

**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

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

La variación morfológica de *E. granulosus*, durante el proceso de diferenciación en dirección quística, se ha estudiado por observación microscópica de protoscólex de procedencia ovina mantenidos *in vitro* en un medio de cultivo monofásico.

En el sobrenadante del medio de cultivo de los protoscólex mantenidos *in vitro*, no se ha observado, mediante SDS-PAGE, la presencia del Ag 5 ni del Ag B, tampoco se ha detectado, por *immunoblot* ni *dot blot*, inmunoreactividad frente a los antisueros monoespecíficos anti-Ag 5 ni anti-Ag B.

PROCESAMIENTO DE LA ARENA HIDATIDICA

OBTENCION DE PROTOSCOLEX

El volumen de los sedimentos de arena hidatídica que se han recuperado tras la centrifugación de las múltiples muestras de líquido hidatídico procedentes de diferentes animales o de diferentes quistes de un mismo animal es muy variable, aunque generalmente proporcional a la cantidad de líquido recogida. No ocurre lo mismo con la proporción de vesículas prolíferas y protoscólex libres presentes entre el resto de *detritus* celulares que, aunque también es muy variable no está en relación con el volumen de líquido extraído y por tanto con el tamaño del quiste.

La observación microscópica de las diferentes muestras de arena hidatídica permite seleccionar las que serán procesadas, escogiéndose para cultivo tan solo aquellas muestras de arena hidatídica de volumen superior a 0.5 ml, con alta proporción en vesículas prolíferas y/o protoscólex libres y que mediante la tinción de Gram no evidencien contaminación bacteriana.

A destacar la disminución subjetiva en la proporción de protoscólex viables en aquellas muestras procedentes de vísceras previamente conservadas 18-24 horas a 4°C, comparativamente con las procedentes de vísceras procesadas de inmediato, hecho que no se observó en el caso de la conservación previa, durante 18-24 horas a 4°C, del contenido quístico extraído por la punción de las hidátides.

El tratamiento de la arena hidatídica con tripsina, consigue, en una incubación de 30 min., la digestión enzimática de las vesículas prolíferas y del material muerto de la mayoría de las muestras, siendo excepcional la necesidad de una segunda incubación.

Tras la tripsinización se recuperan por centrifugación protoscólex libres, que en su practica totalidad se encuentran invaginados (Fig 34-1 y 34-2), con la región del escólex introducida en la región del soma, siendo el porcentaje de las formas evaginadas

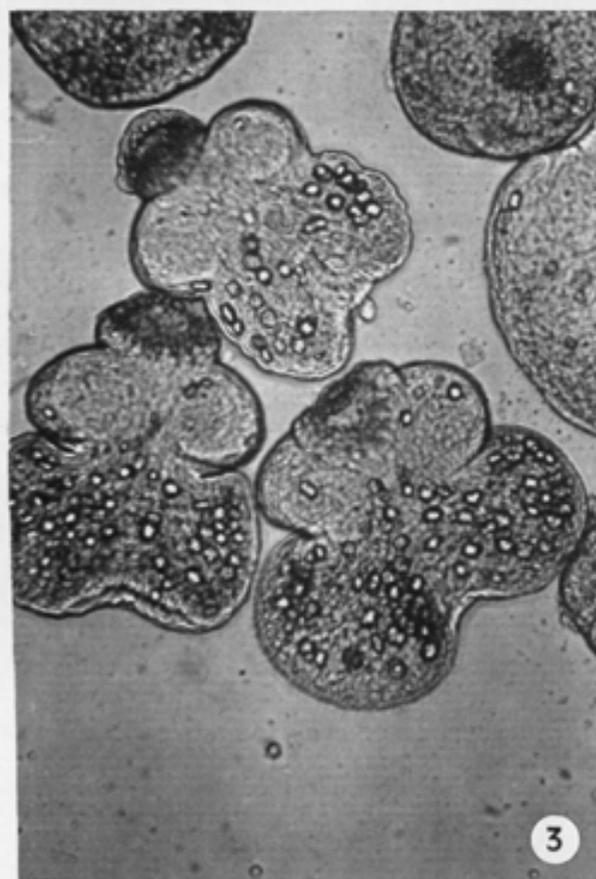
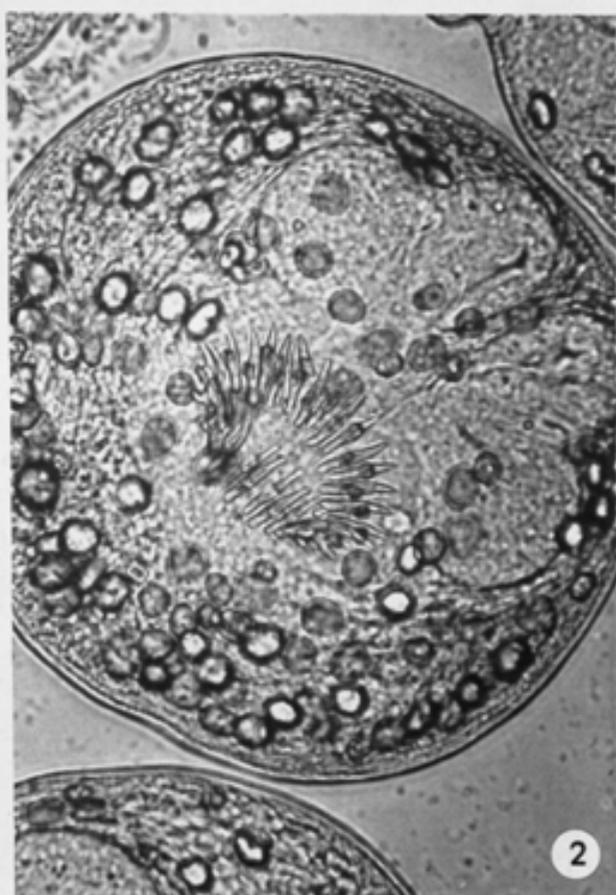
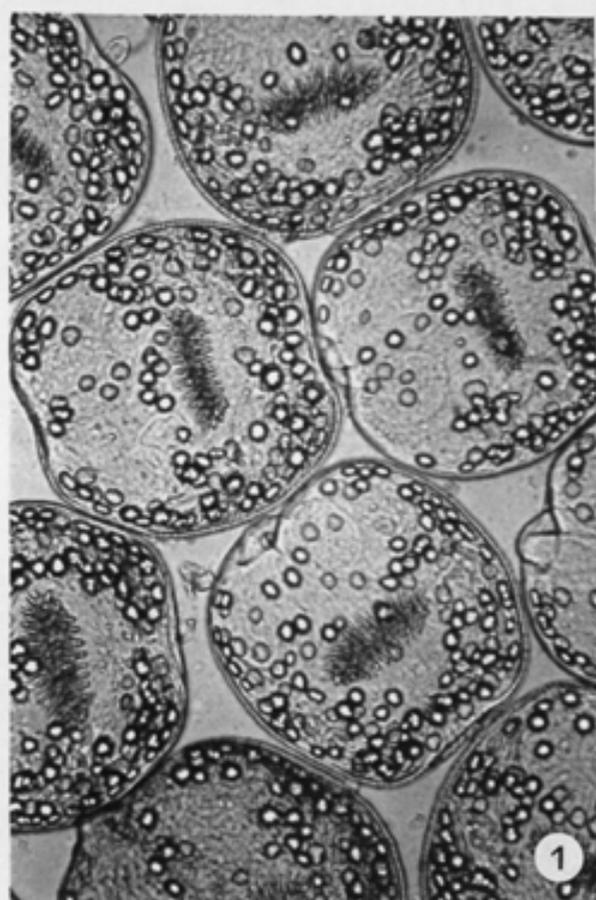


