

**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

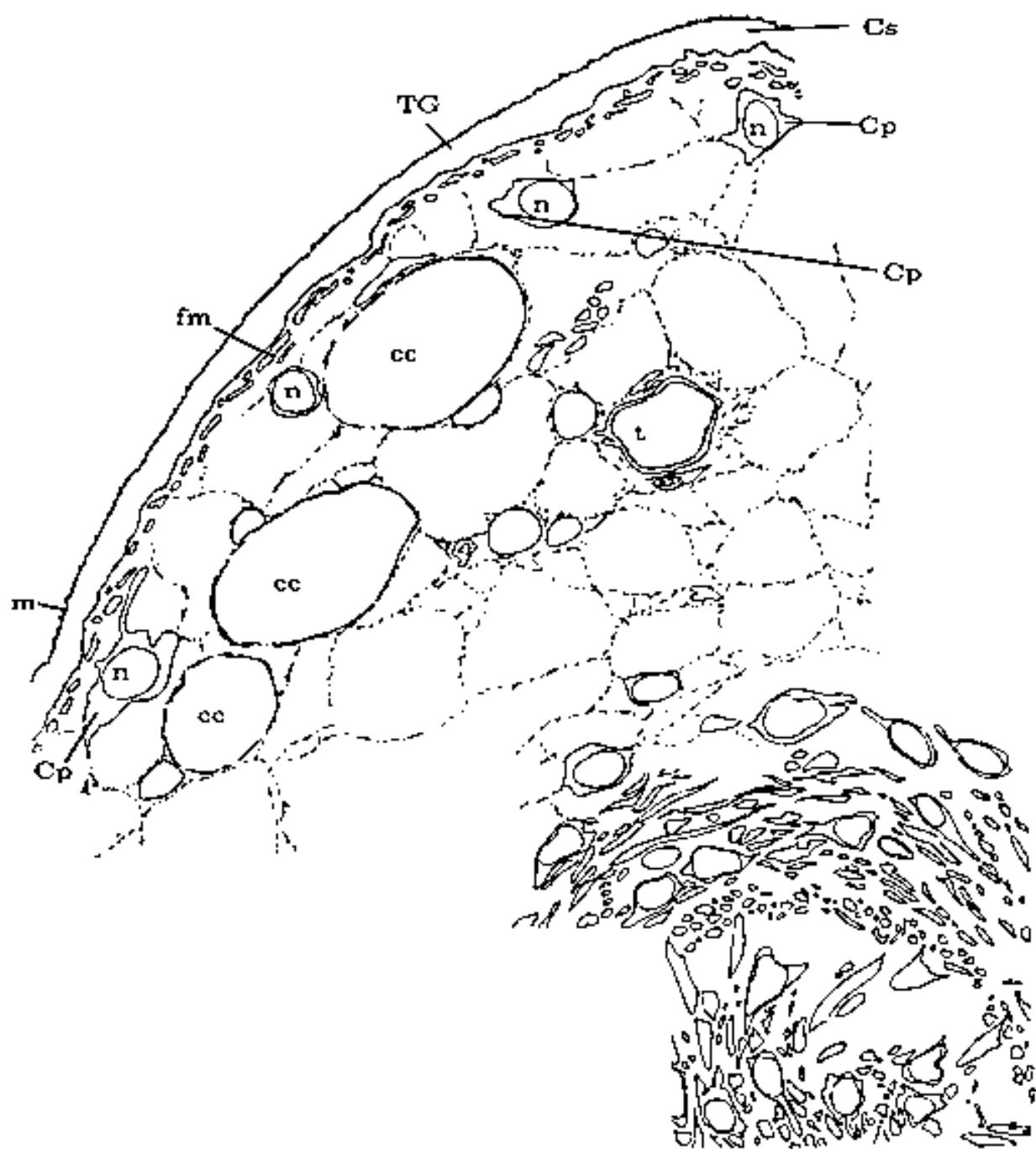


Figura 66 A. Esquema de ultraestructura de un protoxólex. TG: tegumento, Cs: citoplasma sincitial, cp: citoplasma perinuclear, n: núcleo, t: tubo, m: microtriquias, fm: fibras musculares, cc: corpúsculo calórico.

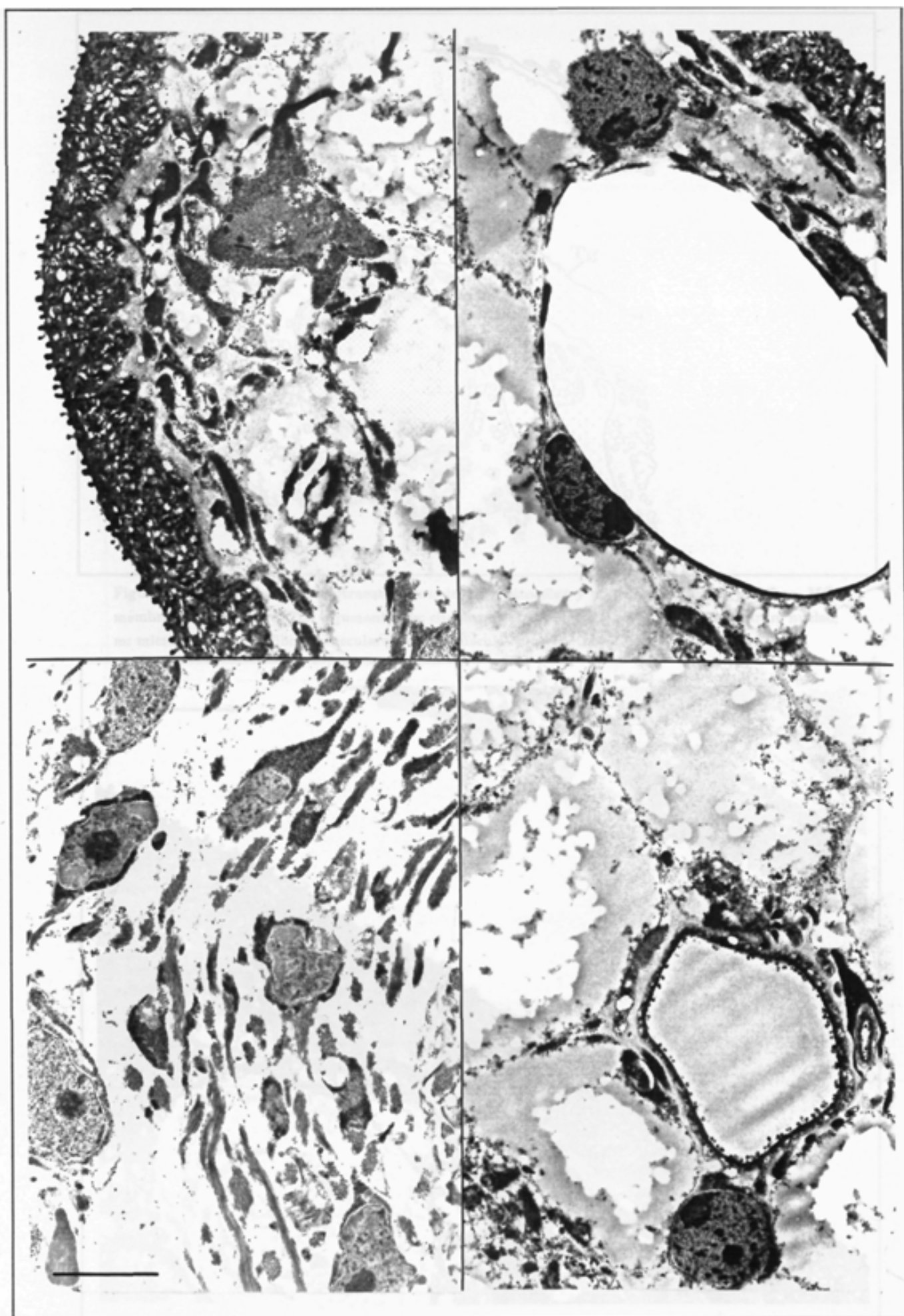


Figura 56 B. Ultraestructura de un protoscólex. Microfotografías correspondientes a porciones del esquema representado en la figura 56 A. Barra: 3 μ m.

