



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE INMUNOGLOBULINA G
EN CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS DE

Echinococcus granulosus

MÓNICA LINA ANDREU ÁLVAREZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario Departamento de
Medicina Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA: NORBEL GALANTI GARRONE

SANTIAGO, CHILE

2006



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE INMUNOGLOBULINA G EN CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATIDICOS DE *Echinococcus granulosus*

MÓNICA LINA ANDREU ÁLVAREZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario Departamento de
Medicina Preventiva Animal.

NOTA FINAL: _____

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: NORBEL GALANTI GARRONE.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: HECTOR ALCAINO.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: CLAUDIO ZUÑIGA.	_____	_____

SANTIAGO, CHILE

2006

RESUMEN

El objetivo de esta memoria de título fue localizar las IgGs presentes en la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles, en diferentes compartimentos celulares (fracción nuclear cruda, mitocondrial, microsomal y sobrenadante), por centrifugación diferencial, inmunoblot e inmunohistoquímica. Además, se purificó la fracción nuclear cruda por gradiente discontinua de sacarosa, para comprobar presencia de IgGs en núcleos purificados.

Los resultados de esta investigación, muestran la obtención de una fracción de núcleos aislados (fracción enriquecida en núcleos) con un alto grado de pureza. En aquella obtenida de quistes hidatídicos infértiles se observó alto contenido de inmunoglobulinas de bovino no así en núcleos aislados de capa germinal de quistes fértiles o protoescólices, además las inmunoglobulinas bovinas presentes en quistes infértiles se localizaron en la región perinuclear. Estos resultados permiten concluir que es posible obtener una fracción enriquecida en núcleos de los quistes hidatídicos y que las IgGs ingresan a todos los compartimentos subcelulares de la capa germinal de quiste hidatídico infértil asociándose principalmente a la región perinuclear, considerado que esta localización sólo se encuentra en quistes infértiles, podría asociarse al proceso de infertilidad.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
3. HIPOTESIS	9
4. OBJETIVO GENERAL	9
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
6. MATERIAL Y MÉTODOS	10
6.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	10
6.2. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE HOMOGENIZADO DE CAPA GERMINAL POR CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL	11
6.2.1. Obtención de fracción nuclear cruda (FNC)	11
6.2.2. Obtención de fracción mitocondrial (FM)	12
6.2.3. Obtención de fracciones microsomal (Fm) y Sobrenadante (S).	12
6.2.4. Obtención de fracción enriquecida en núcleos (FEN)	12
6.3. CUANTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS	13
6.4. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE FRACCIONES NUCLEARES	14
6.4.1. Cuantificación de DNA	14
6.4.2. Extracción de DNA	14
6.4.3. Identificación de proteínas específicas de fracciones subcelulares mediante ensayos de Western-blot	15
6.5. IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G	16
6.5.1. Identificación de IgG bovina mediante ensayos de Western-blot	16
6.5.2. Localización de IgG bovina mediante Inmunohistoquímica	17
7. RESULTADOS	18
8. DISCUSION	38
9. CONCLUSIONES	42
10. BIBLIOGRAFÍA	43

INTRODUCCIÓN

La hidatidosis es una zoonosis parasitaria de distribución mundial y de alta prevalencia en zonas ganaderas. Es producida por las formas larvales del gusano *Echinococcus granulosus*, que en su forma adulta parasita a cánidos y otros carnívoros (hospederos definitivos), que la transmiten al hombre y a mamíferos herbívoros. En estos se desarrollan quistes, principalmente, en hígado y pulmones. Los quistes hidatídicos se clasifican en fértiles e infértiles, según su capacidad de producir protoescólices, forma del parásito infectiva para cánidos.

Paredes (2000) encontró en la capa germinal de quistes hidatídicos, un conjunto de proteínas entre 25 y 27 kDa, identificadas como fragmentos de inmunoglobulinas. Uno de estos fragmentos de 27 kDa, sólo se encuentra en quistes infértiles, lo que hace suponer que una respuesta inmune del hospedero actúa sobre la capa germinal de los quistes, afectando su fertilidad. Por otra parte, Cabezón (2002) en la búsqueda de proteínas marcadoras de fertilidad encontró, en fracciones subcelulares de capa germinal de quiste hidatídico, particularmente, en una fracción nuclear, parcialmente purificada, proteínas con movilidad electroforética similar a cadenas livianas de IgGs.

En esta memoria de título se pretende localizar las IgGs presentes en la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles, en diferentes compartimentos celulares, por centrifugación diferencial, inmunoblot e inmunohistoquímica. Además, se purificó la fracción nuclear cruda por gradiente discontinua de sacarosa, para comprobar presencia de

IgGs en núcleos purificados. En el presente trabajo se obtuvo un aislado de núcleos de capa germinal de quiste hidatídico con un alto grado de pureza. En esta fracción nuclear obtenida de quistes hidatídicos infértiles se observó alto contenido de inmunoglobulinas de bovino. Por el contrario, núcleos aislados de capa germinal de quistes fértiles o protoescólices mostraron baja o nula proporción de inmunoglobulinas respectivamente. Mediante inmunofluorescencia, las inmunoglobulinas bovinas presentes en quistes infértiles se localizaron en la región perinuclear. Estos resultados permiten concluir que es posible obtener una fracción enriquecida en núcleos de la cara interna de los quistes hidatídicos y, por otro lado, que las IgGs ingresan a todos los compartimentos subcelulares de la capa germinal de quiste hidatídico infértil asociándose principalmente a la región perinuclear, considerando que esta localización sólo se encuentra en quistes infértiles, podría estar asociado al proceso de infertilidad. Los resultados aquí presentados ayudarán a comprender las bases celulares y moleculares implicadas en la determinación de la fertilidad en los quistes hidatídicos de *E. granulosus*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La hidatidosis es una zoonosis parasitaria de distribución mundial. Alcanza una alta incidencia en países tales como Argentina, Uruguay, Chile, Australia y Nueva Zelanda. En Europa, se encuentra, fundamentalmente en Grecia, Italia, Portugal y España (Sánchez *et al.*, 1997). En Chile, esta parasitosis, es la segunda causal de decomisos de vísceras en mataderos después de distomatosis. Para el año 2004, el decomiso de vísceras por hidatidosis fue de 24,12% en bovinos (SAG, 2000), 2,26% en ovinos, 9,27% en caprinos, 0,64% en porcinos, 5,66% en equinos y 1% en camélidos (SAG, 2000). El decomiso del animal completo, se aplica en el caso de hidatidosis muscular u ósea. Según datos obtenidos del MINSAL (2005) en el año 2002, hubo un total de 1117 egresos de pacientes humanos con hidatidosis desde hospitales. Sin embargo, sólo se notificaron 337 casos al Ministerio de Salud, lo que indica un importante grado de subnotificación de ésta patología (MINSAL, 2005). En el año 2004 las notificaciones por hidatidosis llegaron a 335. La mortalidad se ha mantenido estable en aproximadamente 0,2 por cien mil habitantes (35 muertes anuales aproximadamente) y la incidencia en un 2,4 por cada cien mil habitantes (MINSAL,2005).

El principal efecto producido por esta parasitosis en la salud animal es de tipo económico, por decomiso de vísceras e incluso decomiso de animales completos. Además, se ha determinado que en animales fuertemente parasitados, se produce una alteración química de la carne. En Bulgaria se ha demostrado que en ovinos con hidatidosis la cantidad de lana y peso corporal de los animales se reduce en un 20 a 30%. Estudios

realizados en Rusia indican que bovinos infectados tienen un rendimiento menor en 4 kilos de carne y 2 kilos de grasa por animal (González *et al.*, 1981)

E. granulosus es un endoparásito perteneciente al phylum Platelmino; clase Cestoda; orden Cyclophyloidea; familia Taenidae y género *Echinococcus* (Thompson y Lymbery, 1988). Es un cestodo pequeño que mide entre 2 y 7 mm de longitud. En el extremo anterior tiene un escólex con un rostelo evaginable y una doble corona de ganchos. El escólex se continúa en un cuello corto al que se unen 3 ó 4 proglótidas, de las cuales la primera es inmadura y la última grávida cargada de huevos (Georgi y Georgi, 1994; Sánchez *et al.*, 1997).

Este parásito se caracteriza por poseer un ciclo de vida indirecto, que involucra a carnívoros (principalmente el perro) como hospedero definitivo, y a mamíferos no carnívoros como hospederos intermediarios (ovinos, bovinos, y otros herbívoros) además del hombre (Thompson y Lymbery, 1988).

En el hospedero definitivo el gusano se aloja a nivel del intestino delgado, pudiendo sobrevivir por más de 20 meses. Las proglótidas grávidas y los huevos que se desprenden del gusano adulto se eliminan con las heces contaminando el ambiente. Los huevos, al ser consumidos por un hospedero intermediario liberan un embrión, que atraviesa la pared del intestino delgado, alcanzando distintos órganos blanco, fundamentalmente pulmón e hígado, mediante transporte pasivo vía sanguínea o linfática (García y Bruckne, 1993). En estos órganos, comienza la formación del estado larval del parásito, conocido como quiste hidatídico, que genera protoescólices, forma del parásito infectante para cánidos. El ciclo

se cierra cuando el hospedero carnívoro ingiere vísceras de un hospedero intermediario que contiene quistes con protoescólices en su interior.

El quiste hidatídico es esférico, de 2 a 5 cm de diámetro, aunque en algunas ocasiones alcanza mayores dimensiones. En su cara externa, está constituido por una capa fibrosa y gruesa, llamada capa adventicia, la que es generada por el hospedero intermediario. Hacia el interior del quiste y adosada a la capa adventicia, se encuentra una capa acelular estratificada blanquecina, llamada capa laminar. Finalmente, hacia el lumen del quiste se encuentra una capa celular, denominada capa germinal. Éstas últimas capas son de origen parasitario (Thompson, 1976). La capa germinal posee una estructura compleja que puede dividirse en 3 regiones; el tegumento que es el borde exterior y mide aproximadamente 1,5 μm de espesor emite prolongaciones denominadas microtrichias hacia la capa laminar y está cubierto por membrana plasmática. Hacia el lumen del quiste se encuentra una región citoplasmática sincicial nucleada. La tercera región es la más interna y en ella se describen 5 tipos celulares distintos; células musculares, glucogénicas, lisosomales, flamíferas y de conducto (Coltorti y Varela-Díaz, 1978). Las células de la capa germinal, producen la capa laminar, y un exudado que se vierte en la cavidad del quiste (líquido hidatídico). A partir de las células de la capa germinal, se originan los protoescólices, que se pueden encontrar libres en el líquido hidatídico constituyendo la denominada "arenilla hidatídica". Un quiste puede contener cientos de estos protoescólices (Romero, 1999).

En los hospederos intermediarios se pueden presentar dos tipos de quistes hidatídicos: fértiles, aquellos que contienen protoescólices en formación unidos a la capa

germinal y protoescólicas libres en el líquido hidatídico; o infértiles, cuya capa germinal y líquido hidatídico no presentan protoescólicas. Estos últimos son incapaces de infectar al hospedero definitivo y en consecuencia no continúan el ciclo de vida del parásito. Los mecanismos involucrados con la fertilidad e infertilidad de los quistes hidatídicos aún no han sido dilucidados.

