

**UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE BARCELONA**

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

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

Tesis que para optar al Grado de Doctor presenta

Fernando Sánchez Reus

Bajo la dirección de

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

Barcelona, Marzo de 1992

LOCALIZACION INMUNOHISTOLOGICA DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS

La obtención y posterior procesamiento de vesículas proliferas y membranas quísticas de procedencia humana, permitió disponer de preparaciones histológicas útiles para ser empleadas como antígenos particulados sobre los que localizar, a nivel estructural y ultraestructural, las fracciones antigénicas mayoritarias de *E. granulosus* (Ag 5 y Ag B).

Para la inmunolocalización se emplearon los antisueros mono y poliespecíficos obtenidos previamente por inmunización de animales de experimentación.

Previamente a la inmunolocalización se precisaron estudios morfológicos que permitiesen conocer, a nivel estructural y ultraestructural, las diferentes estructuras presentes en las formas larvarias de *E. granulosus*.

ESTRUCTURA DE *E. granulosus* POR MICROSCOPIA OPTICA

La observación microscópica de los cortes histológicos que se han obtenido a partir de quistes hidatídicos hepáticos previamente fijados en formol e incluidos en parafina permite, tras un proceso de desparafinización, rehidratación y tinción, la observación morfológica y el estudio estructural de la fase larvaria del parásito.

A pequeños aumentos, el metacestodo, se observa formado por una cavidad quística incluida dentro del parénquima hepático, rodeada por tejido fibroso, y que contiene en su interior, abundantes "detritus" y protoscólex libres, a la vez que numerosas formaciones quísticas menores con gran número de protoscólex.

Trataremos separadamente las observaciones referentes a : la estructura del quiste hidatídico madre, la reacción desencadenada en los tejidos del hospedador, la estructura de las vesículas prolíferas y por último la estructura de los protoscólex.

ESTRUCTURA DEL QUISTE HIDATIDICO

El quiste hidatídico se observa formado por una fina membrana interna (membrana germinativa) que se observa rodeada de una membrana mas externa dispuesta en capas concéntricas (membrana laminar).

Aquellas tinciones especialmente aptas para destacar la cromatina nuclear, como son la tinción de hematoxilina-eosina y la tinción de May-Grünwald-Giemsa, revelan la presencia de numerosos núcleos asociados a la membrana germinativa, y confirman, por otro lado, la naturaleza anhista de la membrana laminar.

El empleo de tinciones tricrómicas, como el tricrómico de Masson, y la tinción de Papanicolaou, permiten distinguir a nivel de la membrana laminar la aposición de múltiples capas concéntricas con diferentes características tintoriales (Fig 41).

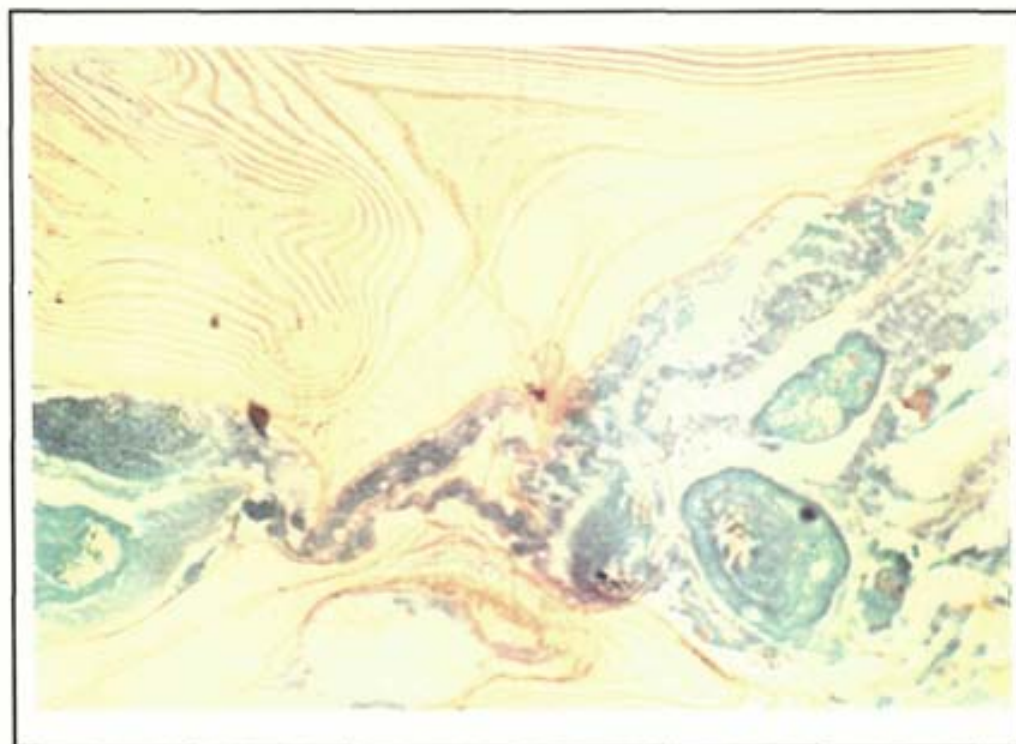


Figura 41. Estructuración de la membrana laminar en capas concéntricas. Tinción de Papanicolaou. 320 x.

La tinción del ácido periódico-Schiff, revela la presencia de material PAS positivo tanto a nivel de la membrana laminar como a nivel de la germinal. La reacción PAS positiva a nivel de la membrana laminar es muy intensa, no se ve afectada por la digestión con diastasa y es también teñida por el azul alcian, mientras que la reactividad a nivel de la membrana germinativa es mas irregular y se vuelve prácticamente inaparente tras el proceso de digestión con diastasa.

Mientras que el grosor de la membrana germinal es muy constante quedando limitado al de una monocapa celular, el grosor de la membrana laminar es muy variable, soliendo incrementar paralelamente al incremento de volumen de los quistes observados.

REACCION DE LOS TEJIDOS DEL HOSPEDADOR

El aspecto histológico que presenta el tejido hepático que engloba la formación quística es muy variable, pero se caracteriza por una alteración del lobulillo hepático y la presencia de una marcada reacción inflamatoria de tipo crónico, no exudativa, con infiltración mononuclear y eosinófila, y con importante respuesta proliferativa fibroblástica que rodea completamente al metacestodo (Fig 42).

El parénquima hepático alejado de la lesión se observa aparentemente sano y los lobulillos hepáticos bien estructurados, visualizándose claramente los sinusoides hepáticos delimitados por los hepatocitos dispuestos en placas radiales alrededor de una vena centrolobulillar.

En las áreas contiguas a la lesión quística se observa como el efecto masa del quiste hidatídico comprime y desplaza al parénquima hepático, perdiéndose la estructuración hexagonal de los lobulillos hepáticos y la disposición radial de los hepatocitos, que se observan dispuestos como masas desorganizadas que delimitan sinusoides irregulares incapaces de conectar un espacio porta con la vena centrolobulillar.

La reacción inflamatoria se evidencia como una área mas o menos gruesa con células linfomonocitarias, fibroblastos y abundante tejido conectivo, que envuelve completamente al parásito e intenta aislarlo del parénquima sano.

En la zona mas periférica de la reacción, se observa la presencia de numerosas células linfomonocitarias (macrofagos, linfocitos y células plasmáticas) asociadas a polimorfonucleares de tipo eosinófilo y fibroblastos. Conforme nos acercamos a la pared quística se aprecia una progresiva disminución de las células linfomonocitarias y un incremento de fibroblastos, para finalmente, y ya en íntimo contacto con la membrana laminar, observar una gruesa pared fibrosa en la que, mediante tinciones tricrómicas, se evidencia la presencia de una gran cantidad de fibras de colágeno.



Figura 42. Membrana adventicia o periquística. H: tejido hepático, RI: reacción linfomonocitaria, RF: reacción fibrosa. Tinción de Papanicolaou. 40x.

El grosor de la reacción fibrosa, o membrana adventicia, es muy variable, y esta en función del tamaño del quiste y presumiblemente de su antigüedad.

En algunas ocasiones se ha observado el depósito de sales de calcio a nivel de áreas limitadas de la membrana adventicia, aunque nunca se ha visto una calcificación completa de la misma.

ESTRUCTURA DE LAS VESICULAS PROLIFERAS

Las vesículas prolíferas se observan delimitadas por una fina membrana nucleada (membrana germinativa) que define una cavidad quística, en cuyo interior se observan numerosas estructuras parasitarias (protoscólex) y restos degenerados de estas.

La membrana germinativa se observa formada por una monocapa celular en la que no pueden diferenciarse espacios celulares delimitados.

