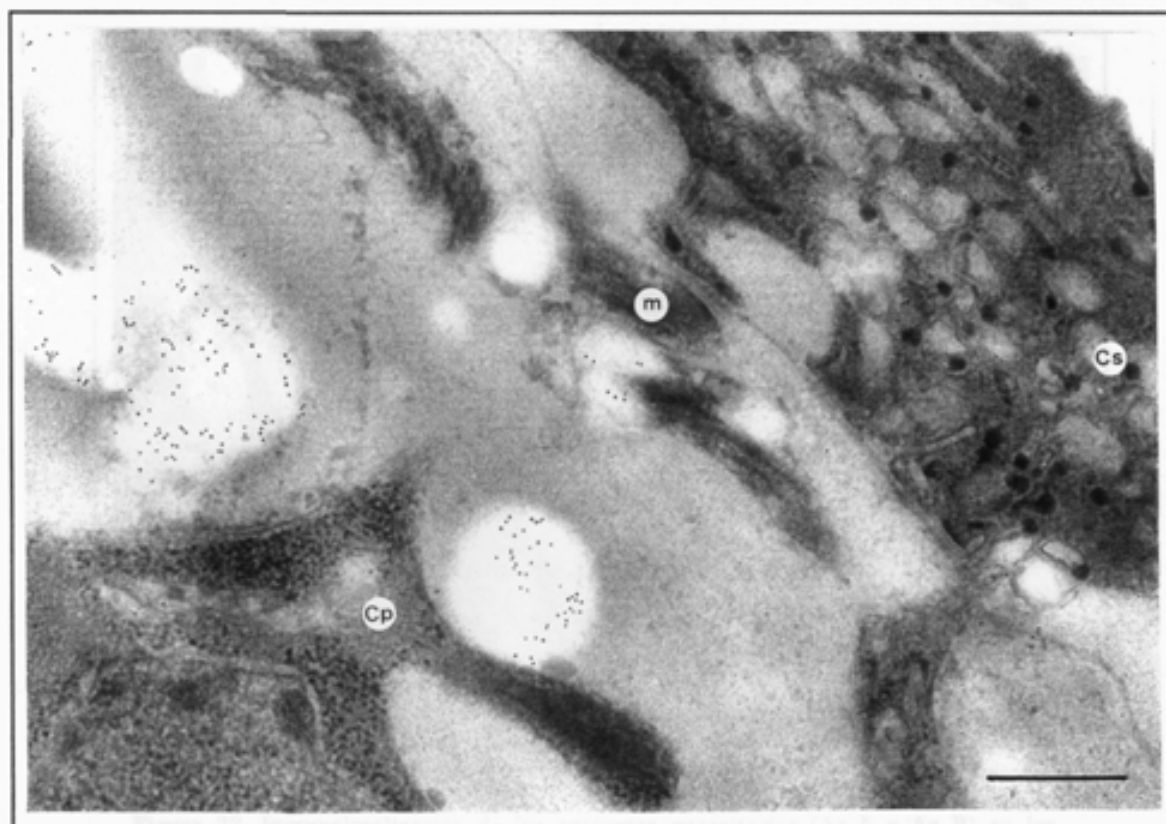


Figura 71. Inmunolocalización de los antígenos parasitarios (Ag 5 y Ag B) en los protoscólex. Antisero Anti-B. Cs: citoplasma sincitial, Cp: citoplasma perinuclear, m: músculos. Marcaje en áreas no contrastadas intercelulares. Barra= 0,5 μ m.

En el sistema muscular, con ninguno de los

A nivel del sistema muscular, ninguna de las dos porciones presentan marcaje específico con ninguno de los dos antisueros empleados, es por ello que la mayor intensidad de marcaje se ha encontrado en una región pobre en estructuras musculares, como lo es la región del soma y no la del escólex.

A nivel del citoplasma sincitial que da lugar a la pared de los

A nivel de los corpúsculos calcáreos no se ha encontrado marcaje específico asociado ni a la matriz, ni a ninguna otra estructura de la célula del corpúsculo calcáreo, aunque si se ha observado la presencia de marcaje específico en espacios no contrastados situados en la periferia de la célula (Fig 72).

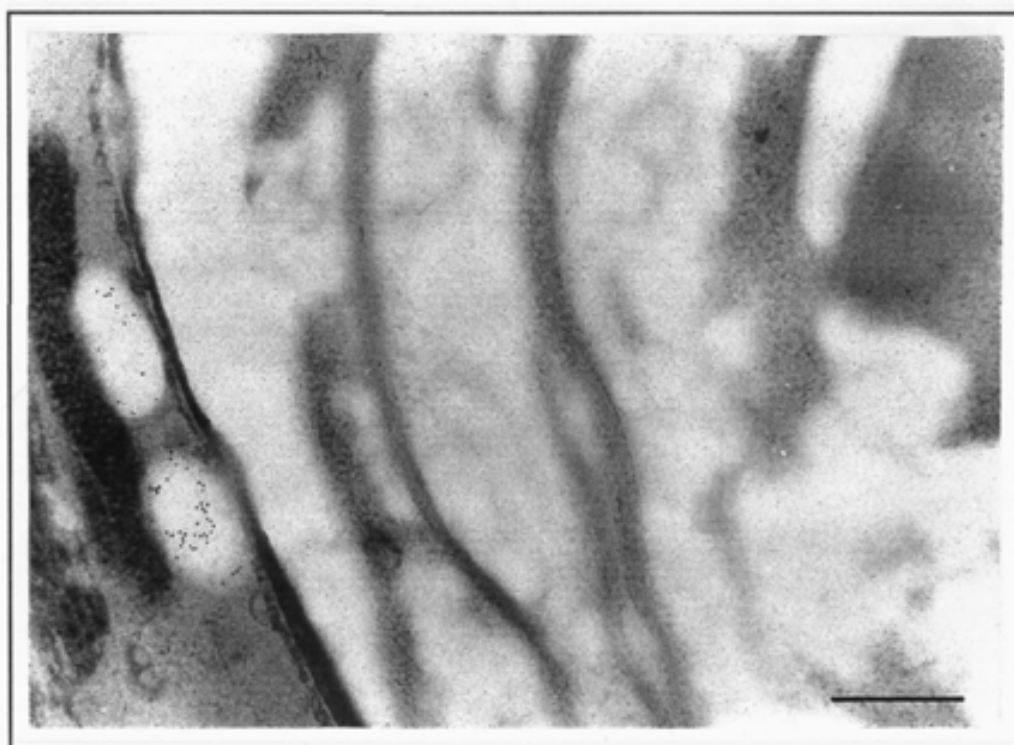


Figura 72. Inmunolocalización de los antígenos parasitarios (Ag 5 y Ag B) en los protoscólex. Antisuero Anti-B. Porción de célula del corpúsculo calcáreo. Barra: 0,5 μ m.

En el sistema osmorregulador, no se observa, con ninguno de los dos antisueros empleados, la presencia de marcaje a nivel de las células flamíferas, aunque si se localiza el Ag-5 en la pared de los túbulos excretores (Fig 73) y no el Ag-B (Fig 62), siendo esta la única diferencia observada en cuanto a la inmunolocalización de ambos antígenos en los protoscólex. El Ag-5 se ha localizado a nivel del citoplasma sincitial que da lugar a la pared de los túbulos colectores, y a nivel de las microvellosidades que tapizan su superficie luminal (Fig 73), pero no se ha observado en el interior de la luz tubular, en donde tampoco ha sido localizado el Ag-B.

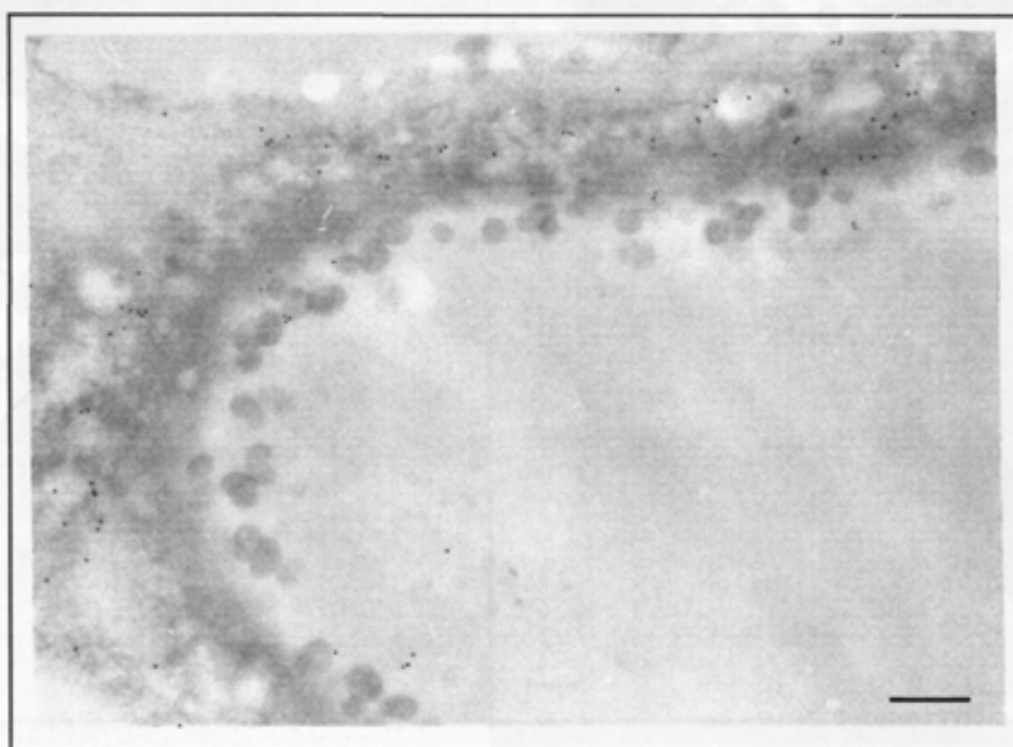


Figura 73. Inmunolocalización del Ag-5 a nivel de un túbulo colector. Barra: 0,3 μ m.