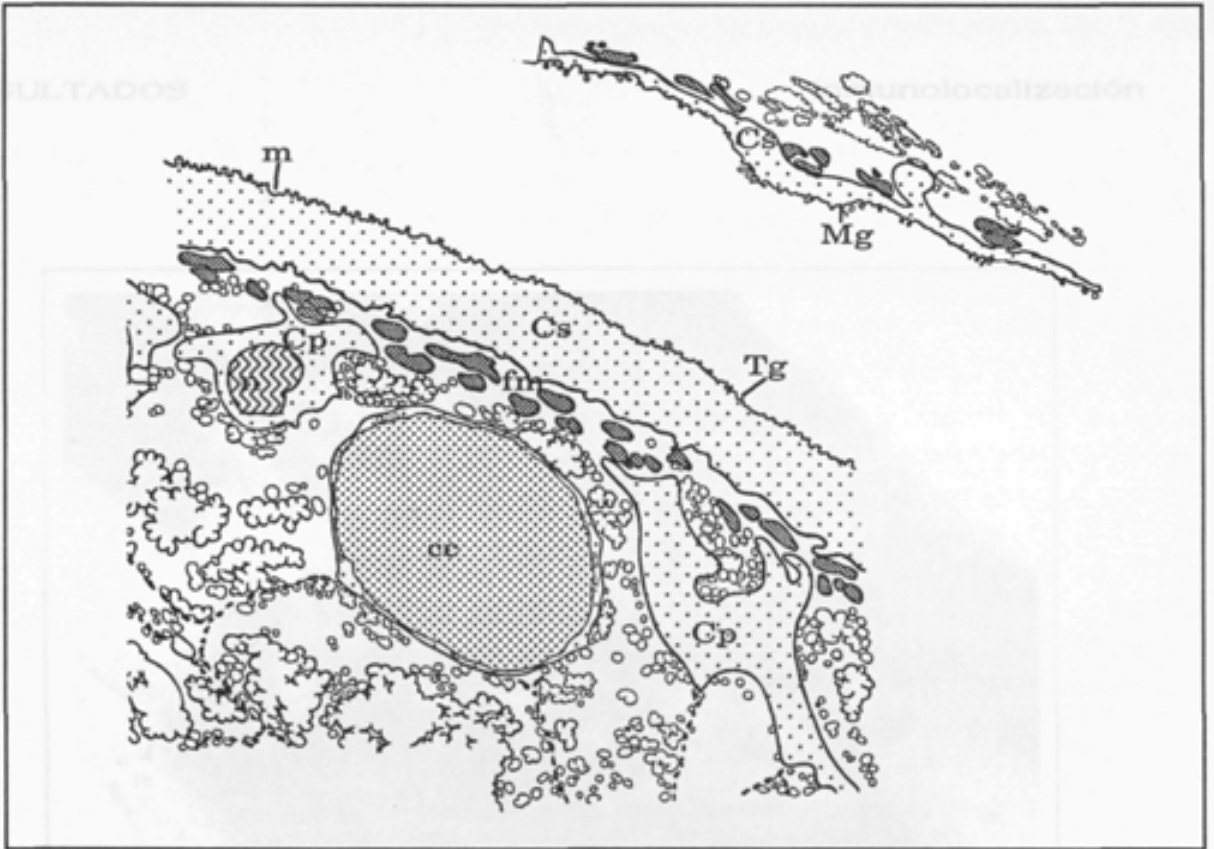


Figura 57 A. Esquema de la ultraestructura de un protoscólex y porción de vesícula proliferadora. MG: membrana germinativa, TG: tegumento, Cs: citoplasma sincitial, cp: citoplasma perinuclear, n: núcleo, m: microtriquias, fm: fibras musculares, cc: corpúsculo calcáreo.