Los núcleos se aprecian dispuestos en un estrato único y situados en el exterior de la formación quística. Tan solo en determinadas ocasiones se observan acumulos nucleares que, dispuestos en el exterior de la vesícula, parecen ser responsables del proceso de invaginación que se inicia a nivel de la pared de esta (Fig 43).

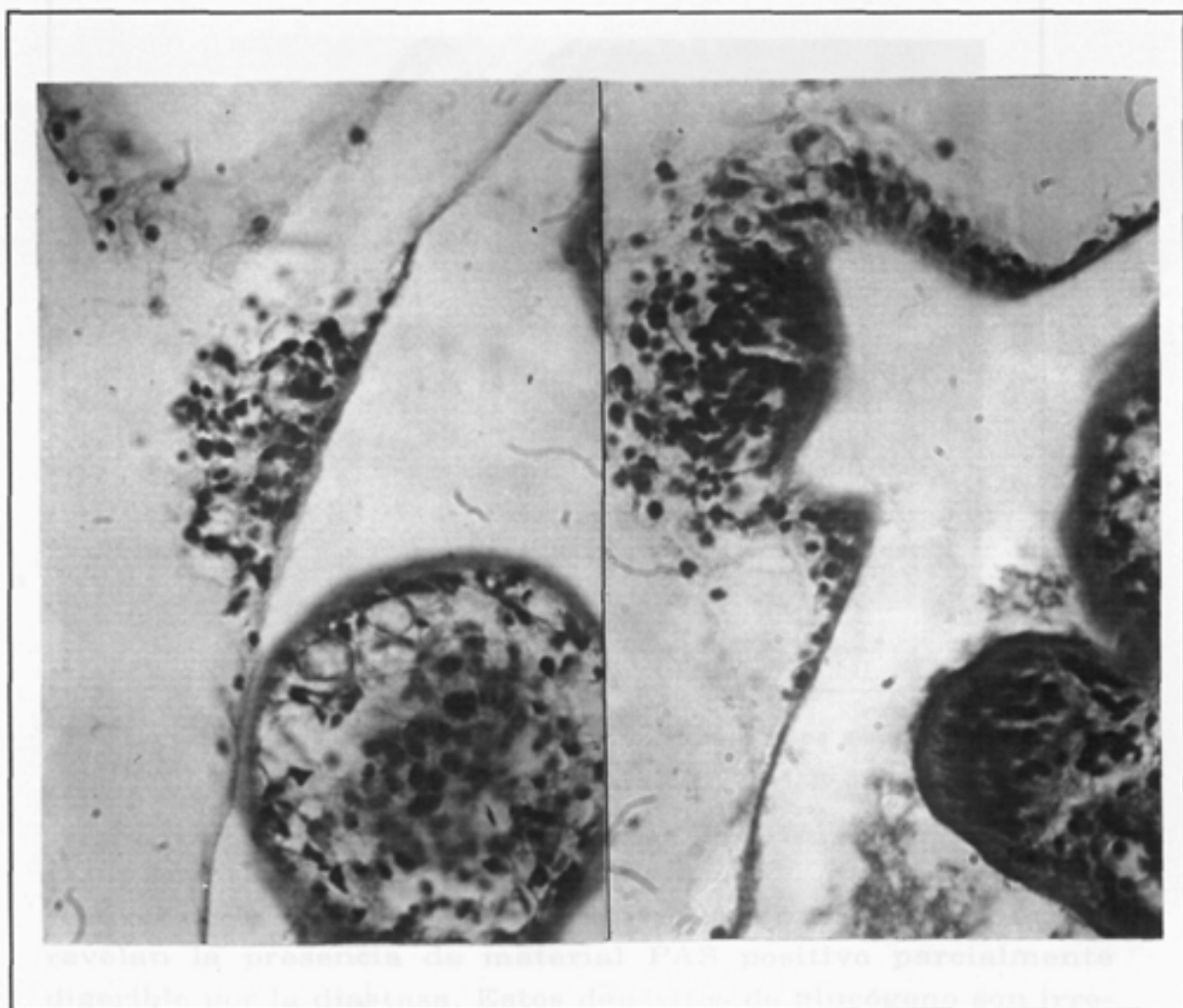


Figura 43. Acumulos celulares en el exterior de las vesículas proliferas. Tinción de hematoxilina eosina. 800 x.

La linealidad de la membrana germinativa se ve interrumpida en los puntos de unión con los protoscólex (Fig 44). A este nivel se observa una mayor proporción de núcleos y la proyección, a modo de pedículo, de la membrana germinativa, la cual va a continuarse con el tegumento del polo posterior de los protoscólex sin que pueda observarse solución de continuidad alguna.

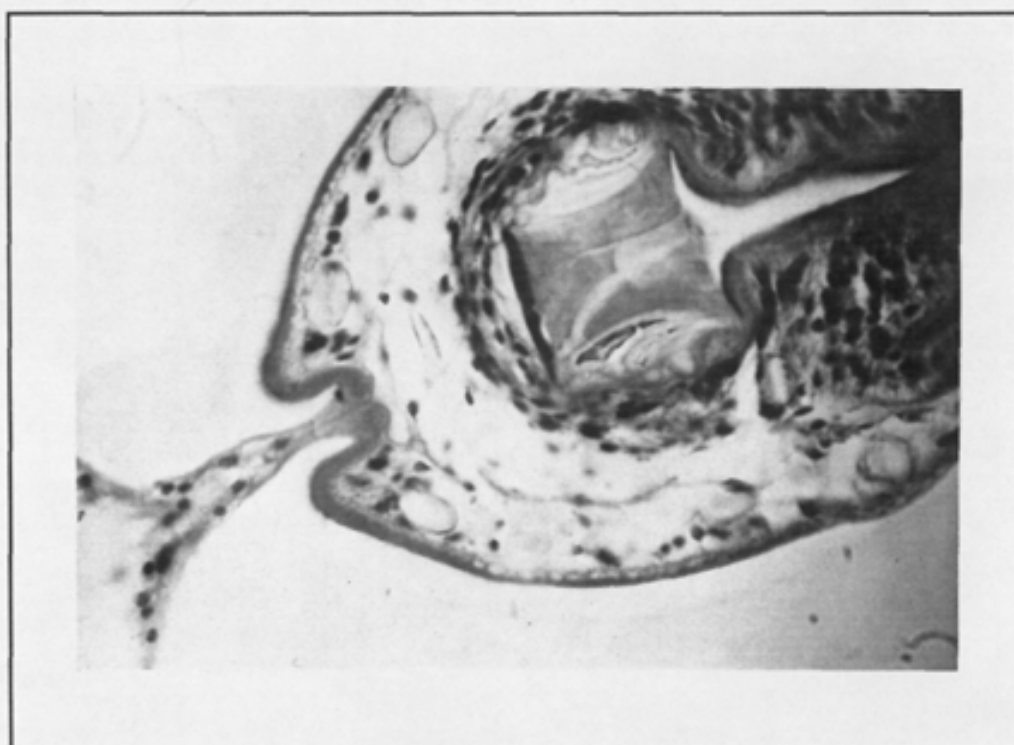


Figura 44. Pedículo de unión entre protoscólex membrana germinativa. Tinción de hematoxilina eosina. 800x.

A nivel de la membrana germinativa, las tinciones de glúcidos revelan la presencia de material PAS positivo parcialmente digerible por la diastasa. Estos depósitos de glucógeno son irregulares y presentan un tamaño y una disposición muy variable, aunque suelen concentrarse en aquellas áreas con mayor densidad de núcleos (Fig 49-B).

En el interior de las vesículas prolíferas se observa gran cantidad de protoscólex viables (cuya estructura será tratada a continuación), protoscólex degenerados o necróticos y numerosos "detritus".

Los protoscólex degenerados se observan como "sombras" de los parásitos en las que pueden reconocerse la presencia de algunos ganchos y el acúmulo de numerosos núcleos picnóticos (Fig 45). Tanto los protoscólex degenerados como los "detritus" poseen características tintoriales PAS positivas (Fig 49-B), son teñidos por el azul alcian (Fig 49-D) y no pierden la PAS positividad tras el proceso de digestión con diastasa (Fig 49-C).