INMUNOLocalización con el Antisero Anti Antígenos Parasitarios Mayoritarios

Al emplear en la inmunolocalización el antisuero poliespecífico anti antígenos parasitarios (Anti-AgP) se observa, tal y como ocurría en la inmunolocalización por microscopía óptica, el reconocimiento de un gran número de estructuras parasitarias, mayor de lo que correspondería a la simple suma de la reactividad de los dos antisueros monoespecíficos.

A nivel de las vesículas prolíferas se observa marcaje en la pared quística y en los "detritus" que forman parte del contenido (Fig 74).

El Anti-AgP reconoce tanto la región germinativa como la región conectiva de la pared de las vesículas prolíferas. En la región conectiva, aunque el marcaje es algo disperso, se localiza

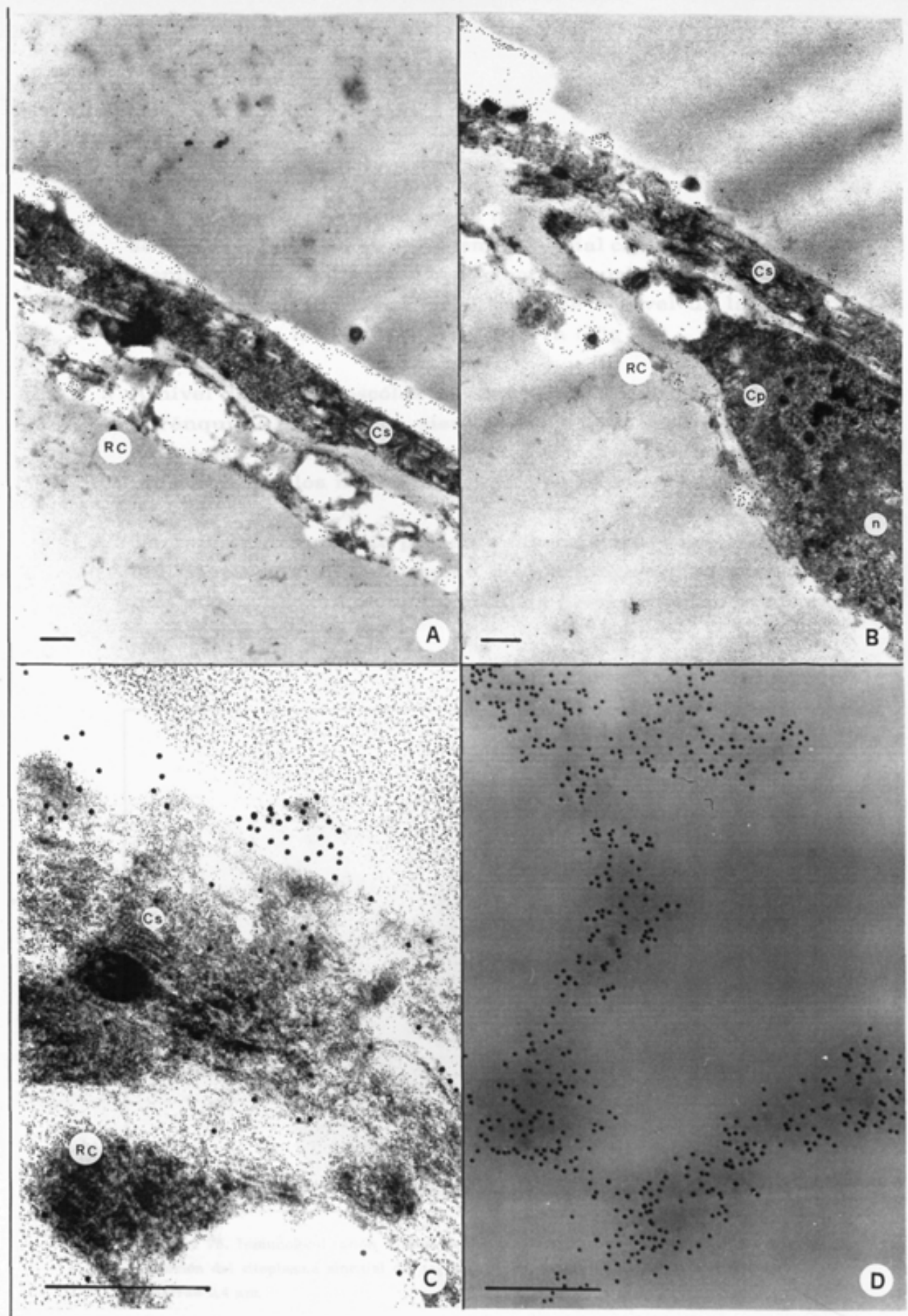


Figura 74. Inmunolocalización a nivel de las vesículas prolíferas con el antisuero Anti-AgP. A, B y C: pared quística. D: contenido. Cs: citoplasma sincitial. Cp: citoplasma perinuclear. n: núcleo. RC: región conectiva. Barra= 0,3 μm.

específicamente asociado a los espacios sin contraste presentes en esta región, mientras que el marcaje de la región germinativa se localiza, tanto en el citoplasma sincitial como en el perinuclear, siendo reconocida incluso la estructura nuclear. Puede observarse una mayor densidad en el marcaje a nivel de la superficie interna de la membrana germinativa (Fig 74).

A nivel de los protoscólex se observa un importante marcaje del parénquima parasitario, siendo reconocidas la practica totalidad de las estructuras en él presentes, con la salvedad de las fibras musculares y los miocitos que se encuentran libres de marcaje.

También el tegumento presenta marcaje específico tanto a nivel del citoplasma sincitial como del perinuclear, aunque destaca una mayor densidad en el marcaje a nivel de la superficie externa del mismo (Fig 75).

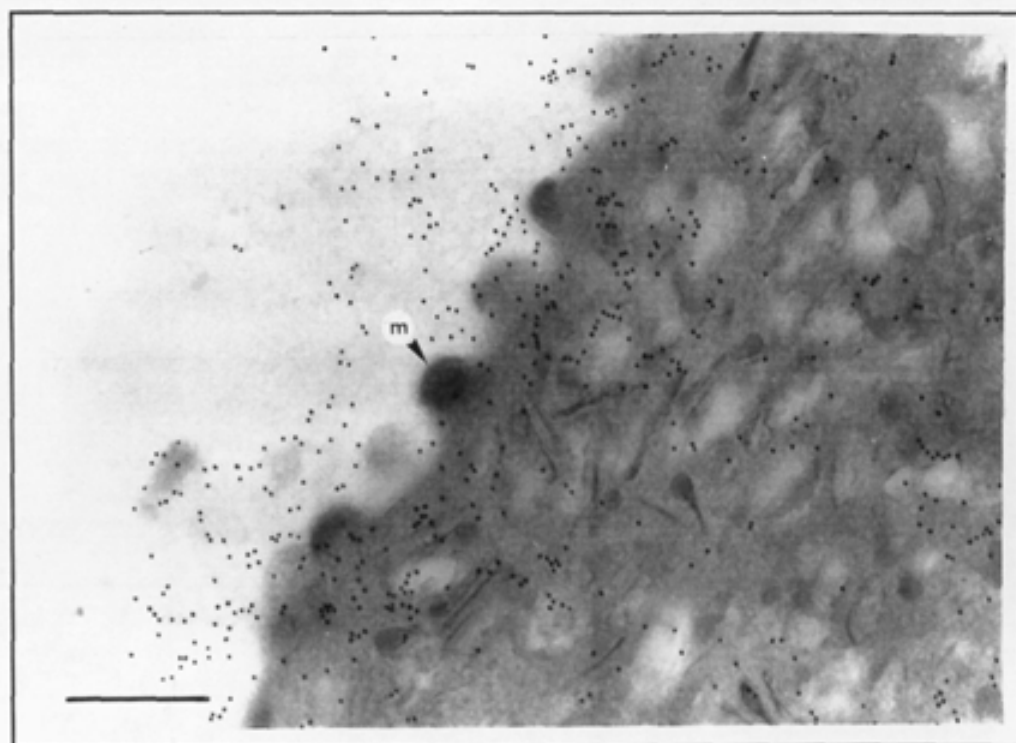


Figura 75. Inmunolocalización a nivel de los protoscólex con el antisuero Anti-AgP. Porción del citoplasma sincitial del tegumento. m: microtriquias (superficie externa). Barra= 0,4 μ m.