Figura 34. Protoscolerxes obtenidos tras tripsinización de la arena hidatídica. 1 y 2: protoscolerxes invaginados; 3 y 4: protoscolerxes evaginados.

presentes inferior al 5% (Fig 34-3 y 34-4). La totalidad de los protoscólex se observan móviles, con una estructuración bien definida, con abundantes corpúsculos calcáreos y abundantes células flamíferas activas distribuidas esencialmente por la periferia de la región del soma.

MANTENIMIENTO IN VITRO

En la presente experiencia, el cultivo de protoscólex en un medio monofásico empleando Mínimo Esencial de Eagle (MEM) sin suplementar con suero bovino fetal, consigue la diferenciación quística de los protoscólex, manteniendo formas viables durante un periodo máximo que oscila entre los 60 y los 85 días.

VALORACION DE LA VIABILIDAD

Durante el periodo que se prolonga el mantenimiento *in vitro* de los protoscólex se observa una reducción progresiva de las formas viables, evidenciada por la pérdida de movilidad, la ausencia de actividad a nivel de las células flamíferas y la desestructuración general del parasitario con la pérdida de un contorno nítido. El mayor índice de mortalidad se observa durante los días 1 y 2 del cultivo y, de forma mucho más aparente, a partir del segundo mes de cultivo, momento en el cual todos aquellos protoscólex que no han iniciado cualquiera de las vías de diferenciación quística comienzan a degenerar y acaban por lisarse (Fig 35-2).

Una vez iniciado el proceso de vesiculización los protoscólex se mantienen viables hasta el día 70 - 80, momento en el que comienza a observarse el progresivo colapso de las diferentes cavidades quísticas y la retracción de sus paredes (Fig 35-3 y 35-4).

CAMBIOS MORFOLOGICOS

Inicialmente los protoscólex, conservan las características morfológicas observadas tras ser recuperados por tripsinización de la arena hidatídica: en su gran mayoría están invaginados,

son móviles, bien estructurados, con abundantes corpúsculos calcáreos y células flamíferas activas. Pero conforme progresan los días de cultivo, los protoscólex, van sufriendo una serie de cambios morfológicos que se inician con el proceso de evaginación y un aumento de volumen.

Proceso de evaginación de los protoscólex

El número de las formas evaginadas no es constante, y la proporción en que están presentes varía según el día de observación y el cultivo que se valora.

Inicialmente, la proporción de las formas evaginados es inferior al 5%, pero durante las primeras 24 horas de cultivo el número de protoscólex evaginados presenta un marcado incremento y se alcanzan proporciones cercanas al 30% (Fig 35-1).

En los siguientes primeros 30 días de cultivo, el número de formas evaginadas presenta múltiples oscilaciones, y la proporción que representan varía entre un 10 y un 50%.

A partir del segundo mes de cultivo las formas evaginadas no incrementan su número absoluto pero sí su proporción, debido a la lisis progresiva de las formas invaginadas que acaban por desaparecer hacia el inicio del tercer mes (Fig 35-2).

Proceso de diferenciación en dirección quística

Los cambios morfológicos atribuibles propiamente al proceso de diferenciación en dirección quística, como son la progresiva vesiculización de los protoscólex y la aparición de una vesícula posterior y su aumento de volumen, serán tratados mas adelante en el apartado: "Desarrollo *in vitro* de *E. granulosus*".

Alteraciones estructurales comunes

Durante el mantenimiento *in vitro* de los protoscólex se aprecia, a partir de los 10 días de cultivo, una marcada reducción en el tamaño de los corpúsculos calcáreos que parece acompañarse de una reducción en número, este hecho es mucho mas notable transcurridos los primeros 30 días de cultivo (Fig 35-1 y 35-2) pero, a no ser que se trate de un estado muy avanzado de vesiculización, la desaparición de los corpúsculos calcáreos no es en ningún caso completa.

