

Plan Nuevo

T  
15  
30

Prov. 4. 13/69

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

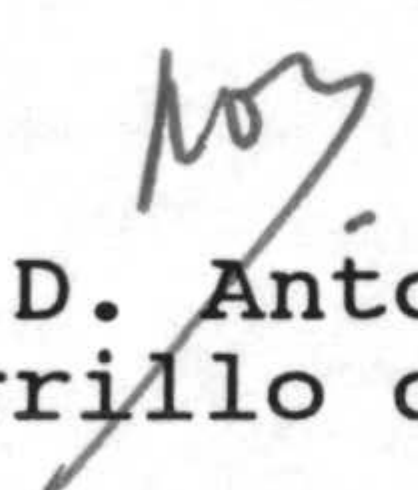
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 26 FEB 1992  
ENTRADA NUM. 377



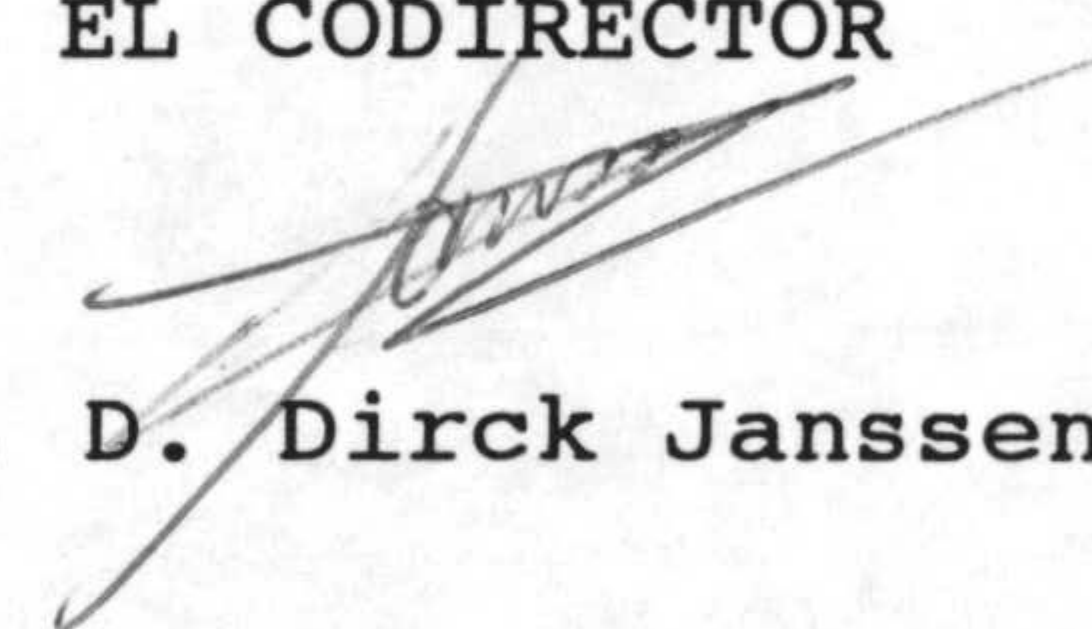
ASPECTOS BIOLOGICOS DEL FACTOR CITOTOXICO EXISTENTE EN EL LIQUIDO  
HIDATIDICO



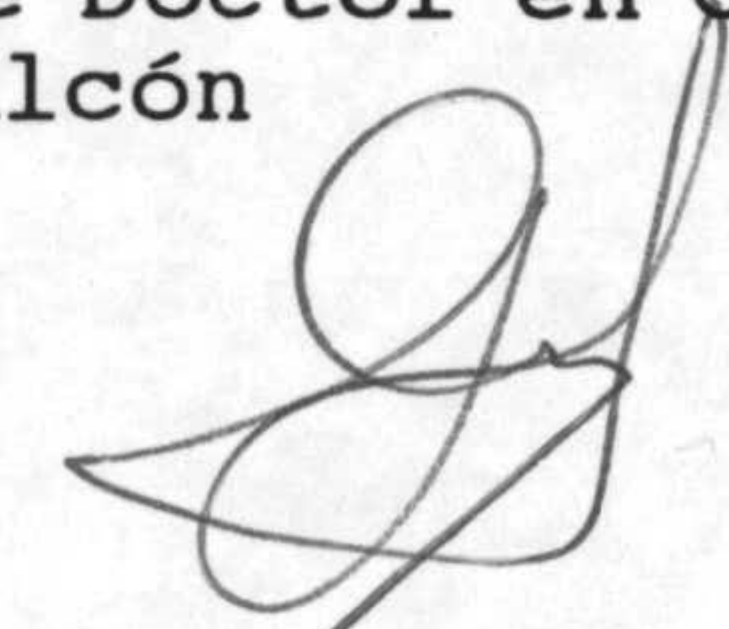
EL DIRECTOR

  
Prf. Dr. D. Antonio  
Osuna Carrillo de Albornoz

EL CODIRECTOR

  
Dr. D. Dirck Janssen

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas, por el Licenciado Jaime Lazúen Alcón

  
Jaime Lazúen Alcón

Granada, 1.992



D. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ, Catedrático de Parasitología de la Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la presente memoria titulada: "ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL FACTOR CITOTÓXICO EXISTENTE EN EL LIQUIDO HIDATÍDICO" que para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta Jaime Lazúen Alcón, han sido realizado bajo mi dirección.



Fdo. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz



**INDICE**



1.1.- EL PARASITO Echinococcus granulosus.	2
1.2.- MORFOLOGIA, BIOLOGIA Y CICLO DE VIDA DE E. granulosus.	2
1.3.- EPIDEMIOLOGIA DE E. granulosus.	6
1.4.- PATOLOGIA Y SINTOMATOLOGIA.	7
1.5.- DIAGNOSTICO.	8
1.6.- PROFILAXIS Y TRATAMIENTO.	9
1.7.- INMUNOMODULACION EN INFECCIONES PARASITARIAS.	10
2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.	24
2.2.- LINEAS CELULARES EMPLEADAS.	24
2.2.1.- Células Vero.	24
2.2.1.1.- Origen e historia de las células Vero.	24
2.2.1.2.- Mantenimiento de células Vero en laboratorio.	24
2.2.1.3.- Criopreservación de células Vero.	24
2.2.1.4.- Subcultivos continuos de células Vero.	25
2.2.1.5.- Separación de las células Vero del substrato.	26
2.2.2.- Fibroblastos de ratón.	26
2.2.2.1.- Obtención de fibroblastos de ratón.	26
2.2.3.1.- Subcultivo de fibroblastos de ratón.	27
2.2.3.- Macrófagos RAW 264'7.	27
2.2.3.1.- Historia, procedencia y características de los macrófagos RAW 264'7.	27
2.2.3.2.- Mantenimiento en laboratorio.	28
2.2.3.3.- Criopreservación de macrófagos RAW 264'7.	28
2.2.3.4.- Cultivos continuos de Macrófagos RAW 264'7.	28
2.2.3.5.- Subcultivo de Macrófagos RAW 264'7.	28
2.2.4.1.- Macrófagos peritoneales de ratón.	28
2.2.4.2.- Método de obtención de los macrófagos.	29
2.3.- PROCESADO DEL LIQUIDO HIDATIDICO.	29
2.3.1.- Precipitación de proteínas.	29
2.3.2.- Obtención de fracción lipídica.	30
2.3.3.- Obtención de la fracción lipopolisacarídica.	30
2.3.4.- Determinación de proteínas.	31
2.3.5.- Determinación de azúcares.	31
2.3.6.- Determinación de lípidos.	32
2.4.- METODOS DE PURIFICACION DE LA FRACCION TOXICA.	32
2.4.1.- Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía en capa fina.	33
2.4.1.2.- Lavado y activación de placas de cromatografía en capa fina.	33
2.4.1.3.- Aplicación de los lípidos sobre la placa de sílica gel.	33
2.4.1.4.- Desarrollo de la cromatografía.	34
2.4.1.5.- Revelado de las placas.	34
2.4.1.6.- Recuperación de la muestra.	35
2.4.2.- Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).	35
2.4.3.1.- Recuperación de la muestra.	36
2.4.3.- Cromatografía de afinidad del líquido hidatídico.	36
2.5.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.	36
2.5.1.- Criterios de citotoxicidad.	37
2.5.1.1.- Siembra de células en placa de microtitulación.	37
2.5.1.2.- Utilización del colorante vital Azul Trypan.	37
2.5.1.3.- Tinción de células con Azul Trypan.	38
2.5.1.4.- Liberación específica de Cromo 51 (Cr 51).	38
2.5.1.5.- Marcaje de células con Cromo 51.	38
2.5.2.- Modificaciones en los niveles de incorporación de análogos radiactivos, inducidas por las fracciones citotóxicas del líquido hidatídico.	39



2.5.2.1.- Marcaje de las células con timidina (H3).	39
2.6.- Dosis de fracción tóxica utilizada en los ensayos in vitro.	40
2.7.- CARACTERIZACION DE LA/LAS FRACCIONES TOXICAS.	41
2.7.1.- Tinciones específicas de TLC para descartar presencia de grupos nitrogenados.	41
2.7.2.- Cromatografía de Gases-espectrometría de Masa ( CG-EM ).	42
2.7.3.- Resonancia magnética Nuclear (RMN).	42
2.7.4.- Espectroscopía infrarroja.	42
2.7.5.- Bloqueo de grupos activos.	43
2.8.- ESTUDIO DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LA FRACCION TOXICA DEL LIQUIDO HIDATIDICO.	44
2.8.1.- Estudio de la posible inducción a la producción de radicales libres en células linfoides.	44
2.8.1.1.- Efecto del agua oxigenada (H2O) sobre la citotoxicidad de la fracción obtenida de líquido hidatídico en macrófagos peritoneales de ratón.	44
2.8.1.2.- Estudio del efecto de la catalasa sobre la capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón.	45
2.8.1.3.- Estudio de la capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón, en un medio suplementado con glutatión reducido.	45
2.8.1.4.- Efecto del T-Butil Hidroperóxido, en la capacidad citotóxica de la fracción tóxica, sobre macrófagos peritoneales de ratón.	46
2.8.1.5.- Efecto de los inhibidores del glutatión sobre la capacidad citotóxica de la de la fracción obtenida de líquido hidatídico.	46
2.8.1.5.1.- Efecto de la butionina sulfoximida (BSO).	47
2.8.1.5.2.- Efecto del 1-cloro-2,4-dinitro-benceno (CDNB).	47
2.8.2.- Determinación de malon-dialdehido (M.D.A.), como método indirecto de peroxidación de lípidos de membrana, inducida por la fracción tóxica del líquido hidatídico.	47
2.8.3.- Efecto de la fibronectina en la capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón.	49
2.8.4.- Efecto del pretratamiento "in vitro", de macrófagos peritoneales de ratón, con 6-metil-prednisolona, sobre la citotoxicidad inducida por la fracción tóxica del líquido hidatídico, "in vitro".	49
2.8.5.- Acción del ionóforo A-23187 en el efecto citotóxico de la fracción obtenida de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón.	50
2.8.6.- Estudio de la capacidad citotóxica de la fracción tóxica de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón activados.	51
2.8.6.1.- Efecto de la fracción tóxica de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón, activados con coadyuvante de Freund.	51
2.8.6.2.- Efecto de la fracción tóxica de líquido hidatídico sobre macrófagos incubados previamente con $\gamma$ -interferón.	51
2.9.- EFECTO DE LA FRACCION TOXICA DE LIQUIDO HIDATIDICO, SOBRE DISTINTAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS CELULARES.	52



2.9.1.-	Determinación de la actividad enzimática de la ciclo-oxigenasa.	
2.9.2.-	Determinación de la actividad del enzima lipoxigenasa (Linoleato-oxígeno-oxidoreductasa).	53
2.9.3.-	Determinación de la actividad enzimática de la malatodeshidrogenasa, (I-Malato:NAD oxidoreductasa).	54
2.9.4.-	Determinación de la actividad enzimática de la NAD (p) H Osidoreductasa.	54
2.9.5.-	Determinación de la actividad enzimática de la lacto-deshidrogenasa.	55
2.10.-	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE MACROFAGOS.	55
2.10.2.-	Microscopía electrónica de transmisión.	55
2.11.-	CONTROLES REALIZADOS AL MATERIAL BIOLÓGICO.	56
2.11.1.-	Control de disolventes utilizados para extracción de la fracción soluble del líquido hidatídico en cloroformo.	56
2.11.2.-	Control de los envases que contenían el líquido hidatídico, utilizado en la realización del presente trabajo.	57
2.11.3.-	Estudio del efecto producido por el extracto obtenido de incubar la solución de albúmina en el envase que contenía el líquido hidatídico sobre la actividad de las enzimas: Ciclo-oxigenasa, Lipoxigenasa, Malatodeshidrogenasa, Lactodeshidrogenasa y NADH-oxidasa.	58
2.12.-	PLANIFICACION DE EXPERIENCIAS.	58
2.13.-	SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS.	60
2.13.1.-	Solución de Hank.	60
2.13.2.-	Líquido de desarrollo para cromatografía en capa fina.	60
2.13.3.-	Tampón de la muestra para electroforésis.	60
2.13.4.-	Líquido de centelleo.	60
2.13.5.-	PBS.	61
2.13.6.-	PBS-EDTA.	61
3.-	RESULTADOS	
3.1.-	Determinación de proteínas, lípidos y lipopolisacáridos que componen el líquido hidatídico.	64
3.2.-	Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía en capa fina.	64
3.3.-	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS.	68
3.3.1.-	Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre macrófagos peritoneales de ratón.	69
3.3.2.-	Determinación de la capacidad citotóxica de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina de macrófagos peritoneales de ratón.	70
3.3.3.-	Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre macrófagos de la línea celular RAW 246'7.	71
3.3.4.-	Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre macrófagos de línea celular RAW 246'7.	72
3.3.5.-	Determinación de la capacidad citotóxica de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre células no linfoides.	73
3.3.5.1.-	Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre células pertenecientes a la línea celular Vero.	74