El diagnóstico actual de la hidatidosis en humanos, está fuertemente marcado por los estudios de imágenes, como la ecotomografía, tomografía axial computarizada y radiografía, entre otras. También, se utiliza el estudio serológico, pesquizando la presencia de anticuerpos a través de distintas técnicas, siendo la más común el test de ELISA (Canales *et al.*, 1994).

El tratamiento del quiste hidatídico es quirúrgico, aunque también se ha dado paso a tratamiento farmacológico y a la punción, aspiración, inyección de protoescolicida y reaspiración del quiste. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos es totalmente satisfactorio; la cirugía presenta altas tasas de recidiva, con riesgo de ruptura del quiste y producción de una hidatidosis secundaria o de un “Shock” anafiláctico. Por otra parte, los tratamientos en base a fármacos, no siempre son exitosos, además de ser costosos y largos. Finalmente, no todos los quistes pueden ser puncionados (Apt *et al.*, 1996).

A la luz de estos datos se hace necesario investigar los procesos que definen la fertilidad de los quistes, y proveer de información que posibilite la preparación de nuevos ensayos diagnósticos de esta enfermedad. Paredes (2000), buscando marcadores de fertilidad en *E. granulosus*, encontró en capa germinal de quistes hidatídicos infértiles, una

proteína de 27 kDa que está ausente en capa germinal fértil y en protoescólicas y que corresponde a un fragmento de cadena liviana de inmunoglobulina. Estudios realizados por Varela-Díaz y Coltorti (1973) señalan la presencia de inmunoglobulinas del hospedero en la capa germinal y líquido hidatídico del quiste. Estos antecedentes hacen suponer que el hospedero intermediario monta una respuesta inmune humoral, que eventualmente deriva en la infertilidad de los quistes. El sistema inmune celular no puede actuar al interior de los quistes hidatídicos, debido a que éste se comporta como una barrera semipermeable que impide el ingreso de células a su interior (Ferreira *et al.*, 2000). El sistema del complemento está inhibido al interior del quiste (Ojeda y Mora, 1988); por lo tanto, las inmunoglobulinas presentes en su interior, deberían realizar su acción en forma independiente del sistema inmune celular y el sistema del complemento.

Existen antecedentes que señalan que inmunoglobulinas podrían ingresar al interior de las células y ejercer su acción a través de la inducción de apoptosis (Williams y Peen, 1999). En células de capa germinal de quiste hidatídico, Cabezón (2002) encontró proteínas con movilidad electroforética similar a fragmentos de IgGs (Inmunoglobulinas G) en fracciones subcelulares, particularmente, en una fracción nuclear parcialmente purificada. Por otra parte, estudios preliminares en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, han demostrado que la apoptosis está, notablemente, elevada en la capa germinal infértil. Como consecuencia de lo anterior, se propone que las IgGs estarían participando en la inducción de infertilidad en las capas germinales. En esta memoria se propone establecer un protocolo confiable de fraccionamiento subcelular, con el objetivo de localizar y cuantificar la presencia de IgGs en subestructuras de la capa germinal estableciendo su localización subcelular específica.

De esta forma se avanzaría en el conocimiento de los procesos celulares involucrados en la determinación de la fertilidad de los quistes hidatídicos.

HIPOTESIS

Inmunoglobulinas inducidas por el parásito en el hospedero intermediario atraviesan la membrana plasmática que separa la capa laminar de la capa germinal del quiste hidatídico y se localizan en diferentes compartimentos subcelulares.

OBJETIVO GENERAL

Localizar inmunoglobulinas en las fracciones subcelulares de capa germinal de quiste hidatídico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-** Obtener fracciones subcelulares de capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles de bovino.
- 2.-** Obtener una fracción enriquecida en núcleos de la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles de bovino.
- 3.-** Caracterizar la pureza de las fracciones subcelulares de capa germinal de quistes hidatídicos infértiles de bovino mediante el uso de marcadores.
- 4.-** Localizar y cuantificar las IgGs en las fracciones subcelulares obtenidas de capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles de bovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Obtención de muestras:

Pulmones e hígados de bovinos decomisados en la planta faenadora Lo Valledor S.A. por hidatidosis, fueron transportados al laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en bolsas plásticas dentro de cajas aislantes. Se realizó una primera clasificación visual de los quistes verificando que no presentaran indicios de abcedación ni calcificación, que presentaran consistencia blanda y un tamaño no inferior a 3 centímetros de diámetro (Paredes, 2000). Con el objetivo de mantener las condiciones de esterilidad, los quistes fueron desinfectados externamente con alcohol yodado y disecados bajo una cámara de flujo laminar con instrumental quirúrgico estéril. De esta forma, se obtuvo capa germinal mediante un lavado con PBS estéril, un raspaje suave de la cara luminal del quiste con ‘‘Rubber Policeman’’ y una resuspensión en PBS estéril; el material fue recuperado con pipetas Pasteur y depositado en tubos Eppendorf. Para determinar la fertilidad o infertilidad de los quistes, se observó, mediante el uso de un microscopio óptico y aumentos de 100 y 400x, la presencia o ausencia de protoescólices en el líquido hidatídico y en la capa germinal, así como presencia de yemas que originan protoescólices. También se consideró el color y grosor de la capa germinal debido a que la capa germinal de quistes fértiles generalmente presenta un color blanquecino y un mayor grosor que la capa germinal de quistes infértiles (Bortoletti y Ferreti, 1978).

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 800 x g por 5 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22. Luego la capa germinal sedimentada fue pesada y homogenizada en un homogenizador Potter Elvehjem, dando 50 golpes a 1400

rpm a 4°C (Santos, 1979) en tampón A (Tris HCl 0,05 M; KCl 0,025 M; MgCl₂ 0,03 M; CaCl₂ 0,002 M y Sacarosa 0,32 M) en presencia de inhibidores de proteasas (EDTA 1 mM; TLCK 0,5 mM; PMSF 5 mM; Aprotinina 5µg/ml). Se utilizó una relación de 7 ml de tampón A por cada gramo de capa germinal.

2.- Fraccionamiento subcelular de homogenizado de capa germinal por centrifugación diferencial:

Homogenizados de capa germinal de quistes fértiles e infértiles fueron centrifugados a gravedades crecientes de forma secuencial, para obtener diferentes fracciones subcelulares según lo descrito por Durham y Galanti, 1974; Durham *et al.*, 1975; López y Galanti, 1976; Santos, 1979, con algunas modificaciones para la obtención de la fracción enriquecida en núcleos. Todo éste proceso fue realizado a 4°C.

2.1. Obtención de fracción nuclear cruda (FNC):

Para la obtención de la fracción nuclear cruda, homogenizados de capa germinal de quistes fértiles e infértiles fueron centrifugados a 650 x g durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22. El sedimento obtenido, correspondiente a la fracción nuclear cruda, fue lavado 2 veces mediante resuspensión en tampón A y centrifugado nuevamente a 650 x g por 15 minutos. A partir de esta fracción se obtuvo posteriormente la fracción enriquecida en núcleos, como se indica en el punto 2.4. El sobrenadante fue utilizado para obtener la fracción mitocondrial.

2.2. Obtención de fracción mitocondrial (FM):

El sobrenadante que se obtiene en el punto 2.1, fue centrifugado a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22. El sedimento obtenido, correspondiente a la fracción mitocondrial, fue lavado 2 veces mediante resuspensión en tampón A y centrifugado a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue utilizado para obtener la fracción microsomal.

2.3. Obtención de fracciones microsomal (Fm) y Sobrenadante (S):

El sobrenadante que se obtuvo en el punto 2.2, fue centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos a 4°C en ultracentrífuga Sorvall modelo OTD 65-B, rotor T-865. El sedimento obtenido corresponde a la fracción microsomal. El sobrenadante corresponde a la fracción sobrenadante.

2.4. Obtención de fracción enriquecida en núcleos (FEN):

La fracción nuclear cruda obtenida en el punto 2.1, fue resuspendida en una solución de sacarosa 1,6 M en tampón C (Tris HCl 0,05 M; KCl 0,025 M; MgCl₂ 0,03 M y CaCl₂ 0,002 M). 1,5 ml de esta suspensión se colocó sobre 1,5 ml de sacarosa 1,9 M en tampón C el que a su vez, se encuentra sobre 1,5 ml de sacarosa 2,2 M en tampón C. Posteriormente, la fracción nuclear cruda posicionada sobre estos 3 colchones de sacarosa, fue centrifugada a 70.000 x g durante 60 minutos a 4°C en ultracentrífuga Sorvall modelo OTD 65-B, rotor AH-650. Se retiraron las bandas formadas en las interfases 1,6–1,9 M; 1,9–2,2 M y el sedimento de 2,2 M , con la ayuda de pipeta Pasteur. El material obtenido se lavó 2 veces mediante resuspensión en tampón A y fue centrifugado a 2.000 x g durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada de mesa Hettich Mikro 22.

Finalmente, los sedimentos obtenidos se observaron mediante microscopía de luz, para determinar la localización de la fracción enriquecida en núcleos.

3.- Cuantificación y Separación Electroforética de Proteínas:

Alícuotas de homogenizado y de fracciones subcelulares obtenidas anteriormente fueron resuspendidas en tampón A con inhibidores de proteasas. En estas muestras se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Luego las proteínas del homogenizado y de las distintas fracciones subcelulares obtenidas, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en sodio dodecil sulfato SDS-PAGE en cámaras Mini Protean3 (Bio-Rad®) mediante el método de Laemmli (Laemmli, 1970) modificado por Thomas (Thomas y Konberg, 1975). Los geles fueron preparados con distintos porcentajes de concentración de poliacrilamida para lograr una mejor resolución de las proteínas específicas en función de sus pesos moleculares. Fueron utilizados geles de poliacrilamida SDS-PAGE 15% para la identificación de la histona H1 y 12% para IgGs. Cada carril tuvo una carga de 15 µg de proteínas de cada fracción. Finalmente, las proteínas se identificaron por tinción de los geles durante toda la noche con Azul de Comassie y mediante ensayos de Western blot como se detalla posteriormente.

4.- Determinación de marcadores de fracciones nucleares:

Con el objetivo de identificar específicamente las fracciones nucleares (FNC y FEN), se emplearon 2 marcadores de estas fracciones: la cuantificación de DNA y ensayos de Western blot utilizando un suero hiperinmune heterólogo anti histona H1 de erizo de mar.

4.1. Cuantificación de DNA:

4.1.1 Extracción de DNA:

La extracción de DNA, se realizó a partir del homogeneizado de capa germinal, y de las fracciones subcelulares obtenidas. De esta forma, los sedimentos de cada fracción, fueron resuspendidos en buffer de lisis (SDS 1%; Tris 10 mM pH 8; Aprotinina 5µg/ml; EDTA 2 mM; PMSF 5 mM y TPCK 1 mM) hasta completar 500 µl. Se agregó 10 µl de proteinasa K (15,6 mg/ml) y se dejó toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Al siguiente día se incubó durante 1 hora a 50°C. Posteriormente, se adicionó 10 µl de RNasa (10 mg/ml) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Luego de agregar 500 µl de solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) se centrifugó a 16.000 x g por 5 min. Se traspasó la fase superior a un tubo estéril y se agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío 100%. Se dejó al menos 2 horas en congelador a -20° C y se centrifugó a 16.000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se solubilizó en 20 µl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). La fracción sobrenadante de 100.000 x g se trató de manera similar.