La distribución del marcaje a nivel del sistema osmorregulador es idéntica a la descrita en la inmunolocalización del Ag 5, observándose el reconocimiento de la pared de las estructuras tubulares y estando libre de marcaje la luz tubular y las células flamíferas.

En los corpúsculos calcáreos el marcaje se observa tanto a nivel citoplasmático como a nivel de la matriz.

CONTROLES

La sustitución del primer anticuerpo por suero no inmune diluido al 1/1000 en PBS-ovoalbúmina (control de especificidad) o la sustitución por tampón dieron resultados completamente negativos, no existiendo pues uniones inespecíficas entre los antisueros y el tejido.

	Anti-5	Anti-B	Anti-AgP
Vesículas proliferas			
membrana germinativa			
región germinativa			
citoplasma sincitial	n	n	+
citoplasma perinuclear	n	n	+
región conectiva	+	+	+
contenido	n	n	*
Protocólex			
tegumento			
glicocalix	n	n	+
citoplasma distal	n	n	+
citoplasma perinuclear	n	n	+
parénquima			
células parenquimatosas	n	n	+
areas intercelulares	+	+	+
sistema excretor			
pared túbulos	+	n	+
luz tubular	n	n	n
células flamíferas	n	n	n
músculos	n	n	n
corpúsculos calcáreos	n	n	+
ganchos	n	n	n

Tabla XVII. Inmunolocalización con los antisueros Anti-5, Anti-B y Anti-AgP en protocólex y vesículas proliferas de *E. granulosus* de procedencia humana. Resultados obtenidos por microscopía electrónica.

DISCUSSION

DISCUSION

- I CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE *E. granulosus*
- II OBTENCION DE ANTISUEROS MONOESPECIFICOS POR INMUNIZACION EXPERIMENTAL DE CONEJOS
- III DESARROLLO DE PROTOSCOLEX CULTINADOS *IN VITRO*, PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION
- IV ESTRUCTURA DE *E. granulosus* A NIVEL DE LA MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA
- V INMUNOLOCALIZACION DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS

CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE *E. granulosus*

El hombre y cualquier otro hospedador intermediario de *E. granulosus*, desde la invasión de la oncosfera y el periodo postoncosferral hasta el desarrollo de la hidátide fértil y la aparición de las formas metacestódicas, están expuestos a una gran variedad de moléculas potencialmente antigénicas derivadas del propio parásito o modificadas por este, frente a las cuales desarrollan una respuesta inmune específica tanto de tipo humoral como de tipo celular (Rickard & Lightowlers 1986; Lightowlers 1990; Gadea & Garcia-de-Lomas 1991).

La contribución de la respuesta inmune a la destrucción del parásito una vez establecido, o su papel en el control de la reinfección no esta claro, y aunque *in vitro* ha sido demostrada su capacidad protectora, *in vivo* no ocurre así, y se barajan las posibilidades de que el parásito presente varios mecanismos de evasión, protección o incluso supresión de la respuesta inmune (Lightowlers 1990).

Independientemente del papel que pueda o no tener la respuesta inmune en el control de la hidatidosis, lo que si comporta es la producción de anticuerpos específicos que, presentes a niveles detectables en los sueros de los pacientes afectados de hidatidosis, pueden tener una gran importancia en el diagnóstico serológico de la infección (Chordi & Kagan 1965; Pozzuoli, Piantelli, Perucci, *et al.* 1975; Shepherd & McManus 1988; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989; Lightowlers 1990; Gadea & Garcia-de-Lomas 1991). De todas formas, no todos los pacientes desarrollan anticuerpos frente al parásito (Rickard & Lightowlers 1986; Lightowlers 1990) y se han descrito reacciones cruzadas entre antígenos de *E. granulosus* y sueros de pacientes afectados de otras parasitosis (Varela-Diaz, Eckert, Rausch, *et al.* 1977; Gottstein, Eckert & Fey 1983; Marcos, Torres & Amaral 1984; Monzon, Coltorti & Varela-Diaz 1985; Larralde, Montoya, Sciutto, *et al.* 1989; Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989; Lightowlers 1990), así como falsos positivos asociados a ciertas patologías orgánicas (Dar, Buhidma & Kidwai 1984; Hrzencjak, Paradina, Rogina, *et al.*

1985). Estos problemas de sensibilidad y especificidad limitan la aplicación de las técnicas de serodiagnóstico y justifican profundizar en el conocimiento y caracterización de las proteínas inmunogénicas de *E. granulosus*, lo que puede llegar a permitir el reconocimiento de las fracciones proteicas especie específicas y la elaboración de técnicas inmunodiagnósticas suficientemente sensibles que permitan detectar los anticuerpos contra ellas dirigidos.

Los protoscolex, las membranas quísticas y/o el líquido hidatídico de quistes estériles o fértiles de diferentes huéspedes intermediarios y de diferentes localizaciones, han sido algunas de las fuentes antigénicas mas comunes utilizadas en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis (Dottorini & Tassi 1978; Rickard & Lightowlers 1986). Estudios comparativos elaborados sobre aspectos cualitativos y cuantitativos de los componentes antigénicos de las diferentes fuentes, revelan una mayor concentración de antígenos en los líquidos hidatídicos procedentes de quistes fértiles, independientemente de la especie hospedadora de la que procedan (Bensted & Atkinson 1953; Hariri, Schwabe & Koussa 1965), aunque parece ser que los quistes ovinos y humanos son los que poseen una mas alta concentración de los antígenos 5 y B (Musiani, Piantelli, Lauriola, *et al.* 1978). Como regla general se acepta, que la mejor fuente para la obtención de antígenos útiles en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana, es el líquido hidatídico obtenido de quistes fértiles de procedencia ovina (Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1972; Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1974; Pozzuoli, Piantelli, Perucci, *et al.* 1975; Di Felice, Pini, Afferni & Vicari 1986; Shepherd & McManus 1987a; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989).

El perfil proteico y antigénico de *E. granulosus*, y en concreto el perfil del líquido hidatídico ya ha sido previamente estudiado por múltiples autores y mediante una gran variedad de metodologías que incluyen básicamente las técnicas de inmunoprecipitación (Kagan & Norman 1961; Biguet, Capron, Tren Van Ky & D'Haussy 1962; Chordi & Kagan 1965; Capron, Vernes & Biguet 1967; Gottstein, Eckert, Michael & Thompson 1987), cromatografía (Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1972; Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1974; Pozzuoli, Piantelli, Perucci, *et al.* 1975; Piantelli, Pozzuoli, Arru & Musiani 1977), electroforesis en geles

de poliacrilamida (Di Felice Pini, Afferni & Vicari 1986; Shepherd & McManus 1987a; Coll, Muñoz, Queralt, *et al.* 1989; Lightowers, Liu, Haralambous & Rickard 1989) e isoelectroenfoque (Kumaratilake & Thompson 1984b), entre otras.

El análisis electroforético ha sido uno de los métodos mas ampliamente empleados en el estudio y caracterización de la composición proteica y antigénica del líquido hidatídico, destacando de modo especial la inmunolectroforesis (IEF) (Biguet, Capron, Tran Van Ky & D'Haussey 1962; Chordi & Kagan 1965; Capron, Vernes & Biguet 1967; Gottstein, Eckert, Michael & Thompson 1987) y, de mas reciente incorporación la separación electroforética sobre geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Di Felice Pini, Afferni & Vicari 1986; Shepherd & McManus 1987a; Coll, Muñoz, Queralt, *et al.* 1989; Lightowers, Liu, Haralambous & Rickard 1989), que consigue la separación de las diferentes fracciones proteicas en función de su peso molecular (PM) y permite su posterior transferencia e inmovilización a membranas (*electroblotting*) sobre las que se pueden aplicar técnicas de enzimoimmunoensayo (*immunoblot*) (Tijssen 1985).

Ya en 1961 Kagan & Norman mediante técnicas de doble difusión y en 1962 Biguet *et al.* mediante inmunolectroforesis demostraron en el líquido hidatídico la presencia de algunos antígenos que reaccionaban con antisueros dirigidos contra proteínas del hospedador. En 1972, Coltorti & Varela-Díaz demostraron la presencia de albúmina e inmunoglobulinas del hospedador en el contenido quístico de hidátidas de diferentes procedencias, y encontraron que, aunque presentes en mas baja proporción, la relación entre ambas no difería significativamente de la relación que presentaban estas en el suero del hospedador. Posteriormente, fue demostrada la presencia de la albúmina y las inmunoglobulinas del hospedador a nivel de las membranas quísticas (Coltorti & Varela-Díaz 1974), y así mismo pudo evidenciarse, mediante el trasplante de vesículas entre diferentes hospedadores, la penetración de estas proteínas a través de las membranas quísticas (Coltorti & Varela-Díaz 1975).