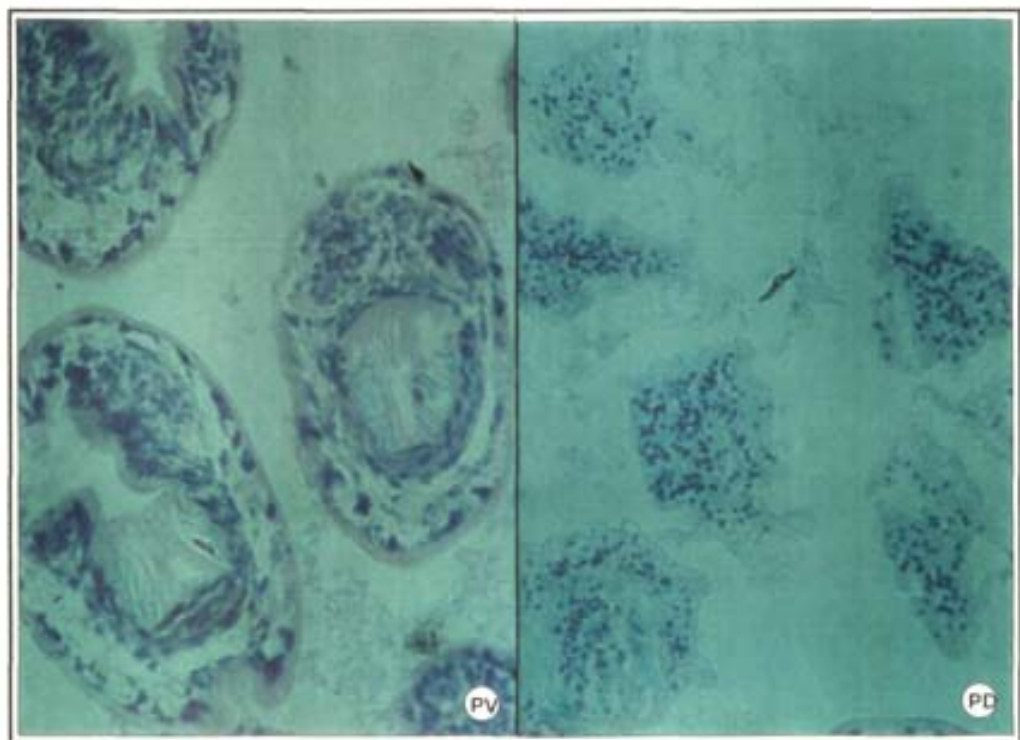


Figura 45. PV: protoscólex viable. PD: protoscólex degenerado. Tinción de May-Grünwald - Giemsa. 400x.

ESTRUCTURA DE LOS PROTOCOLEX

La morfología del protoscólex y su estructura general es bien conocida, pudiendo diferenciarse claramente dos regiones o zonas: la región del escólex que contiene la corona de ganchos y las ventosas, y la región del soma. Ambas regiones están delimitadas por el tegumento.

En el interior de las vesículas prolíferas, los protoscólex, se encuentran en su gran mayoría con la región del escólex

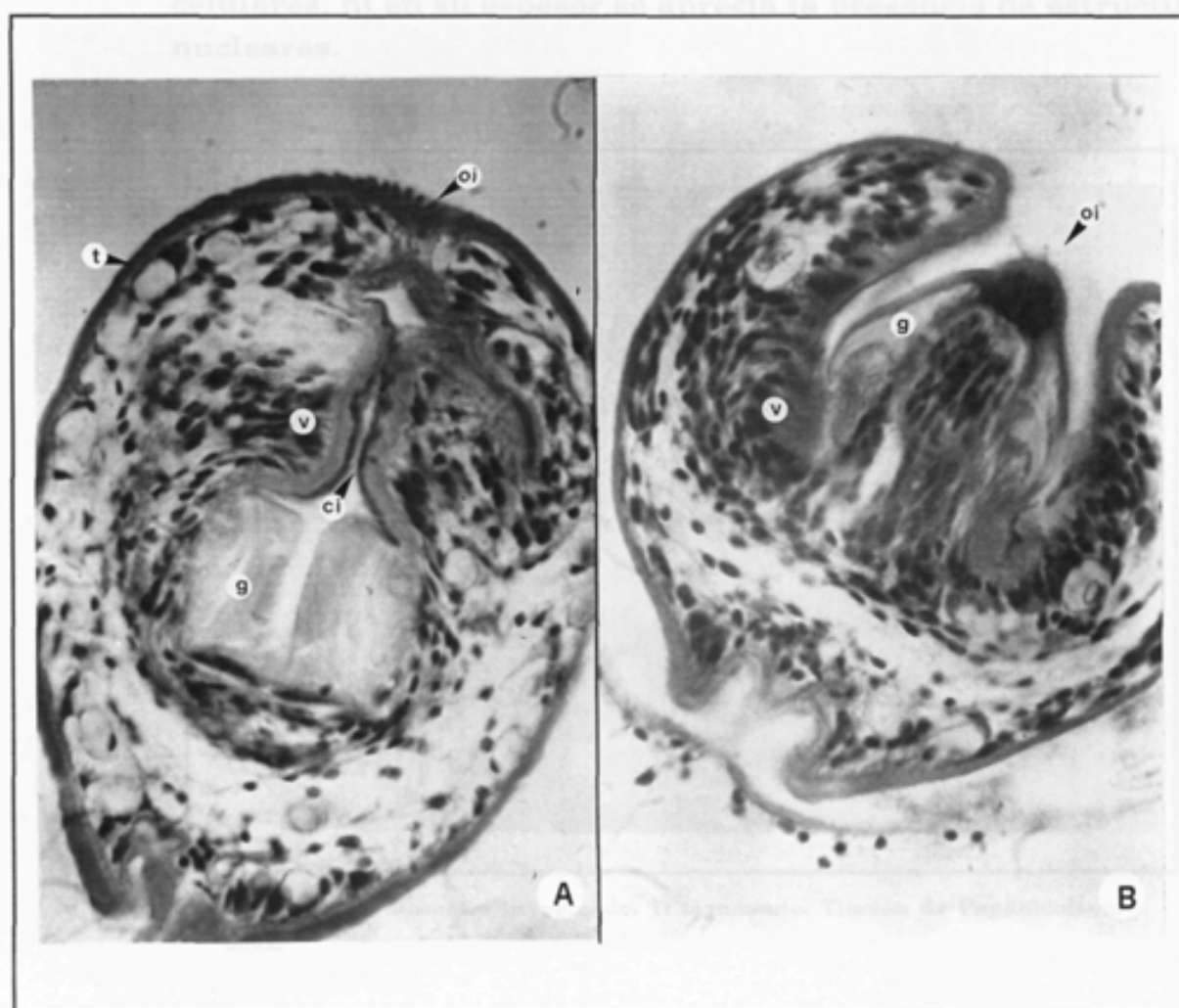


Figura 46. A: Protoscólex invaginado, B: protoscólex en fase de evaginación. oi: orificio de invaginación, ci: canal de invaginación, v: ventosas, g: ganchos, t: tegumento. Tinción de hematoxilina eosina. 800 x.

invaginada en el interior de la región del soma, la cual presenta en su extremo apical un orificio por el que, a modo de dedo de guante, se introduce la región del escólex, observándose en los cortes histológicos un canal de invaginación que acaba en la corona de ganchos y esta delimitado lateralmente por las ventosas (Fig 46).

El tegumento se presenta, a microscopia optica, como una capa de características tintoriales acidófilas, que delimita completamente al parásito. En ella no se pueden diferenciar espacios celulares, ni en su espesor se aprecia la presencia de estructuras nucleares.

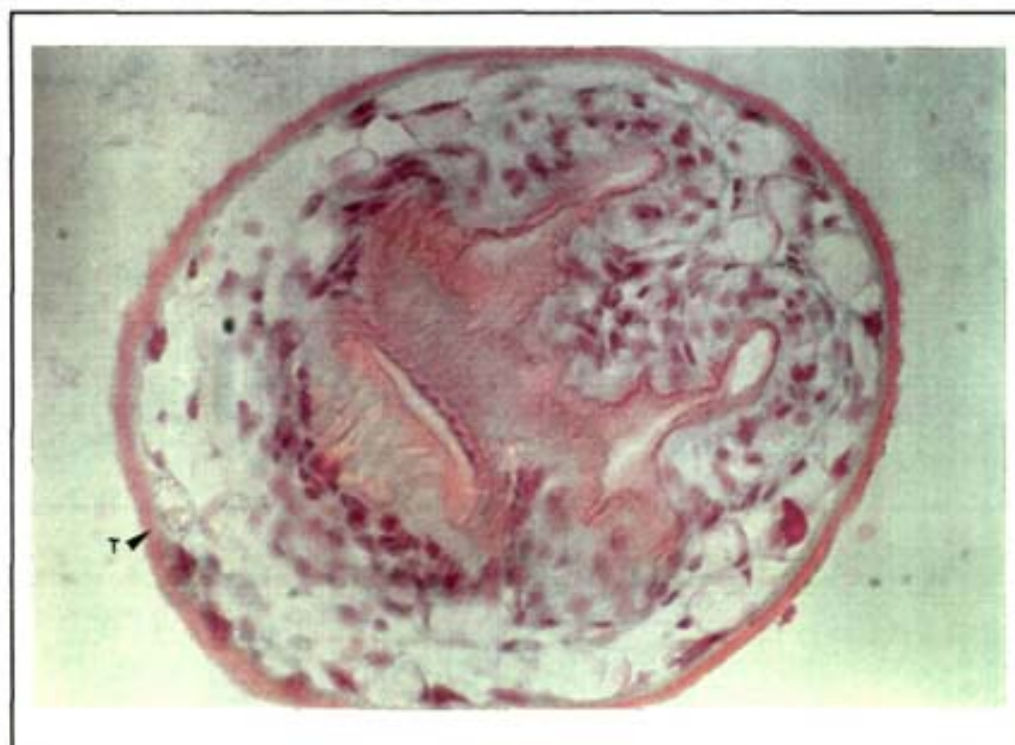


Figura 47. Protoscólex invaginado. T: tegumento. Tinción de Papanicolaou. 800x.