La cuantificación del DNA se realizó mediante la técnica de difenilamina (Burton, 1956) modificada para ser utilizada como micrométodo. Para esto, se tomaron 16 μ l del sedimento final resuspendido, correspondiente al DNA de cada fracción subcelular, se agregó 84 μ l de TCA 5%, 200 μ l del reactivo de difenilamina (0.075 grs de difenilamina en una solución de 5 ml de ácido acético glacial, 0.075 ml de ácido sulfúrico concentrado, 0.025 ml de acetaldehído acuoso) y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche en oscuridad. Finalmente, se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro Shimadzu UV-190 a 600 nm. Como control se utilizó una curva estándar de diferentes concentraciones conocidas de una solución de DNA de timo de ternero (Sigma).

4.1.2. Identificación de proteínas específicas de fracciones subcelulares mediante ensayos de western-blot:

Proteínas de homogenizado y de las distintas fracciones subcelulares obtenidas, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en sodio dodecil sulfato SDS-PAGE 15%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad®) mediante una electro-transferencia húmeda durante 16 horas a 50mV. A continuación, la membrana se bloqueó con BSA al 3% (3 gr de BSA en 100 ml de PBS-Tween 20 0,005%) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces por 10 minutos en una solución de PBS-Tween 20 al 0,005%. Para la identificación de la proteína histona H1 (proteína que se asocia a fibras de actina empaquetando el DNA cromosómico lo que la convierte en un buen marcador de fracciones nucleares) la membrana de nitrocelulosa fue incubada durante 2 horas con un suero hiperinmune de conejo anti histona H1 de espermatozoides de erizos de mar, gentilmente cedido por la Dra. Imtchenesky de la

Universidad de Concepción, Concepción, Chile, utilizando una dilución 1:100 en BSA al 3%. Luego, la membrana fue lavada 3 veces por 10 minutos y se incubó 1 hora, con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa en una dilución 1:20000. La membrana fue lavada 3 veces por 10 minutos. Finalmente, en un cuarto oscuro, se realizó el revelado de la membrana por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL Amersham® y la película Kodak® X-Omat con tiempos de exposición variables de segundos a minutos. Como control positivo se utilizó una fracción enriquecida en núcleos de tejido hepático de ratón el que anteriormente había sido probado con el suero hiperinmune de conejo anti histona H1 de espermatozoides de erizos de mar dando como resultado la identificación positiva de la histona H1 en dicha fracción. Como control negativo se utilizó IgG purificada de suero bovino.

5.- Identificación y localización de Inmunoglobulina G:

5.1. Identificación de IgG bovina mediante ensayos de Western-blot:

Proteínas de homogenizado y fracciones subcelulares se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en sodio dodecil sulfato SDS-PAGE 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el mismo procedimiento detallado en 4.1.2. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de PBS+Soya al 0,5% por 12 horas a 4°C. Para identificar las IgGs, se incubó durante 1 hora 30 minutos con un anticuerpo de conejo anti IgG bovina molécula completa, conjugado a peroxidasa SIGMA®, dilución 1:10000. Finalmente, la membrana fue revelada por quimioluminiscencia como se explicó en el punto 4.1.2. Como control positivo se utilizó IgGs purificadas de suero bovino y como control negativo se utilizó IgGs purificadas de suero de conejo.

5.2. Localización de IgG bovina mediante Inmunohistoquímica:

Para la localización de IgGs bovinas en la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e Infértiles, se realizaron extendidos, en portaobjetos previamente silanizados, de fracciones enriquecidas en núcleos de ambos tipos de quistes. Los extendidos fueron hidratados con PBS durante 2 minutos y fijados con etanol 100% durante 5 minutos. Posteriormente se hidrataron nuevamente en 3 cambios de PBS por 2 minutos. A continuación, se bloquearon en una solución de bloqueo (BSA 1%, saponina 0,1% en PBS) durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Luego, los extendidos se incubaron por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente con anticuerpo de conejo anti IgG bovino molécula completa en una dilución 1:50 v/v en solución de bloqueo. Los frotis se lavaron con 3 cambios de PBS por 3 minutos y se procedió a incubar en cámara húmeda por una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a FITC (tiocianato de fluoresceína) dilución 1:50 v/v en solución de bloqueo. Una vez finalizada la incubación, los extendidos se lavaron con agua destilada y 3 cambios de PBS por 3 minutos en oscuridad. Los núcleos de los extendidos se tiñeron con tinción DAPI. Finalmente los extendidos se montaron con un medio acuoso Vectashield.

RESULTADOS

Para estandarizar el protocolo de fraccionamiento subcelular, se homogeneizó tejido hepático de ratón (figura 1A) y mediante centrifugación diferencial, se obtuvo una fracción nuclear cruda. Esta fracción presenta como componente principal núcleos del tejido hepático, con una contaminación menor de otras estructuras celulares (figura 1B). A partir de la fracción nuclear cruda, se obtuvo una fracción enriquecida en núcleos, mediante el uso de una gradiente discontinua formada por dos concentraciones de sacarosa: 1,6 M en la que se resuspende la FNC y 2,2 M. En el sedimento de esta gradiente, después de centrifugar 60 minutos a 70.000 x g se encontró la FEN, que presenta alto porcentaje de núcleos y una cantidad despreciable de contaminación con otras estructuras celulares (figura 1C).

En la figura 2A, se observa la FEN obtenida luego de realizar una centrifugación diferencial de capa germinal de un quiste hidatídico infértil obtenida mediante raspado exhaustivo de la cara interna del quiste. En esta fracción es posible apreciar dos tipos de núcleos de tamaño diferente. Los núcleos de capa germinal de quistes hidatídicos son de tamaño pequeño (flechas rojas), presentando un diámetro de 2 a 3 μm de acuerdo a lo descrito por Urrea-París *et al* (1999). Los núcleos de mayor tamaño (flechas verdes) probablemente corresponden a células de origen bovino que se encuentran presentes en la capa adventicia y que contaminan las muestras de capa germinal debido a la proximidad entre las capa germinal y adventicia en quistes hidatídicos infértiles. Además, es posible observar estructuras que probablemente corresponden a restos de sincicio de la capa

germinal y restos de capa laminar. Como control se observa la FEN obtenida desde homogeneizado de tejido hepático de ratón (figura 2B).

Con el objetivo de disminuir la contaminación con células de origen bovino, así como de restos de sincicio de la capa germinal y de capa laminar, se procedió a obtener la muestra de capa germinal de quistes hidatídicos mediante un raspado suave de la cara interna del quiste. En la figura 3, se observa fracciones subcelulares de capa germinal de un quiste hidatídico infértil obtenida mediante lavado con PBS estéril y posterior raspado suave. En la figura 3A se observa que el homogeneizado de capa germinal presenta un nivel de contaminación similar al observado en la FEN de capa germinal de un quiste hidatídico infértil obtenida mediante raspado exhaustivo (compare figura 3A y figura 2A); esta observación es indicativa de una menor contaminación de los núcleos con otras estructuras celulares cuando se obtiene la capa germinal por raspado suave. Así, es posible apreciar una notoria y gradual disminución de contaminación de los núcleos de capa germinal al observar la FNC (figura 3B) y FEN (figura 3C) cuando la capa germinal se obtiene mediante raspado suave.

Así mismo, se procedió a comparar el patrón electroforético de las proteínas totales y la identificación de IgGs mediante ensayos de Western blot en capa germinal obtenida por raspado suave o exhaustivo de la cara interna del quiste. En la figura 4A se observa el patrón de separación electroforética de proteínas obtenidas de homogeneizados de CGI obtenidas mediante raspado suave (carril 2) y exhaustivo (carril 4), así como de CGF obtenidas mediante raspado suave (carril 3) y protoescólicas (carril 5). Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. Se aprecia leves diferencias en el patrón electroforético de

proteínas entre las dos formas de obtención de CGI y entre CGI, CGF y protoescólices. Sin embargo, el Western-blot de las mismas muestra que la proporción relativa de IgGs es marcadamente menor en homogeneizado de CGI obtenida por raspado suave (Figura 4B, carril 3) que en el mismo material obtenido por raspado exhaustivo (Figura 4B, carril 5). La capa germinal de quiste fértil presenta muy baja proporción de IgGs (Figura 4B, carril 4) mientras que los protoescólices no muestran IgGs (Figura 4B, carril 6). Como control de carga se utilizó α actina masa molecular de 42 kDa, que fue detectada empleando un anticuerpo policlonal de conejo anti- α actina. De los resultados se desprende que el homogeneizado de capa germinal infértil obtenido por raspado exhaustivo tiene mayor proporción de IgGs que aquellos obtenidos por raspado suave, lo cual podría explicarse por una mayor contaminación de IgGs desde otras estructuras del quiste extraídas junto con la capa germinal. Esto sería debido a la ausencia de lavado de la capa germinal, antes de ser extraída, y a la presión del raspado. Sin embargo, cabe señalar que el homogeneizado de CGI obtenido por raspado suave presenta mayor cantidad de IgGs en comparación con el homogeneizado de CGF (Figura 4B, carril 4) obtenido en las mismas condiciones; el homogeneizado de protoescólices no presenta IgGs (Figura 4B, carril 6).

Una vez realizado el fraccionamiento subcelular, fue necesario demostrar la eficacia del mismo utilizando marcadores de fracciones nucleares. Estos fueron la concentración total y relativa de DNA y la identificación de histonas por electroforesis y de histona H1 mediante ensayos de Western blot, en las diferentes fracciones subcelulares.

En la figura 5 se muestra la cuantificación total en mg de DNA extraído de homogeneizado y de fracciones subcelulares de capa germinal de quiste hidatídico infértil

(A) y el gráfico correspondiente (B). Se observa que la FNC presenta un 71,6% de recuperación de material genético total (tomando como 100% el homogeneizado); a partir de esta fracción se recuperó un 38,3% en la FEN. Las otras fracciones muestran cantidades despreciables de DNA.

La figura 6 A muestra la concentración de DNA relativa a proteínas en el homogeneizado y en las fracciones subcelulares de la capa germinal de quistes infértiles. En 6 B se representa la expresión gráfica de los mismos resultados. La mayor concentración de DNA se encontró en la FEN, que corresponde al sedimento 2,2 molar de sacarosa de la gradiente discontinua, y en la FNC. Por otra parte la FM presenta una concentración de DNA considerablemente menor, aunque significativa; ésta puede deberse a material genético mitocondrial y contaminación con núcleos de capa germinal. La fracción sobrenadante presenta una concentración de DNA similar aunque menor que la FM, podría deberse a ruptura de algunos núcleos y solubilización de su contenido. Finalmente, la Fm presenta una cantidad despreciable de DNA.