3.3.5.2.- Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre fibroblastos de embrión de ratón.	
3.4.- Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía en HPLC.	76
3.4.1.- Ensayo de citotoxicidad de los picos obtenidos por cromatografía en HPLC sobre macrófagos peritoneales de ratón.	77
3.5.- Ensayo de citotoxicidad del antígeno obtenido mediante cromatografía de afinidad.	78
3.6.- CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DE LA FRACCION TOXICA.	79
3.6.1.- Tinciones específicas de TLC para descartar presencia de grupos nitrogenados.	79
3.6.1.1.- Método de revelado con nihidrina.	79
3.6.1.2.- Método de revelado con fluorescamina.	80
3.6.2.- Bloqueo de grupos activos.	81
3.6.2.1.- Bloqueo del grupo carboxilo utilizando diazometano.	81
3.6.2.2.- Bloqueo del grupo carboxilo utilizando metanol HCl.	82
3.6.2.3.- Bloqueo de grupos hidroxilo.	83
3.6.2.4.- Acetilación (bloqueo de grupos amino).	84
3.7.- ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LAS BANDAS QUE HAN MOSTRADO ACTIVIDAD.	85
3.7.1.- Espectro de RMN C13 de la banda 0,34.	86
3.7.2.- Espectro RMN Protones de la banda 0,34.	87
3.7.3.- Espectro RMN C13 de la banda 0,55.	88
3.7.4.- Espectro RMN Protones de la banda 0,55.	89
3.8.- ESPECTROS DE VOLATILIZACION Y MASAS POR INYECCION DIRECTA DE LAS BANDAS QUE HAN MOSTRADO ACTIVIDAD.	90
3.8.1.- Curva de volatilización de la banda 0,34.	91
3.8.2.- Espectro de masas del pico nº 1 de la banda 0,34.	92
3.8.3.- Espectro de masas del pico nº 2 de la banda 0,34.	93
3.8.4.- Espectro de masas del pico nº 3 de la banda 0,34.	94
3.8.5.- Curva de volatilización de la banda 0,55.	95
3.8.6.- Espectro de masas del pico aparecido en la banda 0,55.	96
3.9.- ESPECTROS DE INFRARROJO DE LAS BANDAS 0,34 y 0,55.	97
3.9.1.- Espectro de infrarrojo de la banda de rf. 0,34.	98
3.9.2.- Espectro de infrarrojo de la banda 0,55.	99
3.10.- ESTUDIO DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCION.	100
3.10.1.- Incorporación de Timidina (H)3 por macrófagos peritoneales de ratón.	101
3.10.2.- Estudio de la inducción a la producción de radicales libres por la fracción tóxica sobre macrófagos peritoneales de ratón.	102
3.10.2.1.- Efecto del agua oxigenada (H2O2) sobre la citotoxicidad de la fracción obtenida de líquido hidatídico frente a macrófagos peritoneales de ratón.	102
3.10.2.2.- Efecto de la catalasa en la capacidad citotóxica de la fracción obtenida de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón.	103
3.10.2.3.- Efecto del glutatión reducido sobre la capacidad citotóxica de la fracción clorofórmica obtenida de líquido hidatídico, frente a macrófagos peritoneales.	104
3.10.2.4.- Capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón, incubados con T-Butil Hidroperóxido.	105



3.10.3.- Efecto de los inhibidores del glutati3n sobre la citotoxicidad de la fracci3n obtenida de l3quido hidat3dico.	106
3.10.3.1.- Efecto de la butionina sulfoximida (BSO), sobre la capacidad citot3xica de la fracci3n clorof3rmica obtenida de l3quido hidat3dico, sobre macr3fagos peritoneales de rat3n.	106
3.10.3.2.- Capacidad citot3xica de la fracci3n clorof3rmica obtenida de l3quido hidat3dico, sobre macr3fagos peritoneales de rat3n, en un medio de interacci3n suplementado con 1-cloro-2,4-dinitro-benceno (CDNB).	107
3.10.4.- Estudio de fen3menos de peroxidaci3n de l3pidos de membrana, mediante la cuantificaci3n de los niveles de Mal3n-Dialdeh3do (MDA).	108
3.10.5.- Capacidad citot3xica de la fracci3n obtenida de l3quido hidat3dico sobre macr3fagos peritoneales, provenientes de ratones inyectados con 6-metil-prednisolona.	109
3.10.6.- Efecto de la Fibronectina sobre la citotoxicidad de la fracci3n obtenida de l3quido hidat3dico, sobre macr3fagos peritoneales de rat3n.	110
3.10.7.- Efecto de la fracci3n t3xica de l3quido hidat3dico, sobre macr3fagos peritoneales de rat3n incubados con el ion3foro A23187.	111
3.10.8.- Capacidad citot3xica de la fracci3n obtenida de l3quido hidat3dico, sobre macr3fagos activados.	112
3.10.8.1.- Efecto de la fracci3n t3xica de l3quido hidat3dico sobre macr3fagos peritoneales de rat3n obtenidos de ratones inyectados con la fracci3n lip3dica de coadyuvante de Freund.	112
3.10.8.2.- Capacidad citot3xica de la fracci3n de l3quido hidat3dico sobre macr3fagos peritoneales de rat3n, incubados con $\gamma$ -interfer3n.	113
3.11.- DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.	114
3.11.1.- Determinaci3n de la actividad enzim3tica de la enzima ciclo-oxigenasa, frente a la banda 0,34.	115
3.11.2.- Determinaci3n de la actividad enzim3tica de la enzima lipoxigenasa frente a la banda 0,34.	116
3.11.3.- Determinaci3n de la actividad enzim3tica de la enzima malato-deshidrogenasa frente a la banda 0,34.	117
3.11.4.- Determinaci3n de la actividad enzim3tica de la enzima NADPH-oxidasa, frente a la banda 0,34.	118
3.11.5.- Determinaci3n de la actividad enzim3tica de la enzima lacto-deshidrogenasa, frente a la banda 0,34.	119
3.12.- CONTROLES REALIZADOS A DISOLVENTES Y ENVASES.	120
3.12.1.- Espectro de Gases-Masas del cloroformo.	121
3.12.2.- Espectro de Gase-Masas del metanol.	122
3.12.3.- Espectro de Gases-Masas del hexano.	123
3.12.4.- Espectro de Gases-Masas del dietileter.	124
3.12.5.- Espectro de Gases-Masas del 3cido ac3tico.	125
3.12.6.- Espectro RMN C13 del extracto clorof3rmico obtenido del envase.	126
3.13.- CONTROLES REALIZADOS AL MATERIAL BIOL3GICO.	127
3.13.1.- Cromatograf3a en capa fina del extracto obtenido, tras incubar la soluci3n de alb3mina, en el envase de l3quido hidat3dico.	127



3.13.2.- Perfil laser de la cromatografía en capa fina del extracto de la solución de albúmina en el envase de líquido hidatídico.	128
3.13.3.- Area y situación relativa de cada banda.	129
3.13.4.- Estudio de la actividad citotóxica de cada una de las bandas obtenidas al cromatografiar el extracto de la solución de albúmina, en el envase de líquido hidatídico, frente a macrófagos peritoneales de ratón.	130
3.14.- Espectro de RMN C13 de la banda 0,33 obtenida del extracto de la solución de albúmina, en el envase del líquido hidatídico.	131
3.15.- Espectro de infrarrojo de la banda 0,33 obtenida del extracto de la solución de albúmina, en el envase del líquido hidatídico.	132
3.16.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima ciclo-oxigenasa frente a la banda 0,33, proveniente del envase que contenía el líquido hidatídico.	133
3.17.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima lipoxigenasa frente a la banda 0,33, proveniente del envase que contenía el líquido hidatídico.	134
3.18.- Determinación de la actividad de la enzima malato-deshidrogenasa frente a la banda 0,33, proveniente del envase que contenía el líquido hidatídico.	135
3.19.- Determinación de la actividad de la enzima lacto-deshidrogenasa frente a la banda 0,33, proveniente del envase que contenía el líquido hidatídico.	136
3.20.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima NADPH-oxidasa frente a la banda 0,33, proveniente del envase que contenía el líquido hidatídico.	137
3.21.- Microscopía electrónica de transmisión.	138
4.- DISCUSION.	
5.- CONCLUSIONES.	158
1.5.- BIBLIOGRAFIA.	159



**1.- INTRODUCCION:**



### **1.1.- EL PARASITO *Echinococcus granulosus*.**

El parásito *Echinococcus granulosus* es un cestode perteneciente al Orden Cyclophyllidea, agente causal de la hidatidosis ó Equinococosis. Se trata de una zoonosis que afecta tanto a animales herbívoros como omnívoros.

Es una de enfermedad extendida por toda las las zononas ganaderas del planeta, incluida la cuenca mediterránea, con importantes implicaciones sanitarias y económicas para el hombre y animales domésticos.

Desde el año 1.982 es considerada esta parasitosis en España, como enfermedad de declaración obligatoria.

### **1.2.- MORFOLOGIA, BIOLOGIA Y CICLO DE VIDA DE *E. granulosus*.**

El ciclo de vida de *E. granulosus* fue experimentalmente comprobado por Siebold (1.853), y poco después Virchow (1.855) reconoce a este cestode como agente causal del denominado carcinoma coloide.

En estado adulto *E. granulosus* tiene una longitud de 3 a 5 mm.; con un escolex piriforme de un tamaño de 300  $\mu\text{m}$  de diámetro, con cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos, siendo variable su número y longitud según la cepa de la que se trate. Con el rostelo y ventosas se fija a las criptas intestinales del duodeno y yeyuno de los hospedadores definitivos; los cánidos. Posterior al escolex le sigue un cuello corto, continuándose con un estróbilo constituido por tres anillos o proglótides (un anillo inmaduro, uno maduro y uno grávido, siendo este de mayor tamaño que los otros dos). El anillo posee un número variable de testículos, que oscila entre 45 y 60, con una distribución tanto anterior como posterior al poro genital. En la parte posterior del anillo, aparece un ovario bilobulado.

En el anillo grávido se observa un útero maduro con evaginaciones laterales; este puede disgregarse liberando los huevos en número no superior a 800.

El huevo es similar en estructura y forma al de otros cyclophyllideos y en especial el del género Taenia. Es redondeado u ovoide con un diámetro que oscila entre 30 y 40  $\mu\text{m}$ , con un embrión hexacanto englobado en el embrióforo



## *Antecedentes*

---

Los huevos de *Echinococcus granulosus* son muy resistentes a agentes físicos, lo que hace que se mantengan infectivos por un largo período de tiempo, pudiendo llegar a más de 2 años, en condiciones de sequedad y a temperaturas no extremas.

Al ser ingeridos estos huevos por un hospedador intermediario, susceptible de ser parasitado, (hasta 50 especies, entre ellas el hombre), por acción de los enzimas digestivos, se produce la eclosión de las larvas hexacantas que se activan en presencia de la bilis y se fijan a las microvellosidades intestinales del duodeno. Atravesando la mucosa intestinal por acción de los enzimas histiolíticas secretadas por el parásito, alcanzan la circulación portal siendo llevadas hasta el

hígado. En ocasiones se puede producir el paso de embriones a la cavidad cardíaca derecha y por vía suprahepática cava inferior, pueden alcanzar el pulmón. Otros embriones puede pasar al corazón izquierdo y de aquí pueden pasar a bazo, riñón etc.. a través de la aorta.

Una vez localizado el embrión en un órgano dado, a los cuatro días aproximadamente, se produce una vesicularización de la larva hexacanta, dando esta lugar a un pequeño quiste hidatídico. El crecimiento medio del quiste suele ser de 1 mm por mes llegando a alcanzar tamaños muy variables, y en ocasiones monstruosos. El tamaño medio es de 6-7 cm. pudiendo alcanzar los 20 cm. de diámetro.

El quiste consta de membranas y líquido hidatídico.

La membrana quística se diferencia pronto en una membrana laminar de localización externa, opaca, acelular. Está formada por una serie de subcapas de aspecto fibroso. Más internamente aparece la membrana germinativa, nucleada, de la que parten masas de células hacia el interior de la cavidad del quiste. Estas masas en un principio presentan vacuolas y posteriormente aparecen pedunculadas, dando origen a las cápsulas prolíferas, que pueden estar unidas a la membrana germinativa o bien encontrarse libres en el interior del quiste.

A los quistes que no forman estas cápsulas se les denomina estériles, infértiles o acefalocísticos.

A partir de la membrana interna de las cápsulas prolíferas, se forman los protoscólices que se encuentran invaginados. Tanto las cápsulas prolíferas como los protoscólices pueden estar libres en el interior del quiste, lo que sucede sobre todo en quistes viejos, contribuyendo



## *Antecedentes*

---

a la formación de la denominada arena hidatídica.