En nuestra experiencia, la comparación del perfil electroforético por

SDS-PAGE del líquido hidatídico con los perfiles electroforéticos de la albúmina y las inmunoglobulinas procesadas en las mismas condiciones, demuestra la presencia en el contenido quístico de unas proteínas con idéntica movilidad relativa a la observada para la albúmina y las inmunoglobulinas.

La movilidad relativa determinada para la albúmina, localiza a esta proteína a nivel de la zona intermedia (Z2) de los geles al 8% cargados con líquido hidatídico, identificándose con una banda mayoritaria de 60 kDa que tras ser eluida y posteriormente reducida incrementa en unos 10 kDa su PM, lo cual apoya la identidad entre esta proteína y la albúmina, en la que el incremento de PM esta justificado por la presencia en estado nativo de 17 puentes disulfuro intracatenarios (Peters 1985; Morel, Yarmush, Colton, *et al.* 1988) que, al ser destruidos por el tratamiento con 2-Me dan lugar a un cambio en la estructura terciaria de la proteína que se traduce en una movilidad relativa menor y supone un falso aumento en el PM.

Las inmunoglobulinas son proteínas de alto PM, que en un gel al 8% migran con dificultad y se encuentran muy cercanas al gel apilador, lo que se correspondería con las zona Z1 (120-160 kDa) de nuestros geles. En nuestra experiencia, la elución y reducción de la zona Z1 da lugar a dos bandas proteicas con un PM de 55 y 28 kDa, lo que se adapta al perfil observado para las inmunoglobulinas y concuerda con la base conceptual del modelo básico de una inmunoglobulina (Roitt, Brostoff & Male 1986), correspondiéndose las dos bandas con las cadenas pesadas y las cadenas ligeras respectivamente.

Las diferentes características físico-químicas de los componentes mayoritarios del líquido hidatídico confieren a cada uno de ellos (albúmina, inmunoglobulinas y antígenos parasitarios) unas propiedades particulares de solubilidad que pueden permitir, en condiciones extremas de pH, molaridad y/o concentración de sales, una precipitación selectiva y un fraccionamiento de la muestra.

Oriol *et al.* describen en 1971 una sencilla técnica de purificación parcial del líquido hidatídico, que aprovecha las características físico-químicas de la albúmina y las inmunoglobulinas para separarlas de los

antígenos parasitarios.

La aplicación de la metodología descrita por Oriol *et al.* (1971) en nuestras muestras de líquido hidatídico, permiten evaluar las características físico-químicas de la región Z1 y de la banda de 60 kDa, las cuales se adaptan perfectamente a las observadas por los autores para las inmunoglobulinas y la albúmina respectivamente, lo que nos viene a reafirmar las observaciones ya realizadas mediante SDS-PAGE.

La presencia en el líquido hidatídico de antígenos parásito-específicos ya había sido referenciada en la década de los 60 (Kagan & Norman 1961; Biguet, Capron, Tran Van Ky & D'Haussy 1962; Chordi & Kagan 1965; Capron, Vernes & Biguet 1967), observándose, inicialmente por doble difusión y posteriormente por inmunoelectroforesis, la aparición de varias bandas de precipitación al enfrentar el líquido hidatídico con sueros de pacientes afectados de hidatidosis. Desde entonces, y hasta la actualidad, son muchos los trabajos que se han publicado referentes a la identificación y caracterización de las proteínas inmunogénicas del líquido hidatídico (Kagan & Norman 1961; Biguet, Capron, Tran Van Ky & D'Haussy 1962; Chordi & Kagan 1965; Capron, Vernes & Biguet 1967; Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1972; Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1974; Pozzuoli, Piantelli, Perucci, *et al.* 1975; Piantelli, Pozzuoli, Arru & Musiani 1977; Kumaratilake & Thompson 1984b; Di Felice Pini, Afferni & Vicari 1986; Gottstein, Eckert, Michael & Thompson 1987; Shepherd & McManus 1987a; Coll, Muñoz, Queralt, *et al.* 1989; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989), así como los referentes al papel que pueden desempeñar en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis (Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1974; Shepherd & McManus 1987a; Coll, Muñoz, Queralt, *et al.* 1989; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989; Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989), pero en general se aceptan como mayoritarios y con gran utilidad inmunodiagnóstica dos antígenos de estructura lipoproteica, a los que se ha propuesto denominar unificadamente como antígeno 5 (Ag 5) y antígeno B (Ag B) (Rickard & Lightowlers 1986).

En 1977 Piantelli *et al.* purifican por precipitación a baja carga iónica los antígenos mayoritarios del líquido hidatídico, los separan por

cromatografía e identifican mediante SDS-PAGE las diferentes subunidades los antígenos 5 y B (antígenos 4 y 5 respectivamente, según la nomenclatura de los autores). Di Felice *et al.* obtienen en 1986 un anticuerpo monoclonal capaz de inmunoprecipitar al Ag 5, con él consiguen purificar la fracción antigénica por cromatografía de afinidad, y la caracterizan mediante técnicas de SDS-PAGE e *immunoblot* (W-B). Shepherd & McManus estudian en 1987 la inmunorreactividad de las diferentes subunidades de los antígenos 5 y B mediante técnicas de inmunoprecipitación y W-B. En 1989 Lightowlers *et al.* obtienen anticuerpos monoclonales frente al Ag 5 y al Ag B y caracterizan por inmunoprecipitación y W-B las diferentes subunidades de ambos antígenos, así como su inmunoespecificidad.

En nuestra experiencia, después de eliminar por precipitación las proteínas procedentes del hospedador (albúmina e inmunoglobulinas) (Oriol, Williams, Perez-Esandi & Oriol 1971; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989), la caracterización electroforética por SDS-PAGE de los componentes proteicos presentes en el líquido hidatídico demuestra la presencia de dos grupos proteicos mayoritarios que se asocian a las zonas definidas previamente como Z2 y Z3, en ambas zonas se observa por W-B la presencia de proteínas inmunorreactivas con los sueros de pacientes afectados de hidatidosis. En Z2 destacan dos bandas proteicas con un PM de 65 y 56 kDa y en Z3 tres bandas de 24, 16 y 8 kDa (Fig 26). El hecho de que la zona Z2 de lugar en condiciones de reducción a una sola banda proteica de 37 kDa hace presuponer la presencia de una subunidad común para las proteínas de 65 y 56 kDa.

Mediante la inmunización experimental de conejos con una única banda perteneciente a cada uno de los dos grupos proteicos mayoritarios (65 kDa en Z2 y 16 kDa en Z3), se obtienen antisueros que reconocen todas y cada una de las bandas que forman su correspondiente grupo, lo que demuestra la comunidad antigénica existente entre las proteínas de 65 y 56 kDa, así como entre las proteínas de 24, 16 y 8 kDa. El estudio por IEF de estos antisueros evidencia la presencia de reacciones de identidad con el arco 5 de Capron en el caso de los antisueros que reconocen las proteínas de 65 y 56 kDa, y con el arco de precipitación formado por el Ag B en el caso de los antisueros que reconocen las

proteínas de 24, 16 y 8 kDa (Fig 30).

Como consecuencia de los resultados previamente expuestos, el Ag 5 se caracteriza como una mezcla de dos poblaciones moleculares de 65 y 56 kDa, que tras la reducción dan lugar a una única subunidad de 37 kDa, lo que concuerda perfectamente con las observaciones de Di Felice *et al.* (1986) que identifican al Ag 5 como dos bandas proteicas de 66 y 56 kDa en condiciones no reductoras, y una única banda de 39 kDa en condiciones reductoras. Sin embargo, las observaciones realizadas por otros autores identifican al Ag 5 nativo como una única banda proteica de entre 60 y 67 kDa (Piantelli, Pozzuoli, Arru & Musiani 1977; Shepherd & McManus 1987a, 1987b, 1988), que da lugar en condiciones reductoras a dos subunidades cuyos PM han sido estimados en 47 y 20 kDa (Piantelli, Pozzuoli, Arru & Musiani 1977), 38 y 20 kDa (Shepherd & McManus 1987a, 1987b, 1988) y 38 y 24 (Lightowers, Liu, Haralambous & Rickard 1989).

Las mínimas diferencias de uno o dos kDa, existentes entre nuestra caracterización y la de Di Felice *et al.* son atribuibles a las variaciones inherentes a la técnica que comportan una movilidad relativa variable y como consecuencia una variación en el cálculo del PM aproximado, mientras que el resto de discrepancias descritas son difíciles de explicar, pero podrían estar relacionadas con el procesamiento previo de las muestras o con las pequeñas variaciones metodológicas existentes entre las diferentes caracterizaciones.