Como se ha señalado, el segundo marcador nuclear fueron las histonas, particularmente la histona H1; estas proteínas cromosomales se identificaron por electroforesis de proteínas de fracciones subcelulares de capa germinal de quiste hidatídico fértil, así como por Western-blot empleando un anticuerpo anti histona H1. En la figura 7A se aprecia la separación electroforética de proteínas de las fracciones subcelulares teñidas con azul de Coomassie. En el carril C(+) se muestran las histonas de núcleos aislados de hígado de ratón. Las bandas correspondientes a las histonas nucleosomales (H2A, H3, H2B y H4) se encuentran presentes en el homogeneizado (H), en la fracción nuclear cruda

(FNC) y en la fracción enriquecida en núcleos (FEN) de la capa germinal, pero no es así en las fracciones mitocondrial (FM), microsomal (Fm) y sobrenadante (S). En consecuencia, la técnica aplicada permite aislar núcleos de la capa germinal de quistes hidatídicos con alto grado de pureza. En la figura 7B se muestra la identificación de histona H1 mediante ensayo de Western-Blot , utilizando un suero hiperinmune de conejo anti histona H1 de espermatozoides de erizos de mar, en cada una de las fracciones subcelulares. Como control positivo se utilizó una fracción enriquecida en núcleos (FEN) de tejido hepático de ratón. En este control se aprecia la presencia de un doblete de proteínas de aproximadamente 21 kDa, que corresponde a las 2 isoformas de la histona H1. Estas proteínas reaccionan fuertemente con el antisuero anti histona H1 en la FEN, en relación al H y FNC. Las fracciones mitocondrial (FM), microsomal (Fm) y sobrenadante (S) muestran escasa o nula reacción con el anticuerpo, confirmando que las histonas se encuentran altamente concentradas en la fracción enriquecida en núcleos (FEN).

Basados en los resultados mostrados en la figura 5, 6 y 7 se concluye que es posible obtener una fracción subcelular enriquecida en núcleos a partir de un homogeneizado de capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles, mediante centrifugación diferencial y aplicación de un gradiente de sacarosa a la fracción nuclear cruda.

Posteriormente, se procedió a determinar la ubicación de las inmunoglobulinas en las distintas fracciones subcelulares de la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles. Para este objetivo, se realizaron ensayos de Western-blot de las diferentes fracciones subcelulares obtenidas e inmunohistoquímica de la FEN, utilizando un anticuerpo anti-IgG bovina.

En la figura 8A se observa la separación electroforética de proteínas de cada fracción subcelular de quistes hidatídicos infértiles, las que fueron teñidas con azul de Coomassie. En la figura 8B se observa la identificación de IgG en las mismas fracciones subcelulares mediante ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo anti-IgG bovina que reconoce tanto las cadenas pesada y liviana como la molécula completa. Se observa presencia de IgGs en todas las fracciones subcelulares. Es interesante la presencia marcada de IgGs en las fracciones nucleares, tanto cruda (FNC) como enriquecida en núcleos (FEN). En consecuencia, las IgGs del hospedero bovino atraviesan la membrana plasmática que separa la capa laminar de la germinal e ingresan a los núcleos de esta última estructura. Estos resultados confirman la observación de Cabezón (2002), quien describió presencia de IgGs en una fracción parcialmente purificada de núcleos, por centrifugación diferencial de un homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico infértil.

Considerando estos resultados y tomando en cuenta los datos aportados por Zack *et al* (1996), que indican la existencia de anticuerpos específicos contra moléculas presentes en el núcleo de células renales, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en núcleos aislados de capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles (FEN), para determinar una posible ubicación intra o perinuclear de las IgGs bovinas. En primer lugar se identificó y comparó núcleos provenientes de capa germinal del quiste y aquellos posiblemente de origen bovino, procedentes de la capa adventicia y que pueden contaminar la (FEN). En la figura 9A se muestra claramente 2 tipos de núcleos de tamaño muy diferente. Los de mayor tamaño (flechas de color verde) corresponderían a núcleos de células de bovino con un diámetro aproximado de 10 μ m. Las flechas de color rojo señalan núcleos de capa germinal de quiste hidatídico, con un tamaño aproximado de 2-3 μ m, según lo señalado por Urrea-

París *et al* (1999) y Martínez *et al* (2005). En la figura 9B se observan estos núcleos bajo contraste de fases.

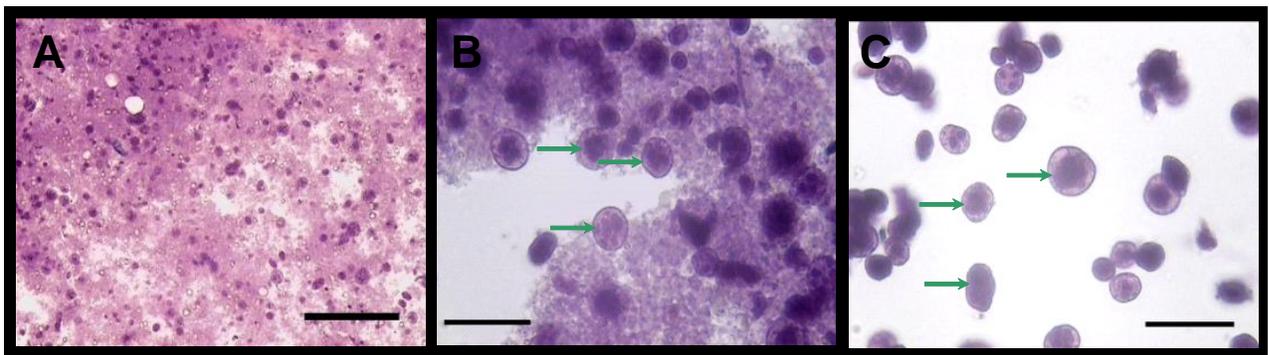
Posteriormente, se realizó la identificación de IgGs en núcleos de capa germinal de quistes hidatídicos infértiles. La figura 10A corresponde a una imagen obtenida en microscopio de epifluorescencia con filtro 430 ± 20 nm de núcleos teñidos con DAPI; se muestra núcleos de capa germinal (flechas rojas) y algunos núcleos contaminantes de células de bovino (flechas verdes). La figura 10B corresponde a la misma muestra observada con un filtro de 520 ± 20 nm, que permite la identificación de IgGs de bovino con un anticuerpo primario anti IgG bovino y un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a FITC (color verde). La figura 10C muestra la sobreposición de la tinción nuclear (DAPI) con la identificación de las IgGs. La figura 10D corresponde a la sobreposición de contraste de fases y DAPI. La figura 11 sigue el mismo esquema de la figura 10, pero con mayor aumento para una mejor visualización de los núcleos y de la disposición de las inmunoglobulinas a su alrededor. De estas figuras se desprende que las IgGs presentes en capa germinal de quistes hidatídicos infértiles se localizarían alrededor de los núcleos, probablemente en la región citoplasmática adyacente a estas estructuras (perinuclear).

La figura 12 A muestra núcleos de capa germinal de quiste fértil teñidos con DAPI, observados bajo microscopio de epifluorescencia con filtro 430 ± 20 nm. La figura 12B corresponde a una imagen obtenida en microscopio de epifluorescencia con filtro 520 ± 20 nm, que permite la identificación de IgGs con anticuerpo anti IgG bovina y Ac secundario anti IgG de conejo conjugado a FITC, en la misma preparación anterior (12 A). La figura 12C corresponde a la sobreposición de contraste de fases y DAPI. No fue posible detectar

IgGs asociadas a núcleos, como tampoco a otras estructuras, en la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles, lo que se condice con los resultados obtenidos en la figura 4B, que sugieren menor cantidad de IgGs en este tipo de quistes.

FIGURA 1

OBTENCIÓN DE NÚCLEOS DE CÉLULAS DE HÍGADO DE RATÓN. FRACCIONES SUBCELULARES



A: Extendido de un homogenizado de tejido hepático de ratón, teñido con azul de toluidina, observado bajo microscopía de luz. Barra: 100µm.

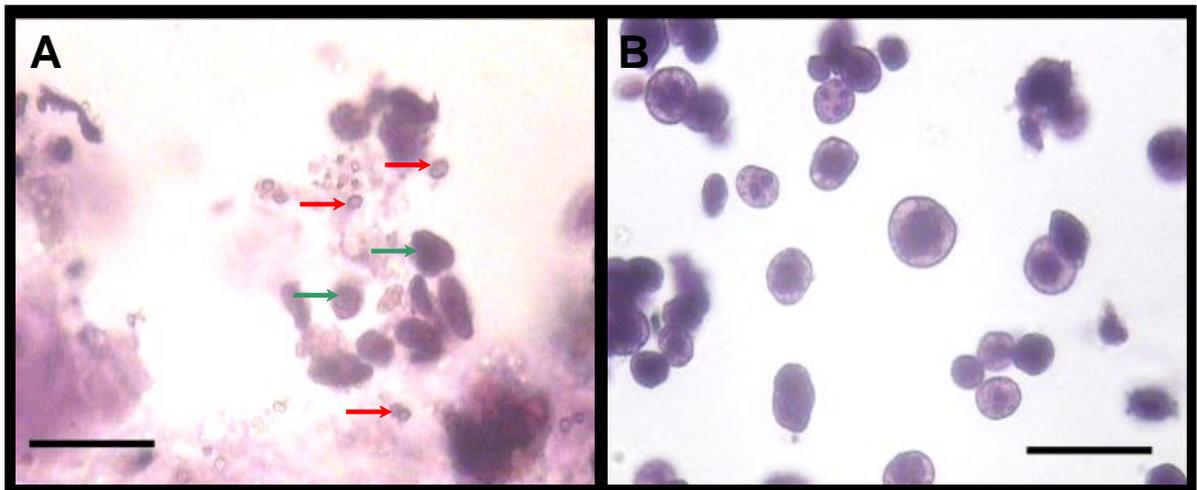
B: Extendido de fracción nuclear cruda de tejido hepático de ratón, teñido con azul de toluidina, observado bajo microscopía de luz. Barra: 25µm

C: Extendido de fracción enriquecida en núcleos de tejido hepático de ratón, teñido con azul de toluidina, observado bajo microscopía de luz. Barra: 25µm

→ Núcleos de células de tejido hepático de ratón

FIGURA 2

COMPARACIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN NÚCLEOS DE TEJIDO HEPÁTICO DE RATÓN Y DE CAPA GERMINAL DE QUISTE HIDATÍDICO INFÉRIL



A: Extendido de fracción enriquecida en núcleos de capa germinal de quiste hidatídico infértil de bovino, teñido con azul de toluidina, observado bajo microscopía de luz. Barra: 25 μ m

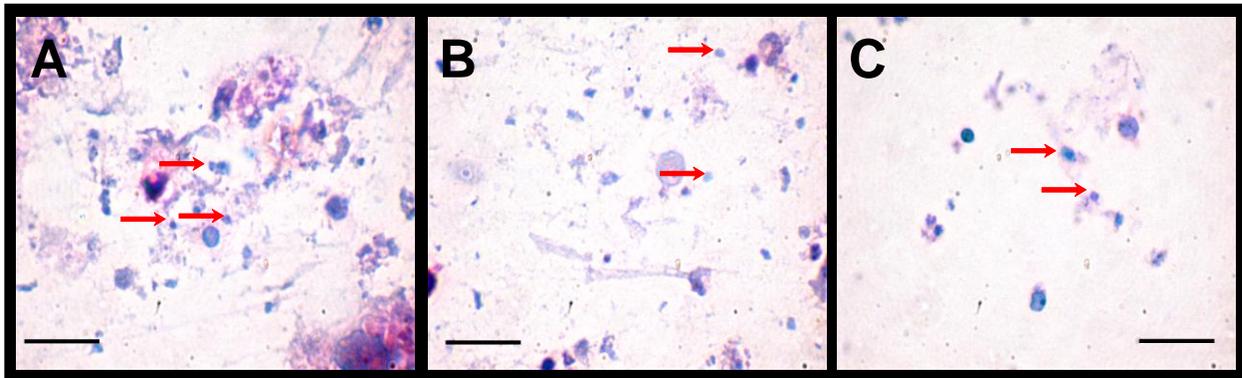
B: Extendido de fracción enriquecida en núcleos de tejido hepático de ratón, teñido con azul de toluidina, observado bajo microscopía de luz. Barra: 25 μ m

→ Núcleos de capa germinal de quiste hidatídico infértil

→ Núcleos de células de bovino

FIGURA 3

HOMOGENEIZADO Y FRACCIONES NUCLEARES OBTENIDAS DE CAPA GERMINAL DE QUISTE HIDATÍDICO INFÉRTEL PREPARADA POR RASPADO SUAVE DE LA CARA INTERNA DEL QUISTE.