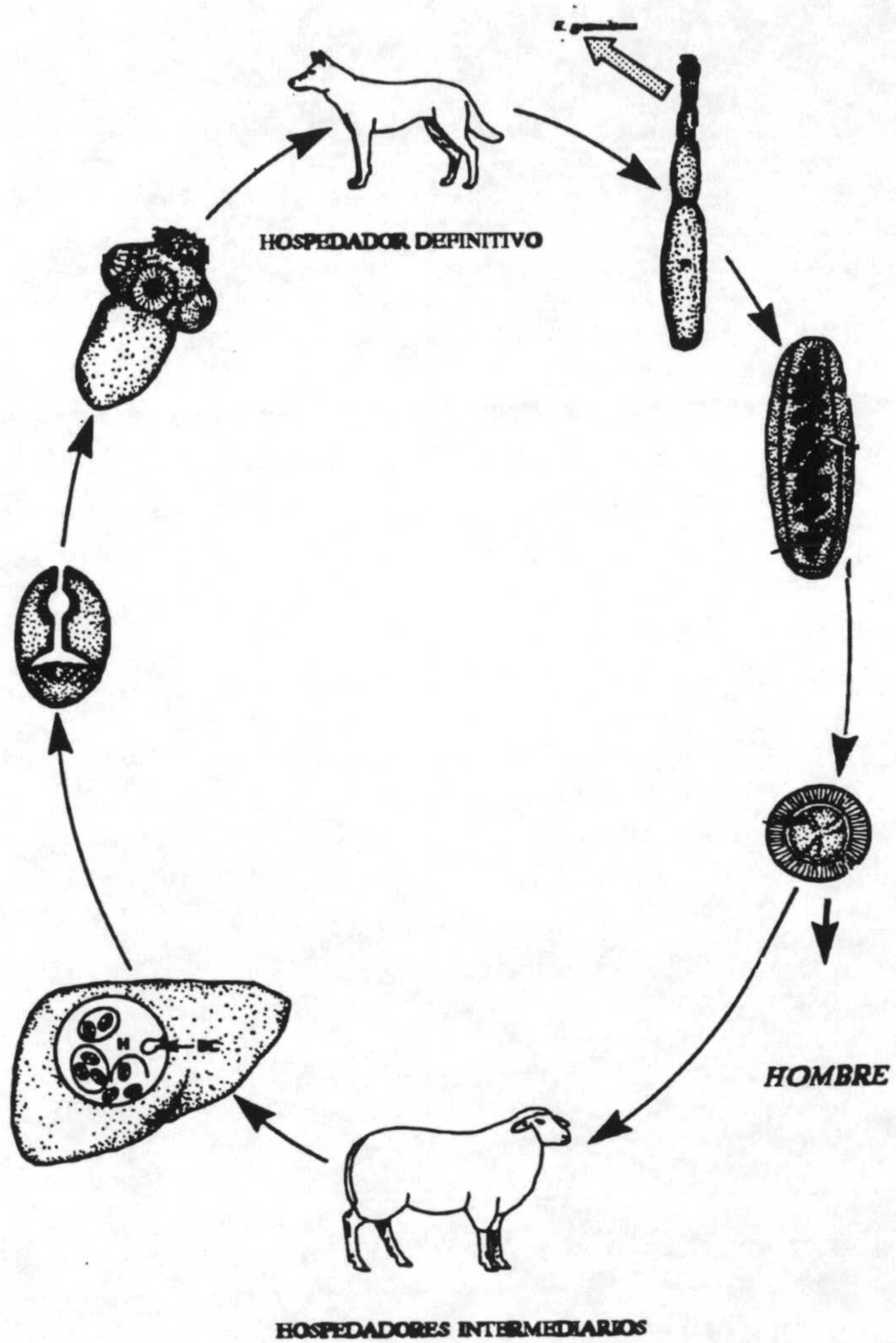
En el interior de la cavidad quística se encuentra un líquido transparente, cristalino, en cuya composición aparece agua, NaCl, hidratos de carbono, proteínas, lípidos, y cierto tipo de sustancias con propiedades antigénicas. Es a este líquido al que se le denomina Líquido Hidatídico.

En la zona de contacto con el tejido en el que se encuentra el quiste, se produce una reacción tisular que da lugar a la formación de una estructura denominada membrana adventicia, cuyos constituyentes fundamentales son células epitelioideas, linfocitos, monocitos, neutrófilos polimorfonucleares y tejido parenquimatoso.

La descripción anteriormente realizada se corresponde con un quiste tipo unilocular, diferente del alveolar producido por otra especie, *E. multilocularis*.

Cuando un hospedador definitivo (un cánido), ingiere vísceras procedentes de un hospedador intermediario que alberga quistes fértiles, los protoscolices, tras la acción de los enzimas gástricos y bajo el estímulo de la bilis y con el cambio de pH, se evaginan y fijan a las vellosidades intestinales. El período que transcurre desde la ingestión del protoscoles a la aparición de huevos del parásito en heces es de 30 a 40 días.





CICLO DE VIDA DE *Echinococcus granulosus*



### 1.3.- EPIDEMIOLOGIA DE *E. granulosus*.

Hasta el momento se han descrito cuatro especies del género *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthus*. Sólo las tres primeras parasitan al hombre, si bien Lopera y col. (1.989) describen un quiste ocular humano producido por *E. oligarthus*.

La especie *E. granulosus*, es una especie cosmopolita, si bien, se pueden definir focos endémicos donde la parasitación es más intensa. Así ocurre en Australia, Nueva Zelanda y los países de la cuenca mediterránea. La región de Río Negro en Argentina se considera hoy como la zona de mayor incidencia de la parasitación, que coincide con las zonas del planeta de más extensa actividad ganadera.

En España coinciden las zonas de cría de ganado ovino y bovino con las mayores tasas de parasitación. En la zona de Castilla-León y Castilla-La Mancha las tasas de parasitación humana son, del orden del 40 x 100.000 habitantes, mientras que las tasas de incidencia en algunas zonas de Andalucía son muy inferiores al valor anterior, así por ejemplo en el año 1.990 se han diagnosticado 31 casos de los que 2 se han diagnosticado en la provincia de Granada (Boletín Epidemiológico Semanal, 1.991).

Las peculiaridades biológicas del parásito que ya hemos indicado, su amplia distribución geográfica, su capacidad de autofecundación, viabilidad de los quistes etc.. determinan la aparición de variabilidad intraespecífica, habiéndose determinado diferentes cepas dentro en *E. granulosus* (McManus y Smyth, 1.986)

Se ha descrito un ciclo rural perro-oveja, hablándose también de un ciclo urbano o periurbano en el que se engloba el hombre, y un ciclo salvaje con herbívoros y cánidos salvajes, que se da mayoritariamente en regiones meridionales. En las zonas Árticas se han descrito ciclos rurales y salvajes con distintos hospedadores intermediarios. Los ciclos no son cerrados, sino que pueden dar interacciones entre ellos (Schantz, 1.983). En las Islas Británicas coexisten el ciclo perro-oveja con el ciclo perro-caballo, considerándose como cepas diferentes las responsables de la infestación en cada caso (Smyth, 1.979).



El que existan o no cada uno de estos ciclos depende, de factores socio-económicos relacionados con comportamientos humanos, llegando a influencias religiosas, con hábitos profesionales y educación sanitaria.

Aparecen diferentes mecanismos de transmisión dependiendo de la fase de desarrollo del parásito y del hospedador de que se trate.

La transmisión del parásito al hombre se suele producir por vía directa con los animales que actúan como hospedadores intermediarios (perro, lobo, zorro, etc..), o bien de un modo indirecto, a través de aguas o alimentos contaminados con huevos del cestode. Los hospedadores intermediarios habituales se infectan por ingestión de huevos dispersos en el suelo o en el agua.

#### **1.4.- PATOLOGIA Y SINTOMATOLOGIA.**

Se producen variaciones en cuanto a la patología y sintomatología producida por *E. granulosus*, según sea la localización y el tamaño que alcance el quiste en su desarrollo.

El desarrollo del parásito puede ser asintomático durante largos periodos de tiempo, debido su lento crecimiento.

La aparición de síntomas variará según la localización del parásito, de tal forma que si se localiza en cabeza (dado que el cráneo es una cavidad inextensible), los síntomas aparecerán más rápidamente que si se localiza en la zona abdominal (es una cavidad ampliamente extensible). En este tipo de localizaciones la sintomatología comienza a aparecer cuando el tamaño del quiste entra en conflicto con algún órgano. Si el tamaño del quiste aumenta desproporcionadamente, se puede producir una fisura en el mismo, vertiendo pequeñas cantidades de líquido hidatídico a la circulación, produciéndose por parte del hospedador una reacción anafiláctica acompañada de eritema, urticaria y prurito; ocasionalmente se ha descrito la aparición de abscesos bronquiales, biliares o procesos de embolismo arterial como consecuencia de la diseminación de restos quísticos en localizaciones periféricas, pudiendo producirse un choque anafiláctico.

En un 70% aproximadamente, la localización del quiste es hepática, afectando principalmente al lóbulo derecho y cursando con síntomas inespecíficos, tales como, dolor



abdominal, ictericia y procesos febriles. Los quistes que se encuentran en la zona convexa del hígado pueden dar lugar a una elevación del diafragma.

La segunda localización quística más frecuente es la pulmonar afectándose fundamentalmente al pulmón derecho, en su región inferior, produciendo ruptura bronquial acompañada de hemoptisis, tos y expectoración crónica pudiéndose expulsar contenido del quiste mediante la tos, denominándose vómica. En estos casos puede llegar a producirse la recuperación total del paciente.

Otras localizaciones menos frecuentes son el riñón, zona cardíaca, bazo, ojo, adrenes, localización esplénica etc...

En determinadas ocasiones se puede producir la calcificación del quiste dándose una involución del mismo y una curación espontánea del paciente.

Según esto, podemos afirmar que la equinocosis unilocular puede localizarse prácticamente en cualquier órgano y ser confundida con una amplia gama de enfermedades.

### **1.5.- DIAGNOSTICO.**

El diagnóstico de esta parasitosis puede realizarse tanto por métodos directos como indirectos.

Los métodos directos ofrecen un diagnóstico presuntivo. Entre ellos podemos destacar: el examen radiológico, la ecografía y la tomografía axial computarizada (TAC) (Rickard y Williams, 1.982).

- El tests de fijación del complemento, utilizado por primera vez para el diagnóstico de esta parasitosis por Ghedini en 1.906. Este método ha sido deshechado por Dighero y Bradstreet (1.979) argumentando falta de especificidad, dado que se producían gran cantidad de falsos positivos tras una extensa encuesta epidemiológica.

- Casoni, en 1.912 utiliza el método de la intradermoreacción mediante una inyección subcutánea de un homogenado de quiste hidatídico, (con el riesgo que este método comporta, por la posible aparición de reacciones anafilácticas). Esta misma técnica es modificada por Hammerberg y col (1.977), los cuales encontraron, que el homogenado contiene gran cantidad de sustancias que no son específicas del quiste hidatídico, motivo por el cual se producirían



falsos positivos.

Por otra parte, Schantz y Gottstein en 1.985, comienzan a utilizar el método de aglutinación indirecta, posteriormente llamado hemaglutinación indirecta, con buenos resultados en lo que a sensibilidad se refiere, pudiendo detectar muy bajos niveles de anticuerpos circulantes.

- En la actualidad, se utiliza con éxito la técnica indirecta de anticuerpos marcados, generalmente con sustancias fluorescentes, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se utiliza como antígeno, fragmentos de protoscolex absorbidos sobre celulosa (Gore y col., 1.970) o bien fracciones antigénicas presentes en el líquido hidatídico (Matossian y col., 1.979).

- La especificidad del test ELISA ha sido demostrada por Rickard y col., 1.984, utilizando antígenos presentes en líquido hidatídico, fraccionados mediante precipitación con sales (p.e. Sulfato amónico) .

El problema de estas técnicas hoy por hoy es la falta de especificidad que presentan lo que puede llevarnos al diagnóstico falso de hidatidosis.

#### **1.6.- PROFILAXIS Y TRATAMIENTO.**

Desafortunadamente es el tratamiento quirúrgico el único que permite asegurar una perfecta curación de la hidatidosis, siempre que los quistes presenten una localización accesible, y no evitan recidivas debidas a errores quirúrgicos. Normalmente se suelen acompañar estas técnicas con un tratamiento interno del quiste previo a su extirpación con formol al 4% en solución hipertónica de NaCl (33%), con el fin de matar las cápsulas de incubación y los protoscolex. Cuando este tratamiento resulta imposible por inaccesibilidad o por riesgos de rotura del quiste (lo que puede originar una equinococosis secundaria o una fuerte reacción anafiláctica, se aplican una serie de tratamientos alternativos, tales como:

Tratamiento biológico con una inestímulo de la inmunidad celular utilizando BCG.



Quimioterapia, siendo el fármaco de elección más utilizado el mebendazol (derivado del benzoimidazol) el cual penetra en el interior del quiste por difusión produciendo una alteración celular y una necrosis del tejido del parásito. Las pautas de administración de este medicamento son: 1.5 mg/Kg/día durante 1 a 11 meses. Este fármaco es utilizado también en los procesos postoperatorios para evitar posibles riesgos de diseminación por rotura del quiste.

Dado que la transmisión del parásito al ser humano se produce por contacto con perros parasitados con el verme adulto, debe mantenerse una adecuada higiene y prevención en el hospedador cánido, recomendándose las siguientes medidas profilácticas:

Desparasitación mensual de perros con praziquantel y bromohidrato de arecolina.

Destrucción por incineración o con cal viva de los desperdicios de los mataderos.

Educación sanitaria adecuada, con divulgación del problema.

### **1.7.- INMUNOMODULACION EN INFECCIONES PARASITARIAS**

La penetración y establecimiento de un parásito en su hospedador, es dependiente de numerosos factores, que difieren según la localización en el hospedador.

El parásito al penetrar en el hospedador es reconocido como un agente extraño, activándose por parte del hospedador una serie de mecanismos de rechazo, poniendo en marcha un gran número de mecanismos inmunológicos.

Se desencadenan respuestas innatas al organismo, tales como, activación de lisozimas, células fagocitarias del retículo endotelial, producción de interferón, activación del complemento, etc...Y se ponen de manifiesto respuestas dependientes de la inmunidad adquirida en base a células T y B y anticuerpos.