La superficie externa del tegumento presenta, tanto en la región del soma como en la del escólex en el caso de protoscólex

invaginados, unas características tintoriales particulares, que se observan a modo de fina cubierta PAS positiva (Fig 49-A y 49-B), que no se afecta por la digestión con diastasa (Fig 49-C), que se tiñe ligeramente con el azul alcian (Fig 49-D) y que retiene sales de plata cuando se efectúan tinciones argénticas para fibras de reticulina (Fig 48).

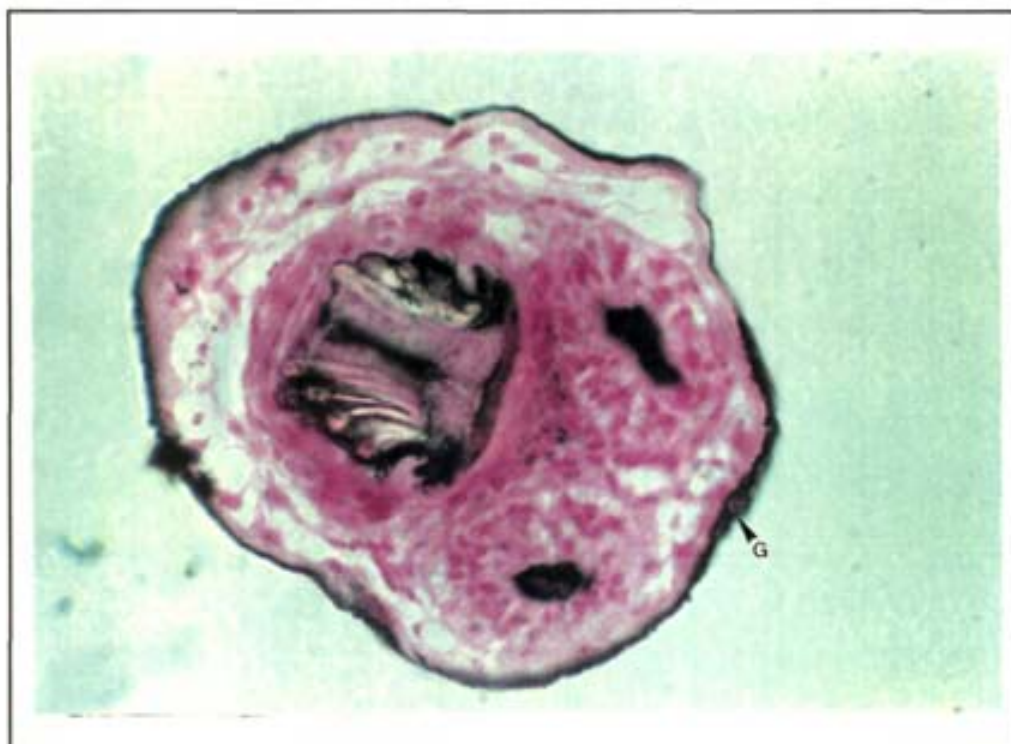


Figura 48. Protoscólex invaginado. G: glicocalix. Tinción argéntica para fibras de reticulina. 800x.

A nivel del parénquima de los protoscólex se observa una distribución irregular de los núcleos celulares (Fig 46), que se evidencian especialmente concentrados en la región del escólex, concretamente en la zona correspondiente a las ventosas y al área de implantación de la corona de ganchos. En la región del soma los núcleos están mucho más dispersos y esencialmente localizados en el área subtegumentaria.

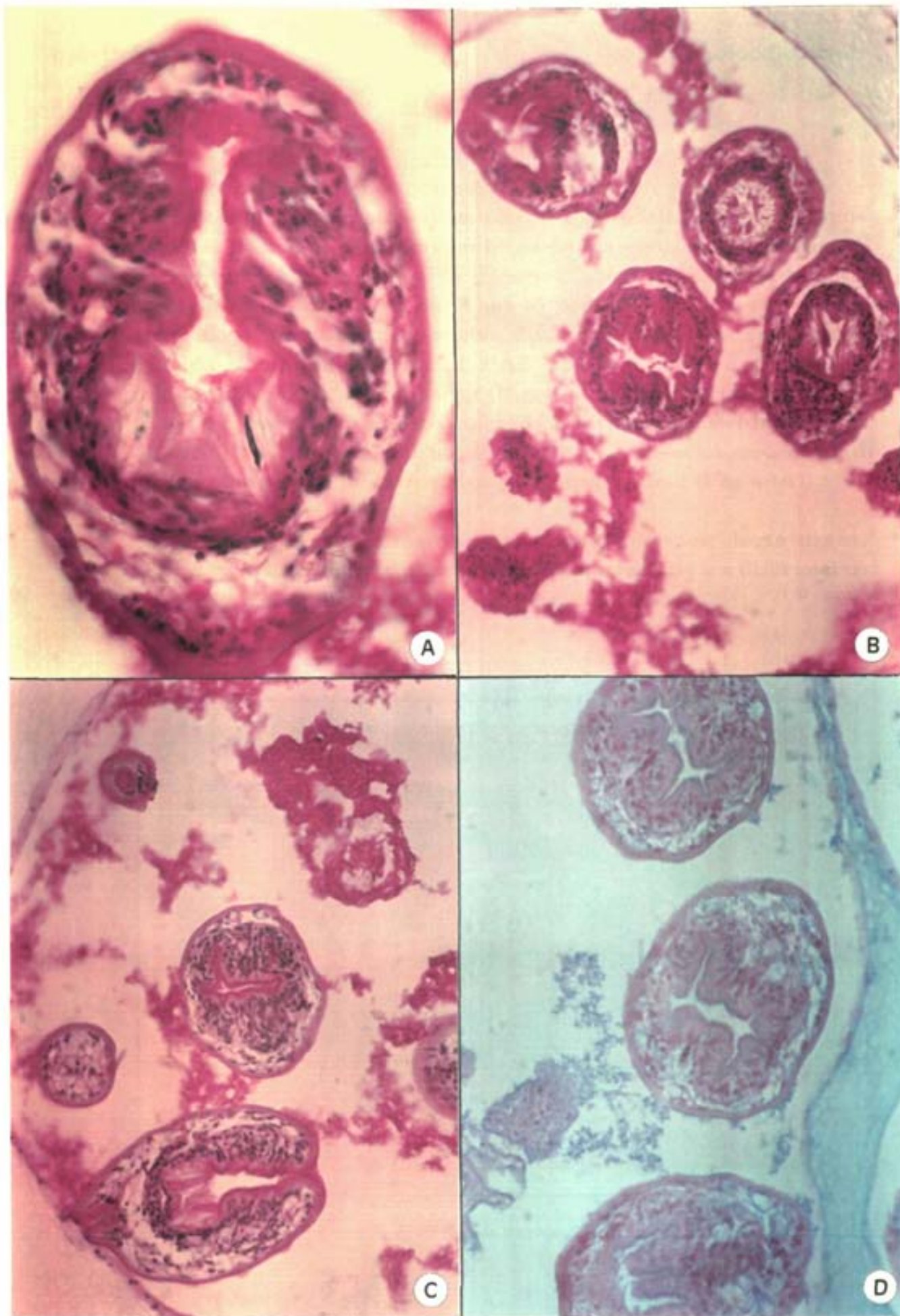


Figura 49. Tinciones de proteoglicanos. A y B: tinción del ácido periódico-Schiff (PAS), 1000x y 400x. C: tinción de PAS tras digestión con diastasa, 400x. D: tinción de azul alcian pH 2.5, 400x.