A: Extendido de homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico infértil teñido con hematoxilina–eosina observado bajo microscopía de luz. Barra: 10µm

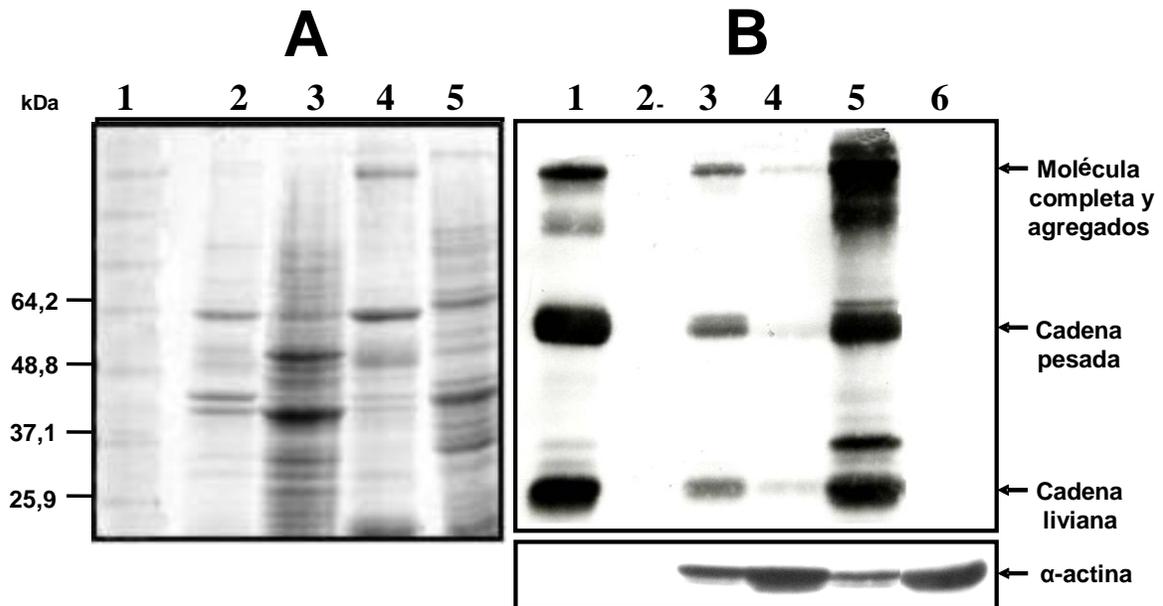
B: Extendido de fracción nuclear cruda de capa germinal de quiste hidatídico infértil teñido con hematoxilina–eosina, observado bajo microscopía de luz. Barra: 10µm

C: Extendido de fracción enriquecida en núcleos de capa germinal de quiste hidatídico infértil teñidos con hematoxilina–eosina, observado bajo microscopía de luz. Barra: 10µm

→ Núcleos de capa germinal de quiste hidatídico infértil

FIGURA 4

IDENTIFICACIÓN DE IgGs EN CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS FÉRTILES E INFÉRTILES Y PROTOESCÓLICES



A: SDS-PAGE 12% de proteínas obtenidas de CGI y CGF teñidas con azul de Coomassie. 1: Marcador de peso molecular; 2: Homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico infértil obtenida mediante raspado suave; 3: Homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico fértil obtenida mediante raspado suave; 4: Homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico infértil obtenida mediante raspado exhaustivo; 5: Homogeneizado de protoescólices.

B. Identificación de IgGs de bovino mediante Western-blot, utilizando Ac anti IgG bovino molécula completa conjugado a peroxidasa. Revelado mediante quimioluminiscencia. 1: C(+). IgG de bovino; 2: C(-). Suero normal de conejo; 3: Homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico infértil obtenida mediante raspado suave; 4: Homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico fértil obtenida mediante raspado suave; 5: Homogeneizado de capa germinal de quiste hidatídico infértil obtenida mediante raspado exhaustivo 6: Homogeneizado de protoescólices.

FIGURA 5

CUANTIFICACIÓN DE DNA EN FRACCIONES SUBCELULARES DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS INFÉRTILES

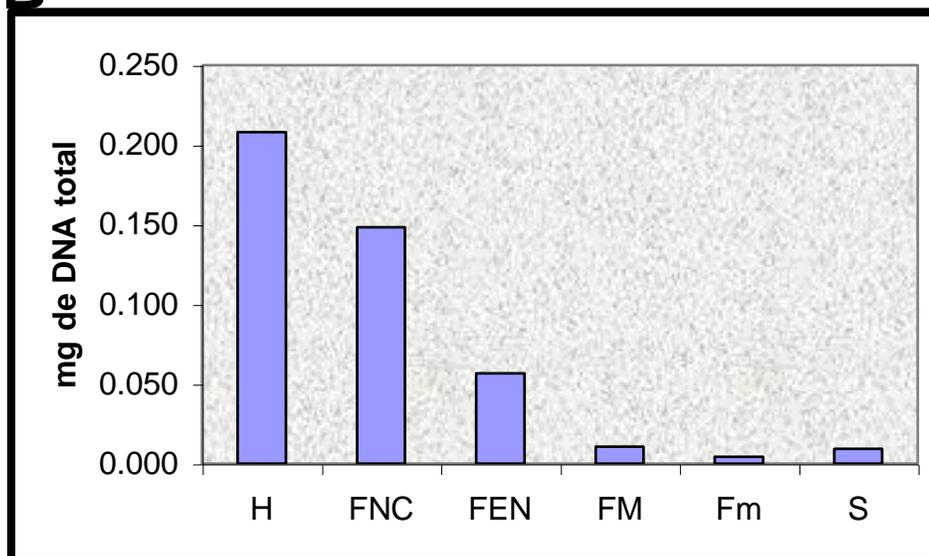
A

	mg de DNA	% de recuperación
H	0.208	100
FNC	0.149	71.46
FEN	0.057	27.4 (38.3)*
FM	0.011	5.3
Fm	0.004	1.9
S	0.009	4.3

RECUPERACIÓN DE DNA EN FRACCIONES SUBCELULARES: 83.1%

(*): Proporción de DNA en FEN relativa a FNC.

B



A. Cuantificación de DNA extraído de fracciones subcelulares de capa germinal de quiste hidatídico infértil.

B. Expresión gráfica de la cantidad de DNA en cada fracción subcelular.H: Homogenizado; FNC: Fracción nuclear cruda; FEN: Fracción enriquecida en núcleos; FM: Fracción mitocondrial; Fm: Fracción microsomal; S: Sobrenadante

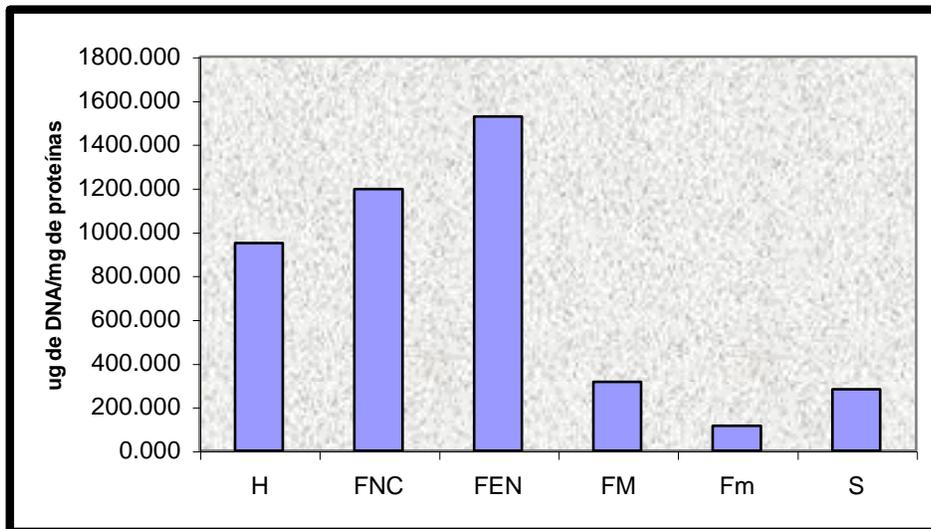
FIGURA 6

CONCENTRACIÓN DE DNA RELATIVA A PROTEÍNAS EN FRACCIONES SUBCELULARES DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS INFÉRTILES