Aunque el Ag B esta presente en el líquido hidatídico en una concentración 10 veces superior al Ag 5, éste último es mucho mas inmunoreactivo (Pozzuoli, Piantelli, Perucci, *et al.* 1975). Así, Pozzuoli *et al.* en 1975 encuentran que los anticuerpos anti-Ag 5 estan presentes en todos los sueros de pacientes inmunorreactivos con hidatidosis confirmada (independientemente de la tecnica empleada), mientras que en un 10 % de estos no consiguen detectar anticuerpos anti-Ag B, posteriormente Shepherd & McManus (1987) observan como todos los sueros de sus pacientes detectan, por W-B, la fracción antigénica correspondiente al Ag 5, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, y como en el 23 % de sus sueros no pueden detectar los anticuerpos dirigidos contra los componentes del Ag B. En un estudio llevado a cabo en 1989 en el

Center for Infectious Diseases de Atlanta (Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989), en el que con una gran serie de sueros (218 sueros de hidatidosis confirmadas quirúrgicamente) se compara por W-B la inmunorreactividad de las diferentes fracciones antigénicas, se concluye que tan solo el 83 % de las hidatidosis presentan anticuerpos frente al Ag 5, mientras que el 86 % (o el 91 % en el caso de hidatidosis hepáticas prequirúrgicas) presentan anticuerpos contra una banda de 8 kDa, presumiblemente el componente de bajo peso molecular del Ag B.

Aunque algunas de las primeras publicaciones habían considerado al Ag 5 específico de *E. granulosus* (Bout, Fruit & Capron 1974), estudios posteriores han demostrado la presencia de anticuerpos anti-Ag 5 en el suero de pacientes afectos de otras cestodiasis, e incluso en pacientes con otras patologías (Varela-Diaz, Eckert, Rausch, *et al.* 1977; Shepherd & McManus 1987a; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989; Lightowlers 1990), a modo de ejemplo, Maddison *et al.* (1989) detectaron reacciones cruzadas en 23 de los 26 sueros estudiados de pacientes afectos de cisticercosis, y en un 78 % de los 205 sueros que seleccionaron por proceder de pacientes afectos de otras parasitosis o con otras patologías que frecuentemente son confundidas con la hidatidosis.

Mediante anticuerpos monoclonales, se ha demostrado la presencia de epítomos fosforilcolina (PC) en la molécula del Ag 5 (Shepherd & McManus 1987a; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989), lo que justificaría en gran parte la reactividad cruzada que presenta este antígeno con las otras parasitosis, puesto que la PC es un epítopo muy común en los antígenos de otros helmintos y algunos protozoos.

La mayor especificidad del Ag B ya había sido apuntada en 1975 por Pozzuoli *et al.*, estos autores, empleando antígenos purificados en la aplicación de diferentes técnicas serodiagnósticas, encontraban que el menor porcentaje de falsos positivos se daba al emplear Ag B purificado. Posteriormente, en 1987, Shepherd & McManus consideran el Ag B específico de *E. granulosus*, pues aplicando técnicas de inmunoprecipitación no observan reactividad entre el Ag B y sus pools

de sueros de pacientes con otras parasitosis (un *pool* de sueros de 4 pacientes con hidatidosis alveolar (*E. multilocularis*) y otro de 2 pacientes con cisticercosis (*T. solium*)). Experiencias posteriores empleando sueros individualizados y en mayor número que los empleados por Shepherd & McManus demuestran inequívocamente que el Ag B no es específico de *E. granulosus* (Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989; Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989), aunque posiblemente si sea un antígeno género específico, apoyando esta última posibilidad destaca la experiencia de Maddison *et al.* en la que se detectan anticuerpos frente al Ag B en el 39 % de los sueros de pacientes infectados por *E. multilocularis* y en el 100 % de los infectados por *E. vogeli*, pero en ninguno de los 205 sueros seleccionados como controles, entre los que destacan 26 cisticercosis.

En este trabajo, para completar la caracterización de las proteínas inmunogénicas de *E. granulosus*, se ha estudiado por W-B la reactividad que presentan las diferentes fracciones antigénicas frente a sueros de pacientes afectados de hidatidosis, donantes sanos y pacientes con otras parasitosis. Durante el estudio, se ha observado la presencia de anticuerpos anti-Ag 5 en todos los pacientes afectados de hidatidosis (100 %) y anticuerpos anti-Ag B en tan solo el 68 % de ellos. No se han detectado anticuerpos específicos frente a estos antígenos en ninguno de los 25 sueros de donantes sanos, y tan solo se han detectado reacciones cruzadas en un 18 % de los sueros de pacientes afectados de otras parasitosis, los cuales presentaban reactividad frente al polipéptido de 65 kDa (Ag 5). Estos resultados no difieren mucho de los obtenidos por la mayoría de los autores previamente citados, coincidiendo en definir al Ag B como más específico y al Ag 5 como más sensible.

Tan solo destacar de nuestra experiencia la inmunorreactividad observada con la banda de 85 kDa, que es reconocida por todos los sueros de enfermos afectados de hidatidosis y no por los sueros de donantes sanos ni por los de los pacientes afectados de otras parasitosis (sensibilidad y especificidad del 100 %). Trabajos realizados por otros autores revelan la presencia de algunas bandas inmunoreactivas en la zona de alto peso molecular (Shepherd & McManus 1987a; Gottstein, Eckert, Michael & Thompson 1987; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989;

Maddison, Siemenda, Schantz, *et al.* 1989), pero estas bandas se observan en una baja proporción de los sueros estudiados, y en ningún caso se han considerado útiles en el serodiagnóstico de la hidatidosis. El porque de la constante inmunorreactividad de los sueros frente a esta banda de 85 kDa no ha podido ser aclarado, pero en la explicación podrían intervenir los factores previamente señalados referentes a variaciones metodológicas y la posibilidad de una diferente expresión antigénica de las cepas de *E. granulosus* de nuestra área geográfica de actuación. Diferencias antigénicas intraespecíficas ya han sido demostradas por otros autores en otras áreas (Thompson 1988), estudiando la inmunorreactividad frente a líquidos hidatídicos de diferentes hospedadores (Gottstein, Eckert, Michael & Thompson 1987), estudiando la respuesta inmune de los mismos hospedadores infectados por diferentes cepas de *E. granulosus* (Lightowers, Rickard, Honey, *et al.* 1984) o mediante inmunización experimental de conejos con líquidos hidatídicos de diferentes procedencias (Shepherd & McManus 1987a). En España se ha demostrado, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, la presencia de varias cepas de *E. granulosus* (Cuesta-Bandera, McManus & Rishi 1988), y aunque no existen evidencias claramente documentadas de posibles variaciones antigénicas intraespecíficas, sí se han descrito variaciones geográficas en cuanto a la prevalencia de *E. granulosus* en el hospedador definitivo y en diferentes hospedadores intermediarios, de tal modo que en la España sur los hospedadores intermediarios son predominantemente las cabras, en el norte y noroeste caballos y en la zona centro, noreste y oeste la oveja (Cuesta-Bandera, McManus & Rishi 1988).

La caracterización de esta banda de 85 kDa no ha podido, hasta el momento, ser realizada, conociéndose tan solo que esta presente en el líquido hidatídico, que precipita al ser esté dializado frente a tampón acetato de baja fuerza iónica y no en tratamientos con sulfato de amonio al 40%, que no se observa en los geles teñidos con azul Coomassie y que tras el tratamiento con 2-mercaptoetanol al 5 % pierde su reactividad o modifica su peso molecular. El hecho de no observar en condiciones reductoras ninguna banda inmunorreactiva diferente a las descritas para los antígenos 5 y B, hace presuponer que la banda de 85 kDa es una forma polimérica de las subunidades de estos antígenos mayoritarios, presumiblemente el Ag 5, pues es el que modifica su reactividad

tras el tratamiento con 2-mercaptoetanol.

El resto de resultados concernientes a la sensibilidad y especificidad de las diferentes fracciones antigénicas no serán discutidos debido a lo limitado de la muestra de sueros estudiados ya que el estudio de la respuesta inmune no es uno de los objetivos de esta tesis.

OBTENCION DE ANTISUEROS MONOESPECIFICOS POR INMUNIZACION EXPERIMENTAL DE CONEJOS

Los antisueros específicos frente a un determinado antígeno pueden ser de origen monoclonal o policlonal. Conocidas son las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

Si bien es cierto que el empleo de anticuerpos monoclonales reduce, en parte, la presencia de reacciones cruzadas y que estos poseen una afinidad y especificidad constante para un determinado antígeno, su producción es laboriosa y costosa y, suelen ser más sensibles a la inactivación por cambios físicos o químicos.

La selección de unos u otros está condicionada por varios factores. Por un lado, en los anticuerpos policlonales la existencia de distintas subpoblaciones de anticuerpos con diferentes grados de afinidad por el antígeno permite, mediante incubaciones repetidas o prolongadas, reemplazar los anticuerpos de baja afinidad por los de alta afinidad, incrementándose así la sensibilidad. Por otro lado, el grado de pureza de los antígenos de los que se dispone para la inmunización de animales de experimentación es de suma importancia, siendo imprescindible, en el caso de los antisueros policlonales, disponer de antígenos con el mayor grado de pureza posible.