La tinción del ácido periódico-Schiff revela, en el parénquima de los protoscólex, depósitos de material PAS positivo especialmente asociados a las áreas musculares de las ventosas y el área de implantación de la corona de ganchos. También destaca la PAS positividad de las áreas cercanas al pedículo, la presencia irregular de acumulos PAS positivo dispersos por el parénquima y una fina capa de material PAS positivo que contornea el tegumento por su cara interna (Fig 49-A). El material PAS positivo del parénquima reduce marcadamente su reactividad tras la digestión con diastasa (Fig 49-C) y no se observa que el azul alcian tiña ninguna estructura parenquimatosa (Fig 49-D).

Los ganchos de los protoscólex presentan una morfología típica, y unas características tintoriales particulares que los diferencian del resto de estructuras parasitarias.

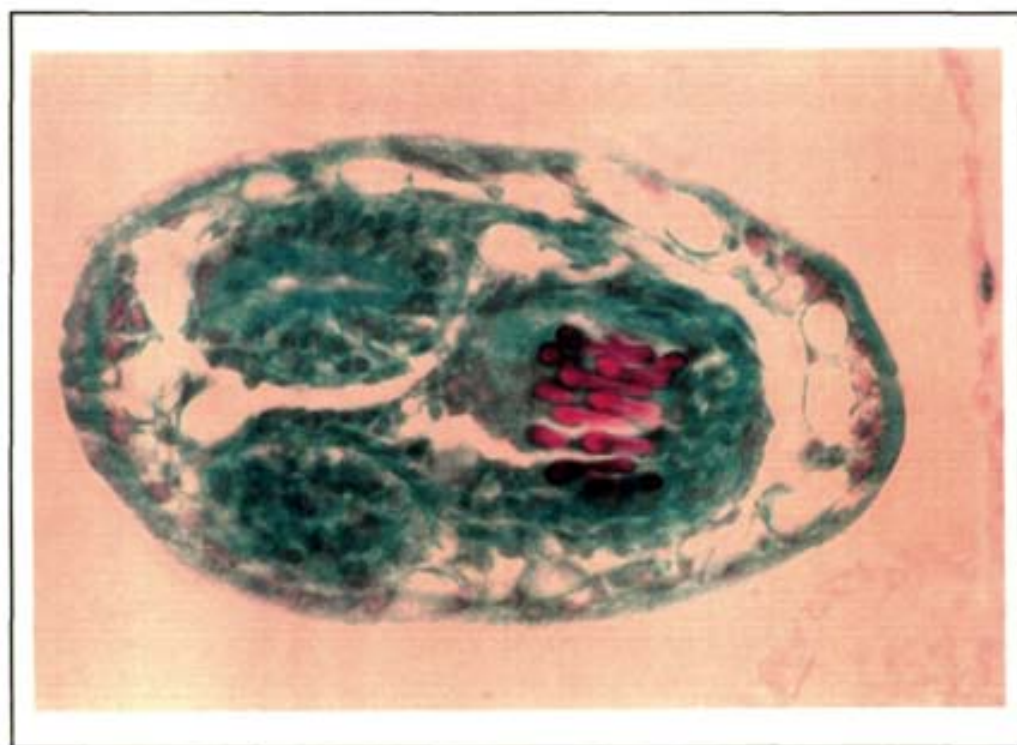


Figura 50. Protoscólex invaginado. Tinción de kinyoun. 800x.

Los ganchos, tras ser coloreados por la fucsina resisten a la decoloración con una solución de alcohol ácido (Fig 50) y además, tienen una gran capacidad para reducir las sales argénticas del reactivo de Gomori-Grocott (Fig 51).

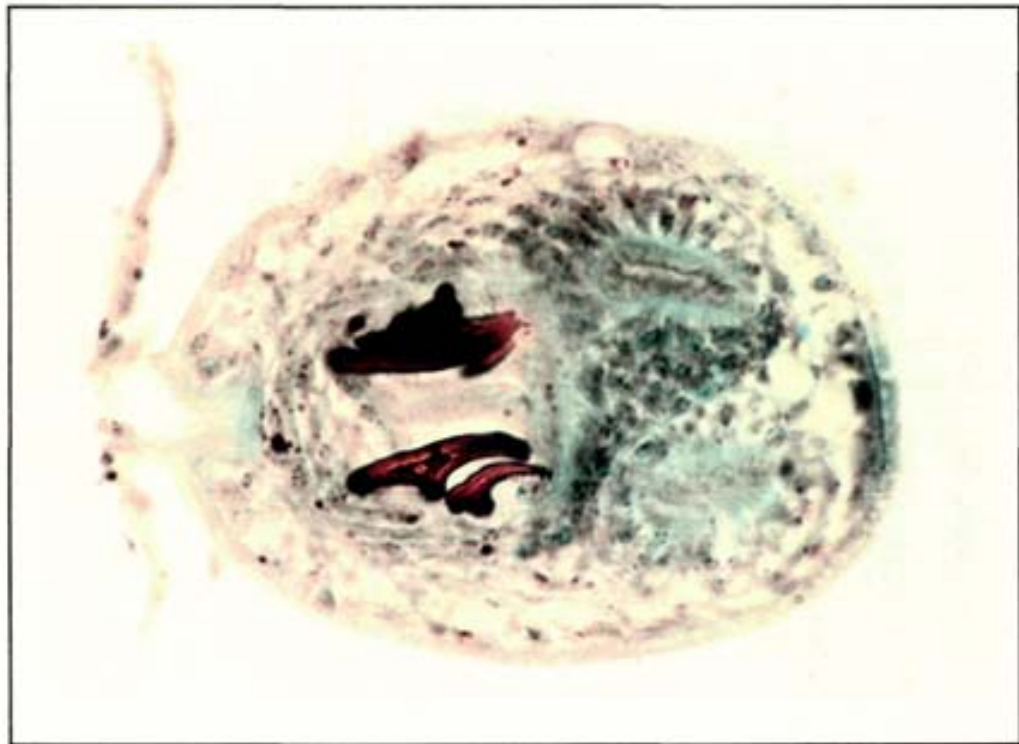


Figura 51. Protoscólex invaginado. Tinción argéntica de Gomori-Grocott, 800x.

ESTRUCTURA DE *E. granulosus* POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

La observación por microscopia electrónica de los cortes ultrafinos que se han obtenido a partir de vesículas prolíferas fértiles previamente fijadas en una solución de paraformaldehído y glutaraldehído e incluidos en Lowicryl® K4M permite, tras un contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo, la observación morfológica a nivel ultraestructural de los principales componentes presentes en las vesículas prolíferas y los protoscólex de *E. granulosus*.

ULTRAESTRUCTURA DE LAS VESICULAS PROLIFERAS

Las vesículas prolíferas se observan como una cavidad quística que contiene en su interior protoscólex y abundantes "detritus" y esta delimitada por una pared celular en sincitio (membrana germinativa), que se continua con el tegumento de los protoscólex a través de un pedículo que los une.

A nivel de la membrana germinativa se pueden distinguir claramente dos regiones, una germinativa y otra conectiva (Fig 52).

La región germinativa es un sincitio celular en el que se puede distinguir un citoplasma distal o también llamado sincitial, que sin separaciones celulares bordea toda la cavidad quística, y un citoplasma perinuclear que engloba a los núcleos celulares y esta intercomunicado con el citoplasma sincitial a través de unos puentes citoplasmáticos (Fig 52).

El citoplasma sincitial presenta numerosas prolongaciones citoplasmáticas digitiformes que se proyectan hacia la luz quística (microtriquias), y esta formado por una matriz homogénea que contiene gran abundancia de vesículas de varios tipos.

El citoplasma perinuclear se encuentra en el exterior de la cavidad quística y esta rodeado por la región conectiva, engloba al núcleo y en el pueden distinguirse algunas endomembranas.