A

FRACCIÓN	ug DNA/mg prot
H	949
FNC	1196
FEN	1526
FM	314
Fm	113
S	281

B

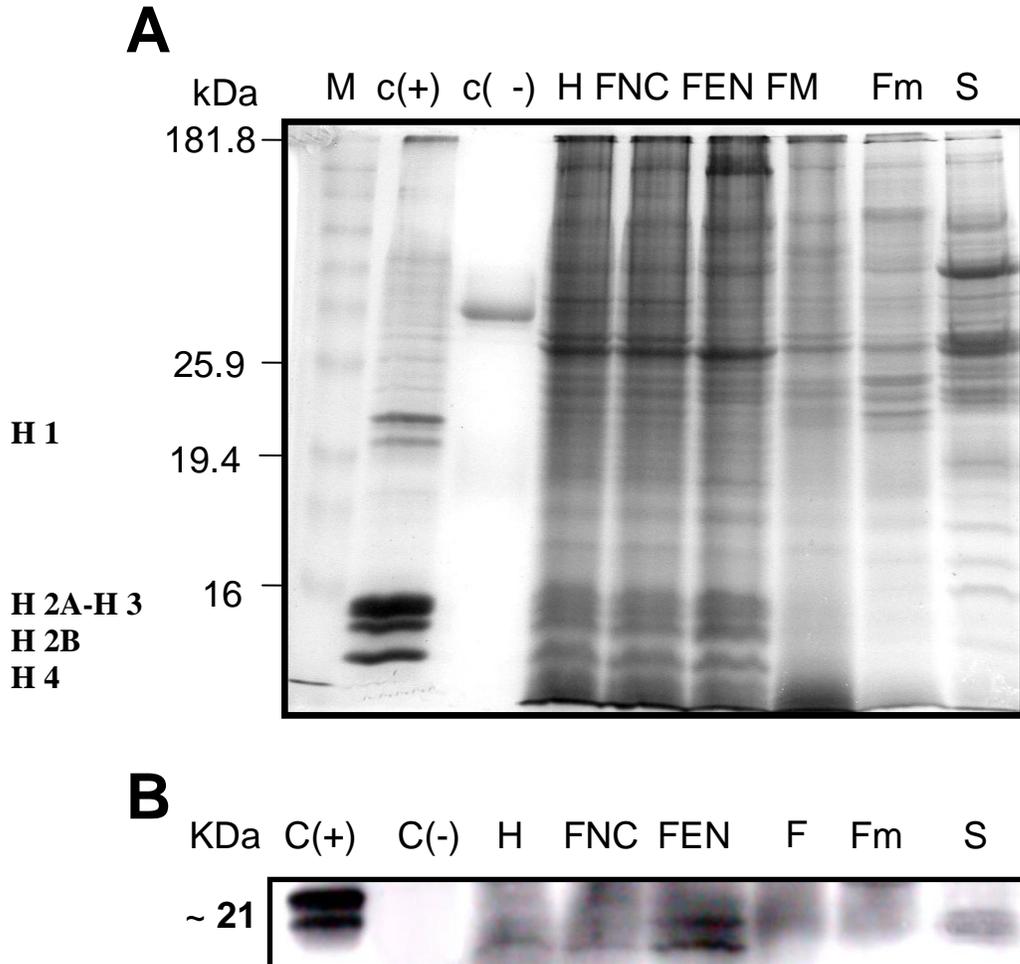


A. Concentración de DNA/ mg de proteína en homogeneizado y en fracciones subcelulares de capa germinal de quiste hidatídico infértil.

B. Expresión gráfica de la concentración de DNA relativa a proteínas en homogeneizado y en fracciones subcelulares de capa germinal de quiste hidatídico infértil. H: Homogeneizado; FNC: Fracción nuclear cruda; FEN: Fracción enriquecida en núcleos; FM: Fracción mitocondrial; Fm: Fracción microsomal; S: Sobrenadante

FIGURA 7

IDENTIFICACIÓN DE HISTONAS POR ELECTROFORESIS Y DE HISTONA H1 POR WESTERN-BLOT EN FRACCIONES SUBCELULARES DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS FERTILES



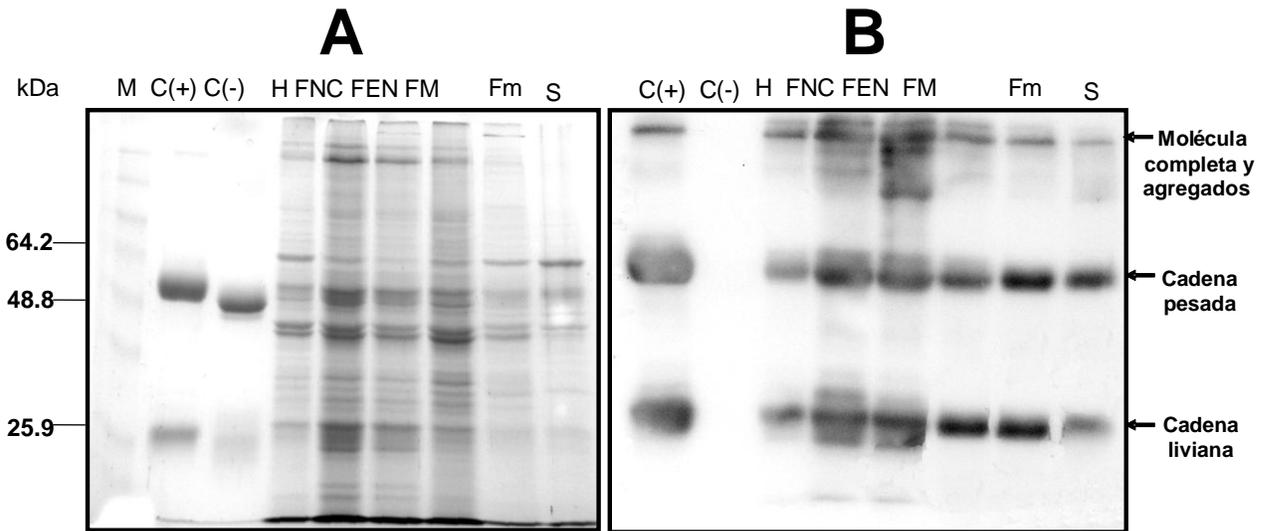
A: SDS-PAGE 15% de proteínas obtenidas de fracciones subcelulares de CGF, teñidas con azul de Coomassie.

B. Identificación de Histona H1 mediante Western-blot, utilizando suero hiperinmune anti-H1 de espermatozoide de erizo de mar y Ac secundario anti IgGs de conejo conjugado a peroxidasa en fracciones subcelulares de CGF. Revelado mediante quimioluminiscencia.

M: Marcador de masa molecular; C(+):Fracción enriquecida en núcleos de tejido hepático de ratón; C(-): IgGs de bovino; H: Homogenizado; FNC: Fracción nuclear cruda; FEN Fracción enriquecida en núcleos; FM: Fracción mitocondrial; Fm: Fracción microsomal; S: Sobrenadante.

FIGURA 8

IDENTIFICACIÓN DE IgGs EN FRACCIONES SUBCELULARES DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS INFÉRTILES



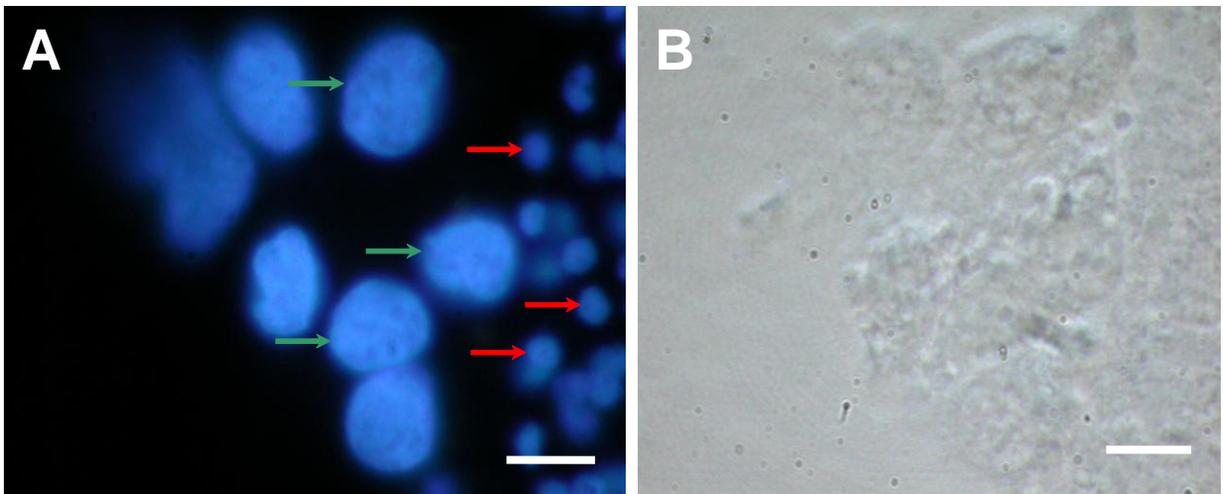
A: SDS-PAGE 12% de proteínas de fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial de CGI, teñidas con azul de Coomassie.

B. Identificación de IgGs de bovino en fracciones subcelulares de CGI identificadas mediante Western-blot, utilizando Ac anti IgG bovino molécula completa conjugado a peroxidasa. Revelado mediante quimioluminiscencia.

M: Marcador de masa molecular; H: Homogenizado; FNC: Fracción nuclear Cruda; FEN Fracción enriquecida en núcleos; FM: Fracción Mitocondrial; Fm: Fracción microsomal; S: Sobrenadante; C(+): IgGs parcialmente purificadas de suero bovino; C(-): Suero de conejo

FIGURA 9

IDENTIFICACIÓN DE NÚCLEOS DE CÉLULAS DE BOVINO Y DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS INFÉRTILES



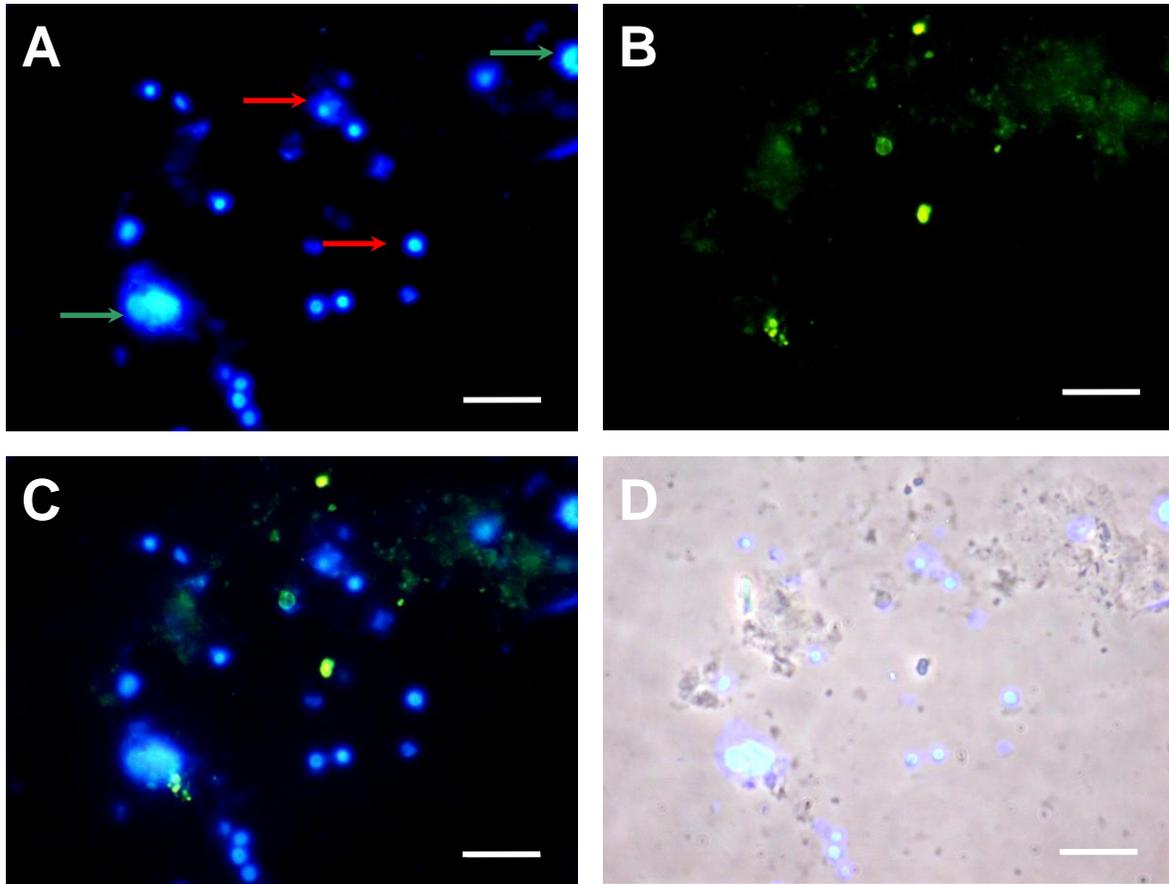
Extendido de una fracción subcelular de capa germinal de quiste hidatídico infértil enriquecida en núcleos (FEN). A. Imagen obtenida en microscopio de epifluorescencia con filtro 430 ± 20 nm de núcleos teñidos con DAPI. B. Contraste de fases. Barra 10 μm