Estos dos sistemas forman parte del complejo, (aún no del todo conocido) sistema de defensa, utilizado por el hospedador para defenderse de agresiones externas, tales como las producidas por un parásito. Hoy día se sabe que el grado de éxito en la actuación de estos mecanismos va a depender de factores intrínsecos del hospedador tales como el sexo, edad, estado de salud.

El parásito, a lo largo de su evolución ha desarrollado una serie de mecanismos de



inmunoevasión, con los que intenta escapar de los mecanismos de defensa del hospedador. Parece ser que el parásito desarrolla mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del animal parasitado en sus primeros estadios de desarrollo en el interior de este, que interfieren en el desarrollo y liberación de productos del sistema inmunitario del hospedador facilitando así el establecimiento del parásito; esto parece un contrasentido con la teoría de "mimetismo molecular" lanzada por Damian (1.964), en la que se postula la adquisición de epítomos del hospedador por parte del parásito mediante un mecanismo adaptativo, que trae consigo la inactivación de los mecanismos de defensa del animal parasitado frente al parásito. Esta teoría ha sido discutida frente a diferentes resultados experimentales (Damian, 1.987) concluyéndose que los epítomos del hospedador pueden tener diferentes funciones. En 1.986 Grossman y col. proponen una hipótesis que integra la teoría del mimetismo molecular y la inmunomodulación, alcanzándose así una inmunidad concomitante, definiéndose este concepto como una tolerancia inmune de una parte del organismo del hospedador (probablemente el lugar donde se localiza el parásito) manteniendo el resto del organismo su capacidad de defensa frente a nuevas invasiones del mismo parásito, o de parásitos de diferentes especies.

El efecto principal de la inmunidad concomitante parece ser la inhibición de la capacidad de presentación de lo "propio", quedando este fenómeno restringido a las proximidades del parásito, desapareciendo este fenómeno conforme aumenta la distancia al lugar de establecimiento del parásito.

Las hipótesis realizadas por Grossman y col. (1.986) se encuentran sujetas a modificaciones, así De Boer y Hogeweg (1.987) propusieron un mecanismo para llegar a diferenciar lo propio de lo extraño a nivel neonatal, como reacción a antígenos extraños, basado exclusivamente en la depleción de las células precursoras y en el acumulo de células memoria. No está claro hoy día a qué nivel podría aplicarse esta idea en las relaciones parásito hospedador, teniendo en cuenta el elevado número de datos que confieren importancia al papel de las células T tanto en el mantenimiento de la tolerancia natural por sí misma, como por las infecciones parasitarias (Fazekas y Groth y col. 1.984).

Estas ideas pueden servir como hipótesis válida para diferenciar las distintas estrategias de defensa de los parásitos con diferente grado de patogenicidad, tales como, *T. cruzi*, *T.*



*brucei*, *E. granulosus*, etc...

Los mecanismos de inmunoevasión e inmunosupresión que se producen por parte del hospedador cuando la infección es producida por un helminto, es muy diferente a la que se produce frente a protozoos, parásitos dado el bajo número de parásitos generalmente presentes en infecciones producidas por helmintos y su tamaño (no fagocitables).

El grupo de los helmintos parásitos representado por los Cestodes, Nematodes y Trematodes, es de una gran heterogeneidad de tipo bio-fisiológico, produciendo por contra, sus infecciones una respuesta inmunológica muy similar ó por lo menos comparable.

Uno de los fenómenos inmunológicos más típicos en las infecciones por parásitos helmintos, es la aparición de eosinofilia y la elevación de los niveles de IgE. Se ha visto que muchos helmintos eluden la respuesta citotóxica dependiente de anticuerpos, sugiriéndose que puedan estar involucrados en este proceso los neutrófilos, eosinófilos y a la alteración de macrófagos mediada por IgE (Butterwood, 1.984). El ciclo biológico del parásito, así como, su localización caracterizan el mecanismo de defensa propio de cada parásito.

En el caso específico de los Trematodes, tomaremos como modelo al género *Schistosoma*. Clegg y col en 1.971a demostraron la existencia de una inmunidad concomitante, así, los *Schistosomas* adultos sobreviven en un hospedador, induciendo una respuesta inmunitaria a la que ellos mismos son resistentes, pero que puede llegar a eliminar a los *schistosomas* jóvenes que aún se encuentran en fase de migración o de nuevas reinfecciones (Lichtenberg y Ritchie, 1.961), esto podría ser explicado por un proceso de mimetismo molecular por el cual los *schistosoma* adultos captarían moléculas del hospedador que pasan a su tegumento, con lo cual se harían irreconocibles por el sistema inmunológico (Clegg y col. 1.971b). Hoy día se ha podido comprobar como *Schistosomas* cultivados "in vitro", en ausencia de moléculas del hospedador, manifiestan resistencia a la acción citotóxica dependiente de anticuerpos (Dessein y col, 1.981), por lo que se concluye que la resistencia de los *Schistosomas* es debida a la expresión de antígenos de superficie del mismo que continuamente está siendo renovada (Samuelson y Caufield, 1.982).

Mientras que en el caso de los trematodes la supervivencia en el seno de un hospedador inmunocompetente se basa en estrategias de inmunoevasión, parece ser que en el



caso de los nematodos su supervivencia es debida a una reacción activa de la respuesta inmune del hospedador.

Parece ser que la mayor protección de la que gozan los nematodos frente a la respuesta de su hospedador es debida a la peculiar estructura de la cutícula que los recubre, que parece ser que los hace menos lábiles a la respuesta humoral.

Han sido demostrados fenómenos de inmunosupresión en infecciones gastrointestinales, producidas por nematodos parásitos, así, Sneider y col (1.986) han encontrado inmunosupresión mediada por células en vacas infectadas por *Ostertagia ostertagi* y *Trichostrongylus axei* mediante el ensayo in vitro de blastogénesis de linfocitos sanguíneos.

Ortega-Pierres y col. (1.984) han observado como a medida que se produce la maduración de la larva de *Trichinella spiralis*, se produce un cambio en la estructura antigénica de esta. Fue observado por Gansmüller y col. (1.987) como existe una dependencia entre la capacidad citotóxica que presentan in vitro las larvas de *Trichinella spiralis* frente a macrófagos y la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* en la superficie de estos macrófagos, demostrando como los macrófagos que presentan en su superficie estos anticuerpos logran sobrevivir a las veinte horas de contacto con las larvas del nematode.

En infecciones producidas por *Ascaris suum* se ha observado una respuesta del hospedador, mediada por IgE, a extractos del parásito con propiedades alergógenas y mitogénicas (Sasagawa y col, 1.987). Un fenómeno muy similar fue observado por Mota y col (1.969) en infecciones producidas por larvas de *Trichinella spiralis*.

En infecciones producidas por larvas de cestodes se han podido encontrar multitud de ejemplos en la relación parásito-hospedador. Hay algunos resultados encontrados en infecciones experimentales producidas con *Taenia taeniformis* sobre ratas de laboratorio en las que se ha observado como desarrollan un grado de inmunidad concomitante frente a reinfecciones (Leid, 1.987), siendo utilizado este modelo para estudios referentes a procesos de inmunoevasión.

La respuesta que aparece en ratas infectadas fue estudiada por Richard y col (1.982), observando como existe una inmunidad concomitante que impide el desarrollo de nuevas infecciones y es dependiente de reacciones humorales, ofreciendo un amplio espectro de



anticuerpos. Parece ser que el mecanismo responsable de impedir esta infección, está mediado por eosinófilos dependientes del complemento y anticuerpos. Se ha visto en experiencias "in vitro" como se produce adherencia de eosinófilos sobre los estróbilos, lo cual sugiere que este mecanismo sea eficaz contra larvas establecidas (Engelkirk y col, 1.981).

Otro aspecto importante es el efecto de supresión de la inmunidad humoral observada en ratones por Nichol y Sewell (1.984) cuando se encuentran infectados con *Taenia taeniformis*, la cual conlleva aparejada una inmunoreacción contra otros parásitos. Según Leid y Suquet (1.986) la superóxido dismutasa del metacestode de *T. taeniformis* parece alterar los iones superóxido que generan los leucocitos del hospedador parasitado, proceso que podría explicar la resistencia de la larva de *T. taeniformis* frente a linfocitos adherentes, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos. Ha sido observado in vitro como los metacestodes de *T. taeniformis* liberan una serie de factores que alteran la proteína C3 del complemento. Cuando estos factores son inyectados por vía intravenosa en ratas, se observa una disminución del complemento en suero, así mismo, ha sido observado por Hammerberg y Williams (1.978a) como se produce una interacción no inmunológica de las vías C3 alternativa y clásica, viéndose como estas sustancias anticomplemento poseen una naturaleza del tipo de un glucosaminoglicano. Según todo lo anterior podría decirse que la activación de C3 en zonas lejanas a la ubicación del parásito, protege al metacestode de la lisis y de la adherencia de los leucocitos, ambas mediadas por el complemento (Davis y Hammerberg, 1.988b).

Suquet y col en 1.984 encontraron una proteína de 19.500 Da de peso molecular, aislada del metacestode *T. taeniformis* llamada Taeniaestina; parece ser que uno de sus principales efectos es la inhibición de la activación del complemento humano por vía alternativa (C5a) y por la vía clásica (C3), es capaz de inhibir la activación de linfocitos en ratones (inducida por antígenos y lectinas), parece ser que también se encuentra involucrado en el bloqueo de la producción de interleukina 1 (IL1) e interleukina 2 (IL2), los cuales inducen la proliferación de timocitos de ratón (Leid y col., 1.986). En 1.987, este mismo autor describe como esta proteína produce también la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos para C5a.

Tanto la taeniaestina como los compuestos glucosaminoglicanos, así como, otra serie



de compuestos producidos por larvas de parásitos, deben contribuir al desarrollo del mismo en el hospedador, manipulando el sistema inmunológico del huésped.

En el caso del género *Echinococcus*, son dos especies de este las que fundamentalmente causan la enfermedad conocida como echinococosis o hidatidosis, estas son *E. granulosus* y *E. multilocularis*, Thompson en 1.986 describe las importantes diferencias entre cada una de estas, así nos encontramos, con diferente morfología del adulto y el quiste, diferente distribución geográfica y distintos hospedadores.

Es conocida la existencia de variaciones intraespecíficas, sobre todo en el caso de *E. granulosus* y se hacen estudios de subespeciación tomándose varios criterios tales como, variaciones morfológicas, infectividad para el hombre, especificidad hacia el hospedador intermediario, comparaciones bioquímicas, etc... El conocimiento de estas diferencias es fundamental para plantear programas de control y estudios epidemiológicos (Thompson y Lymbery, 1.988). Las diferentes cepas pueden manifestar diferentes patrones de transmisión, manifestaciones clínicas, etc..., así, en estudios realizados en el Reino Unido se observó como el hombre es susceptible a la infección con la cepa proveniente de perro/oveja y no con la que procede de perro/caballo (Thompson, 1.977), esto trae consigo la adopción de diferentes procedimientos de inmunodiagnóstico según la zona (Richard y Lightowers, 1.986).

Se puede hablar de una diferente susceptibilidad a la infección producida por *E. granulosus* según el hospedador que parasite y el estado de este hospedador, así, Kroeze y Tanner (1.987) encuentran diferencias de susceptibilidad en ratones según el peso del bazo de estos, concluyendo que el control genético desempeña un papel importante en la relación final resistencia susceptibilidad.

Es conocido que *E. granulosus* posee antígenos que son reconocidos por el hospedador y que provocan la expresión de anticuerpos específicos originando reacciones linfocitarias; este proceso juega un importante papel en el diagnóstico de infecciones producidas por este parásito. Han sido aislados y comparados muchos antígenos (Chordi y Kagan, 1.965), si bien, parte de la inmunoreactividad y detección de los anticuerpos depende de la fuente antigénica empleada.

Dada la gran cantidad de reacciones cruzadas que se producen con otros parásitos en



la detección inmunológica de esta enfermedad, una de la mayores tareas que hoy día se plantea es la obtención de un antígeno único y específico de este parásito y que evite la aparición de reacciones cruzadas con parasitosis del tipo de la cisticercosis. Oriol y col. (1.971) describen dos antígenos a los que denominan Ag5 y AgB, ambos de estructura lipoproteica. Otro antígeno también importante es el que presenta similitud con el del subgrupo sanguíneo P<sub>1</sub>. El que este antígeno este presente en el líquido hidatídico y en extractos celulares, explica la aparición de anticuerpos anti-P<sub>1</sub> en pacientes con el subgrupo P<sub>2</sub> que padecen hidatidosis (Cameron y Staveley, 1.957). Este antígeno se localiza en las membranas hidatídicas, es de estructura glicoproteica con un determinante antigénico asociado a la mitad del carbohidrato (Russi y col, 1.974). En la actualidad ha sido demostrada la presencia en otros parásitos de actividad P<sub>1</sub>, motivo por el cual puede que este antígeno sea la principal fuente de reacciones cruzadas en procesos de inmunodiagnóstico (Ben-Ismael y col., 1.980).

Por otra parte ha sido detectada en individuos infectados con *E. granulosus* la presencia de una hiperglobulinemia, una elevación en los niveles de IgG y en los casos de hidatidosis pulmonar unos niveles anormales de IgM e IgA, apareciendo una elevación en los niveles de IgE en un 70% de los pacientes (Matossian y col., 1976).

Araj y col. (1.977) infectaron ratones de laboratorio con protoscolices de *E. granulosus* y no detectaron anticuerpos, mediante el empleo del tests de hemaglutinación y fijación del complemento, antes de las 14 semanas postinfección. Por otra parte Torres-Rodríguez y Wisnivesky (1.978) infectaron ratones con oncosferas de *E. granulosus* encontrando anticuerpos capaces de reaccionar con el Ag5 a las 11 semanas de la infección, mientras que otras Ig aglutinantes sólo se detectaron después de 18 semanas.