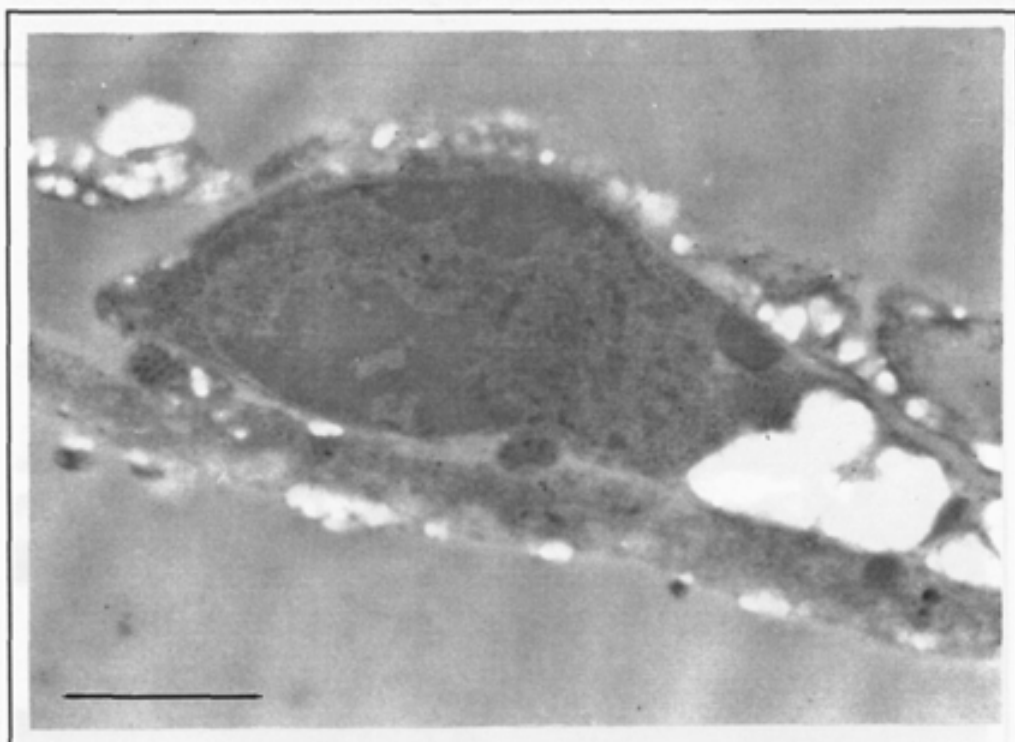


Figura 52 A. Ultraestructura de la membrana germinativa de una vesícula prolifera.
Barra: 1µm.

Figura 52 A. Ultraestructura de la membrana germinativa de una vesícula prolifera.
Barra: 1µm.

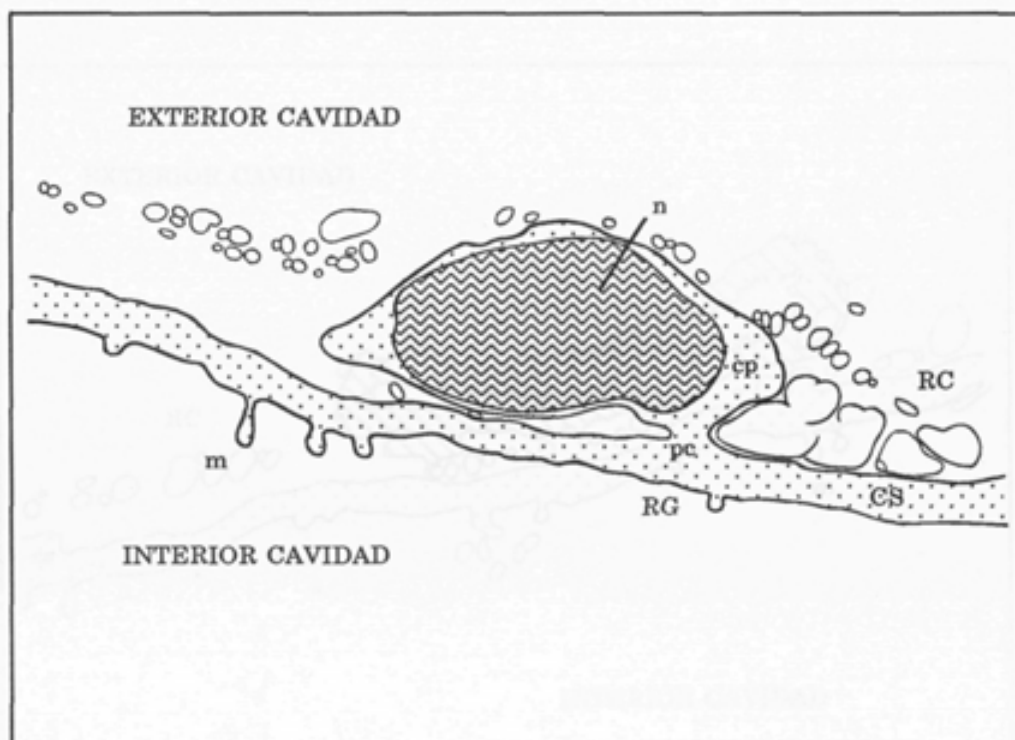


Figura 52 B. Representación esquemática de la figura 53 A. RG: Región germinativa, RC: región conectiva, CS: citoplasma sincitial, cp: citoplasma perinuclear, pc: puente citoplásmico, n: núcleo, m: microtriquias

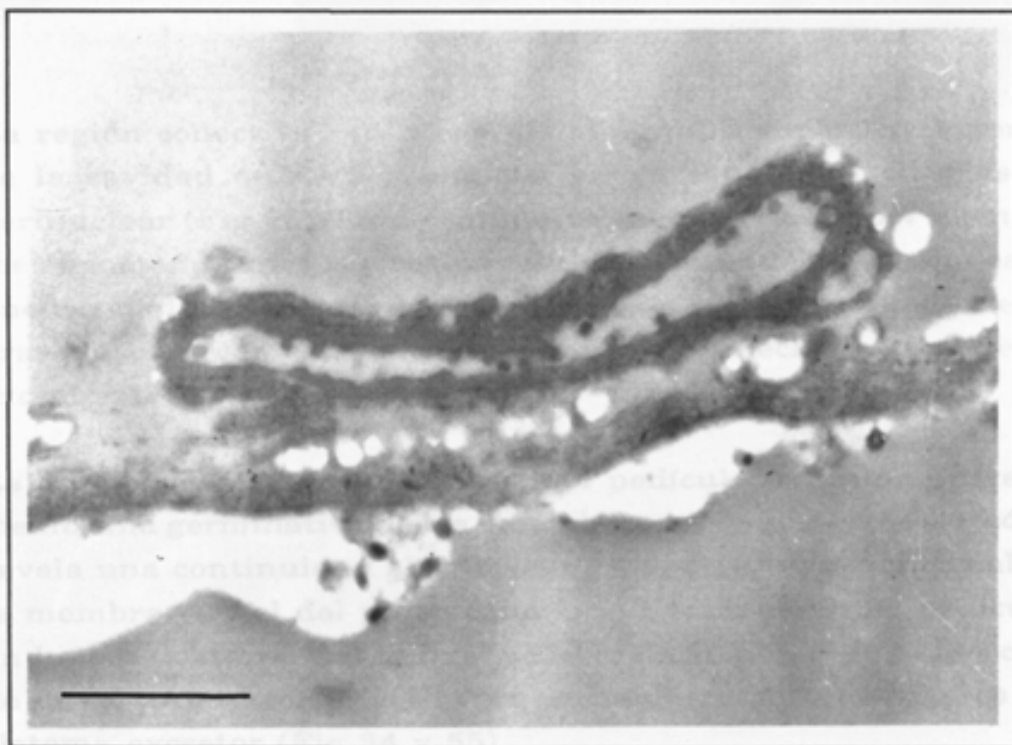


Figura 53 A. Ultraestructura de la membrana germinativa de una vesícula prolifera.
Barra: 1µm.