→ Núcleos de capa germinal de quiste hidatídico infértil

→ Núcleos de células de bovino

FIGURA 10

IDENTIFICACIÓN DE IgGs EN EXTENDIDOS DE UNA FRACCIÓN SUBCELULAR ENRIQUECIDA EN NÚCLEOS (FEN) OBTENIDA DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS INFÉRTILES

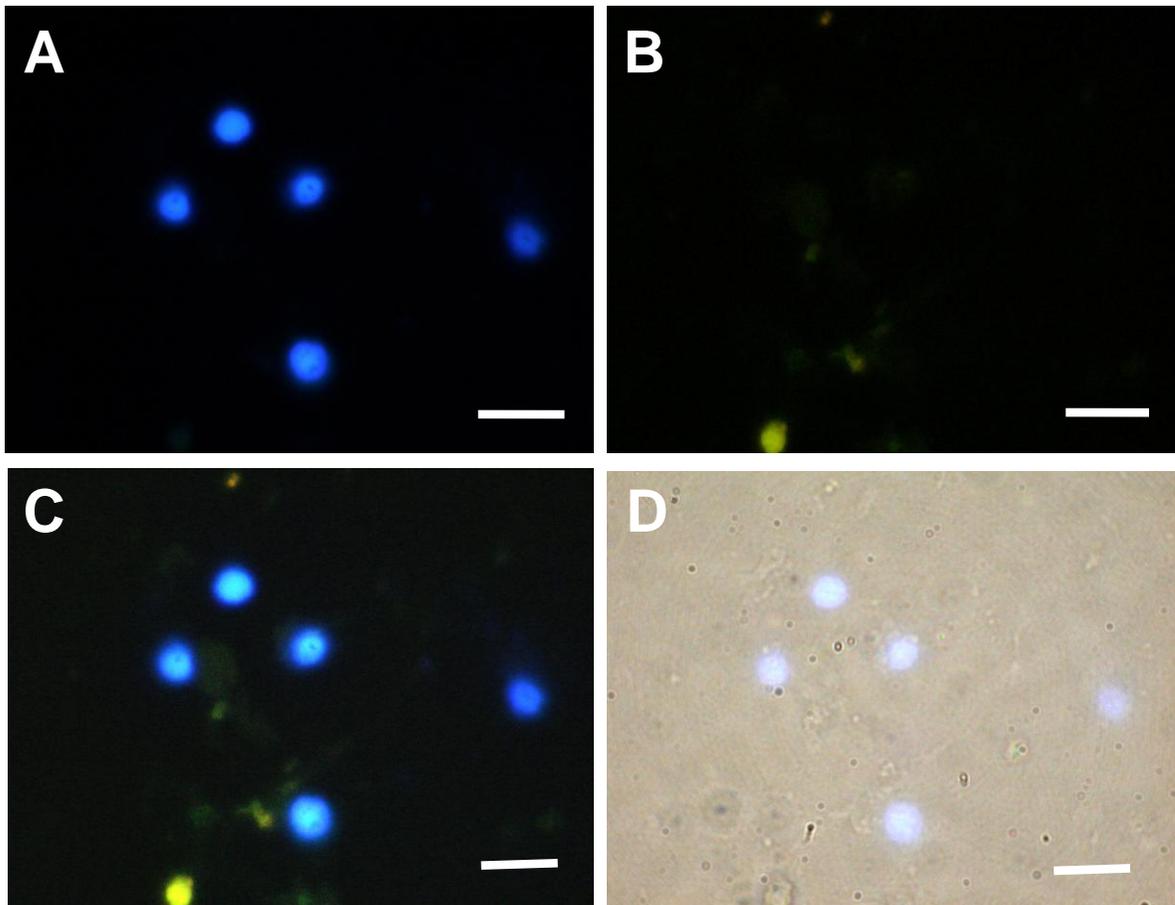


Extendidos de núcleos de capa germinal de quistes hidatídicos infértiles (FEN) incubados con Ac anti IgG bovina (1:50) y Ac secundario anti IgG de conejo conjugado a FITC (1:100). A: Imagen obtenida bajo microscopio de epifluorescencia con filtro 430 ± 20 nm de núcleos teñidos con DAPI. B: Imagen obtenida bajo microscopio de epifluorescencia con filtro 520 ± 20 nm que permite la identificación de IgGs. C: Sobreposición de A (DAPI) y B (FITC). D: Sobreposición de contraste de fases y DAPI. Barra 15 μ m

- Núcleos de capa germinal de quiste hidatídico infértil
- Núcleos de células de bovino

FIGURA 11

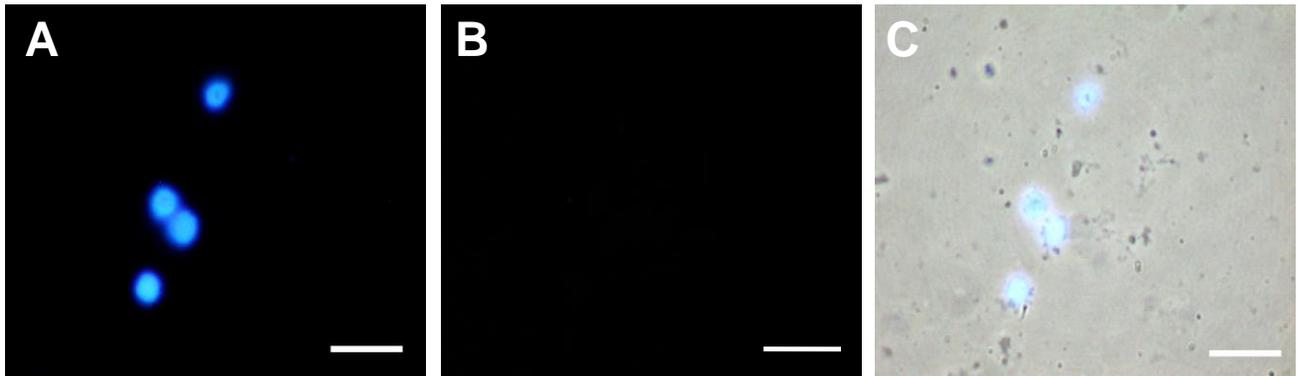
IDENTIFICACIÓN DE IgGs ASOCIADAS A NÚCLEOS DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS INFÉRTILES



Extendidos de núcleos de capa germinal de quistes hidatídicos infértiles (FEN) incubados con Ac anti IgG bovina (1:50) y Ac secundario anti IgG de conejo conjugado a FITC (1:100). A: Imagen obtenida bajo microscopio de epifluorescencia con filtro 430 ± 20 nm de núcleos teñidos con DAPI. B. Imagen obtenida bajo microscopio de epifluorescencia con filtro 520 ± 20 nm, que permite la identificación de IgGs. C: Sobreposición de A (DAPI) y B (FITC). D. Sobreposición de contraste de fases y DAPI. Barra 10 μ m

FIGURA 12

IDENTIFICACIÓN DE IgGs EN EXTENDIDOS DE UNA FRACCIÓN SUBCELULAR ENRIQUECIDA EN NÚCLEOS (FEN) OBTENIDA DE CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS FÉRTILES



Extendidos de núcleos de capa germinal de quiste hidatídico fértil (FEN) incubados con Ac anti IgG bovina (1:50) y Ac secundario anti IgG de conejo conjugado a FITC (1:100). A: Imagen obtenida bajo microscopio de epifluorescencia con filtro 430 ± 20 nm de núcleos teñidos con DAPI. B. Imagen obtenida bajo microscopio de epifluorescencia con filtro 520 ± 20 nm, que permite la identificación de IgGs. C: Sobreposición de contraste de fases y DAPI. Barra $10 \mu\text{m}$

DISCUSION

Algunos autores describen la estructura de la capa germinal dividida en 3 regiones: un tegumento que separa la capa germinal de la capa laminar, una región citoplasmática sincicial nucleada y una tercera región más interna en la que describen 5 tipos celulares (Bortoletti y Ferretti, 1978; Coltorti y Varela Díaz, 1978). De esta forma, es muy probable que al realizar una centrifugación diferencial restos de citoplasma perinuclear continúen asociadas a la FEN, debido a la naturaleza estructural del tejido sincicial.

La respuesta inmunológica del hospedero intermediario frente a la invasión de sus tejidos por quistes hidatídicos comprende el sistema del complemento, así como a los sistemas inmune celular y humoral. No obstante, algunos componentes del sistema del complemento son neutralizados en la capa laminar del quiste hidatídico, impidiendo la acción de este sistema en la destrucción de la capa germinal (Ferreira *et al*, 2000). En relación a la respuesta de tipo celular, se ha descrito la presencia de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y fibrocitos en la capa adventicia del quiste. Sin embargo, éste tipo de células es incapaz de ingresar al interior del quiste hidatídico debido a la resistencia física que ejerce la capa laminar (Zhang *et al*, 2003). En consecuencia, estas células no logran atacar las estructuras de la capa germinal.

Estudios realizados por Varela-Díaz y Coltorti (1973) señalan la presencia de IgGs en la “membrana” de quistes hidatídicos (capa germinal más capa laminar) sugerente de una respuesta inmune humoral capaz de alcanzar la capa germinal de los quistes. Al respecto, estudiando la síntesis de proteínas en quistes hidatídicos bovinos, se ha detectado

la presencia de IgGs en la capa germinal (Paredes, 2000). Las IgGs se unen fuertemente a estas estructuras del quiste, se encuentran muy concentradas en capa germinal de quistes infértiles y se asocian a muerte celular programada (Paredes, 2005).

Recientemente, se ha descrito la penetración de anticuerpos hacia el interior de células de diferentes tejidos y su asociación con apoptosis mediante el reconocimiento de antígenos citoplasmáticos o nucleares (Alarcón-Segovia *et al.*, 1996; Zack *et al.*, 1996; Ruiz-Argüelles *et al.*, 1998). De esta manera, IgGs anti-U1 snRNP pueden penetrar en el núcleo de linfocitos T humanos, inducir un arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁, y finalmente gatillar la muerte celular programada. Los mecanismos involucrados en la penetración de anticuerpos aun no se han determinado con exactitud (Ruiz-Argüelles y Alarcón-Segovia, 2001).

Cabezón (2002) estudió la localización subcelular de las IgGs en capa germinal de quistes hidatídicos bovinos mediante centrifugación diferencial, encontrando una mayor asociación de IgGs en una fracción enriquecida en núcleos. Sin embargo, solo fue posible obtener fracciones subcelulares de capa germinal parcialmente purificadas. En esta tesis se trabajó en la obtención de fracciones subcelulares con un mayor grado de pureza. En primer lugar, se aplicó una técnica standard para purificación de núcleos (Durham y Galanti, 1974; Durham *et al.*, 1975; López y Galanti, 1976; Santos, 1979) a un tejido hepático como control previo a su aplicación a la capa germinal de quistes hidatídicos. Se obtuvo una preparación de núcleos con alto grado de pureza. Posteriormente, considerando la posible contaminación de la capa germinal con la capa adventicia, que también presenta diversos tipos celulares, se comparó dos procedimientos de obtención de la muestra inicial de capa

germinal de quistes hidatídicos; uno, raspando exhaustivamente y otro, raspando suavemente la cara interna del quiste.