Ali-Kan (1.974) encontró una correlación entre los niveles de anticuerpos (IgM e IgG<sub>1</sub>) y la biomasa parasitaria inicial resultante, en infecciones experimentales con *E. multilocularis*.

Cuando se determina la especificidad de las Ig producidas frente al parásito, Ali-Kan y Siboo (1.981), empleando material quístico de *E. multilocularis*, encontraron un incremento en la cantidad de IgG<sub>1</sub> específica durante el curso de la infección.

Kassis y Tanner (1.976) han observado como los protoscolices de *E. granulosus* y *E.*



*multilocularis* son lábiles al suero fresco de determinados hospedadores. Parece ser que el factor que está implicado en este proceso es el complemento, ya que su efecto desaparece por calentamiento a 56°C durante 30 minutos (Rau y Tanner, 1.976), como por tratamiento con EDTA o con el factor de veneno de cobra. Kassis y Tanner (1.977) demostraron que, in vivo, el complemento juega un importante papel en la defensa del hospedador.

El mecanismo de defensa mediado por células frente a la infección por *Echinococcus* constituye un elemento importante en la patología, encontrándose involucrado en el control del desarrollo del quiste hidatídico. Sin embargo, la patología resultante puede variar dependiendo de las formas infectivas que están siendo estudiadas: Una oncosfera invasiva (equinococosis normal) o un protoscolex invasor (equinococosis secundaria) (Richards y col., 1.983. Ali-Kan y col., 1.983).

En el caso de equinococosis secundaria experimental de *E. granulosus*, los pequeños quistes sufren primero una invasión de macrófagos, encontrándose rodeados por capas de fibroblastos y células mesoteliales.

La reacción inicial frente a los quistes de *E. multilocularis* está caracterizada por una invasión de neutrófilos que los rodean y que, lentamente, son sustituidos por histiocitos y plasmocitos, entre otros tipos celulares.

Cuando los animales están infectados con oncosferas de *E. granulosus* se desarrolla una necrosis alrededor de las oncosferas, seguida de una infiltración de neutrófilos y macrófagos. La supervivencia del parásito depende del mantenimiento de dicha necrosis durante el desarrollo del quiste. A continuación, próximo a la capa laminar, se forma una capa de fibroblastos rodeada por mastocitos, eosinófilos e histiocitos. La capa de fibroblastos puede convertirse en una capa notable de tejido conectivo hialino y degenerado, que actúa de forma tal que separa al parásito de las reacciones inflamatorias del hospedador.

Rau y Tanner (1.976) encontraron que las células peritoneales de rata, en animales masivamente infectados con *E. multilocularis*, pueden destruir in vitro los protoscolices. Este fenómeno no tiene lugar con células del hospedador no infectado o escasamente infectado. Según Baron y Tanner (1.977) los macrófagos activados constituyen la clave para el establecimiento del parásito en los tejidos del hospedador. Estas células se han visto adheridas



al parásito, estando incrementada la adhesión por la presencia de suero inmune.

Los macrófagos pueden ser activados por una infección previa, por inyección de BCG (Bacilo de Calmet y Guerin), o por una infección con larva de *Taenia crassiceps*.

Se ha observado que existe una resistencia a la infección, desarrollo y metástasis de *E. multilocularis* (Reuben y Tanner, 1.979), y de *E. granulosus* (Thompson, 1.976) mediada por macrófagos activados previamente con BCG. La importancia de la actividad de los macrófagos en la hidatidosis puede estar de acuerdo con el papel de estos en otras infecciones por helmintos, si bien, de acuerdo con Cox y col. (1987) la relación entre macrófagos y células T en sujetos infectados no parece estar clara.

Las células T pueden desempeñar un papel muy importante en el control de la infección por *E. multilocularis*. Baron y Tanner (1.976) observaron que la depleción de las células T incrementaba la metástasis de *E. multilocularis*. Siracusano y col. (1.988) observaron como un 75% de pacientes seropositivos también presentaban tests de proliferación positivo. El antígeno con el que se conseguía un mejor resultado era, bien líquido del quiste hidatídico o bien una fracción de dicho fluido conteniendo la fracción Ag5 y AgB.

Se postula que la capa laminar del quiste hidatídico, en su papel de protección de la capa germinativa, constituye una barrera para las células inmunes, anticuerpos del suero y complemento, así, se ha encontrado IgG del hospedador ligada a la capa laminar pero, Coltorti y Valera-Díaz (1.975) trasplantaron quistes de *E. granulosus* de un hospedador a otro de otra especie, no encontraron Ig del último hospedador dentro del quiste, incluso una vez transcurridos dos años desde el inicio de la infección.

Se sospechaba que ciertos componentes no específicos del suero del hospedador pueden difundir a través de la capa laminar en la fase inicial del desarrollo del quiste. cuando en un estado posterior el hospedador produce más anticuerpos específicos frente a la capa laminada, estos anticuerpos pueden ligarse y prever el paso posterior de sustancias del hospedador que interfieren en el desarrollo del parásito (Heath, 1.986). Pueden comprenderse así, los resultados de Ali-Khan y Siboo (1.981), por ejemplo la identificación de anticuerpos no específicos en la capa laminar y dentro del quiste y la detección de anticuerpos específicos



sólo en la capa laminada.

Al igual que ocurre con *T. taeniformis*, el fluido del quiste hidatídico puede interaccionar con el complemento causando su depleción (Hammeberg y col., 1.977). De hecho también se ha comprobado que el complemento es capaz de lisar los protoscólices en quistes hidatídicos intactos, postulándose la inactivación del C3 del complemento dentro del quiste (Kassis y Tanner, 1.976. Perricone y col., 1.980)

Aún resulta difícil entender como la larva de *E. granulosus* puede evadir el sistema inmunitario defensivo del hospedador. Solamente durante la última década, las investigaciones han considerado que las reacciones del hospedador pueden ser el resultado de una alteración del mecanismo de defensa del hospedador por el parásito.

Riley y col. (1.984) observaron una linfoproliferación en los nódulos linfáticos y bazo de ratones Balb/c infectados subcutáneamente con protoscólices del parásito, ya, a las 24 horas de la infección. Pasadas tres semanas observaron una blastogénesis incrementada, involucrando células T y células portadoras de IgM (en la médula y folículo cortical externo). La inducción de proliferación de células B se reflejó también por la detección en el suero de elevados niveles de IgM. Pero a los 31 días de la infección se vió una reducción del bazo, timo y ganglios linfáticos. Esto está de acuerdo con lo visto por Ali-Khan (1.978), el cual describió como los ratones infectados con *E. granulosus* mostraban una reducción de las zonas T dependientes, en el paracortex y en las zonas periarteriales de los nódulos linfoides, transcurridos 13 meses de la infección. Se ha comparado el efecto de los protoscólices con el mecanismo de acción de una lectina, tanto in vitro, como in vivo (Dixon y col., 1.982), dependiendo del contacto directo de los protoscólices vivos con las células del sistema inmune. Según Cox y col. (1.986) los protoscólices son capaces de transformar in vitro los linfocitos B sin la intervención de otros tipos celulares, mientras que la estimulación de las células T es dependiente de macrófagos.

Allan y col. (1.981) con objeto de comprobar si existe alguna actividad inmunosupresora en los nódulos linfoides de ratones, emplearon la transferencia adoptiva de células de nódulos linfoides mesentéricos, para encontrar que la inmunosupresión puede ser dependiente de células Ly-2,3+. Estos autores también encontraron una supresión de la



respuesta inmune frente a antígenos no relacionados, tales como eritrocitos de oveja, por lo que la infección con la larva de *E. granulosus* puede llevar a una inmunosupresión inespecífica.

De todo lo anterior se puede deducir que la larva de *E. granulosus* es capaz de inducir una transformación blástica primaria de los linfocitos, seguida de una depleción de las actividades de los linfocitos, presumiblemente favoreciendo a las células T supresoras. Esto puede ser el resultado de una regulación descendente de la población de las células T helper. Cox y col. (1.986) sugieren también una actividad reguladora de las células que presentan antígenos puesto que los macrófagos activados pueden reducir la respuesta de proliferación de los linfocitos a los antígenos del parásito. Además los macrófagos son capaces de matar protoscolecidos in vitro (Baron y Tanner, 1.977).

Deschiens en 1.947 y 1.949 observó la existencia de sustancias tóxicas presentes en el líquido hidatídico, en parte responsables de los procesos patológicos producidos por el parásito en su hospedador intermediario. Annen y col. (1.981) describen efectos citopatológicos sobre células esplenicas producidos in vitro por acción del líquido hidatídico, así mismo, De Rycke y col. (1.985) y Osuna y col. (1.985) observaron como el líquido hidatídico presenta efectos letales sobre macrófagos peritoneales de ratón, muriendo hasta el 90% de los macrófagos que estaban en contacto con este líquido; posteriormente en nuestro laboratorio ha sido estudiada por Osuna y col. (1.987) la capacidad citotóxica de líquidos hidatídicos provenientes de diferentes hospedadores intermediarios, sobre macrófagos, provenientes de diferentes hospedadores intermediarios del parásito. Ha sido observado también como desde el punto de vista morfológico se produce un notable cambio en el aspecto de estas células cuando se encuentran en contacto con el líquido hidatídico, antes de su destrucción.

Por otra parte es conocido que durante el proceso de activación celular, los cambios conformacionales de la membrana de células fagocíticas va acompañado de procesos respiratorios acelerados, sería la llamada "explosión respiratoria". durante este proceso es necesaria la presencia de iones  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Este proceso solo se produce en células que no están en estado de reposo (Bortolussi y col., 1.987).



La perturbación de la membrana celular inducida por algún proceso exógeno, provoca un consumo de oxígeno que se traduce en la generación de  $O^{\cdot -}$  que tiene poco poder tóxico en sí mismo, no siendo así sus productos de dismutación, el  $H_2O_2$  y los productos de la interacción de  $H_2O_2$  y  $O_2$ . que a parte de su función principal como bactericidas, son citotóxicos (Gahir y Babior, 1.981). Por otra parte muchas sustancias solubles tales como acetato de forbol miristato, ionóforos, lectinas y antígenos, son capaces de activar la "explosión respiratoria.

El oxígeno consumido durante este proceso se convierte en  $O_2$ . y un 80% de este en  $H_2O_2$ , siendo catalizada esta reacción por la superóxido dismutasa (SOD). La propiedad principal de este enzima es la de proteger a los organismos aerobios de los efectos dañinos del  $O_2$ . manteniendolo en unas concentraciones no superiores a  $10^{-12}$  M en el interior celular (Chance y col, 1.979)

Este proceso trae con sigo un incremento en la derivación hexosa monofosfatos cuya actividad depende del aporte de  $NADP^+$  desde la reacción catalizada por la NADP oxidasa (Thomas y col. 1.988) y tambien por el sistema glutatión-peroxidasa/glutatión-reductasa. sistema fundamental para la destoxificación celular del  $H_2O_2$ .

La relación en el interior celular entre formas reducidas y oxidadas de glutatión es de 100 a 1, siendo mantenida por la glutatión reductasa.

Otro de los principales mecanismos de defensa celular frente al  $H_2O_2$  es la catalasa que descompone el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno y el sistema glutatión que convierte el  $H_2O_2$  en agua. Para Nathan y col. (1.980) la resistencia al  $H_2O_2$  depende más del sistema glutatión que de la catalasa, así el glutatión repara los daños causados por el estres oxidativo y la catalasa descompone el  $H_2O_2$ .

Por otra parte la catalasa es un enzima que no se satura por el sustrato, muy al contrario, a más  $H_2O_2$  más rapidamente actua, así las células que presentan alterada la catalasa son dañadas por el  $H_2O_2$  extracelular.

Como antes se ha mencionado, es necesaria la presencia de  $Ca^{++}$ , en el proceso de activación celular; este es un proceso que se da, de modo natural, en procesos en los que se produzca una perturbación celular. Este mismo proceso se puede inducir "in vitro", mediante



## *Antecedentes*

---

la utilización de productos que permeabilicen la membrana celular, al ión  $\text{Ca}^{++}$ ; entre estos productos se puede citar, por ejemplo, el ionóforo A23187.

Por otra parte, cuando este proceso se dá, se produce la estimulación de la síntesis de prostaglandinas, leukotrienos y tromboxanos; compuestos, cuyo precursor principal es el ácido araquidónico (así como, otros eicosanoides).

Por otra parte, en el proceso de síntesis de estos compuestos, es necesaria la intervención de dos enzimas, cuya situación física en la célula, es la membrana, estos son: la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa. (Slater, T. F. y col, 1.987).



## **2.- MATERIAL Y METODOS**



## **2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO**

Para el desarrollo de nuestro estudio, se ha utilizado de líquido hidatídico de origen ovino suministrado por los laboratorios GIRESA de Madrid, procedente de mataderos locales. Este líquido ha sido mantenido a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en un arcón Koxka, hasta su posterior utilización.

## **2.2.- LINEAS CELULARES EMPLEADAS:**

### **2.2.1.- Células Vero:**

#### **2.2.1.1.- Origen e historia de las células Vero:**

Esta línea celular se estableció a partir de fibroblastos de riñón de *Cercopithecus aethiops*, el 27 de Marzo de 1.962, por Yasumura y Kawakita, en la Universidad de Chiba, en Chiba (Japón) (Yasumura y Kawakita, 1.963).

La línea celular empleada en este trabajo, procede del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina (Universidad de Granada), el cual la cedió a nuestro Departamento de Parasitología en el año 1.982, y fué obtenida de una cepa mantenida en los Laboratorios Flow, con el número de catálogo 03-230 (American Type Culture Collection Catalogue of Strains II THIRD EDITION, 1.981).