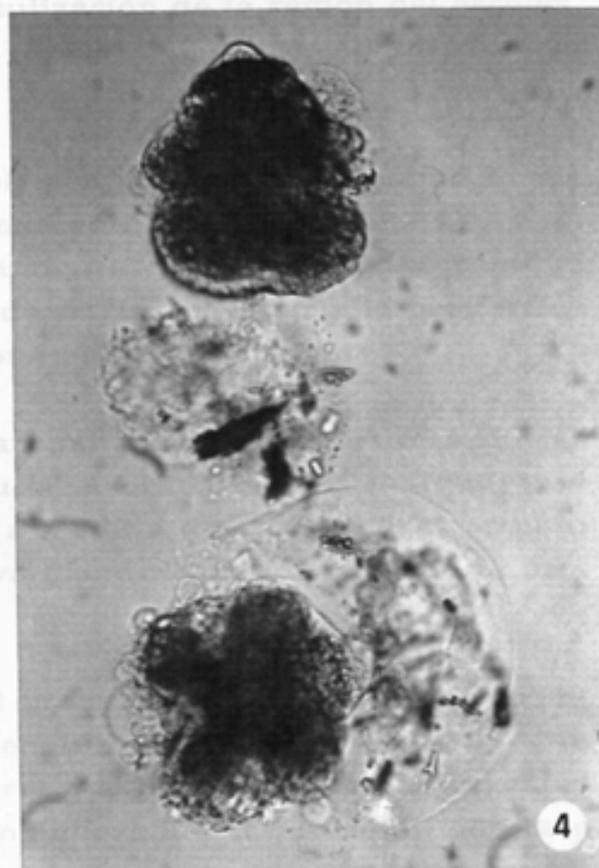
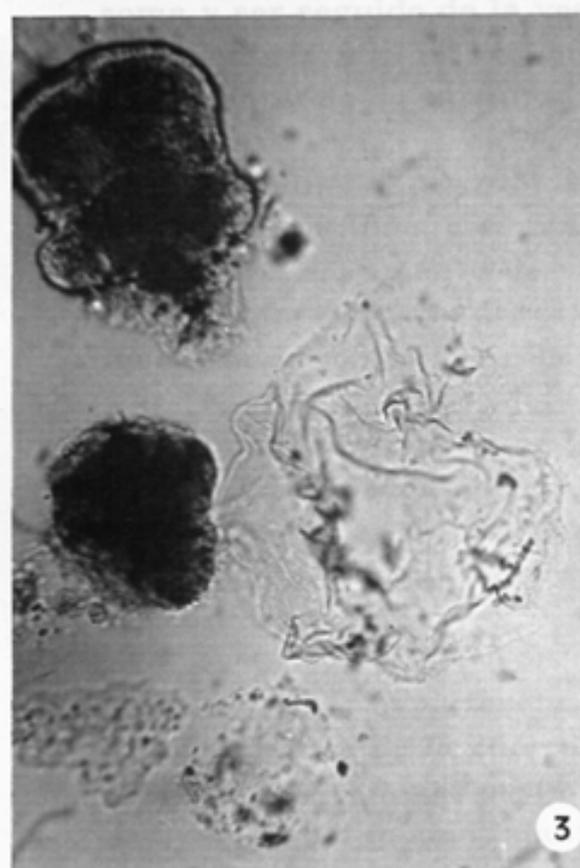
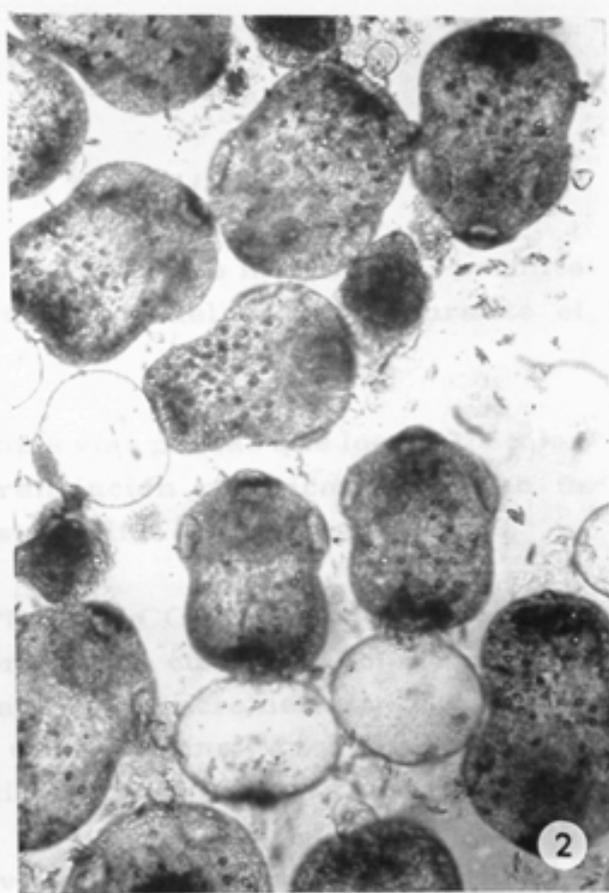
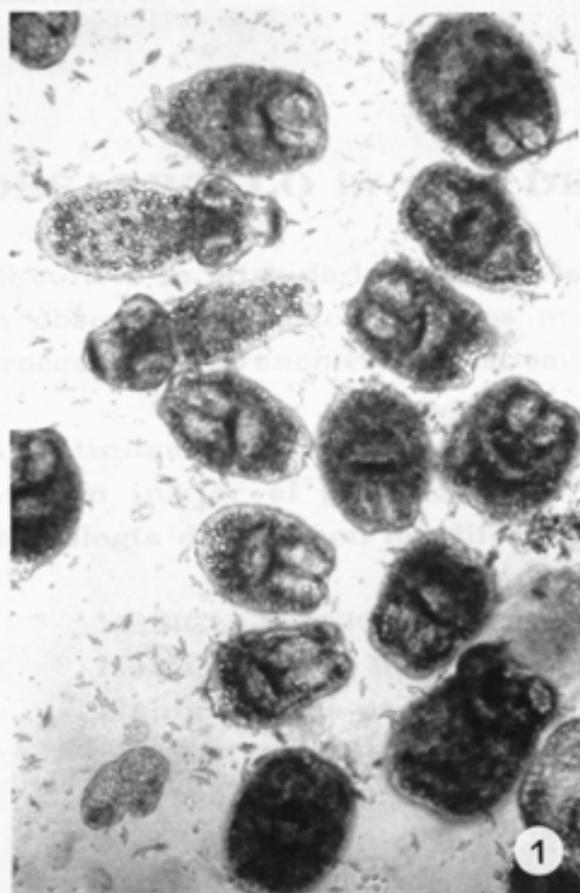


Figura 35. Mantenimiento de protoscólex *in vitro*. 1: 7 días de cultivo; 2: 67 días de cultivo; 3 y 4: 84 días de cultivo.

DESARROLLO *in vitro* DE *E. granulosus*

El cultivo *in vitro* de los protoscólex en un medio monofásico, permite la observación de los cambios morfológicos del parásito durante el proceso de diferenciación quística.

A continuación se tratarán las diferentes vías por las que los protoscólex pueden iniciar el proceso de diferenciación quística, así como la morfología de éstos en los diferentes estadios de desarrollo.

VESICULIZACION DE LOS PROTOSCOLEX

Hacia el fin de la primera semana de cultivo, se observa como algunos de los protoscólex evaginados incrementan su volumen progresivamente y adquieren una apariencia globulosa que progresará hasta la total vesiculización del parásito.

El proceso suele iniciarse a nivel del parénquima de la región del soma y ser seguido de la vesiculización de la región del escólex, dando lugar a una vesícula única que progresivamente ira incrementando su tamaño.

El parénquima de los protoscólex en proceso de vesiculización se observa expandido, con una marcada pérdida de densidad y un progresivo incremento de volumen a expensas de una cavidad interna que desplaza al resto de estructuras hacia la periferia y las sitúa en lo que sería la zona subtegumentaria.

Inicialmente se conservan gran parte de las estructuras típicas del protoscólex como son conductos excretorios, células flamígeras y corpúsculos calcáreos, pero a medida que progresa el proceso de vesiculización su número va disminuyendo hasta ser su presencia inaparente.

En la presente experiencia, el proceso de vesiculización se completa a finales de la cuarta semana de cultivo, sin que puedan evidenciarse cambios posteriores que hagan pensar en la posible progresión del mismo, manteniéndose las vesículas en una fase estacionaria hasta el momento de su degeneración y lisis.