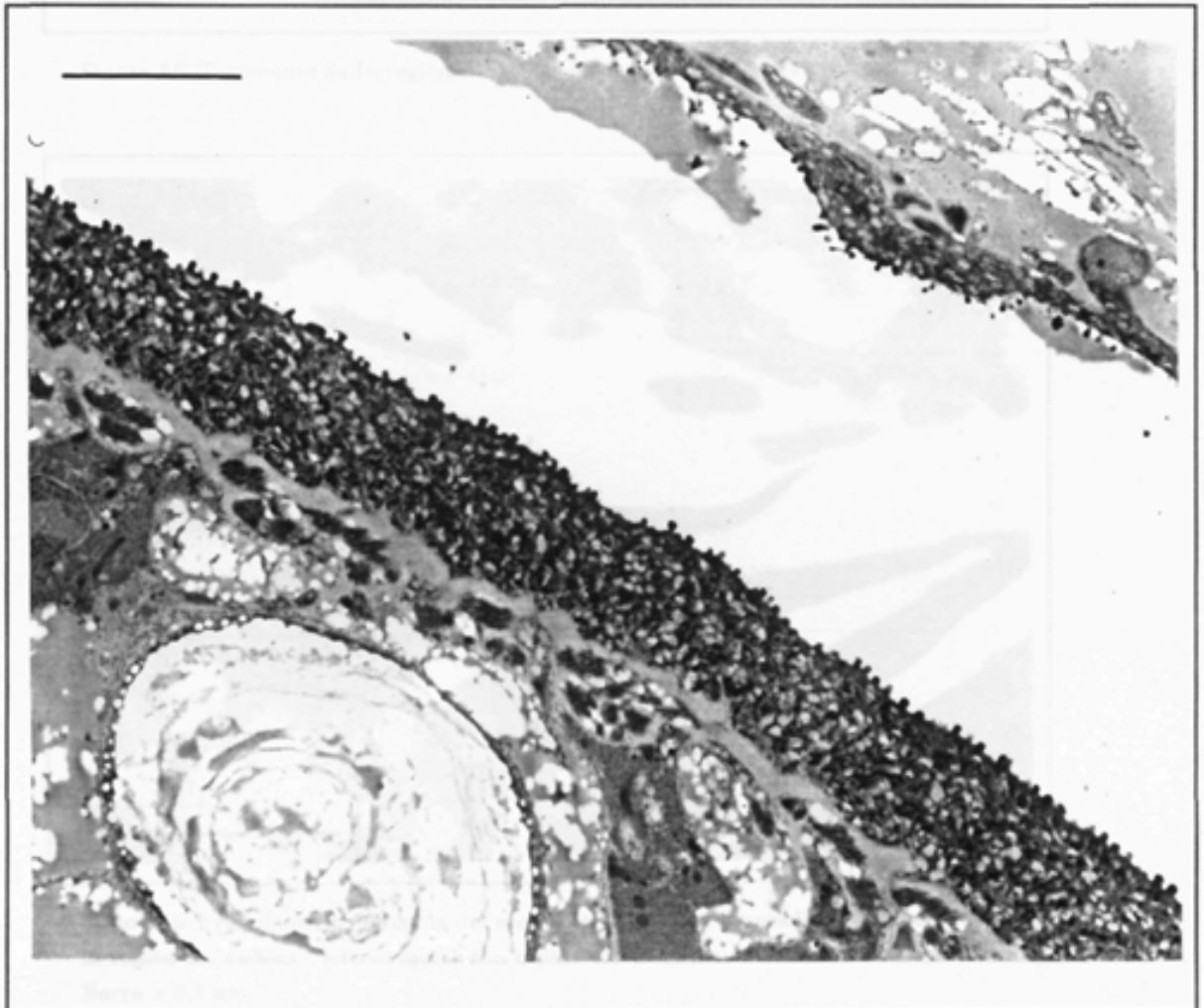


Figura 57 B. Microfotografía correspondiente al esquema representado en la figura 57 A. Barra: 3 μ m.

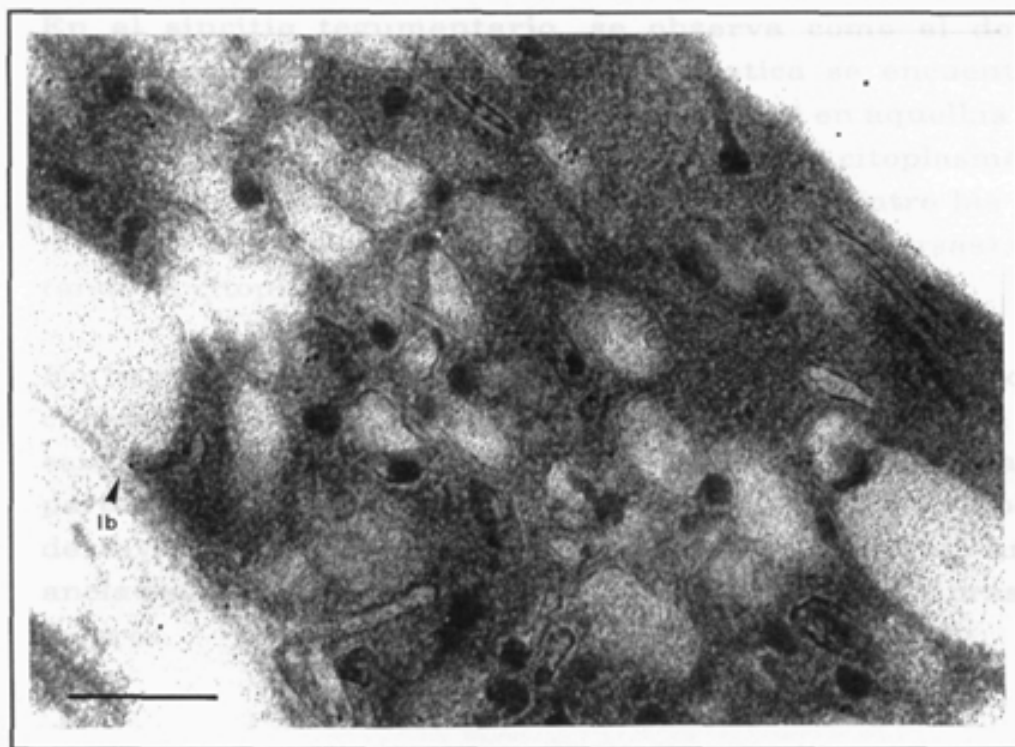


Figura 58. Tegumento de la región del soma. Barra: 0,3 μm . lb.: lámina basal

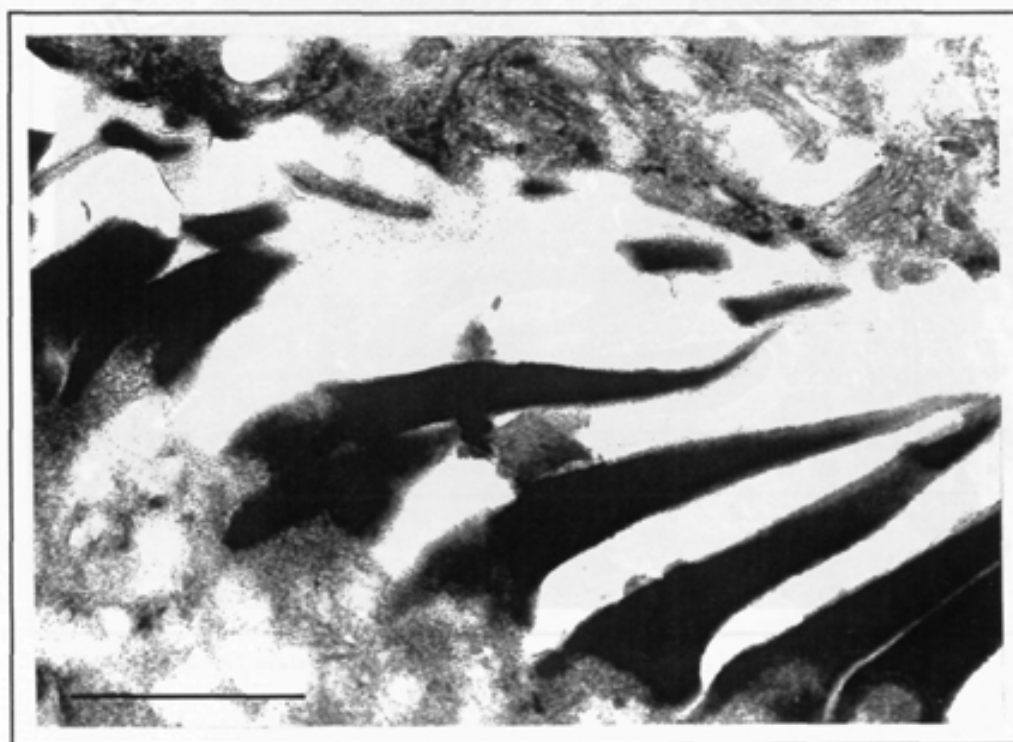


Figura 59. Tegumento de la región del soma - microtriquias truncadas. Tegumento de la región del escólex - microtriquias con espina electrodensa. Barra = 0,7 μm .

En el sincitio tegumentario, se observa como el dominio basolateral de la membrana citoplásmica se encuentra en contacto con una lámina basal (Fig. 58), salvo en aquellas regiones en las que se organizan unas expansiones citoplasmáticas, las cuales atraviesan la lámina basal y pasan entre las fibras musculares subtegumentarias (circulares y transversas) conectando el citoplasma sincitial con el perinuclear.

En la región del escólex se observa la corona de ganchos, los cuales, a modo de microtriquias gigantes, se aprecian como estructuras electrodensas con una luz interior. Los ganchos parten de la base del tegumento, están rodeados por un laberinto de invaginaciones del mismo (Fig 60) y están internamente anclados al parénquima del parásito por numerosas fibras musculares.