La electroforesis en SDS-PAGE, como técnica de separación de los diferentes componentes polipeptídicos de una mezcla antigénica para la obtención de buenos antisueros policlonales monoespecíficos, ya había sido empleada con anterioridad por diferentes autores (Mendel-Hartvig 1982; Boulard & Lecroisey 1982; Marshall, Pongparit & Kaufman 1987). Las experiencias de Boulard & Lecroisey en 1982 demuestran, que la acrilamida del gel es químicamente inerte y no induce por sí misma respuesta inmune en los conejos, que la actividad antigénica de las proteínas permanece intacta aun después de haber sido teñidas con azul Coomassie o negro amido, que la desnaturalización de las proteínas por el SDS y su presencia en el gel no alteran la respuesta inmune,

y que por tanto para la obtención de buenos inmunogenos no es necesaria la elución de las proteínas o componentes polipeptídicos separados por SDS-PAGE. Una de las limitaciones de esta técnica viene dada por la sensibilidad de las tinciones proteicas, siendo imposible detectar la existencia de otras proteínas contaminantes presentes en cantidad inferior al límite de detección de la tinción, así como la de obtener anticuerpos frente a epítomos conformacionales (Tijssen 1985).

En nuestra experiencia, mediante técnicas de precipitación a baja carga iónica (Oriol, Williams, Perez-Esandi & Oriol 1971) se han podido purificar los antígenos parasitarios mayoritarios del líquido hidatídico (Ag 5 y Ag B), y caracterizado por SDS-PAGE sus diferentes componentes polipeptídicos, los cuales una vez teñidos con azul Coomassie se han recortado de los geles y emulsionado en adyuvante completo de Freund para ser empleados como inmunogenos en la inoculación de animales de experimentación.

El empleo de SDS en la caracterización de los antígenos y en el proceso de obtención de los inmunogenos comporta la desnaturalización del antígeno nativo, con lo que parte de los anticuerpos obtenidos pueden ser muy afines a la proteína desnaturalizada pero incapaces de reconocer la presentación de ésta en los tejidos. De modo similar, en el proceso de fijación de los tejidos, los antígenos o algunos de sus epítomos pueden ser modificados por la acción de los fijadores o en los pretratamientos. La posibilidad de falsos negativos debido a las causas mencionadas se obvian en gran parte con el empleo de antisueros policlonales, los cuales son capaces de reconocer más de un epítomo del mismo antígeno.

En nuestra experiencia, la inmunización de conejos con polipéptidos separados por SDS-PAGE, ha sido una técnica efectiva que nos ha permitido un gran rendimiento en la obtención de antisueros con un alto grado de especificidad frente a los antígenos seleccionados (Ag 5 y Ag B) y en un periodo de tiempo relativamente corto.

Aunque es imposible comprobar que un anticuerpo no reacciona cruzadamente con ninguna otra proteína, el inmunoblot es una de las técnicas más sensibles habitualmente empleadas en el estudio de las

reacciones cruzadas, y su practica reveló tan solo la presencia de anticuerpos frente a la albúmina en los antisuceros dirigidos contra el Ag 5.

Debido a que los contaminantes del líquido hidatídico son proteínas procedentes del hospedador (Coltorti & Varela-Díaz 1972, 1974, 1975), la sensibilización de una columna con suero de oveja y el pase del antisucero a través de esta, consiguió eliminar los anticuerpos contaminantes (anti-albúmina) y por tanto la monoespecificidad del antisucero anti-Ag 5.

En las experiencias previas sobre inmunolocalización de los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* (Yarzabal, Dupas, Bout & Capron 1976; Yarzabal, Dupas, Bout, *et al.* 1977; Rickard, Davies, Bout & Smyth 1977; Davies, Rickard, Bout & Smyth 1978), los antisuceros fueron obtenidos por inmunización experimental de conejos con cada uno de los complejos antigénicos mayoritarios parcialmente purificados. Tras una inmunolectroforesis bidimensional, los antisuceros anti-Ag 5 se obtuvieron mediante la inmunización con la porción del gel en la que se sitúa el arco de precipitación del Ag 5 (Bout, Fruit & Capron 1974). Los antisuceros anti-Ag B se obtuvieron a partir de la inmunización con líquido hidatídico hervido (Yarzabal, Dupas, Bout, *et al.* 1977). Posteriormente, se consiguió la monoespecificidad de estos antisuceros tras la absorción con sueros procedentes del hospedador y antígenos heterólogos, controlándose esta monoespecificidad mediante técnicas de doble difusión, electroforesis bidimensional e inmunolectroforesis.

Aunque la limitación inicial que puede suponer la obtención de antisuceros a partir de antígenos parcialmente purificados puede ser solventada mediante la aplicación de técnicas de purificación que permitan eliminar los anticuerpos contaminantes, este proceso es largo y nunca es completa la seguridad de una buena purificación. Además, las técnicas de inmunodifusión e inmunolectroforesis, aunque han sido muy empleadas en el estudio de la especificidad de los anticuerpos, solo reconocen antígenos precipitantes y tienen una sensibilidad inferior a cualquiera de las técnicas aplicadas habitualmente en inmunohistoquímica.

En el presente trabajo, el empleo de antígenos purificados en la

inmunización de los animales de experimentación y la aplicación de técnicas cromatográficas para la purificación de los anticuerpos contaminantes, ha permitido la obtención de antisueros monoespecíficos que reconocen por técnicas de *immunoblot* exclusivamente las fracciones proteicas del líquido hidatídico correspondientes a cada uno de los dos antígenos parasitarios mayoritarios (Ag 5 y Ag B), siendo reconocidos los polipéptidos de 65 y 56 kDa en el caso del anti-Ag 5, y los de 8, 16 y 24 kDa en el caso del anti-Ag B (Fig 31).

DESARROLLO DE PROTOSCOLEX CULTIVADOS *IN VITRO*. PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION

Los primeros ensayos del cultivo *in vitro* de protoscólex fueron realizados a principios de siglo por Dévé (1901, 1902) pero sin embargo, estas primeras experiencias fueron un fracaso y no es, hasta iniciada la década de los 60, el momento en que con Smyth (Smyth 1962) se progresa realmente en el cultivo *in vitro* de las formas larvarias de algunos cestodos y en particular de *E. granulosus*. Desde entonces y hasta la actualidad, son múltiples los avances que se han logrado referentes al cultivo *in vitro* de protoscólex de *E. granulosus* y muchas las circunstancias para las que ha sido aplicado (Howell 1986, Casado 1991b).

En 1962, Smyth consigue mantener protoscólex de *E. granulosus* en un medio axénico, y observa el desarrollo *in vitro* de pequeñas formaciones quísticas. Posteriormente, Webster & Cameron (1963) consiguen el desarrollo *in vitro* de algunas formas segmentadas de *E. multilocularis*, y Smith (1967) describe como el empleo de diferentes medios puede conseguir el desarrollo *in vitro* de protoscólex de *E. granulosus* ya sea en dirección quística o estrobilar.

Estudios posteriores han conseguido el desarrollo *in vitro* de oncosferas de *E. granulosus* (Heath & Smyth 1970; Harris, Heath, Lawrence & Shaw 1989) y el mantenimiento de microquistes (Taylor, Morris, Richards 1989a; Brasa, Casado, Perez, *et al.* 1991; Casado, Brasa, Perez, *et al.* 1991a). Más recientemente se ha logrado el cultivo *in vitro* de líneas celulares de origen parasitario, ya sea procedentes de *E. granulosus* (Fiori, Monaco, Scappaticci, *et al.* 1988; Howell & Matthaei 1988) o de *E. multilocularis* (Dieckmann & Frank 1988; Furuya 1991), y de líneas híbridas con un origen mixto parasitario y tumoral (Dieckmann-Schuppert, Ruppel, Burger & Frank 1989).

El cultivo *in vitro* de *E. granulosus* permite el estudio de los parásitos eliminando las posibles interferencias derivadas de la complejidad de los tejidos del hospedador, y aunque básicamente ha sido empleado en

estudios de morfogénesis y/o histogénesis (Smyth 1967; Heath & Osborn 1976; Richards, Arme & Bridges 1983; Rogan & Richards 1986a; Macpherson & Smyth 1985; Rodríguez-Caabeiro & Casado 1988; Casado & Rodríguez-Caabeiro 1989a; Ponce & Cuesta 1991), también permite evaluar la nutrición, fisiología y bioquímica parasitaria (Howell 1986, McManus & Bryant 1986), así como ciertos aspectos de la relación huésped-parásito (Howell 1986; Heath 1986; Rodríguez-Caabeiro, Casado & Jimenez 1989a).