El nivel de pureza de la FNC y FEN de capa germinal de quistes hidatídicos fue corroborado mediante la cuantificación total y relativa de DNA y por la identificación de histonas nucleosomales y de histona H1 (figura 7), como marcadores de fracciones nucleares. Así, más del 70% del DNA total presente en el homogeneizado se encontró en la fracción nuclear cruda y la cantidad de DNA relativa a proteínas alcanzó su máximo en la fracción enriquecida en núcleos. Coincidentemente, las histonas nucleosomales (H2A, H2B, H3 y H4) así como la histona H1 sólo se encontraron en las fracciones nuclear cruda y enriquecida en núcleos. Estos resultados, así como la observación morfológica, indican que la fracción enriquecida en núcleos está altamente concentrada en estas estructuras. Alternativamente sugieren que las fracciones mitocondrial, microsomal y sobrenadante presentan una contaminación extremadamente baja con núcleos. En consideración de nuestros resultados, se analizó la presencia de IgGs por Western-blot en las diferentes fracciones subcelulares, a partir de un homogeneizado de capa germinal obtenido por raspado suave de la cara interna del quiste. Además, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para localizar IgGs en la fracción enriquecida en núcleos de la capa germinal de quistes fértiles e infértiles. Los resultados obtenidos en las diferentes fracciones subcelulares indican que éstas moléculas se encuentran en todas ellas (figura 8), sugiriendo que las IgGs penetrarían a todos los compartimentos subcelulares de la capa germinal de los quistes hidatídicos infértiles. Si bien no es posible discriminar el posible efecto redistributivo de las IgGs en los diferentes compartimentos subcelulares derivados de la homogeneización y la centrifugación a altas velocidades, está claro que una alta concentración de IgGs se encuentra en los núcleos de capa germinal. Los resultados de la

inmunocitoquímica confirman, sin ambigüedad, la concentración de las IgGs en el núcleo y/o en la región perinuclear de preparaciones obtenidas de capa germinal de quistes infértiles. No fue posible detectar IgGs en núcleos de fracciones subcelulares enriquecidas en estas estructuras, obtenidas a partir de quistes fértiles. Este resultado es coincidente con el hecho demostrado en este trabajo y en otros anteriores (Paredes, 2005) sobre la muy baja frecuencia de IgGs en capa germinal de quistes fértiles y su ausencia en protoescólices.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que, en algunos bovinos, la infección con *E. granulosus* induce una respuesta inmune humoral efectiva, que se caracteriza por la presencia de isotipo IgG. Una subfamilia de estas IgGs atraviesan las capas adventicia y laminar del quiste, así como la membrana plasmática propia de la capa germinal e ingresan a esta estructura, alojándose en los núcleos o regiones perinucleares. La relación entre estas IgGs y la infertilidad de los quistes es evidente, considerando su ausencia en capa germinal de quistes fértiles. No obstante, esta asociación debe ser rigurosamente comprobada.

CONCLUSIONES

- Se describe una técnica que permite obtener una preparación de núcleos de la capa germinal de quistes hidatídicos, altamente concentrados y con apreciable grado de pureza.
- En quistes hidatídicos infértiles, inmunoglobulinas del hospedero bovino pasan por las capas adventicia y laminar del quiste hidatídico, atraviesan la membrana plasmática propia de la capa germinal y se concentran en los núcleos y/o regiones perinucleares.
- En quistes hidatídicos fértiles se observa escasa o nula presencia de inmunoglobulinas en la capa germinal; estos anticuerpos están ausentes en protoescólices.
- Existe una fuerte asociación entre la presencia de inmunoglobulinas en la capa germinal y la infertilidad de los quistes hidatídicos.
- En consecuencia, la respuesta inmune humoral jugaría un rol importante en la determinación de la infertilidad de los quistes hidatídicos.

BIBLIOGRAFÍA

ALARCÓN-SEGOVIA, D.; LLORENTE, L.; RUIZ-ARGÜELLES, A. 1996. The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. *J Autoimmun*, 9: 295-300.

APT, W.; PÉREZ, C.; DE RYCKE, P. 1996. Tratamiento no convencional de la hidatidosis humana. *Rev. Med. Chile*. 124: 1385-1389.

BORTOLETTI, G.; FERRETI, G. 1978. Ultrastructural aspects of the fertile and sterile cyst of *Echinococcus granulosus* developed in hosts of different species. *Int. J. Parasitol.* 8 (6): 421-431.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

BURTON, K. 1956. A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of the Deoxyribonucleic Acid. *Biochem. J.* 62: 315-323.

CABEZÓN, C. 2002. Proteínas marcadoras de fertilidad de quistes hidatídicos en fracciones subcelulares de capa germinal. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. U. Chile. Escuela de Ciencias Veterinarias. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 56 p.

CANALES, M.; TORRES, M.; SANCHEZ, T.; NUÑEZ, R.; IVANOVIC, D.; DIAZ, A.; MUÑOZ, H. 1994. ELISA para el diagnóstico de hidatidosis humana. *Rev. Chile. Infect.* 11: 243-247.

COLTORTI E. A. ; VARELA-DÍAZ V. M. 1978. Inmunología e inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. *Med Argentina.* 6: 135-147.

DURHAM, J. P.; GALANTI, N. 1974. The effect of isoprotenerol upon the activiti and intracellular distribution of pyrimidine nucleoside kinases in the mouse parotid gland. *J. Biol. Chem.* 249: 1806-1813.

DURHAM, J. P.; GALANTI, N.; REVIS, N. W. 1975. The purification and characterization of plasma membranes and the subcellular distribution of adenylate cyclase in mouse parotid gland. *Biochim. Biophys. Acta*. 394: 388-405.

FERREIRA, A. M.; IRIGOÍN, F.; BREIJO, M.; SIM, R. B.; DÍAZ, A. 2000. How *Echinococcus granulosus* Délas UIT Complement. *Parasitol. Tod.* 16(4): 168-172.

GARCÍA, L.; BRUCKNE, D. 1993. *Diagnostic Medical Parasitology*. 2th ed. American Society for microbiology. Washington DC, USA. Pp. 288-297.

GEORGI, J.; GEORGI, M. 1994. *Parasitología Clínica Canina*. 1ª edición, México. Nueva editorial interamericana, p 136-142.

GONZÁLEZ, H.; PLAZA, J.; ABALOS, P. 1981. Fertilidad del quiste hidatídico en tres especies animales en Chile. estudio de vitalidad de sus escólices. *Bol. Chil. Parasitol.* 36: 14-19.

LAEMMLI, U. K. 1970. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

LÓPEZ, R.; GALANTI, N. 1976. Changes in plasma membranes during the prereplicative phase of the isoproterenol-stimulated parotid glands of mice. Arch. Biol. Med. Exper. 10: 92-99.

MARTÍNEZ, C.; PAREDES, R.; STOCK, R.P.; SARALEGUI, A.; ANDREU, M.; CABEZÓN, C.; ERLICH, R.; GALANTI, N. 2005. Cellular organization and appearance of differentiated structures in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. J. Cell Biochem. 94:327-335.

MINISTERIO DE SALUD . 2005. El Vigía N° 33. Boletín de vigilancia en salud pública en Chile. Ministerio de Salud, Chile. Tomado de: <http://epi.minsal.cl/elvigia/html/notific/resum/resum1.htm>

OJEDA, J. M.; MORA, J. R. 1998. Respuesta inmune frente a virus, bacterias y parásitos. In: Palomo, I.; Ferreira, A.; Sepúlveda, C.; Rosenblatt, M.; Vergara, U. Fundamentos de Inmunología. U. de Talca. Talca, Chile. Pp. 377-406.

PAREDES, R. 2000. Síntesis de proteínas de *Echinococcus granulosus*, marcadores potenciales de fertilidad en quistes hidatídicos. Memoria para optar al Título de

Médico Veterinario. U. Chile. Escuela de Ciencias Veterinarias. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 53 p.

PAREDES, R. 2005. *Echinococcus granulosus*: Asociación entre la respuesta inmune humoral bovina, apoptosis e infertilidad de quistes hidatídicos. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, Escuela de Post-Grado .69p.

ROMERO, R. 1999. *Echinococcus*. Microbiología y Parasitología Humana. 2°ed. Panamericana. México. pp. 700-703.

RUIZ-ARGÜELLES, A.; PÉREZ-ROMANO, B.; LLORENTE, L.; ALARCÓN-SEGOVIA, D.; CASTELLANOS, J.M. 1998. Antibody penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells. J Autoimmun, 11: 547-556.

RUIZ-ARGUELLES, A.; ALARCON-SEGOVIA. 2001. Penetration of Autoantibodies Into Living Cells, 2000. Isr Med Assoc J. 3: 121-126.

SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), Chile. 2000. Boletín N°37 Vigilancia Epidemiológica. Departamento de Protección Pecuaria. Ministerio de Agricultura. República de Chile. pp. 2-5.

SANCHEZ, C.; ESTRADA, A.; DEL CACHO, E.; QUILEZ, J.; LÓPEZ, F.; CAUSAPE, A.; VIU, M. 1997. ¿Qué es la Hidatidosis?. [en línea] <<http://www.unizar.es>> [consulta:22-04-2003]

SANTOS, M. 1979 Antígenos de histocompatibilidad en parótida de ratón, factores que regulan su exposición. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Celular. U. Católica de Chile. Depto. Biología Celular. Ins. Ciencias Biológicas. 161 p.

THOMAS, J.O.; KORNBERG, R.D. 1975. Cleavable cross-links in the analysis of histone-histone associations. *FEBS Lett.* 58: 353-358.

THOMPSON, R.C.A. 1976. The development of brood capsule and protoescolice in secondary hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Res.*, 51: 31-36.

THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J. 1988. Variation within the genus *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.* 27:210-258.

URREA-PARIS, M. A.; MORENO, M. J.; CASADO, N.; RODRIGUEZ-CAABEIRO,

F. 1999. *Echinococcus granulosus*: Praziquantel treatment against the metacestode stage. Parasitol. Res. 85:999-1006.

VARELA-DÍAZ, V. M.; COLTORTI, E. A. 1973. The presence of host

immunoglobulins in hydatid cyst membranes. J. Parasitol; 59, N° 3: 484-488.

WILLIAMS Jr, R.C.; PEEN, E. 1999. Apoptosis and cell penetration by autoantibody

may represented linked processes. Clin. and Exp. Reum. 17: 643-647.

ZACK, D.J.; STEMPNIAK, M.; WONG, A. L.; TAYLOR, C.; WEISBART, R. H.

1996. Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. J. Immunol. 157: 2082-208

ZHANG, W.; LI, J.; DONALD, P. MCMANUS. 2003. Concepts in immunology and

diagnosis of hydatid disease. Clin Microbiol Rev. 16: 8.