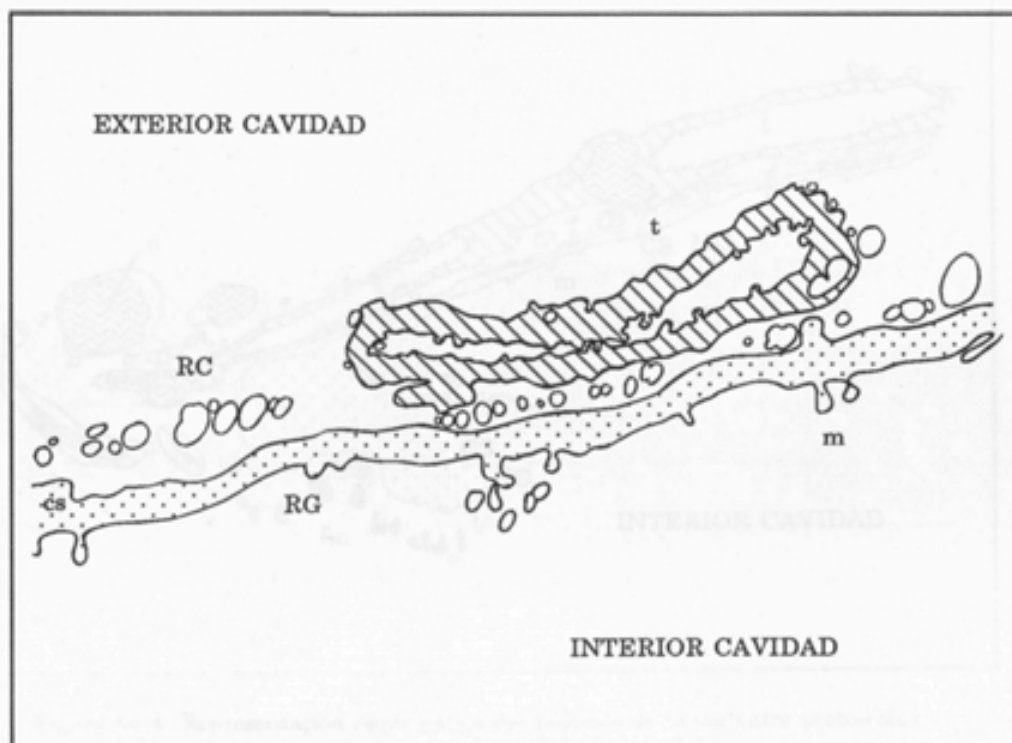


Figura 53 B. Representación esquemática de la figura 53 A. RG: región germinativa, RC: región conectiva, cs: citoplasma sincitial, m: microtriquias. t: túbulo.

La región conectiva rodea completamente la superficie externa de la cavidad quística y engloba en su espesor al citoplasma perinuclear (Fig 52). Esta compuesta esencialmente por elementos endomembranosos y restos celulares, aunque en ocasiones se pueden distinguir claramente en su espesor la presencia de fibras musculares y estructuras tubulares pertenecientes al sistema excretor (Fig 53).

La observación ultraestructural del pedículo de unión entre la membrana germinativa de las vesículas proliferas y los protoscólex revela una continuidad absoluta entre el citoplasma sincitial de la membrana y el del protoscólex (Fig 54). A nivel del pedículo, en la zona externa del quiste, se aprecia una mayor proporción de estructuras nucleares y la presencia de numerosos túbulos del sistema excretor (Fig 54 y 55).

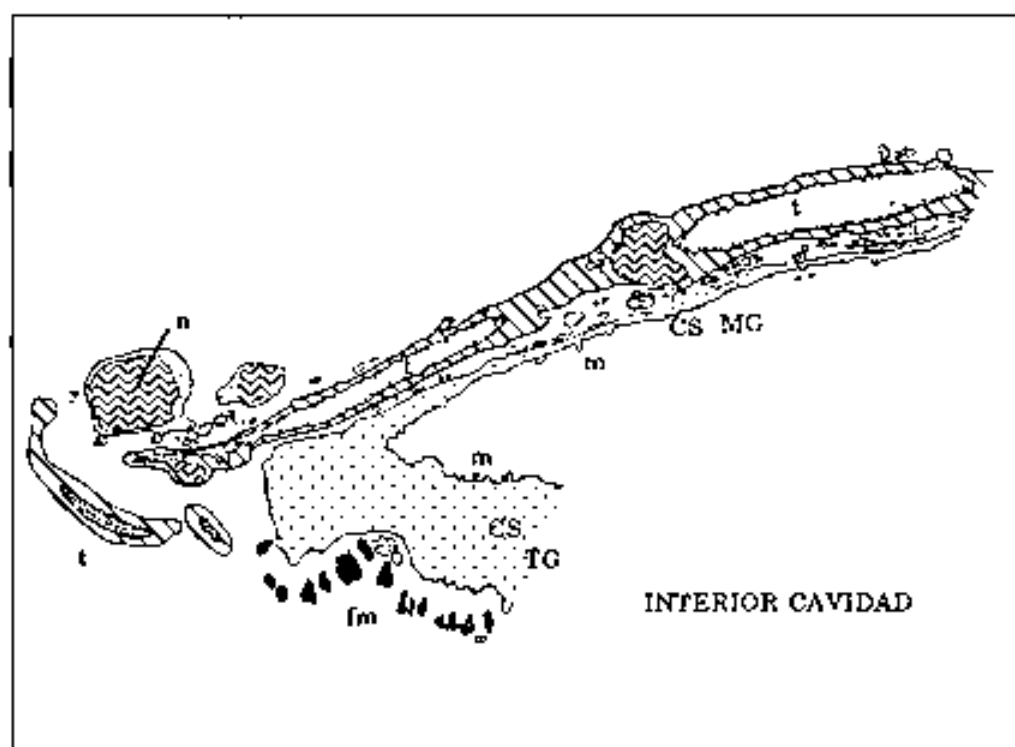


Figura 64 A. Representación esquemática del pedículo de unión entre protoscólex y vesícula proliferadora. MG: membrana germinativa, TG: tegumento, CS: citoplasma sincitial, n: núcleo, t: túbulo, m: microtriquias, fm: fibras musculares.

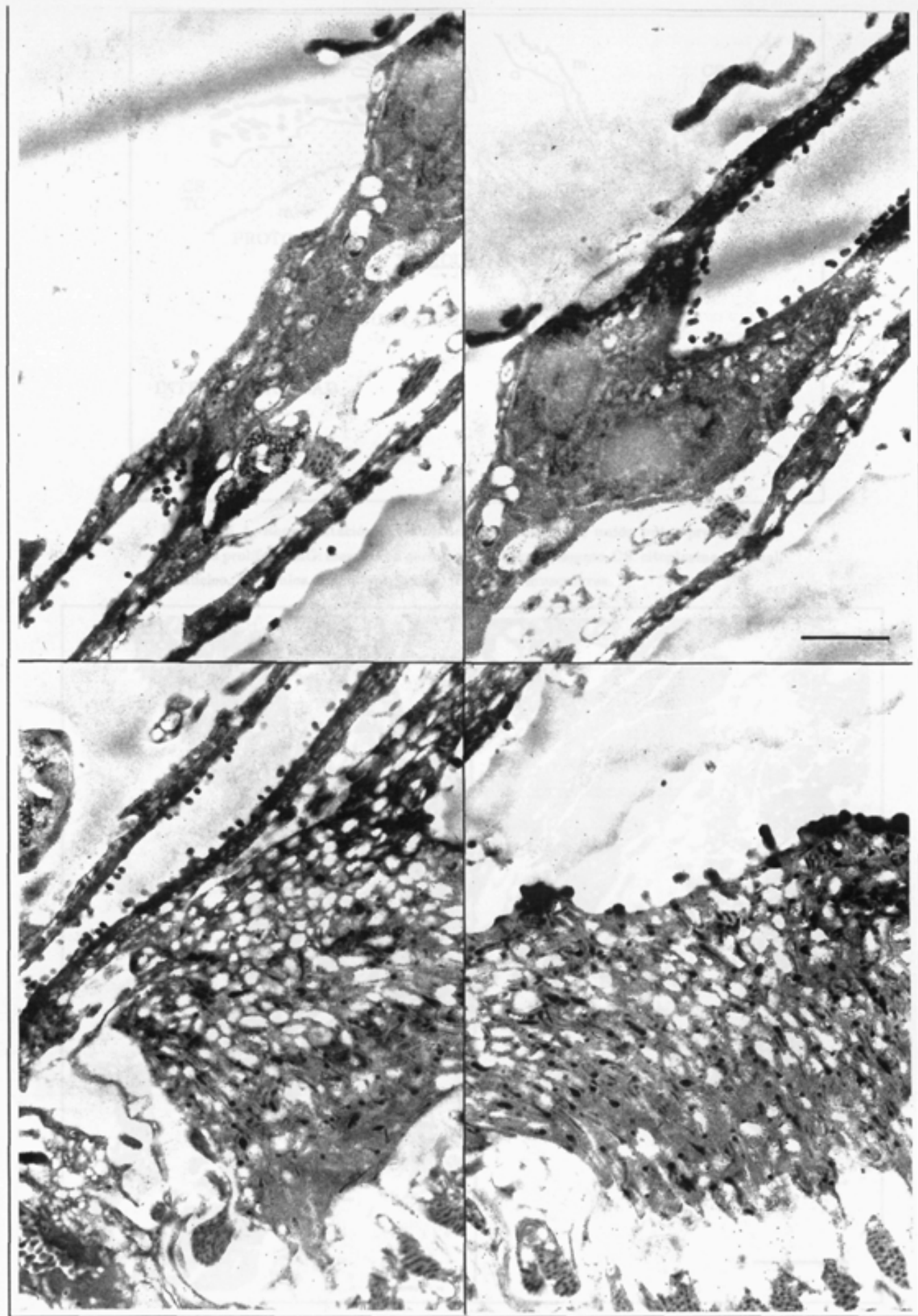


Figura 54 B. Ultraestructura del pedículo de unión entre protoscolex y vesículas prolíferas. Microfotografías correspondientes a porciones del esquema representado en la figura 54 A. Barra: 1 μ m.