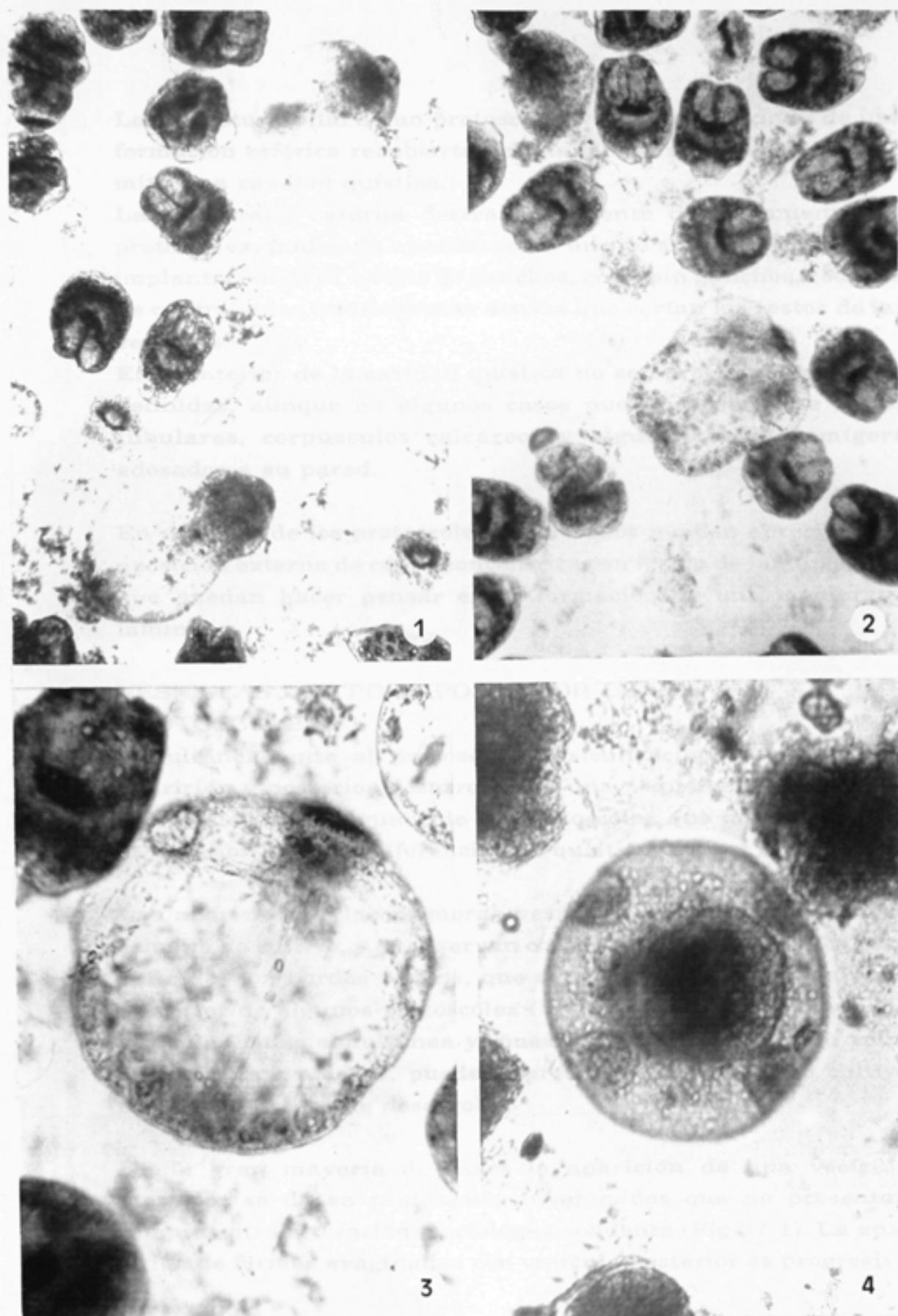


Figura 36. Vesiculación de los prostocólex cultivados in vitro. 1: vesiculación región del soma, 14 días de cultivo; 2: vesiculación región del soma y del escólex, 23 días de cultivo; 3 y 4: vesiculación completa, 25 días de cultivo.

La estructura final de un protoscólex vesiculado, sería la de una formación esférica recubierta de una membrana única que delimita una cavidad quística.

La membrana externa deriva claramente del tegumento del protoscólex, pudiendo apreciarse en uno de sus polos la zona de implantación de la corona de ganchos, con o sin ganchos, rodeada de cuatro áreas esféricas más densas que serían los restos de las ventosas.

En el interior de la cavidad quística no se aprecian estructuras definidas, aunque en algunos casos pueden observarse restos tubulares, corpúsculos calcáreos y alguna célula flamígera adosados a su pared.

En ninguno de los protoscólex vesiculados pueden apreciarse la aposición externa de capas concéntricas en forma de laminaciones que puedan hacer pensar en la formación de una membrana laminar.

VESICULAS DEL POLO POSTERIOR DE LOS PROTOSCOLEX

Simultáneamente al proceso de vesiculización se observa, la aparición y posterior desarrollo, de una pequeña vesícula en el polo posterior de algunos de los protoscólex que no han seguido la anterior línea de diferenciación quística.

Las aparición de las primeras vesículas ocurre en la primera semana de cultivo, y se observan como una cavidad quística bien definida, con bordes nítidos, que se encuentra adherida al polo posterior de algunos protoscólex (Fig 37-1). La aparición de las vesículas no es simultánea y, puesto que incrementan su volumen progresivamente, pueden apreciarse en un mismo cultivo diferentes grados de desarrollo.

En la gran mayoría de casos la aparición de una vesícula posterior se da en protoscólex invaginados que no presentan ninguna otra alteración morfológica evidente (Fig 37-1). La aparición de formas evaginadas con vesícula posterior es progresiva