Por otro lado, con la aparición de nuevos antihelmínticos, el cultivo *in vitro* ha sido ampliamente empleado para valorar índices de supervivencia de protoscolex a diferentes niveles terapéuticos (Morris, Richards & Chinnery 1986; Morris, Taylor, Daniels & Richards 1987; Taylor, Morris & Richards 1988; Rodríguez-Caabeiro, Casado & Juárez-Pelaez 1989b; Taylor, Morris, Richards 1989a; Brasa, Casado, Perez, *et al.* 1991) y las alteraciones estructurales tras la quimioterapia (Richards, Morris, Daniels & Riley 1988; Casado, Rodríguez-Caabeiro, Jimenez, *et al.* 1989b). También, algunos autores, ante la dificultad de la obtención de los antígenos hidatídicos brutos y la presencia en éstos de proteínas contaminantes, han empleado los sobrenadantes del cultivo *in vitro* de protoscolex como fuente de obtención de antígenos de secreción-excreción (Ris, Hamel & Mackle 1987; Auer, Hermentin & Aspöck 1988; Gasser, Lightowers & Rickard 1989).

En los estudios iniciados por Smyth (1962, 1967) sobre el cultivo de protoscolex de *E. granulosus* en dirección quística, ya se había observado la aparición de vesículas en el polo posterior de los protoscolex, la vesiculización de éstos y la posterior aparición de vesículas libres completamente envueltas por una membrana laminar; estudios posteriores han corroborado estas observaciones y las han ampliado estudiando el proceso de vesiculización en diferentes medios de cultivo y diferentes condiciones de incubación (Heath & Osborn 1976; Rogan & Richards 1986a; Rodríguez-Caabeiro & Casado 1988; Casado & Rodríguez-Caabeiro 1989a; Casado 1991b).

Heath & Osborn en 1976 sugieren que las vesículas del polo posterior pueden ser debidas a un proceso de hidropesía osmótica derivado de una lesión del tegumento originada durante el proceso de digestión

enzimática; posteriormente Rogan & Richards (1986a), contradiciendo los resultados previos, suponen el origen de estas vesículas en los restos del pedículo de unión que existía entre protoscólex y vesícula. Estudios estructurales sobre el desarrollo *in vitro* de *E. granulosus* (Rodríguez-Caabeiro & Casado 1988; Casado & Rodríguez-Caabeiro 1989a), demuestran la desaparición de cualquier resto del pedículo tras los tratamientos enzimáticos, y una ultraestructura de las vesículas del polo posterior idéntica a la descrita para la membrana germinativa, observándose incluso *clusters* (o acumulos) celulares en el interior de la cavidad (Casado 1991b).

Nuestras observaciones concuerdan con las de estos últimos trabajos en el hecho de observar la presencia de acumulos celulares en el interior de la luz de las vesículas posteriores (Fig 38), dichos acumulos, presentan una disposición morfológica muy similar a la observada por otros autores en las fases iniciales de desarrollo de los protoscólex (Rogan & Richards 1987), pero en ningún caso hemos conseguido mantener los cultivos viables el periodo de tiempo suficiente como para confirmar o desmentir esta hipótesis.

El origen de formaciones quísticas a partir de la vesiculización de los protoscólex es un hecho generalmente aceptado (Smyth 1962, 1967; Heath & Osborn 1976; Rogan & Richards 1986a; Rodríguez-Caabeiro & Casado 1988; Casado & Rodríguez-Caabeiro 1989a), y que en nuestra experiencia ha podido ser comprobado observándose una vesiculización progresiva de los protoscólex que finaliza en la formación de una cavidad quística delimitada por una membrana única (Fig 36).

La observación de la aposición externa a modo de capas concéntricas de un material amorfo con agregados electrodensos, ha sido relacionada con la formación *in vitro* de membrana laminar, observada tanto a nivel de vesículas procedentes de la vesiculización de un protoscólex (Heath & Osborn 1976; Rogan & Richards 1986a) como a nivel de las vesículas del polo posterior (Smyth 1962, 1967; Casado & Rodríguez-Caabeiro 1989a). En nuestra experiencia no se ha podido evidenciar en ninguno de los cultivos la formación de una membrana laminar envolviendo algunas de las formaciones quísticas (Fig. 36, 37, 38 y 39). La carencia de galactosa en el medio empleado para el cultivo *in vitro* de los

protoscólex (MEM) podría ser una justificación a esta ausencia de membrana laminar, hecho ya demostrado por otros autores (Smyth 1967; Brudnjak, Cvetnic & Wikerhauser 1970), aunque también podría influir la falta de suero bovino fetal en el medio de cultivo empleado en nuestra experiencia.

Es general se acepta, para los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* (Ag 5 y Ag B), un origen secretor-excretor (Shepherd & McManus 1987b). Es por ello, que ante la dificultad de obtención de antígenos puros libres de contaminantes procedentes del hospedador, diversos autores se han planteado el estudio de los componentes antigénicos presentes en los sobrenadantes de los cultivos de protoscólex, así como su posible utilidad en la elaboración de nuevas pruebas diagnósticas. En 1987, Ris *et al.* emplean componentes polipeptídicos obtenidos del sobrenadante de cultivos de protoscólex, para elaborar una prueba de ELISA con cierta utilidad en el serodiagnóstico de la hidatidosis ovina. En 1988, Auer *et al.*, empleando como antígeno el precipitado de los medios de cultivo de *E. multilocularis*, desarrollan una técnica de inmunoblot que les permite discriminar entre la infestación humana por *E. granulosus* y la producida por *E. multilocularis*. Gasser *et al.* (1989) observan como perros infectados con *E. granulosus* reconocen específicamente algunos de los componentes proteicos recuperados del medio de cultivo en el que se han mantenido los protoscólex de *E. granulosus*.

En nuestra experiencia, se han recuperado y concentrado los sobrenadantes de diferentes cultivos, procesado por separado las muestras con diferentes grados de desarrollo de los protoscólex, y estudiado mediante análisis electroforético o inmunológico (ya sea por *inmunoblot* o por *dot blot*), no habiéndose podido demostrar la presencia de los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* (Ag 5 y Ag B). Este hecho no descarta la posibilidad de que estos antígenos hayan sido secretados al medio de cultivo, ya que es posible que se haya trabajado por defecto, pero tampoco permite reafirmar el posible origen secretor-excretor de dichos antígenos en contra de un posible origen lítico de los protoscólex sin la intervención de procesos de secreción activa.

ESTRUCTURA DE *E. granulosus* A NIVEL DE MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA

En nuestros resultados, a nivel de la microscopía óptica y con el empleo de colorantes acidófilos, se ha podido evidenciar la presencia de núcleos en la membrana germinativa (Fig 44) y la ausencia de éstos en la membrana laminar (Fig 41), y mediante la microscopía electrónica se ha observado esta membrana germinativa organizada en una región propiamente germinal en íntimo contacto con otra conectiva. En la región germinal se ha diferenciado un citoplasma distal en sincitio que comunica a través de puentes citoplasmáticos con la región citoplasmática perinuclear que engloba a los núcleos y resto de organelas (Figs 52A, 52B, 53A y 53B).

De hecho, el componente celular de la pared de los quistes hidatídicos es ya bien conocido desde 1931, cuando Coutelen (1931, 1938) demuestra la presencia de núcleos y diversos tipos celulares a nivel de la membrana germinativa. Estudios posteriores de Kilejian *et al.* (Kilejian, Schinazi & Schwabe 1961) confirman este hallazgo y demuestran mediante técnicas histoquímicas la presencia de ADN a nivel de los núcleos de esta membrana. Pero no es hasta 1967 cuando, gracias a los trabajos de microscopía electrónica realizados por Morseth, se describe la estructuración de esta membrana en forma de sincitio, tal y como se conoce en la actualidad y se ha comprobado en este trabajo.

La membrana laminar es básicamente un complejo de proteínas y oligosacáridos (galactosa, galactosamina y glucosamina) (Kilejian & Schwabe 1971) que mantiene la estructura quística de la hidátide y que posiblemente desempeña algún otro papel en la biología del parásito como podría ser el de barrera inmunológica (Coltorti & Varela-Díaz 1974; Richards, Arme & Bridges 1983; Thompson 1986).

Ultraestructuralmente, la membrana laminar se observa formada por una matriz microfibrilar con agregados de material electrodensó (Morseth 1967), ricos en calcio, a los que se les ha atribuido un papel anticomplementario similar al de los corpúsculos calcáreos de los protoscólex (Rogan & Richards 1989). La diferente compactación de

estos dos componentes (matriz y agregados electrodensos) da lugar a las laminaciones (Richards, Arme & Bridges 1983), visibles a microscopía óptica y que en nuestra experiencia han sido especialmente evidenciadas mediante el empleo de tinciones tricrómicas, y en especial con la tinción de Papanicolaou (Fig 41).

Aunque, en estudios de diferenciación quística de protoscólex de *E. granulosus* realizados *in vivo*, se ha observado como antes de la aparición de la membrana laminar se produce alrededor del tegumento un acúmulo de células del hospedador degeneradas (Rogan & Richards 1989), la matriz microfibrilar de la membrana laminar se ha relacionado ultraestructuralmente al contenido de algunas vacuolas de la membrana germinativa (Richards, Arme & Bridges 1983), y el material electrodenso se cree iniciado en la liberación de las llamadas vesículas "G" del tegumento, originadas presumiblemente en el complejo de Golgi (Rogan & Richards 1989).