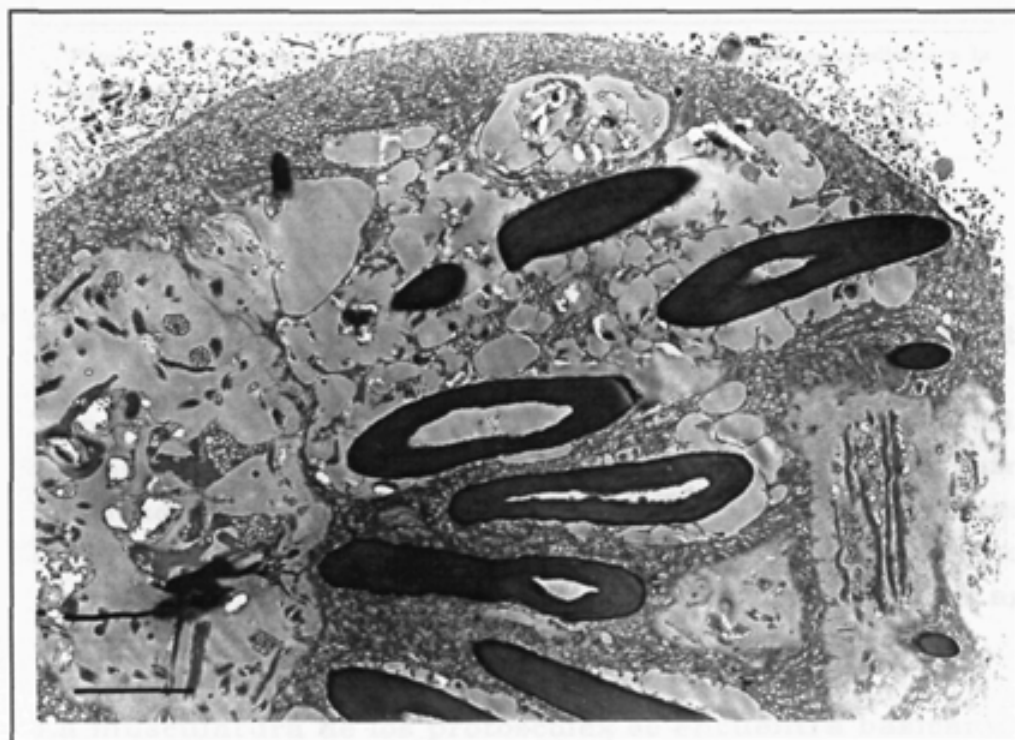


Figura 60 A. Ultraestructura del rostelo. Barra: 5 μ m.

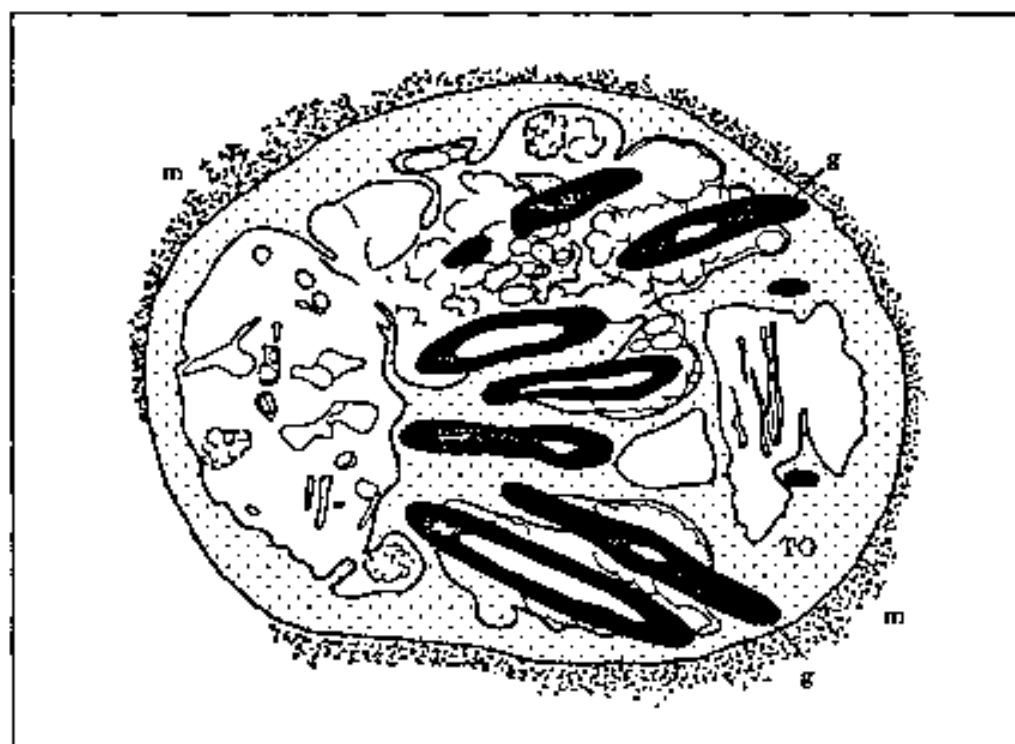


Figura 60 B. Representación esquemática del zootelo. Esquema correspondiente a la figura 60 A. TC: tegumento, g: ganchos, m: microtiquias.

SISTEMA MUSCULAR

En el sistema muscular de los protoscólex se puede distinguir una porción contráctil conectada con otra porción no contráctil.

La porción contráctil se observa formada por múltiples filamentos agrupados en miofibrillas que le confieren una estriación longitudinal pero no transversal (Fig. 56 y 57). La porción no contráctil o pericarión contiene los núcleos celulares, que se encuentran dispersos por el parénquima y muchas veces agrupados en sincitio.

La musculatura de los protoscólex se encuentra básicamente en la región subtegumentaria, aunque también se observan mioцитos dispersos por toda el parénquima. Esta dispuesta en forma de dos capas perpendiculares de fibras musculares, una circular y otra

transversal, y es especialmente abundante y de mayor tamaño en la región del escólex, donde da lugar a las ventosas y ancla el roseto.

SISTEMA OSMORREGULADOR

El sistema osmorregulador (o excretor) de los protoscólex es del tipo protonefrítico, y está básicamente formado por dos componentes mayoritarios, las células flamíferas y los conductos excretores.

Las células flamíferas se encuentran distribuídas por el parénquima de los protoscólex. Presentan un núcleo polar, rodeado de escaso citoplasma, del que parte un conjunto de cilios que, en número de 50-70, se proyectan hacia el interior de la luz del conducto excretor que los engloba.

Los cilios son estructuras cilíndricas, que contienen en su centro un par de microtúbulos separados y en la periferia 18 microtúbulos, agrupados por pares y dispuestos circularmente (2 + 9 pares) (Fig 61).