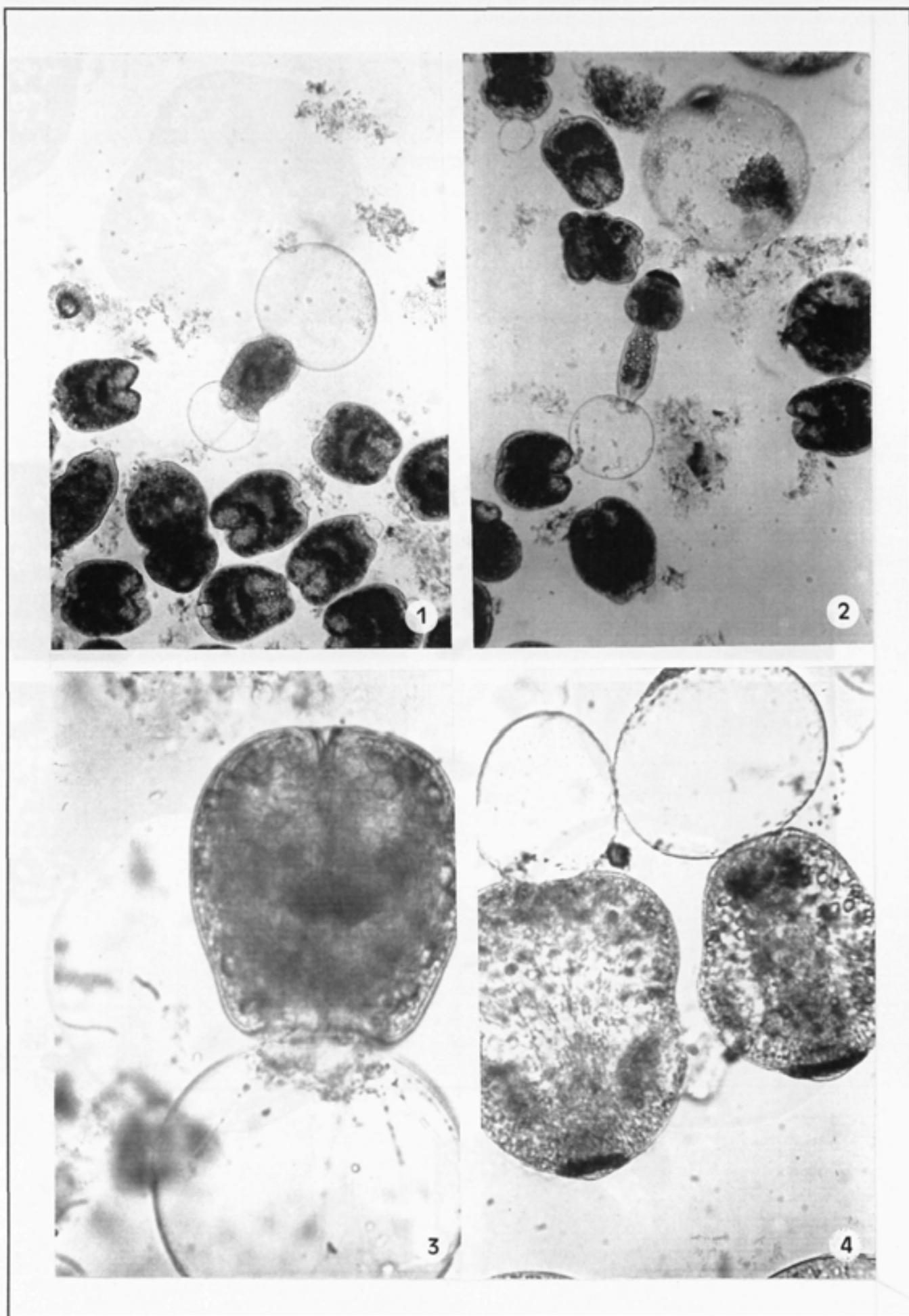


Figura 37. Vesículas del polo posterior de los protoscólex. 1: aparición de vesículas en protoscólex invaginados; 2: vesícula en protoscólex evaginado; 3: vesícula posterior, 30 días de cultivo y 4: vesícula posterior, 60 días de cultivo.

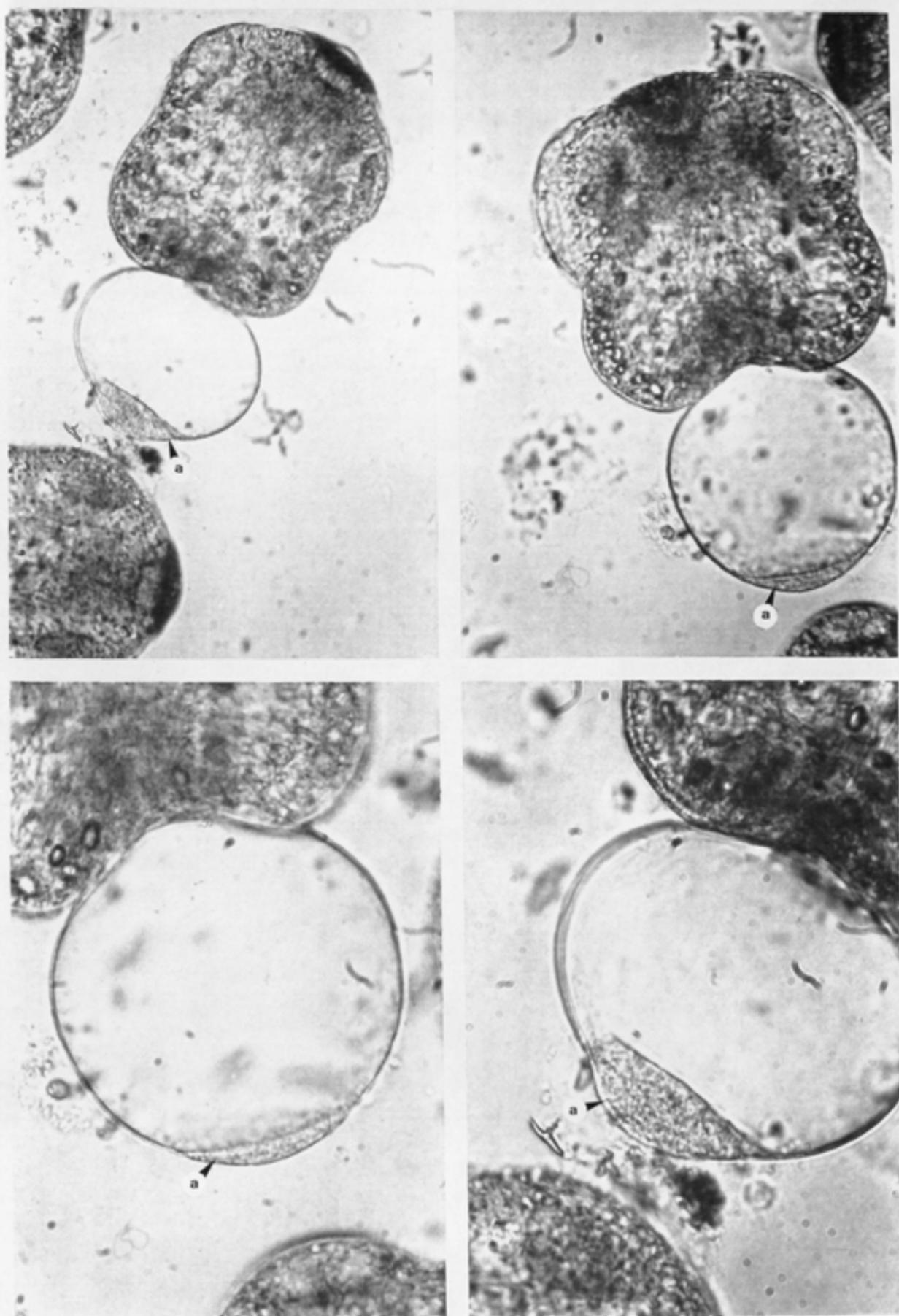


Figura 38. Vesículas del polo posterior de los protoscólex, a los 67 días de mantenimiento *in vitro*. a: acúmulos celulares.

(Fig 37-2), pero al finalizar el segundo mes de cultivo todos los protoscólex con vesícula posterior se encuentran evaginados y presentan un incremento de volumen tanto en la región del soma como en la del escólex (Fig 35-2), aunque conservan una estructura bien definida, son móviles y presentan células flamíferas activas.

Las vesículas posteriores, que un principio tienen un diámetro inferior a los 10 μm , durante los primeros dos meses de cultivo van incrementando progresivamente su tamaño, hasta alcanzar un volumen máximo que no logra nunca superar el del protoscólex pero que prácticamente lo iguala (Fig 37-3 y 37-4).