La llamada membrana adventicia se corresponde con una cápsula fibrosa desarrollada por el hospedador, que engloba totalmente la formación quística, y que es producto de la respuesta inflamatoria que se desencadena a nivel tisular tras las primeras fases del desarrollo post-oncosferal (Slais & Vanek 1980; Thompson 1986). La reacción fibrosa, se demuestra, en nuestra experiencia, mediante el empleo de tinciones tricrómicas que ponen en evidencia la presencia de numerosas fibras de colágeno, al mismo tiempo que permiten visualizar una importante reacción linfomonocitaria en la zona más periférica (Fig 42).

A nivel de los protoscólex, se pueden distinguir dos regiones claramente diferenciadas: la región del escólex y la región del soma (Fig 6). Ambas regiones están delimitadas por un tegumento, la región del escólex esta ocupada por cuatro ventosas y un rosetelo armado, y la región del soma esta ocupada básicamente por las células del parénquima, los corpúsculos calcáreos y el sistema osmorregulador.

Aunque, a principios de la década de los 60 todavía se consideraba que los cestodos y trematodos estaban recubiertos por una "cutícula" secretada por el parénquima al cual envuelven, los primeros estudios

realizados sobre la ultraestructura de esta cubierta externa (Threadgold 1962) demostraron que esta falsa "cutícula" era un tejido vivo delimitado por una membrana citoplasmática, por lo que se adoptó para su mención el término de tegumento.

En el caso de los protoscólex de *E. granulosa*, la organización básica de este tegumento quedó reflejada en los trabajos de ultraestructura llevados a cabo por Morseth en 1967, aunque son múltiples las aportaciones posteriores con las que se han complementado sus estudios (Lumsden & Hildreth 1983; Conder, Marchiondo, Williams & Andersen 1983; McManus & Barret 1985; Rogan & Richards 1986b, 1987, 1989).

En esta experiencia, la marcada acidofilia del tegumento, demostrada mediante la observación a microscopía óptica de preparaciones teñidas por diferentes metodologías (Fig 47), hace que éste sea fácilmente distinguible de entre el resto de estructuras parasitarias. El tegumento delimita completamente al parásito y se observa recubierto de una fina capa PAS positiva (Fig 49), que se tiñe ligeramente con el azul alcian (Fig 49) y retiene sales de plata (Fig 48). Estas características se corresponden con las descritas por otros autores para el glicocalix (Kilejian, Schinazi & Schwabe 1961, Morseth 1967), atribuibles a su contenido en glúcidos y/o a su carga negativa (Mehlhorn, Dubremetz, Franz, *et al.* 1988c; Schmidt & Roberts 1989). El hecho de observar esta fina capa PAS positiva, tanto en el tegumento de la región del soma como en el del escólex, llama la atención, puesto que en trabajos recientes de microscopía electrónica no se consigue demostrar la presencia del glicocalix recubriendo el tegumento de la región del escólex (Rogan & Richards 1989).

A nivel de la microscopía electrónica, nuestras observaciones sobre la ultraestructura del tegumento concuerdan perfectamente con las previas de otros autores (Morseth 1967; Lumsden & Hildreth 1983; Conder, Marchiondo, Williams & Andersen 1983; McManus & Barret 1985; Rogan & Richards 1986b, 1987, 1989), encontrándose en el tegumento diferenciado en dos regiones organizadas a modo de sincitio celular: citoplasma distal (o sincitial) y citoplasma perinuclear (Fig 56A, 56B, 57A, 57B y 58). El tegumento de la región del escólex se caracteriza por

la presencia de microtriquias con espina electrodensa (Fig 59), mientras que a nivel de la región del soma éstas quedan reducidas a pequeñas elevaciones con un casquete electrodenso (Fig 59). El empleo de una metodología de fijado e inclusión más óptima para estudios antigénicos que estructurales no ha permitido la visualización del glicocalix.

La existencia en la región del soma de fibras musculares subtegumentarias dispuestas en dos capas perpendiculares y su organización en la región del escólex para dar lugar a la musculatura de las ventosas y de los ganchos, así como la división de la célula muscular en una porción contráctil y otra no contráctil (Lumsden & Hildreth 1983; Schmidt & Roberts 1989), son hechos que, comunes al sistema muscular de todos los cestodos, también se han podido observar en nuestras preparaciones para microscopía electrónica (Fig 56A, 56B, 57A y 57B).

La especial composición de los ganchos, formados mayoritariamente a base de proteínas del grupo de las queratinas (Gallagher 1964), les confiere unas características tintoriales particulares, que permiten diferenciarlos fácilmente del resto de estructuras parasitarias (incluso mediante microscopía óptica a pequeños aumentos). Algunos de los métodos que han sido propuestos para la tinción selectiva de los ganchos, son muy específicos pero complejos de elaborar (Sterba, Milacek & Vitovec 1989), mientras que en nuestra experiencia, se han obtenido buenos resultados con dos de las tinciones empleadas rutinariamente en el estudio de cortes histológicos, la tinción de kinyoun y la de Gomori-Grocott (Fig 50 y 51).

Los corpúsculos calcáreos son estructuras de origen celular constituidas por acumulos de compuestos inorgánicos depositados sobre una matriz orgánica (Lumsden & Hildreth 1983; Pawlowski, Yap & Thompson 1988; Schmidt & Roberts 1989). En nuestra experiencia mediante la microscopía electrónica, se ha podido comprobar la naturaleza intracelular de los corpúsculos calcáreos, observándose como la matriz orgánica, típicamente dispuesta en líneas concéntricas (Fig 57), se localiza en el citoplasma de células especializadas, desplazando al núcleo y ocupando la práctica totalidad del espacio celular (Fig 56).

El sistema osmorregulador de los cestodos es de tipo protonefrítico, y

esta básicamente formado por dos componentes mayoritarios, las células flamíferas y los conductos excretores (Lumsden & Hildreth 1983; Schmidt & Roberts 1989). Nuestras observaciones sobre la ultraestructura de los diferentes componentes del sistema osmorregulador, son esencialmente idénticas a las que ya apuntara Morseth en 1967 (Fig 61 y 62), aunque este autor negaba la existencia de un poro excretor. Aunque en éste trabajo, no se ha podido constatar la existencia de soluciones de continuidad en el tegumento que pudiesen ser consideradas como verdaderos poros excretores, si se ha observado la continuidad de los túbulos colectores comunes a través del pedículo (Fig 54A, 54B, 55A y 55B), pudiendo ser ésta una de las vías de drenaje del sistema osmorregulador.

La reproducción asexual del parásito por procesos originados en la división mitótica de células indiferenciadas (Ubelaker 1983a; Mehlhorn, Taraschewski, Franz, *et al.* 1988b), ha sido también bien documentada en nuestras experiencias. Así, mediante la microscopía óptica, se ha podido apreciar como el acúmulo de células indiferenciadas en la superficie externa de la membrana germinativa se acompaña de la invaginación de esta membrana y de la protusión del conjunto hacia el interior de la cavidad quística (Fig 43) y, mediante la microscopía electrónica, se ha demostrado, a nivel del pedículo de unión entre los protoscólex y la membrana germinativa de las vesículas proliferas, la continuidad entre el citoplasma sincitial de la membrana germinativa y el citoplasma sincitial del tegumento de los protoscólex (Figs 54A, 54B, 55A y 55B). Estas observaciones estarían de acuerdo con el modelo de reproducción asexual propuesto por Mehlhorn, Taraschewski, Franz, *et al.* (1988b) (Fig 4), en el que la invaginación de la membrana germinativa es la que da lugar al tegumento del parásito, el cual engloba a un conjunto de células indiferenciadas que tras varios procesos de diferenciación darán lugar a las diferentes estructuras de los protoscólex (Mehlhorn & Pickarski 1985; Rogan & Richards 1987; Mehlhorn, Taraschewski, Franz, *et al.* 1988b).

El empleo, en nuestra experiencia, de diferentes tinciones para glúcidos (PAS, PAS-díastasa y azul alcian), se ha demostrado la presencia de glucógeno en la zona de las ventosas, en las áreas cercanas al pedículo

y formando una fina capa en la región subtegumentaria (Fig 49), así como en forma de pequeños acumulos dispersos por el parénquima de los protoscólex (Fig 49) y a nivel de la membrana germinativa (Fig 49). Resultados que no difieren de los observados por otros autores mediante el empleo de tinciones específicas (Kilejian, Schinazi & Schwabe 1961; Morseth 1967a; Linxian & Yuguang 1990) o el marcaje con lectinas (Leducq, Gabrion & Gabrion 1988, 1990).

La presencia de otras glucoproteínas, demostrada por su reactividad PAS positiva no digerible por la diastasa, es especialmente evidente a nivel de la membrana laminar, en el glicocalix (Fig 49A) y a nivel de los protoscólex degenerados y detritus del interior de las vesículas prolíferas (Fig 49B), aunque gran parte de estas glucoproteínas podrían corresponder a proteoglucanos sulfatados pues son teñidos total o parcialmente por el azul alcian (Fig 49D).