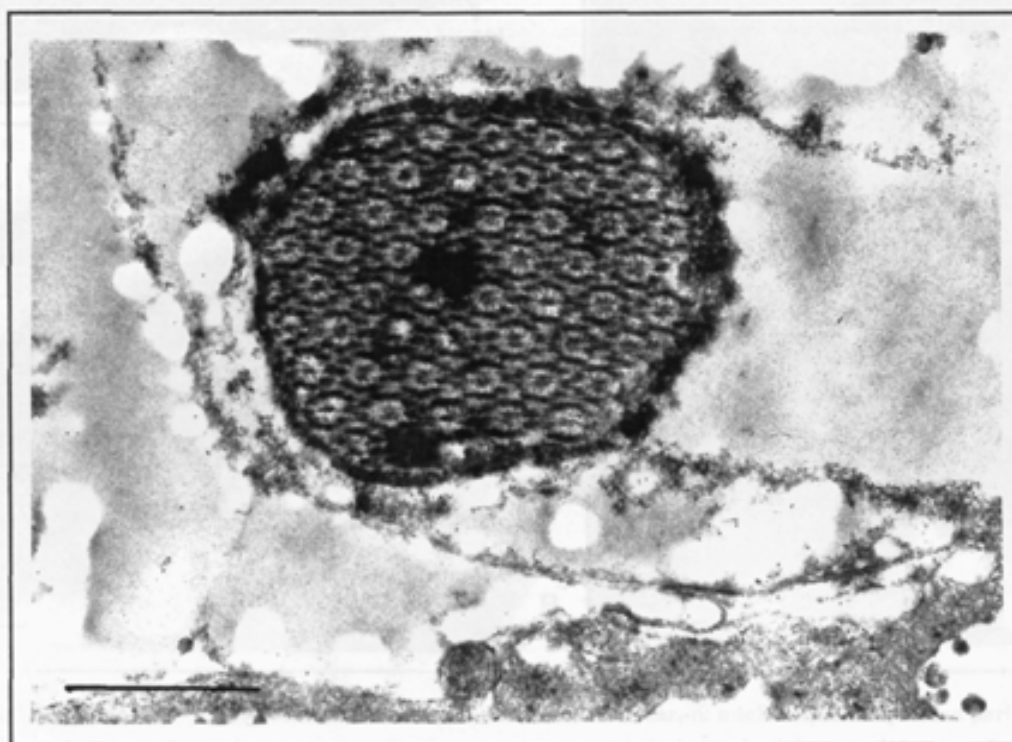


Figura 61. Ultraestructura de un corte transversal de una célula flamígera de *E. granulosus*. Barra: 1 μ m.

Los conductos excretores se inician a nivel de las células flamíferas (túbulos colectores primarios) formando un sistema canalicular de conductos de diferentes diámetros (Fig 62) que abocan a unos conductos principales (túbulos colectores comunes), los cuales, en número de dos, recorren el parénquima de los protoscólex desde la región del escólex a la del soma (Fig 34-4) y van a desembocar en dos poros excretores.

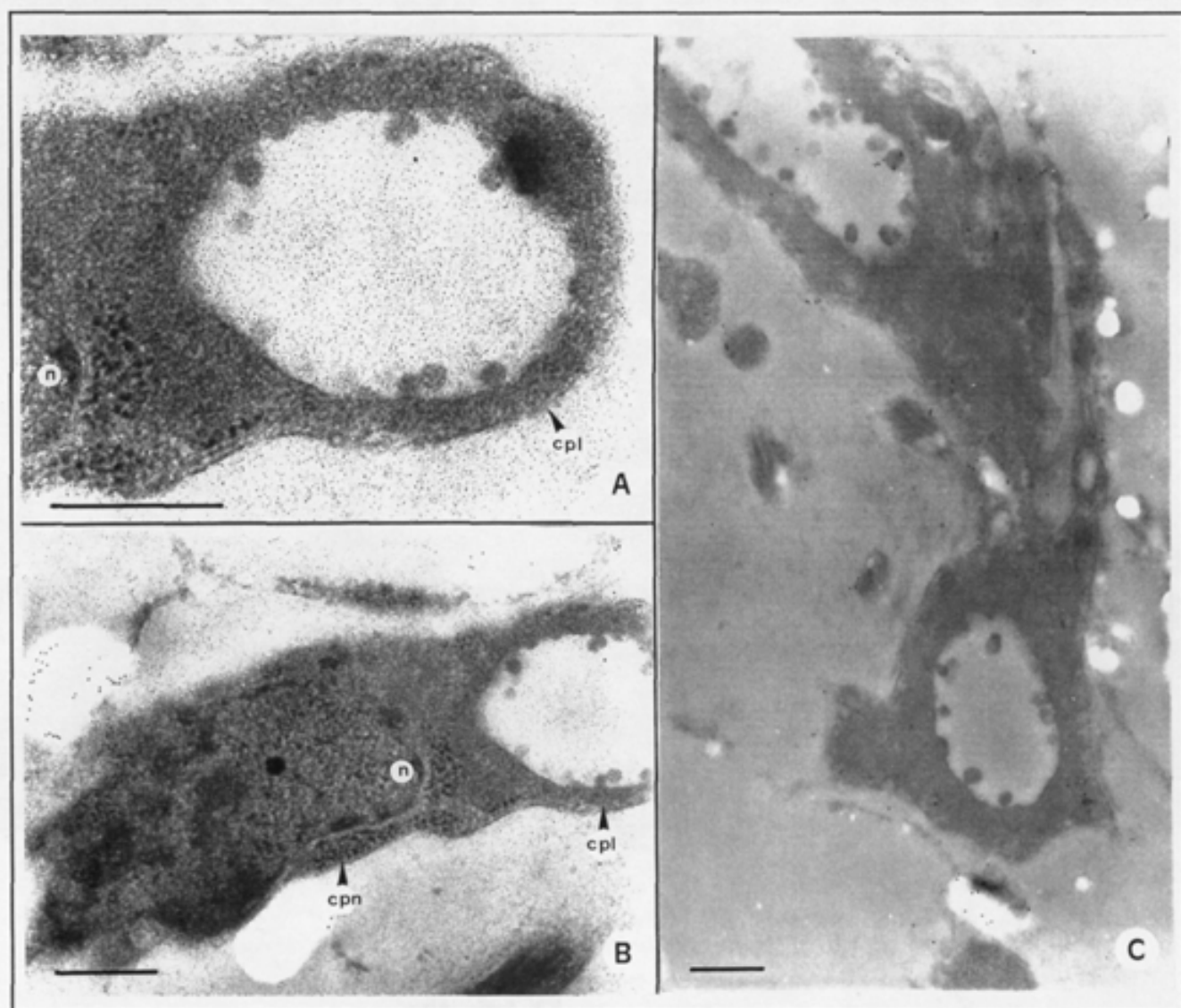


Figura 62. Ultraestructura de los túbulos colectores. A y B: célula tubular, n: núcleo, cpl: citoplasma perinuclear y cpt: citoplasma peritubular. C: parénquima parasitario con estructuras tubulares de diferente diámetro. Barra: 0,5μm.

Las células que forman los conductos excretores están estructuradas de una forma muy similar a la del tegumento, pudiéndose distinguir una región periluminal en sincitio y una distal o perinuclear que engloba el núcleo celular (Fig 62).

Los túbulos excretores se observan como canales intracelulares delimitados por el citoplasma periluminal de las células de los conductos excretores, las cuales organizadas en sincitio dan lugar a la pared tubular. La pared de los túbulos presenta en su superficie luminal numerosas expansiones o microvellosidades, y en su superficie externa numerosas prolongaciones citoplasmáticas que se adentran en el espacio intersticial.

CORPUSCULOS CALCÁREOS.

Los corpúsculos calcáreos se observan, dispersos en el parénquima parasitario, como unas estructuras ovoides incluidas en el citoplasma de células diferenciadas.