A partir del segundo mes de cultivo se aprecia en las vesículas posteriores, a nivel del polo opuesto a su conexión con los protoscólex, la formación de un acúmulo celular que va aumentando progresivamente de volumen y que protuye hacia la luz vesicular (Fig 38). En ninguno de los casos se consigue identificar ninguna estructura concreta derivada de estos acúmulos celulares, sobreviniendo antes la degeneración y lisis del parásito (Fig 35-3 y 35-4).

En ninguna de las vesículas del polo posterior de los protoscólex se aprecia la aposición externa de laminaciones en capas concéntricas.

VESICULAS LIBRES

En la mayoría de los cultivos efectuados se observa, hacia los siete o diez días de iniciado el proceso de mantenimiento *in vitro* de los protoscólex, la presencia en el medio de microvesículas libres sin conexión alguna a ningún protoscólex ni a ninguna otra estructura definida (Fig 39-1).

Las microvesículas, inicialmente, tienen un tamaño que oscila entre los 25 y 50 μm , son esféricas y poseen un contorno nítido, y aunque en su interior se aprecian ciertas irregularidades o

cambios de densidad, no presentan restos de ventosas ni de la corona de ganchos. Posteriormente incrementan su tamaño, y conforme progresa el cultivo se vuelven irregulares, para finalmente, ya dentro de un estadio final, plegarse sobre si mismas y lisarse. Previamente al inicio del proceso de lisis se observa la aparición de granulaciones a nivel de su pared.

En ninguna de las vesículas libres se ha podido constatar, durante el periodo que se ha prolongado su desarrollo, la aposición de laminaciones concéntricas sobre su superficie.

El hecho de que la presencia de microvesículas libres no hubiese sido detectada con anterioridad a la primera semana de cultivo permitira especular sobre su posible origen, pero puesto que esta observación no será objeto de discusión a continuación solo se expondrán algunos hechos que serían útiles en el momento de una discusión:

Algunos protoscólex con vesícula posterior se observan estructuralmente alterados sin que se observen modificaciones a nivel de esta (Fig 39-2).

En algunos de los protoscólex con vesícula posterior, la conexión protoscólex-vesícula se observa francamente reducida (Fig 39-3).

Durante el proceso de degeneración de las vesículas posteriores, se ha observado en algunos casos, que tras la retracción de la pared se produce una posterior aparición de múltiples microvesículas asociadas entre si y con el mismo protoscólex, que ya se encuentra en fase degenerativa (Fig 39-4).

VESICULAS CON MÚLTIPLES PROTOSCOLEX

En ninguno de los cultivos efectuados se ha observado la aparición de vesículas que presentaran múltiples protoscólex en conexión a su superficie externa.

En alguna ocasión, en fases muy iniciales del cultivo y en proporción muy escasa, se han observado vesículas de gran tamaño que presentaban en su exterior más de un protoscólex (Fig 40-1).

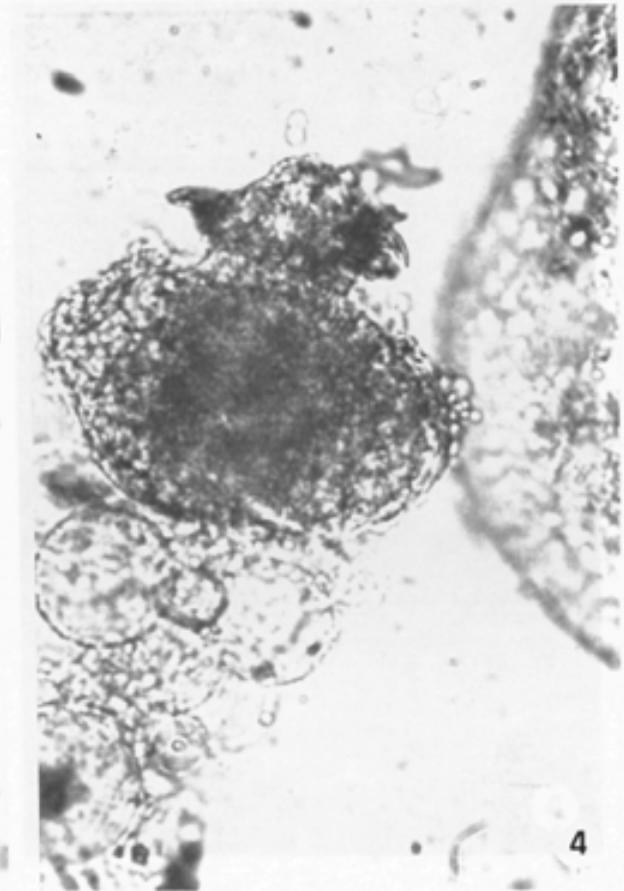
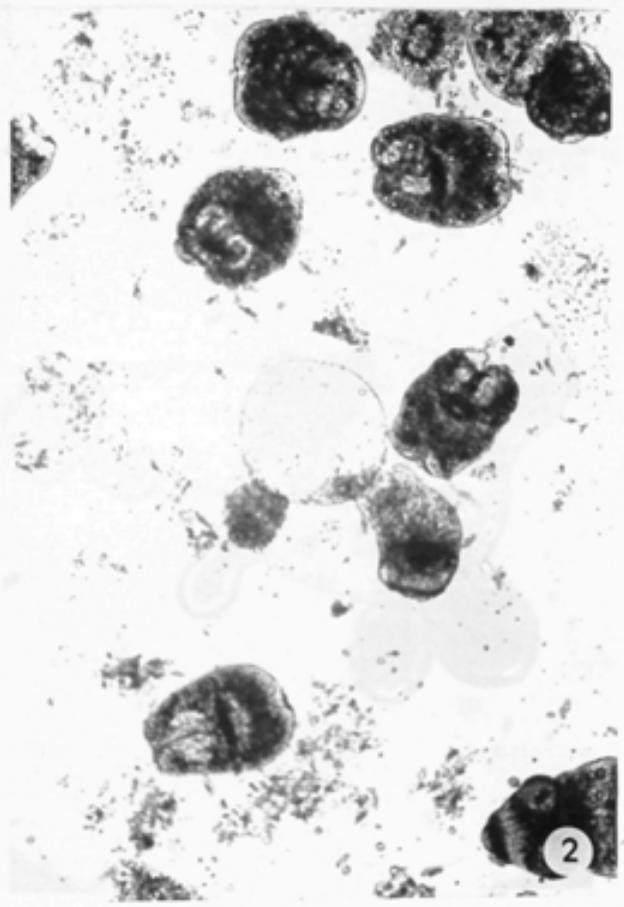
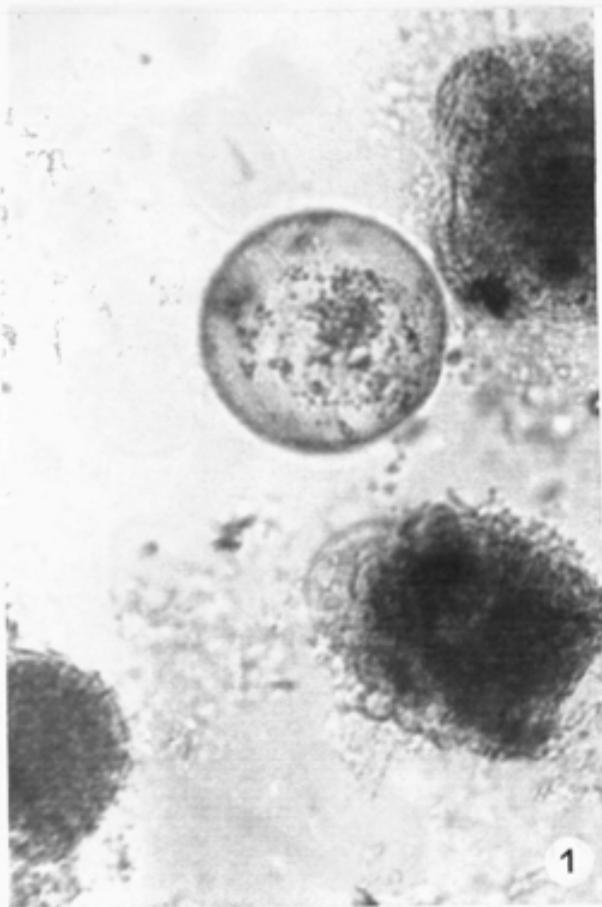