#### **2.2.1.2.- Mantenimiento de células Vero en laboratorio:**

Estas células pueden ser mantenidas, por criopreservación o por subcultivos sucesivos.

#### **2.2.1.3.- Criopreservación de células Vero:**

La criopreservación se puede realizar bien a  $-80^{\circ}\text{C}$  en arcón congelador o en Nitrógeno líquido a  $-173^{\circ}\text{C}$ .

Esta técnica de mantenimiento, parte de los cultivos en monocapa que son separados de sustrato en esterilidad.



Una vez despegadas las células, se le añade medio MEM (Minimum Essential Medium-Eagle), con L-Glutamina (GIBCO), suplementado con un 20% de suero bovino fetal, previamente inactivado a 56°C, durante 30 minutos (SBFI), y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) como criopreservador, hasta formar una suspensión celular en dicho medio cuya concentración final sea de  $10^4$  células/ml.

Esta suspensión celular se pasa a viales estériles de polipropileno (COSTAR). Los viales son sometidos a continuación, a un enfriamiento progresivo de un 1°C/min, hasta -80°C.

Parte de los viales son pasados posteriormente a Nitrógeno líquido asegurar el mantenimiento de la línea celular.

Cuando se necesita utilizar estas células, bastará con descongelarlas rápidamente, en un baño termoregulado a 37°C, para evitar recristalizaciones intracelulares que dañarían a las células.

Tras la descongelación de los viales, y en un ambiente estéril, la suspensión celular se pasa a frascos de fondo cónico estériles, adicionándole el doble del volumen que había en el vial, de medio MEM suplementado con un 20% de SBFI (V/V), centrifugándose a 1.000 rpm durante 10 minutos, resuspendiéndose el precipitado celular obtenido en medio MEM suplementado con un 20% de SBFI, hasta que la concentración final sea de  $10^4$  células/ml. La suspensión celular se cultiva sobre frascos Roux (NUNC), de 20 cm<sup>2</sup> de superficie, que son llevados a un incubador automático de CO<sub>2</sub> (SELECTA), regulado a 37°C con una atmósfera húmeda, y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas aproximadamente 6 horas, las células comienzan a adherirse al frasco y a multiplicarse hasta formar una monocapa.

#### **2.2.1.4.- Subcultivos continuos de células Vero:**

El medio de cultivo que se utiliza es el MEM con L-Glutamina (GIBCO), suplementado con un 20% (V/V) de SBFI. Una vez preparado el medio, se esteriliza por filtración a través de filtros SARTORIUS (SM 16519) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m, bajo presión positiva suministrada por una bomba MILLIPORE (XX 6022 050) de 1.2 Kg/cm<sup>2</sup>. Tras ello el medio es trasvasado a frascos estériles en una cámara de flujo laminar



vertical CRUMA y almacenado a 4°C, comprobándose previamente su esterilidad mediante controles a 37 °C durante 72 horas. Los subcultivos se realizan en frascos de cultivo (NUNC). Se inocula 1 ml de una suspensión concentrada de células Vero, (siempre en condiciones de esterilidad), en una cámara de flujo laminar vertical (CRUMA) y tras ello se pasa a un incubador automático (SELECTA) a 37°C, con atmósfera húmeda enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Aproximadamente a las seis horas de la siembra, las células comienzan a adherirse al substrato (Harris, 1.973), y a multiplicarse, hasta formar una monocapa.

Cada cuatro días es necesario sustituir el medio de cultivo por medio fresco, y cada quince días deben realizarse nuevos subcultivos, ya que de lo contrario, el crecimiento se inhibe por contacto y puede producirse la pérdida de los cultivos.

#### **2.2.1.5.- Separación de las células Vero del substrato:**

Para separar las células del substrato se emplea una solución de PBS-EDTA, (preparada como se describe en **\*\*soluciones y medios empleados\*\***) .

Tras haber eliminado el medio de cultivo, se adicionan 3 ml de la solución PBS-EDTA, dejándose en incubador a 37°C durante diez minutos, tras lo que se mira al microscopio si las células se han despegado. Si esto es así, se pipetea la mitad del contenido con la suspensión celular y se pasa a otro frasco de cultivo. Se añade a ambos medio fresco y se pasan al incubador a 37°, con una atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **2.2.2.- Fibroblastos de ratón:**

La cepa de ratones de la que han sido obtenidos estos fibroblastos ha sido la BALB/c, siguiendo la técnica descrita por Hunt, S.V. (1.987)

##### **2.2.2.1.- Obtención de fibroblastos de ratón:**

Se partió de un ratón hembra con seis días de gestación, que fué sacrificada previa anestesia con cloroformo, y posteriormente fijada a un banco de disección en posición decúbiteo supino. Tras desinfectar al animal con una solución de cloruro de benzalconio



(1:10.000), y utilizando material de disección estéril, se procedió a abrir el vientre, siguiendo la dirección marcada por la línea alba. Una vez localizadas las ramas uterinas, se procedió a abrir estas, extrayendo los fetos que fueron depositados en una placa de Petri que contenía solución de Hank estéril.

A los fetos se les extrajeron las vísceras, y fueron decapitados y troceados. Posteriormente estos trozos fueron introducidos en frascos de cultivo previamente bañados con medio MEM suplementado con el 10% de SBF1. (preparado como se describe en 2.2.1.4.).

Una vez estos trozos se encontraban adheridos a la superficie superior del frasco de cultivo, (tras 24 horas de incubación en una estufa a 37°C y con atmósfera enriquecida con el 5% de CO<sub>2</sub>), se pusieron los frascos en su posición normal y se les añadieron 2 ml de medio MEM, suplementado con el 10% de SBF1.

#### **2.2.3.1.- Subcultivo de fibroblastos de ratón:**

Trascurridos 4 días de cultivo y con las células en monocapa, se procedió a separar éstas del sustrato como se describe en 2.2.1.5., siendo sembradas en un nuevo frasco de cultivo.

Cada 4-5 días es necesario sustituir el medio de cultivo por medio fresco, así como, cuando las células se encuentran en monocapa, hay que proceder a separarlas del sustrato y a subcultivarlas para evitar que crezcan unas sobre las otras y mueran.

#### **2.2.3.- Macrófagos RAW 264'7:**

##### **2.2.3.1.- Historia, procedencia y características de los macrófagos RAW 264'7:**

Esta línea celular se estableció a partir de un tumor inducido en un ratón macho por inyección intraperitoneal del virus de la leucemia Abelson (A-MuLV).

Estas células son susceptibles de lisis por anticuerpos. No secretan partículas virales detectables, y es negativa en el ensayo en la placa XC. Las características de la superficie celular incluyen Ig<sup>-</sup>, H<sup>-2b</sup>, Thy<sup>-1.2</sup> y I<sup>a</sup>. En resumen, los receptores para el complemento y la Ig están presentes.



**2.2.3.2.- Mantenimiento en laboratorio:**

Al igual que las células Vero estas son también mantenidas por criopreservación o por subcultivos sucesivos.

**2.2.3.3.- Criopreservación de macrófagos RAW 264'7:**

El método de criopreservación de la línea celular RAW 264'7 es en todo similar a lo descrito en el apartado 2.2.1.3, con la salvedad de que el medio de cultivo de estos macrófagos es RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (GIBCO) y la proporción de suero con que se suplementa es del 10% (V/V)

**2.2.3.4.- Cultivos continuos de Macrófagos RAW 264'7:**

Al medio de cultivo se le adicionaron 100  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de estreptomicina, 50  $\mu\text{g/ml}$  de Kanamicina y 100 UI/ml de penicilina G sódica, con el fin de evitar crecimientos bacterianos. La esterilización del medio de cultivo se realizó tal y como se describe en el apartado 2.2.1.4.

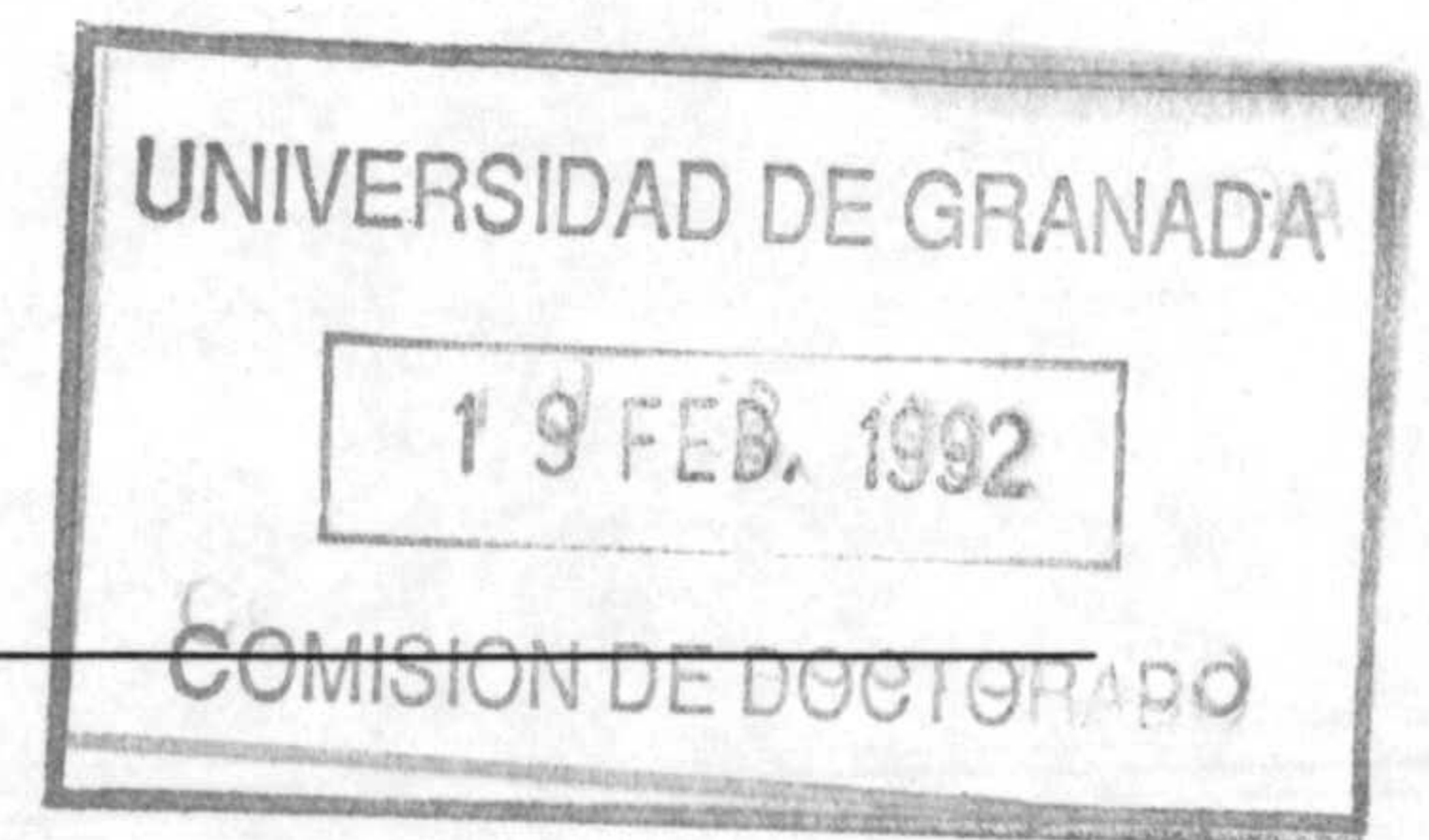
**2.2.3.5.- Subcultivo de Macrófagos RAW 264'7:**

El cultivo celular se inicia tomando un frasco de cultivo Roux (NUNC), con un cultivo en monocapa. Con una pipeta Pasteur se recoge el medio de cultivo que contiene el frasco, y se expulsa con energía por su superficie, comprobándose al microscopio que las células se han despegado. Cuando esto sucede, se trasvasa este medio a un frasco de fondo cónico (STERILING), centrifugándose a 1.500 rpm durante 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en medio fresco, pasándose a un nuevo frasco de cultivo. Al frasco de partida se le añade medio fresco en cantidad suficiente y se pasan ambos a un incubador con atmósfera húmeda, enriquecida con un 5% de  $\text{CO}_2$  y a  $37^\circ\text{C}$ .

**2.2.4.1.- Macrófagos peritoneales de ratón:**

La cepa de ratones de la que han sido obtenidos estos macrófagos ha sido la BALB/c





#### **2.2.4.2.- Método de obtención de los macrófagos:**

Partiendo de ratones albinos hembras de la cepa BALB/c, se procede a anestésiar al ratón con cloroformo hasta que pierda el reflejo parpebral. Posteriormente, se procede a lavar exteriormente al ratón con una solución de cloruro de benzalconio 1:10.000 (MERCK). Una vez el animal limpio es fijado a un banco de disección en posición decúbito supino, e introducido en una campana de flujo laminar vertical (CRUMA). En primer lugar se procede a sajar la epidermis superficial por la zona que delimita la línea alba, separando ésta hasta dejar la zona ventral del ratón limpia. Esta zona es desinfectada con alcohol al 70% (V/V).

Siguiendo el método descrito por Hunt (1.987), procedemos a hacer un lavado peritoneal utilizando una solución isotónica (Hank), la cual es introducida en la cavidad peritoneal por un orificio que se practica utilizando una pipeta Pasteur. Introducimos 4 ml de esta solución, y procedemos a dar un masaje en la zona ventral, extrayendo posteriormente este líquido que contendrá las células libres presentes en dicha cavidad, entre las que se encuentran los macrófagos. Este líquido es trasvasado a un frasco de fondo cónico, y centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se retira la solución anterior añadiendo seguidamente 5 ml de medio RPMI. Mediante una pipeta se agita suavemente el medio con el fin de resuspender el precipitado celular y, posteriormente se trasvasa a una placa de microtitulación de 96 receptáculos, en alícuotas de 100  $\mu$ l. Esta placa es incubada a 37°C durante 2 horas. Dada la propiedad que presentan los macrófagos de adherirse a superficies apolares, podremos retirar, con un simple lavado de la placa con solución de Hank, aquellas células que no sean macrófagos.