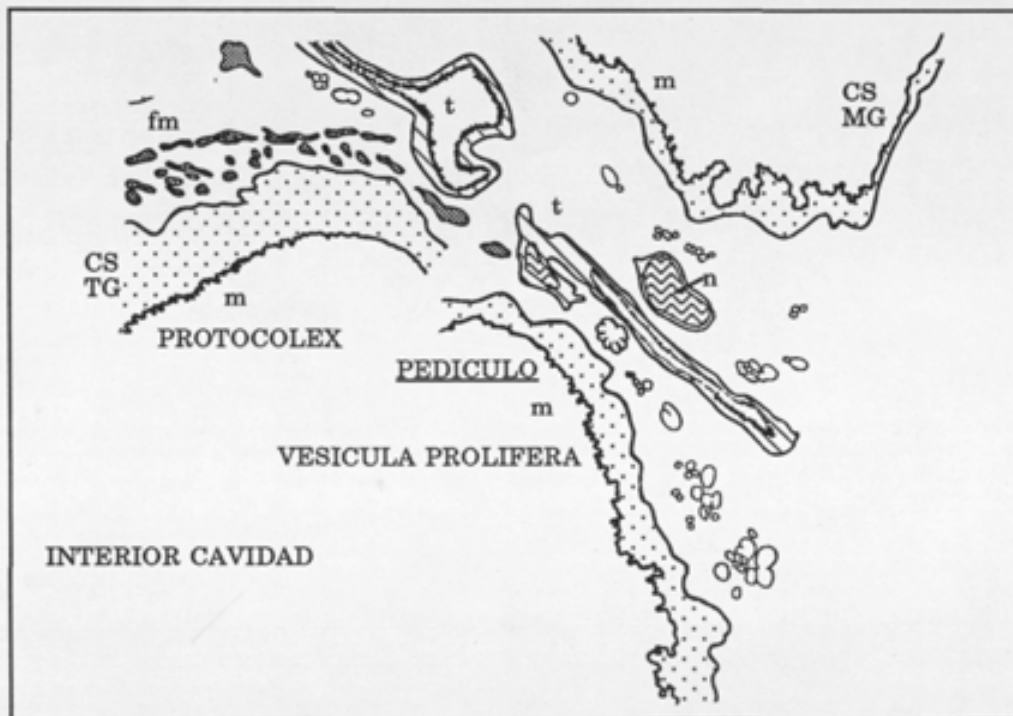


Figura 55 A. Representación esquemática del pedículo de unión entre protoscólex y vesícula prolifera. MG: membrana germinativa, TG: tegumento, CS: citoplasma sincitial, n: núcleo, t: túbulos, m: microtriquias, fm: fibras musculares.

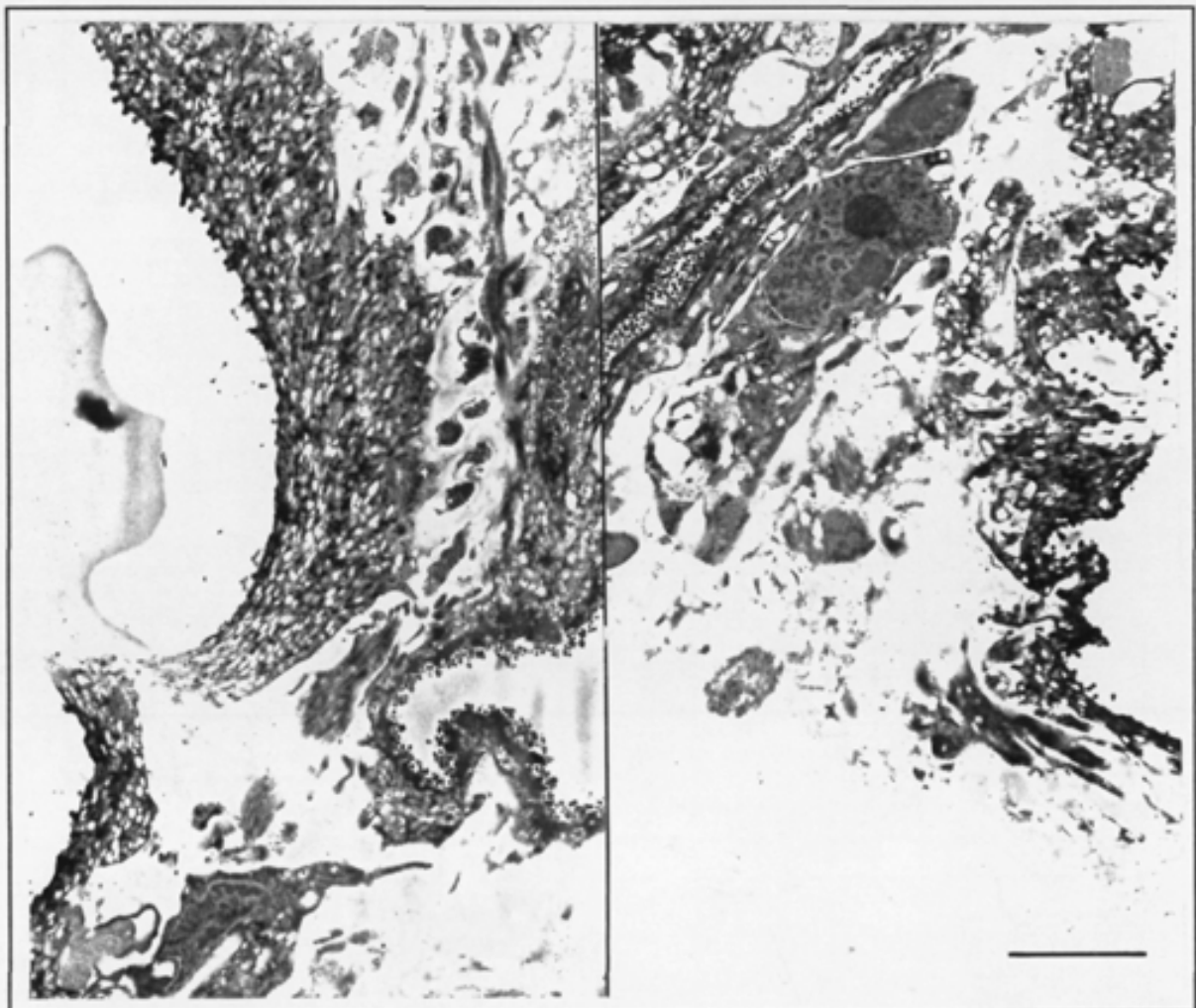


Figura 55 B. Ultraestructura del pedículo de unión entre protoscólex y vesículas proliferas. Microfotografías correspondientes a porciones del esquema representado en la figura 55 A. Barra: 3µm.

ULTRAESTRUCTURA DE LOS PROTOSCOLEX

A nivel ultraestructural los protoscólex de *E. granulosus* se observan delimitados por un tegumento de caracter sincitial que recubre externamente al parásito, y engloba en su interior un parénquima sumamente laxo, pobre en elementos celulares, con abundante substancia fundamental y muy escasas fibras conectivas.

La ultraestructura de los protoscólex queda reflejada en las figuras 56 y 57, en las que se representan esquemáticamente, a diferentes aumentos, el conjunto de las estructuras observadas en cortes ultrafinos de protoscólex de *E. granulosus*. En la figura 57 se representa también una porción de membrana germinativa de la vesícula prolifera.

TEGUMENTO

El tegumento de los protoscólex, al igual que la membrana germinativa (Fig 52 y 57), es un sincitio celular en el que se puede distinguir un citoplasma sincitial y un citoplasma perinuclear intercomunicados a través de puentes citoplasmáticos (Fig 56 y 57).

El citoplasma sincitial contiene gran variedad de vesículas, gránulos de diferentes tipos, mitocondrias y otras endomembranas (Fig 58), mientras que en el citoplasma perinuclear se encuentra el núcleo de la célula.

La superficie externa del tegumento se encuentra recubierta de numerosas microtriquias que adoptan dos morfologías características sumamente diferentes (Fig 59). La región del soma presenta las microtriquias en forma de pequeñas elevaciones con un casquete electrodenso, mientras que en la región del escólex las microtriquias presentan una larga espina electrodensa que descansa sobre una base plana.