Figura 39.1: vesícula libre, 10 días cultivo. 2: protoscólex destruido con vesícula posterior. 3: protoscólex y vesícula posterior. 4: protoscólex y vesícula posterior tras iniciar proceso degenerativo, 84 días cultivo.

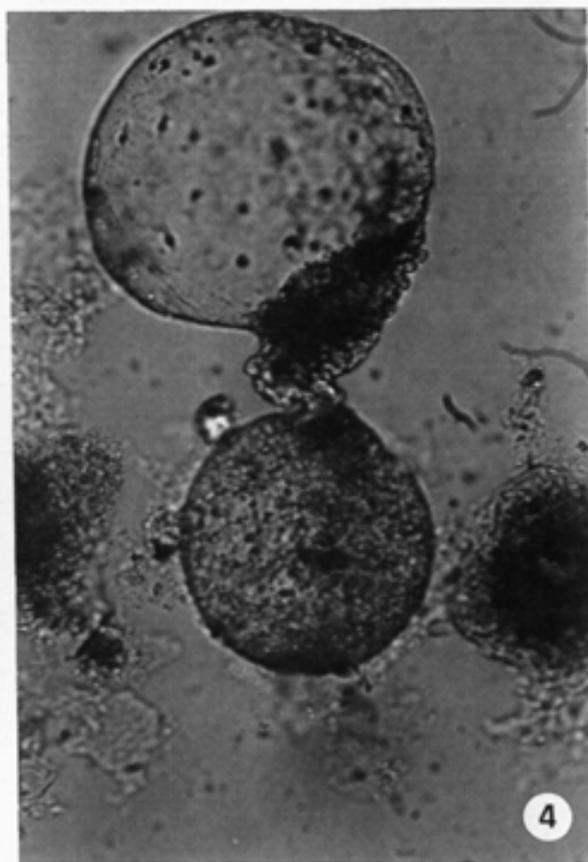
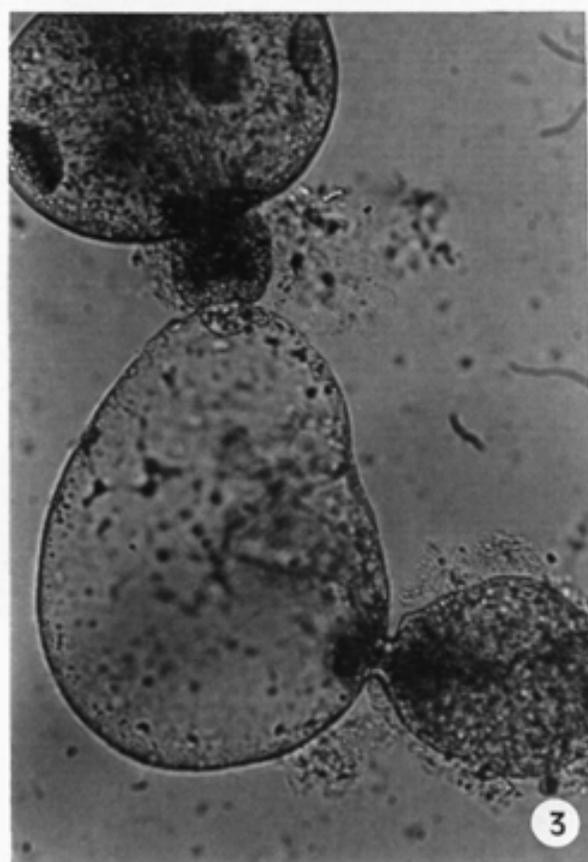
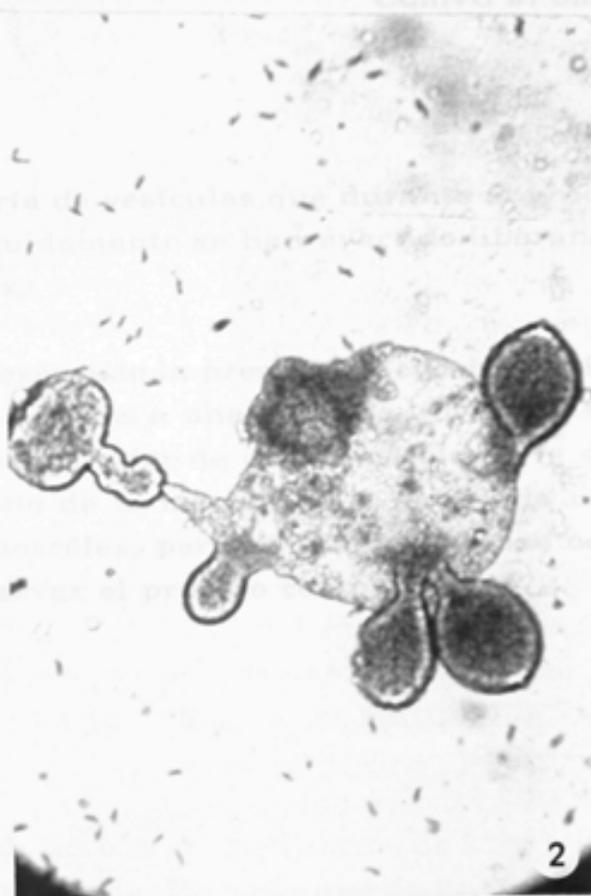
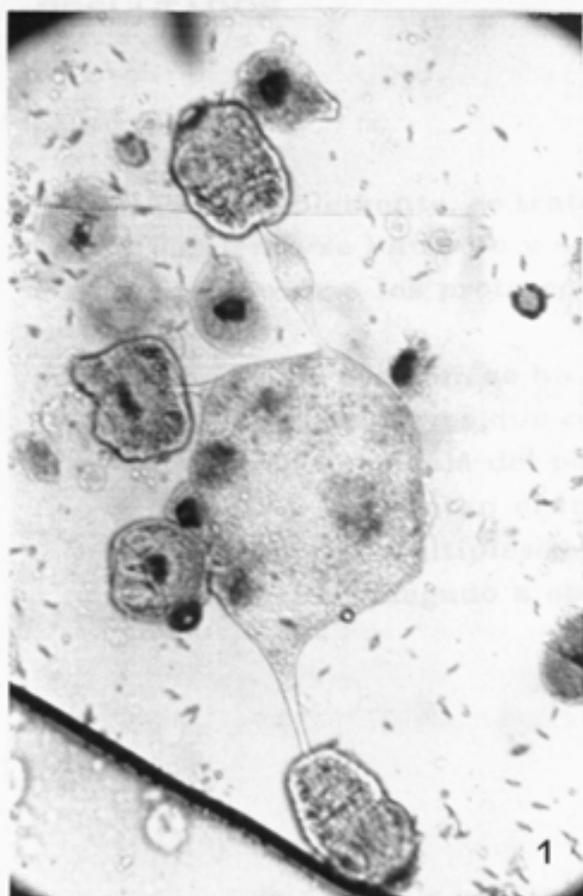