### **2.3.- PROCESADO DEL LIQUIDO HIDATIDICO:**

#### **2.3.1.- Precipitación de proteínas:**

Siguiendo el método propuesto por Schleif (1.981), alícuotas de 100 ml de líquido hidatídico son tratadas con Sulfato amónico ( $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ) (MERCK) al 70% de concentración (P/V) agitándose durante 15 minutos y almacenándose a 4°C durante un tiempo mínimo de 12 horas. Tras esto se centrifuga, a 16.000 rpm. y a 4°C, en una centrífuga BECKMAN (J2-



21M). El sobrenadante es retirado cuidadosamente, y el precipitado que contendrá las proteínas más el sulfato amónico, se somete a diálisis en una membrana de diálisis, previamente tratada, mediante ebullición con 0,2M de EDTA, durante 15 minutos. El tamaño de poro oscila de 5 a 8 Kda. La diálisis se realizó frente a agua bidestilada, durante dos días a 4°C, cambiando el agua cada 6 horas y en permanente agitación, liofilizándose posteriormente.

### **2.3.2.- Obtención de la fracción lipídica:**

Tanto para la obtención de la fracción lipídica, como la lipopolisacarídica se siguió el método de Folch (1.957) modificado en nuestro laboratorio.

Partiendo del sobrenadante obtenido anteriormente en el proceso de precipitación de proteínas, se le añade un volumen igual de cloroformo (MERCK), manteniéndose en agitación durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se centrifuga durante 15 minutos a 16.000 rpm. y a 4°C en una centrífuga BECKMAN (J2-21M). Tras este proceso, pueden ser observadas dos fases claramente diferenciadas. La fase superior se separa en una ampolla de decantación y se conserva a -20°C.

A la fase inferior, (clorofórmica), se le añade metanol (MERCK) en proporción 2:1, agitándose vigorosamente y dejando esta mezcla a 4°C toda la noche. Al día siguiente se puede observar la aparición de un precipitado.

El sobrenadante es nuevamente lavado con metanol, repitiéndose esta operación por dos veces. El sobrenadante final es evaporado en un rotavapor (Büchl R-110), siendo almacenado a -20°C o bien resuspendido en solución de Hank, o medio de cultivo, tras sonicación durante 3 minutos, en un baño de ultrasonidos SELECTA.

### **2.3.3.- Obtención de la fracción lipopolisacarídica:**

La fracción superior, (acuosa), obtenida anteriormente es tratada con metanol en proporción 1:1, apareciendo poco más tarde un precipitado blanco formado por los lipopolisacáridos. Estos serán lavados tres veces mediante redisolución en agua bidestilada y posterior reprecipitación con metanol, siendo posteriormente liofilizados y almacenados a -



80°C o resuspendidos en solución de Hank, o medio de cultivo, para ser utilizados en estudios experimentales.

#### **2.3.4.- Determinación de proteínas:**

Ha sido utilizado el método descrito por Bradford (1.976), utilizando para ello un kit comercializado por los laboratorios Bio-Rad.

Se realiza una curva patrón de proteínas, utilizando diferentes diluciones de albúmina bovina (Sigma) en solución de Hank, partiendo de una solución madre a una concentración de 1 mg/ml y tomando cantidades decrecientes que van de 16  $\mu$ l, a 2  $\mu$ l, a las que se añade solución tampón hasta completar 800  $\mu$ l. Posteriormente se prepara una cubeta con la solución problema de la cual se añaden 5  $\mu$ l volviéndose a completar hasta 800  $\mu$ l con el tampón. A todas las cubetas se les adicionan 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford, midiéndose posteriormente en un espectrofotómetro Milton Roy 3000, a una longitud de onda de 595 nm y extrapolando para calcular la cantidad total de proteínas existentes en el líquido hidatídico.

#### **2.3.5.- Determinación de azúcares:**

Para la determinación de azúcares presentes en el líquido hidatídico, se siguió la técnica descrita por Hess y Lewin (1.965), que está basada en la reacción colorimétrica del orcinol-sulfúrico.

Se realizó una curva patrón de azúcares utilizando como patrón galactosa (Sigma), a una concentración de partida de 0.1 mg/ml en agua destilada tomando de esta distintas cantidades en orden decreciente, (de 80  $\mu$ l hasta 4  $\mu$ l), que fueron liofilizadas, y 5  $\mu$ l del problema que se procesan de igual forma.

Por otra parte, se preparó una solución compuesta por 0.22% de Orcinol y 50% de sulfúrico (P/V). Al ser este reactivo fotosensible se preparó en el instante de realizar la medición, y fué protegido de la luz ambiental.

A las muestras se les adicionaron 800  $\mu$ l de reactivo, siendo calentadas a 100°C durante 25 minutos, deteniendo la reacción en baño de hielo y midiéndose a una longitud de onda de 425 nm. en un espectrofotómetro Milton Roy 3000.



### **2.3.6.- Determinación de lípidos:**

Para determinar la cantidad de lípidos presentes en el líquido hidatídico, se utilizó el método descrito por Zöllner y Kirsch (1.962), mediante un kit comercializado por los laboratorios Boheringer Mannheim.

Para ello se realizó en principio una curva patrón, partiendo de una solución de lípidos de concentración conocida (5 mg/ml), tomando de ésta 5  $\mu$ l y otros 5  $\mu$ l del problema, y adicionándoles 0.2 ml de ácido sulfúrico al 96% (Probus), precalentando a 100°C durante 10 minutos, y deteniendo la reacción en baño de hielo.

Posteriormente, se toman 28  $\mu$ l de la solución patrón y 28  $\mu$ l de la solución problema, así como 28  $\mu$ l de ácido sulfúrico 96% que actuará como blanco. A todos los tubos se les añaden 700  $\mu$ l de solución cromógeno (ácido fosfórico y vainillina). Se agitan vigorosamente, y transcurridos 30 minutos se mide a 530 nm. en un espectrofotómetro Milton Roy 3000.

El cálculo de la cantidad de lípidos se realiza de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$C(\text{mg}/100 \text{ ml}) = 1.000 \times \frac{A_{pb}}{A_{\text{Patrón}}}$$

donde:

A pb: Absorbancia del problema.

A patrón: Absorbancia del patrón.

### **2.4.- METODOS DE PURIFICACION DE LA FRACCION TOXICA:**

Con el fin de conocer cual o cuales de los lípidos presentes en el líquido hidatídico, son responsables de los fenómenos de citotoxicidad que manifiestan las células de origen fagocitario, se ensayaron diversos métodos de separación, para posteriormente intentar su caracterización. Dado que según anteriores trabajos realizados en nuestro Departamento, es en la fracción lipídica del líquido, donde se encuentra el factor o factores responsables de la citopatogenicidad.



Por otra parte, al objeto de comprobar si la fracción tóxica responsable de la citotoxicidad del líquido hidatídico, era similar antigénicamente, al antígeno P, se utilizó un método inmunológico basado en la existencia de un antígeno denominado por Cameron y Staveley (1.957) como P<sub>1</sub>, y en la aparición de anticuerpos anti-P<sub>2</sub>.

**2.4.1.- Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía en capa fina:**

Partiendo de la fracción lipídica proveniente de 100 ml de líquido hidatídico obtenidos como se describe en el apartado 2.3.2.-, se preparó un concentrado bajo corriente de nitrógeno, hasta un volumen final de 1 ml.

Se tomaron placas de vidrio de 20 x 20 cm. y 3 mm de grosor que fueron lavadas y desengrasadas con cloroformo (Merck). Sobre estas placas fué vertida la suspensión de silica gel, mediante un extensor manual (Selecta), con un grosor de placa de 0.5 mm.

**2.4.1.2.- Lavado y activación de placas de cromatografía en capa fina:**

Las placas fueron sumergidas en cubetas de cromatografía (Desaga) que contenían 100 ml de cloroformo, hasta que por capilaridad quedaron embebidas en este disolvente. Posteriormente fueron secadas en un ambiente saturado de nitrógeno. Cuando la placa estaba perfectamente seca, se procedió a su activación siguiendo el método descrito por Stahl (1.969), introduciendo ésta en un horno (Raypa) a 110°C, durante 1 hora. Con ello la placa debía quedar perfectamente deshidratada.

El método de lavado y activación de las placas de cromatografía ya confeccionadas se realizó de igual manera a la anteriormente descrita.

**2.4.1.3.- Aplicación de los lípidos sobre la placa de silica gel:**

Para la aplicación de los lípidos a analizar, se ha seguido el el método que se describe a continuación:

Se dispuso una placa de silica gel G-60 con soporte de vidrio en una bancada Whatman graduada en divisiones de 1 mm. para placas de silica gel de 20 x 20.

Mediante una jeringa de vidrio silanizado Hamilton de 50  $\mu$ l de capacidad, fueron



depositadas alícuotas de 10  $\mu$ l de la muestra sobre la placa a 1,5 cm. del extremo inferior de la placa y a 2 cm. de distancia entre muestra y muestra. Las muestras fueron secadas en ambiente saturado en nitrógeno.

#### **2.4.1.4.- Desarrollo de la cromatografía:**

Una vez las muestras secas, se procedió a introducir la placa en una cubeta de cromatografía (Desaga) que contenía 100 ml. de líquido de desarrollo y cuya composición se detalla en el apartado 2.10.3. El líquido había sido vertido 20 minutos antes, con el fin de obtener una atmósfera saturada en el mismo, y anteriormente había sido comprobada la horizontalidad de la cubeta a fin de evitar que el frente fuese oblicuo, lo que nos llevaría a un cálculo erróneo de los rf.

Tras este proceso se dejó que el frente ascendiera por capilaridad hasta llegar a 1 cm. del límite superior de la placa, momento en el cual se extrajo la placa, dejándose secar en una atmósfera saturada de nitrógeno.

#### **2.4.1.5.- Revelado de las placas:**

El método seguido para revelar las placas de cromatografía fué el siguiente:

Revelado con Iodo metálico:

Con el fin de conocer cuantas bandas de lípidos contiene el líquido hidatídico y que características poseen, las placas de cromatografía que los contenían, fueron introducidas en cubetas de vidrio que contenían 100 g de iodo metálico (Probus), observándose constantemente para evitar una sobresaturación de la placa, cosa que impediría observar las marcas donde se encuentran los lípidos en cuestión.

Extraída la placa de cromatografía se observó la presencia de diferentes bandas de cada uno de los lípidos separados, lo que nos permitió conocer el número de bandas, correspondientes a los diferentes lípidos presentes en las muestras cromatografiadas.

Este método no es destructivo, lo cual permite la recuperación de la muestra a analizar.



#### **2.4.1.6.- Recuperación de la muestra:**

Con el fin de conocer cuál o cuales, de los lípidos separados mediante esta técnica, eran los responsables de los efectos citopatológicos, las muestras habían de ser recuperadas de la placa de cromatografía, dada la toxicidad para células que presenta la Silica-gel. Para realizar dicha recuperación se utilizó la siguiente pauta:

a) Se prepararon tantas pipetas Pasteur como bandas se obtenían tras el revelado de la placa, (hecho este por métodos no destructivos).

b) Fueron montadas con estas pipetas unas columnas, introduciendo lana de vidrio compactada con un espesor de 3 cm, y previamente lavada con cloroformo.

c) Las columnas así montadas, fueron silanizadas mediante lavado con diclorodimetilsilano (Merck).

d) Posteriormente, cada una de las bandas obtenidas en la placa, fueron raspadas con una cuchilla de bisturí sobre una lámina de papel de aluminio.

e) El polvo de silica conteniendo la muestra en cuestión fué introducido en la pipeta, lavándose posteriormente con cloroformo (Merck), a razón de tres volúmenes de pipeta por muestra, siendo estas desecadas hasta un volumen final de 1 ml, y almacenadas a -20°C para posteriores ensayos de citotoxicidad.

#### **2.4.2.- Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC):**

Otro de los métodos utilizados para separar la fracción tóxica ha sido la cromatografía líquida de alta presión, siguiendo el método propuesto por Powell (1.985), basado en técnicas de purificación de eicosanoides. El haber seguido esta técnica se justifica en la sospecha de que la fracción tóxica, presente una composición similar a estos compuestos, por el mecanismo de acción que presenta en estudios realizados anteriormente, y en la actualidad en nuestro Departamento.

La muestra de partida está compuesta por la fracción clorofórmica del líquido hidatídico, extraída como se describe en 2.3.2., siendo esta acidificada hasta un Ph=3.5 mediante adición de ácido fórmico 0.5 M. Esta muestra es desecada a corriente de nitrógeno,



y reconstituida en una mezcla de acetonitrilo: agua: ácido acético (33:67:0.1). El flujo ha sido de 1 ml/minuto, siendo utilizada una columna Waters C<sub>-18</sub> nucleosil, de 5 $\mu$ m de poro, en un equipo Hewlett Packard. HP 1090A. Las muestras fueron colectadas cada minuto en tubos de vidrio silanizado. (Este método fué repetido 20 veces con el fin de obtener igual cantidad de muestra que en casos anteriores).

#### **2.4.3.1.- Recuperación de la muestra:**

La muestra fué recuperada de la fase móvil mediante evaporación de ésta a presión negativa, en un rotavapor (Büchl R-110) siendo almacenadas a -20°C para posteriores ensayos de citotoxicidad.