A nivel ultraestructural, se aprecia como una fina lámina citoplasmática envuelve la matriz de cada uno de los corpúsculos calcáreos, y como una membrana citoplasmática rodea el conjunto y delimita un espacio celular en el que también puede apreciarse la presencia de un núcleo celular.

La matriz de los corpúsculos calcáreos se encuentran típicamente organizados en múltiples líneas concéntricas de un material amorfo electrodenso (Fig 57).

El núcleo celular es único, y se encuentra desplazado hacia la periferia por la matriz del corpúsculo calcáreo (Fig 56 B2).

INMUNOLocalIZACION DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS POR MICROSCOPIA OPTICA

Mediante la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica se ha podido localizar a nivel estructural la ubicación del Ag 5 y del Ag B en protoscólex y membranas quísticas de *E. granulosus* de procedencia humana.

Las preparaciones histológicas empleadas como antígeno particulado han sido obtenidas y procesadas tal y como se ha descrito previamente en el apartado de material y métodos.

Los antisueros mono y poliespecíficos empleados en la inmunolocalización han requerido de una titulación previa que ha permitido escoger aquella combinación de diluciones óptima, con la que se consigue un mayor contraste entre las zonas positivas específicas y la coloración de fondo.

TITULACION DE LOS ANTISUEROS

En la inmunolocalización se emplean como primer anticuerpo los antisueros monoespecíficos anti-Ag 5 (Anti-5) y anti-Ag B (Anti-B), y el antisuero poliespecífico anti antígenos parasitarios mayoritarios (Anti-AgP). La reacción antígeno anticuerpo se revela con conjugados comerciales anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa o con biotina, según se emplee el protocolo de la peroxidasa indirecta o el de avidina-biotina-peroxidasa (ver material y métodos).

La titulación de los antisueros se realiza en función de los resultados obtenidos en un "tablero de titulación", en el que se valora, para las diferentes combinaciones de antisueros, la tinción considerada específica (reactividad localizada solo en determinadas estructuras) y la coloración de fondo.

Cuando se emplean concentraciones suficientemente altas de los anticuerpos primarios, tanto el método de la inmunoperoxidasa indirecta como el de la avidina-biotina, se han demostrado útiles para la inmunolocalización de los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* en cortes histológicos de protoscolex y vesículas proliferas de procedencia humana previamente fijados en formol e incluidos en parafina.

Aunque la reactividad observada con el método de la inmunoperoxidasa indirecta es suficientemente evidente, el empleo del método de avidina-biotina-peroxidasa incrementa notablemente la intensidad de tinción y permite el empleo de diluciones mas altas de los antisueros con lo que se reduce en gran manera la tinción inespecífica de fondo.

Debido a lo antes expuesto, y puesto que no se han podido observar diferencias significativas en cuanto a la localización estructural de la reactividad al emplear una u otra técnica de inmunolocalización, no se hará diferencia entre ambas, y se tratarán los resultados en conjunto refiriéndose exclusivamente a los obtenidos con la técnica de avidina-biotina-peroxidasa.

En la tabla XIII se exponen los resultados obtenidos en el "tablero de titulación" elaborado para la selección de las diluciones óptimas de los antisueros empleadas en el protocolo de la avidina-biotina-peroxidasa. En el eje de las abscisas se disponen las diferentes concentraciones de los tres antisueros primarios diluidos en tris-salino (TS) y en el de las ordenadas las concentraciones del antisuero biotinizado diluido en tris-salino-gelatina (TSG), en la intersección se valora la tinción específica y la coloración de fondo en una escala del 0 al +4.

	Conjugado biotinizado				
	1/200	1/400	1/600	1/800	
Anti-S 1/2	++++ +++	++++ +++	++++ ++	++++ ++	ESP FONDO
Anti-S 1/4	++++ ++	++++ ++	++++ +	+++ +	ESP FONDO
Anti-S 1/8	+++ +	+++ 0	++ 0	++ 0	ESP FONDO
Anti-S 1/16	++ +	++ 0	++ 0	- 0	ESP FONDO
Anti-B 1/200	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ +	ESP FONDO
Anti-B 1/400	+++ ++	+++ +	++ +	++ +	ESP FONDO
Anti-B 1/800	++ 0	++ 0	+ 0	+ 0	ESP FONDO
Anti-B 1/1600	+ 0	+ 0	+ 0	+ 0	ESP FONDO
Anti-AgP 1/200	++++ ++++	++++ ++++	++++ ++++	++++ ++++	ESP FONDO
Anti-AgP 1/400	++++ ++++	++++ ++++	++++ +++	++++ +++	ESP FONDO
Anti-AgP 1/800	++++ +++	++++ ++	++++ ++	++++ +	ESP FONDO
Anti-AgP 1/1600	++++ +	++++ +	++++ +	+++ +	ESP FONDO

Tabla XIII. Titulación de los antisueros empleados en la inmunolocalización por microscopía óptica técnica avidina-biotina. ESP: tinción específica. FONDO: coloración de fondo.

En función de los resultados que se exponen en la tabla XIII se escogen como óptimas las combinaciones de las diluciones que se encuentran recogidas en la tabla XIV.

Con el fin de simplificar la metodología, y puesto que los resultados lo permiten, se ha escogido como óptima una única dilución de conjugado biotinizado que se ha empleada con cualquiera de los tres antisueros primarios.

ANTISUEROS	dilución óptima
Antisuero anti-Ag 5 (purificado).....	1/8
Antisuero anti-Ag B.....	1/800
Antisuero anti antígenos parasitarios mayoritarios.....	1/1600
Conjugado biotinizado anti-Ig de conejo obtenido en cabra (ICN BIOMEDICALS).....	1/400

Tabla XIV. Diluciones empleadas en la inmunolocalización por microscopía óptica mediante la técnica de avidina-biotina.

LOCALIZACION INMUNOHISTOLOGICA

Los resultados de la inmunolocalización con los diferentes antisueros se encuentran resumidos en la tabla XV, aunque serán tratados a continuación por separado de una forma mas detallada.

El hecho de que en el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo se emplee como cromógeno la DAB (3,3' diaminobenzidina tetrahydrochloride), que es una molécula que se colorea de marrón y precipita al reaccionar con el complejo peroxidasa-H₂O₂,

supone el que una reacción positiva se observe como una mancha de color marrón intenso que destaca sobre el resto de estructuras teñidas en diversas tonalidades de azul por la hematoxilina de Harris empleada como contracolorante.

INMUNOLOCAIZACION DEL ANTIGENO 5

En las membranas quísticas de *E. granulosus*, el Ag 5 se observa localizado a nivel de la membrana germinativa de las vesículas hijas (Fig 63-A) y de las paredes de las vesículas prolíferas (Fig 63-B y 64), no observándose la presencia de reactividad a nivel de la membrana laminar (Fig 63-A).

Los acúmulos celulares asociados a la membrana germinativa (Fig 63-C y 63-D), así como el pedículo de unión entre ésta y los protoscólex (Fig 65-D) son intensamente reactivos frente al antisuero Anti-5.

No se aprecia la presencia del Ag 5 a nivel de los "detritus" que forman parte del contenido quístico (Fig 64), pero si se observa su presencia en las formas parasitarias morfológicamente alteradas y desestructuradas que se encuentran libres en el interior de las vesículas prolíferas (Fig 64-A y 64-B).