Figura 40.1: vesícula prolifera evertida: 2: acúmulos celulares en vesícula libre 10 días de cultivo. 3 y 4: acúmulos celulares en vesículas del polo posterior de los protoscólex, 10 días de cultivo.

Presumiblemente, se trataría de vesículas que durante el procesamiento se han roto y seguidamente se han evertido liberando al exterior a los protoscólex.

En alguna ocasión, se ha observado la presencia de uno o varios acúmulos celulares que conectados a una vesícula libre (Fig 40-2) o a una vesícula del polo posterior de un protoscólex (Fig 40-3 y 40-4) aparentan el inicio de formación de lo que sería una vesícula con múltiples protoscólex, pero en ninguna de las ocasiones se ha llegado a observar el proceso completo.

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION

La recuperación de los diferentes sobrenadantes del medio de cultivo celular empleado para el mantenimiento *in vitro* de los protoscolex permitió, mediante estudios electroforéticos e inmunológicos, valorar la liberación de antígenos parasitarios de secreción-excreción.

OBTENCION Y PREPARACION DE LOS SOBRENADANTES

Siguiendo el protocolo que se ha expuesto previamente en el apartado de material y métodos, tan solo se han podido procesar los sobrenadantes recuperados de dos de las experiencias de cultivo *in vitro* efectuadas, que denominaremos cultivo 1 (C-1) y cultivo 2 (C-2).

El volumen total de medio de cultivo recuperado es de 51 ml y 60 ml, para C-1 y C-2 respectivamente. En cada uno de los cultivos, las diferentes alícuotas se encuentran agrupadas en tres *pools* (*pool A*: primeros 7 días de cultivo, *pool B*: semanas 2, 3, 4, 5 y 6 y *pool C*: semanas 7, 8 y 9 de cultivo) en función del estado de desarrollo de los protoscolex.

Para C-1 el volumen del *pool A* es de 10 ml, 20 ml el del *pool B* y 21 ml el del *pool C*, para C-2 los volúmenes recuperados son 8, 22 y 30 ml respectivamente.

Debido a la baja concentración proteica de cada uno de los diferentes *pools* (valores inferiores a 200 $\mu\text{gr/ml}$ según el método de Bradford), se procede a la concentración de los diferentes sobrenadantes recuperados (Tabla XII).

Los *pools* correspondientes a C-1 se concentran por ultrafiltración, y los correspondientes a C-2 por precipitación con ácido tricloroacético.

	<i>pool A</i>		<i>pool B</i>		<i>pool C</i>	
	VI	VF	VI	VF	VI	VF
C-1	10 ml	200 μ l	20 ml	400 μ l	21 ml	400 μ l
C-2	8 ml	200 μ l	22 ml	400 μ l	30 ml	600 μ l

Tabla XII. Volúmenes de medio de cultivo empleados en el estudio de la producción de antígenos de secreción-excreción. VI: volumen inicial. VF: volumen final.

CONCENTRACION POR ULTRAFILTRACION

Mediante la ultrafiltración se consiguen concentrar los sobrenadantes de C-1 unas 50 veces.

Los volúmenes finales de medios de cultivo concentrados disponibles son: 200 μ l para el *pool A*, 400 μ l para el B y 400 μ l para el C.

CONCENTRACION POR PRECIPITACION

En el proceso de concentración de los sobrenadantes de C-2 con etil acetato, tan solo se observa precipitado macroscópico en el *pool A*, correspondiente a los sobrenadantes de los 7 primeros días de cultivo.

Los precipitados proteicos se regeneran con un volumen de tampón fosfato unas 50 veces inferior al de partida, con lo que los volúmenes finales obtenidos para los diferentes *pools* de C-2 son: *pool A* 200 μ l, *pool B* 400 μ l y *pool C* 600 μ l.

ANALISIS ELECTROFORETICO E INMUNOLOGICO DEL SOBRENADANTE

Los sobrenadantes concentrados se separan electroforéticamente por SDS-PAGE y se tiñen con CBB R-250 con el fin de comprobar la presencia de alguna banda proteica.

El estudio inmunológico se realiza sobre las proteínas separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa o por *dot-blot*.

SDS-PAGE

Para la separación electroforética, se emplean geles analíticos de 80 x 70 x 0.75 mm, con gradiente de poliacrilamida del 5 al 20 %. Los geles se cargan con 20 μ l/pocillo de los diferentes *pools* de los sobrenadantes concentrados, que son diluidos al 1/2 en tampón de muestra 2x.

De las diferentes muestras procesadas, tan solo se evidencia una banda proteica muy tenue en la muestra correspondiente al *pool* A de C-2. El PM aproximado de esta banda proteica se ha estimado entre 50 y 60 kDa.

INMUNOBLOT

Los componentes proteicos de los diferentes *pools* concentrados, son separados electroforéticamente en geles preparativos de 80 x 70 x 1.5 mm con gradiente, y transferidos a membranas de nitrocelulosa. De cada muestra se siembran 40 μ l/pocillo.

El revelado de las diferentes tiras de nitrocelulosa obtenidas, con cada uno de los dos antisueros monoespecíficos (anti-5 y anti-B), no muestra ningún tipo de reactividad para ninguno de los sobrenadantes procesados.

DOT BLOT

Sobre membranas de nitrocelulosa se depositan tres muestras de 40 μ l de cada uno de los diferentes *pools* de los sobrenadantes concentrados, y posteriormente se procede al revelado con los dos antisueros monoespecíficos y un suero no inmune como control de especificidad.

Tras el procesado inmunoenzimático de la nitrocelulosa, no se observa reactividad en ninguna de las muestras, tanto al ser reveladas con los antisueros monoespecíficos como con el suero no inmune.