A nivel de los protoscólex, las estructuras reconocidas son esencialmente las mismas tanto en las formas evaginadas como en las invaginadas, siendo muy importante el marcaje del parénquima, y especialmente a nivel de la región del soma (Fig 65). No se detecta la presencia de Ag 5 ni en los corpúsculos calcáreos ni en los ganchos, ni se encuentra asociado a las estructuras musculares que dan lugar a la ventosas y anclan la corona de ganchos (Fig 64 y 65). Tampoco se observa la presencia del Ag 5 ni a nivel del tegumento ni a nivel del glicocalix que recubre a este (Fig 65).

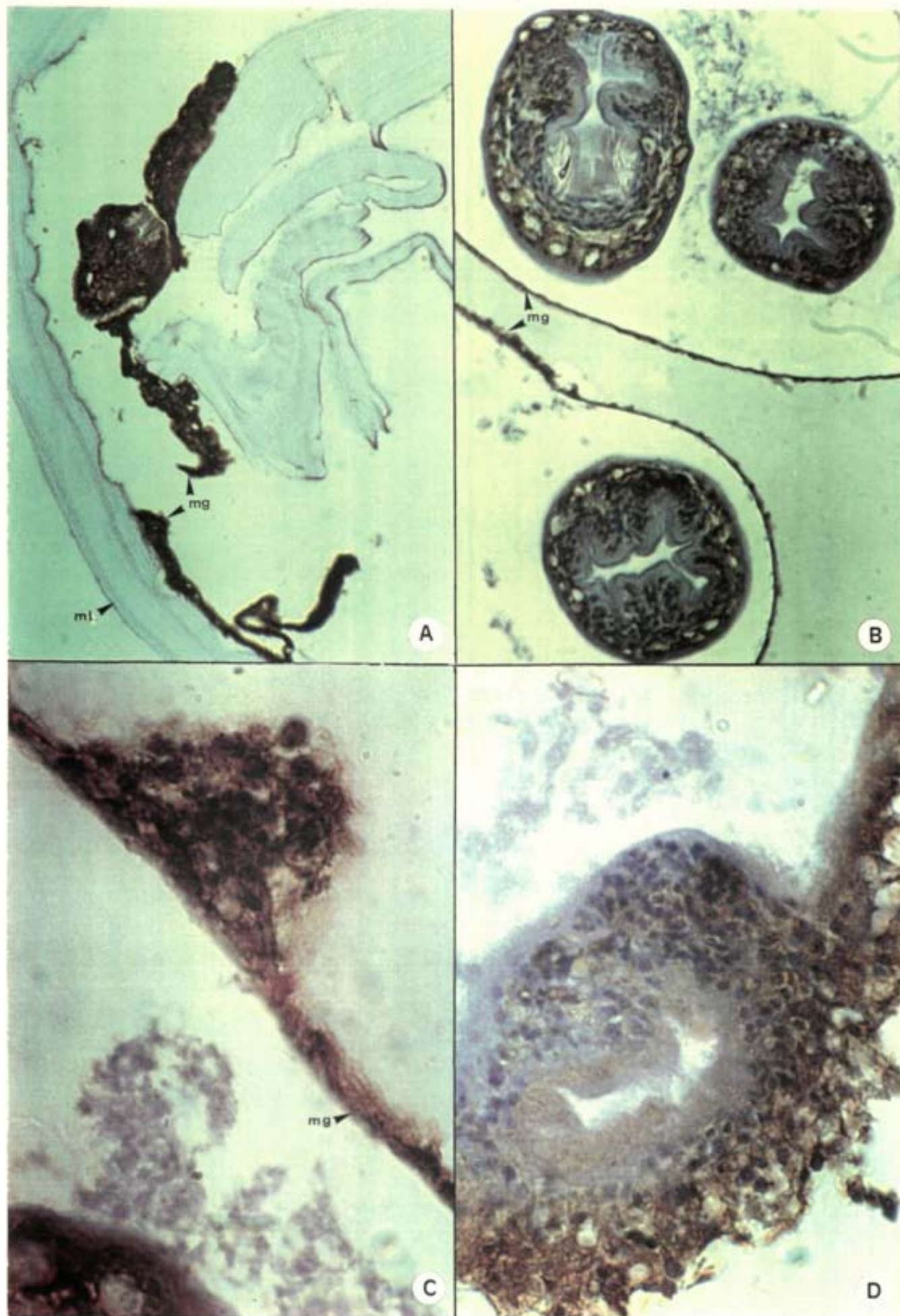


Figura 63. Localización inmunohistológica del Ag 5. A: vesícula hija, 200x. B: vesícula prolifera y protoscólex, 320x. C y D: acúmulos celulares en pared de vesícula prolifera, 1000x. ml: membrana laminar. mg : membrana germinativa.

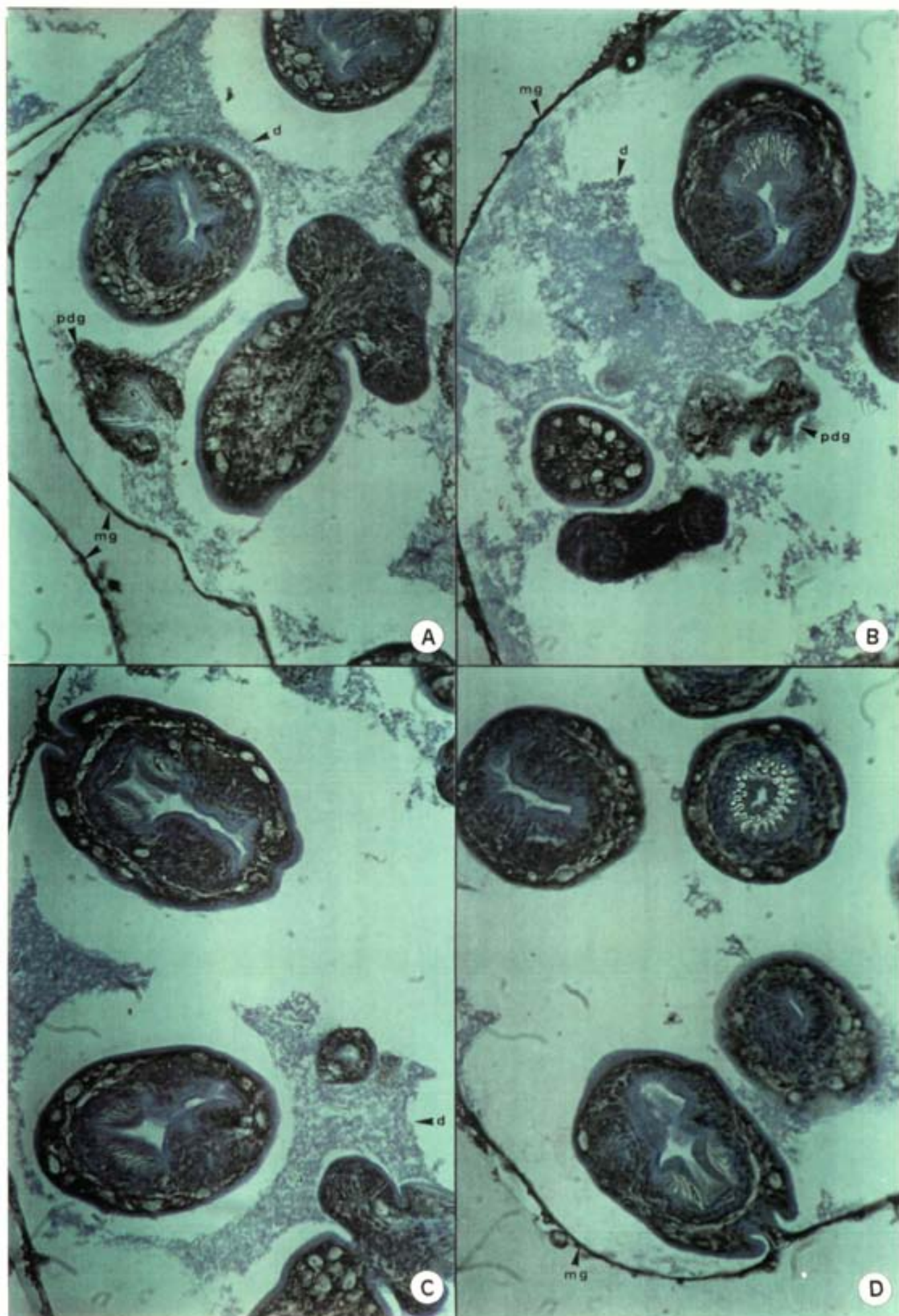


Figura 64. Localización inmuohistológica del Ag 5. A, B, C y D: vesículas proliferas y protozoólex, 320x. mg: membrana germinativa. pdg: protozoólex degenerados. d: detritus.

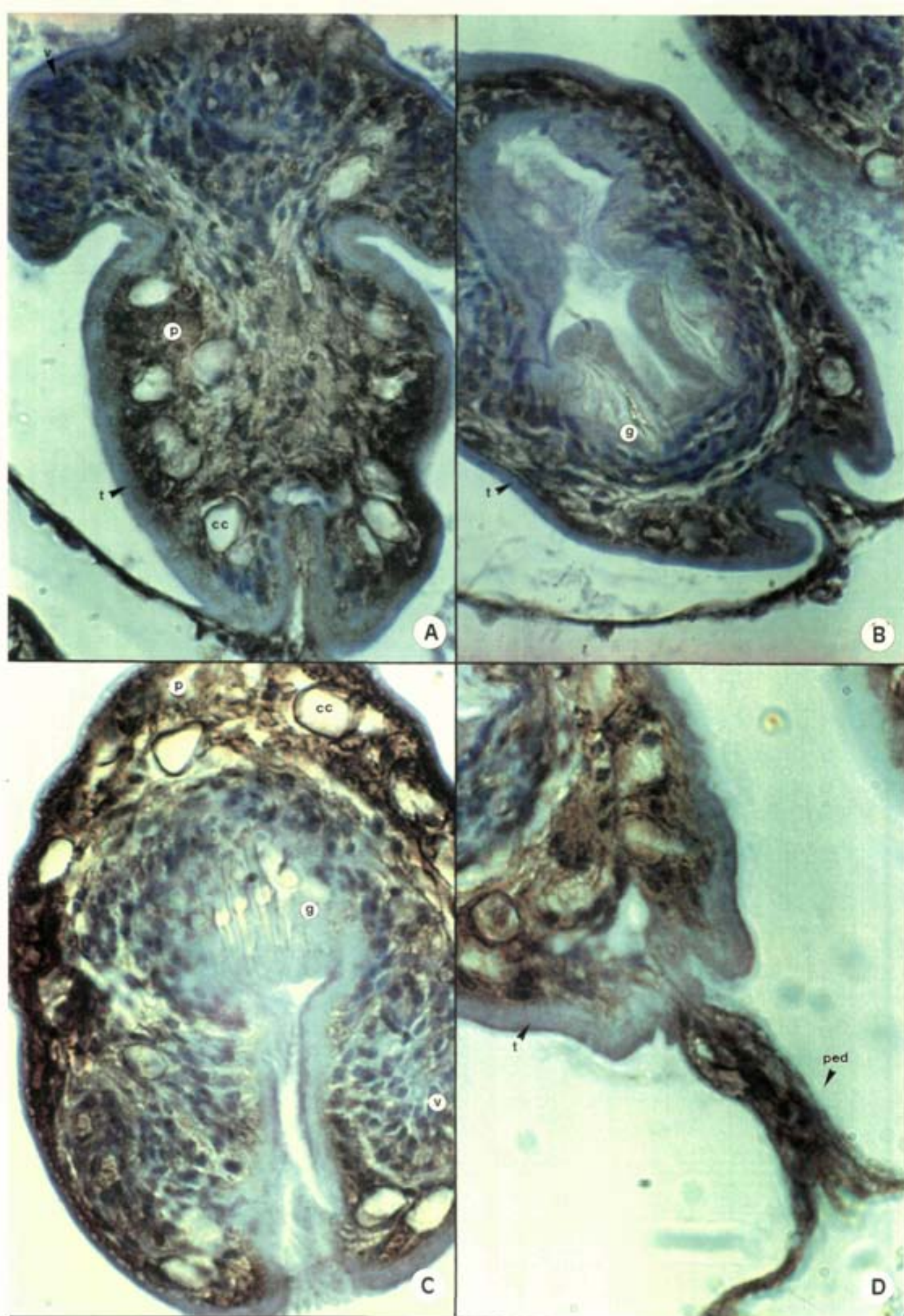


Figura 65. Localización inmunohistológica del Ag 5. A, B, C y D: protoscolex de *E. granulosus*, 1000x. t: tegumento. p: parénquima. g: ganchos. v: ventosas. cc: corpúsculos calcáreos. ped: pedículo.

INMUNOLOCALIZACION DEL ANTIGENO B

Al emplear en la inmunolocalización el antisuero monoespecífico Anti-B, se observa como a nivel de las membranas quísticas y de los protoscólex la localización del Ag B es esencialmente idéntica a la descrita para el Ag 5 (Fig 66).

La única diferencia notable es la falta de marcaje a nivel de los protoscólex degenerados (Fig 66-A y 66-B).

INMUNOLOCALIZACION CON EL ANTISUERO ANTI ANTIGENOS PARASITARIOS MAYORITARIOS

Cuando se emplea como primer anticuerpo un antisuero poliespecífico dirigido contra los antígenos parasitarios mayoritarios (Anti-AgP) obtenido por la inmunización con líquido hidatídico purificado y que reconoce simultáneamente el Ag 5 y el Ag B, se observa el marcaje de nuevas estructuras además de las que ya eran reconocidas por los dos antisueros monoespecíficos.

A nivel de la vesículas hijas el Anti-AgP reconoce además de la membrana germinativa, la membrana laminar, pudiendo observarse como las diferentes intensidades de marcaje dibujan perfectamente las laminaciones de esta (Fig 67A).

Los "detritus" presentes en el contenido de las vesículas prolíferas son también intensamente marcados (Fig 67-B), al igual que ya lo eran los protoscólex degenerados.

A nivel de los protoscólex, la mayor intensidad de marcaje se encuentra también localizada a nivel del parénquima, pero se observa un refuerzo de este en la periferia de los corpúsculos calcáreos (Fig 67-C y 67-D). No son reconocidas las estructuras musculares, ni los ganchos, ni el tegumento, aunque se observa un marcaje importante situado en la periferia de este que coincidiría en su disposición con la del glicocalix (Fig 67-D).