#### **2.4.3.- Cromatografía de afinidad del líquido hidatídico:**

Para realizar este proceso fué utilizado un anticuerpo anti-P<sub>1</sub>, proporcionado por el Dr. Fernández Montoya (Banco de Sangre del S.A.S.), y obtenido por Instituto Catalán de Salud, de la Generalitat de Cataluña. Este anticuerpo fué absorbido sobre la superficie de un frasco de cultivo (Nunc), siendo bloqueados los restos libres con una solución de albúmina bovina (Sigma), a una concentración de 10  $\mu$ g/ml. Seguidamente esta placa fué lavada con tampón Tris-ClH pH=5,4, y posteriormente incubada con 5 ml de líquido hidatídico durante toda una noche a 4°C, siendo este retirado y posteriormente lavada la placa con PBS. El posible antígeno retenido por los anticuerpos, fué extraído por lavado de la placa con Tampón Tris-ClH pH= 5,4

#### **2.5.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.**

Para poder realizar la primera fase de caracterización de el/los factores tóxicos presentes en el líquido hidatídico, fué imprescindible comprobar, que lo que se purificaba continuaba presentando propiedades citotóxicas. Para esto se diseñó una serie de experiencias tendentes a cuantificar los efectos de estos compuestos, sobre los diferentes tipos de células descritos en 2.2..

En ocasiones observamos en algunos ensayos una citotoxicidad mayor de la esperada,



y, al mismo tiempo la localización de las bandas con citotoxicidad obtenidas en cromatografía era variable según los lotes ensayados. Decidimos, por ello, que era necesario realizar una serie de controles con los disolventes empleados en las extracciones, así como valorar la posible influencia de los envases en que nos suministraban el líquido hidatídico la empresa GIRESA de Madrid.

#### **2.5.1.- Criterios de citotoxicidad:**

En primer lugar se establecieron los criterios necesarios para considerar la toxicidad de estos compuestos, siendo estos los siguientes:

Para determinar la viabilidad celular se utilizaron dos ensayos, la tinción con el colorante vital Azul Trypan, y por otro lado, mediante marcaje con  $Cr^{51}$  y posterior medida del cromo radiactivo liberado al medio.

##### **2.5.1.1.- Siembra de células en placa de microtitulación:**

Partiendo de cultivos celulares en monocapa, se procede a la separación de estas células de su soporte, pasándose a frascos de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling). Se procede a centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, retirándose el medio de cultivo. Posteriormente se adiciona solución de Hank hasta tener una concentración final de  $10^6$  células/ml. En el caso de utilizar macrófagos peritoneales de ratón se partirá de la suspensión celular obtenida como se detalla en 2.2.4.2.

Utilizando una micropipeta, se distribuye esta suspensión celular a razón de  $100 \mu\text{l}$  por cada pocillo, pasándose a un incubador automático con atmósfera húmeda, y enriquecida con el 5% de  $CO_2$ , durante 2 horas. Posteriormente se retira el medio de mantenimiento y se adiciona medio fresco con el producto cuyo efecto queremos conocer.

##### **2.5.1.2.- Utilización del colorante vital Azul Trypan:**

Este colorante presenta la particularidad de teñir solamente aquellas células no viables.



#### **2.5.1.3.- Tinción de células con Azul Trypan:**

Transcurrido el tiempo previsto para el desarrollo de la experiencia en cuestión, se procede a teñir las células con una solución de azul-trypan (Sigma) al 0.1% (P/V) en PBS, previamente filtrado, por filtros Sartorius de un tamaño de poro de  $0,45\mu$ .

Se cuantifica el número de células teñidas y se calcula la relación de éstas, con arreglo a un control de células, cuyo medio no contiene fracción tóxica de líquido hidatídico.

#### **2.5.1.4.- Liberación específica de cromo 51 ( $Cr^{51}$ ):**

La base de este método no es otra sino la utilización de un isótopo radiactivo del cromo, el cual es absorbido por la célula y liberado al medio cuando esta pierde viabilidad.

#### **2.5.1.5.- Marcaje de células con $Cr^{51}$ :**

Una vez sembradas las células de que se trata sobre una placa de microtitulación y, adheridas al substrato se retira el medio de cultivo, adicionando  $40\mu$ l de solución de Hank que contiene  $50\mu$ Ci/ml de  $Cr^{51}$  (obtenida de una solución madre de  $Cr^{51}$  (DUPONT) con una actividad específica de 500 Ci/g). Esta placa se introduce por un espacio mínimo de 3 horas en un incubador automático, con atmósfera húmeda y enriquecida con un 5% de  $CO_2$ .

Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo y se procede a lavar tres veces con PBS, adicionando medio fresco con el compuesto a estudiar.

Una vez transcurrido el tiempo de realización del ensayo, se retira el sobrenadante, pasándolo a tubos eppendorf y congelándolo a  $-80^{\circ}C$ . Las células son tratadas con una solución detergente, compuesta por NaOH (1N) (Merck) y por SDS, (Lauril sulfato sódico), 0.1% (P/V) (Sigma), a razón de  $50\mu$ l por pocillo, a fin de inducir la rotura de las mismas y permitir la salida del Cr, atrapado en el citoplasma celular, pasándose tras ello a tubos eppendorf y congelándose a  $-80^{\circ}C$ .

El cromo liberado fue medido, tanto en sobrenadantes como en precipitados, en un contador de centelleo líquido y LKB.

Para calcular el porcentaje de liberación específica de  $Cr^{51}$  se ha seguido la fórmula propuesta por Fulford y Marciano-Cabral (1.986) y que es:



$$\% \text{ Lib. espc.} = \frac{\text{cpm sobrenadante problema}}{\text{cpm sb pb} + \text{cpm precipitado pb}} \times 100 - \% \text{ Lib. espt}$$

$$\% \text{ Lib. espt.} = \frac{\text{cpm sobrenadante control}}{\text{cpm sbc} + \text{cpm precipitado C}} \times 100$$

donde:

Lib. espc. = liberación específica

sb pb = sobrenadante problema

sbc = sobrenadante control

Lib. espt = liberación espontánea

cpm = cuentas por minuto

### **2.5.2- Modificaciones en los niveles de incorporación de análogos radiactivos, inducidas por las fracciones citotóxicas del líquido hidatídico:**

Se pretenden estudiar los cambios metabólicos producidos por los productos citotóxicos sobre macrófagos peritoneales de ratón.

Para realizar este estudio se ha utilizado como precursor marcado Timidina-[H]<sup>3</sup>.

#### **2.5.2.1.- Marcaje de las células con timidina [H<sup>3</sup>]:**

Cuando las células ya están sembradas, como ha sido descrito anteriormente, se procede a retirar el medio de cultivo, y se añaden 100  $\mu$ l por receptáculo, de solución de Hank conteniendo el compuesto citotóxico disuelto.

Esta placa se introduce en un incubador automático, con atmósfera húmeda y



enriquecida con el 5% de CO<sub>2</sub>.

Cuando falta una hora para finalizar la experiencia, se retira este medio de interacción, se añaden 40 µl de una solución de timidina-[H]<sup>3</sup> a una concentración de 10 µCi/ml en solución de Hank, preparada a partir de una solución madre de timidina [H]<sup>3</sup>, con una actividad específica de 15.7 Ci/Mm, (proporcionada por los laboratorios DUPONT). Se vuelve tras ello a introducir en el incubador.

Una vez transcurrido el tiempo necesario (una hora), se retira el sobrenadante, y se añaden a cada pocillo 60 µl de tricloracético (TCA) (Panreac), al 5% (v/v) en agua bidestilada. Transcurridos 5 minutos, se retira esta solución, y se realizan tres lavados con etanol absoluto (Merck), secándose la placa bajo luz infrarroja durante tres minutos. Posteriormente se, añaden a cada pocillo 100 µl de SDS-NaOH, pasando el contenido de cada uno de estos, a viales con 4 ml de líquido de centelleo.

Para medir la radiación β se empleó un contador de centelleo líquido LKB (1209).

Para calcular el porcentaje de inhibición de la incorporación del precursor radiactivo (% I.I.) se utiliza la siguiente fórmula:

% I.I. = 100 - % Incorporación, donde

$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{cpm problema}}{\text{cpm control}} \times 100$$

#### **2.6.- Dosis de fracción tóxica utilizada en los ensayos in vitro:**

El patrón estandar de la fracción tóxica fué obtenido siempre de la siguiente forma:

Partiendo de 100 ml de líquido hidatídico desproteinizado, se realiza una extracción de lípidos como se describe en 2.4.2. Estos lípidos extraídos y disueltos en cloroformo, se concentran hasta un volumen final de 1 ml, es decir, 100 veces concentrados.

De este ml. se toman 14 µl que se pasan a un volumen final de 100 µl de cloroformo,



es decir 7,14 veces concentrado.

De esta solución se toman (tras haber realizado los ensayos pertinentes), tres volúmenes constantes de trabajo. Esto es, 14, 8 y 4  $\mu\text{l}$  que se corresponden a su vez con las dosis letales 50, 25 y 12,5 aproximadamente. Estos volúmenes son disueltos en solución de Hank, mediante sonicación en un baño de ultrasonidos Selecta.

Se ha seguido el mismo criterio para las fracciones obtenidas de procesar los lípidos del líquido hidatídico por los métodos anteriormente descritos.

## **2.7.- CARACTERIZACION DE LA/LAS FRACCIONES TOXICAS.**

Con este apartado se pretenden determinar algunas características fisico-químicas de la/s fracciones tóxicas, responsables de los efectos citopatológicos. Así mismo se intenta diseñar una posible estructura que responda a estas características, y que justifique los efectos observados en las células.

Para la realización de este trabajo se han seguido fundamentalmente 4 métodos de análisis. Esto es, Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masa (CG-EM), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría Infrarroja, y otras técnicas de exclusión tales como métodos de tinción de cromatografía en capa fina, y bloqueo químico de grupos activos.

### **2.7.1.- Tinciones específicas de TLC para descartar presencia de grupos nitrogenados:**

#### **a) Método de revelado con ninhidrina:**

Para esto se parte de una solución de ninhidrina (Probus) al 2% (P/V) en acetona (Merck). Mediante un spray es rociada sobre la placa de cromatografía, e introducida en una estufa a 90°C durante 5 minutos, siendo observado (si lo hay) cualquier tipo de compuesto nitrogenado.

#### **b) Método de revelado con fluorescamina:**

Se parte para ello de una solución de fluorescamina al 1% (P/V) en acetona (Sigma). Mediante un spray es rociada sobre la placa de cromatografía, y tras secarse la placa es observada bajo luz ultravioleta a 375 nm. apareciendo bandas fluorescentes en las zonas



donde puedan existir compuestos nitrogenados.

### **2.7.2.- Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masa (CG-EM):**

Una vez la muestra cromatografiada por los sistemas anteriormente descritos en: 2.4.1., 2.4.2. y 2.4.3. y recuperada convenientemente, 1mg de esta fué resuspendido en 50  $\mu$ l de cloroformo (Merck).

El tipo de análisis realizado fué la inyección directa de la muestra, para determinar si se trataba de una muestra pura o bien la mezcla de varias, así como para conocer el peso molecular del producto ó productos.

Estos análisis fueron realizados en un cromatógrafo Hewlett-Packard (HP-5988-A), perteneciente a los Servicios Técnicos Centrales de la Universidad de Granada. La interpretación de los resultados obtenidos fué realizada por el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, Sección de Productos Naturales.

### **2.7.3.- Resonancia Magnética Nuclear (RMN):**

Se realizó el estudio de dos parámetros:

A) Análisis de Carbono-13 ( $C^{13}$ ).

B) Análisis de Protones.

Estos análisis fueron realizados en un equipo Bruker (AM-300) de 300 MHz., perteneciente a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

### **2.7.4.- Espectroscopía infrarroja:**

La fracción tóxica, fué analizada mediante espectroscopía infrarroja, en un espectrógrafo Perkin-Elmer, perteneciente al Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

Para esto, una cantidad igual de fracción tóxica, a la anteriormente mencionada, fué depositada sobre pastillas de NaCl (Sigma), dejando que se evapore el cloroformo. Posteriormente estas pastillas fueron montadas sobre la bancada portapastillas del espectrógrafo, procediéndose a su lectura.



**2.7.5.- Bloqueo de grupos activos:**

**a) - Bloqueo de grupos carboxilo utilizando diazometano:**

Se partió de 100  $\mu$ l de fracción tóxica concentrada, que fué desecada bajo corriente de nitrógeno.

Por otra parte se tomaron 2 ml de diazometano, sintetizado en el Departamento de Química Orgánica, de la Universidad de Granada.

Sobre el producto desecado se vertió el diazometano, (recogido en eter etílico). Transcurridos 30 minutos fué retirado el diazometano, mediante una corriente de nitrógeno, siendo reextraída con cloroformo, volviendo a desecarse bajo corriente de nitrógeno y resuspendiéndose en solución de Hank.

**b) - Bloqueo de grupos carboxilo mediante metanol:HCl:**

Se tomó la misma cantidad de fracción tóxica que en el caso anterior, que fué desecada con nitrógeno.

Por otra parte, se prepararon 5 ml de una solución de metanol: HCl 1:1, que fué vertida sobre la fracción tóxica desecada. Transcurrida una hora, fué retirada esta solución utilizando un liofilizador (Telstar). Posteriormente, se reextrajo la muestra con cloroformo, volviendo a desecarse con nitrógeno.

La muestra seca, fué resuspendida en solución de Hank mediante ultrasonidos.

**c) -Bloqueo de grupos hidroxilo:**

Se partió de la misma cantidad de fracción tóxica, siendo procesada como en los dos casos anteriores.

Por otra parte se tomó 1 ml de BSTFA (Bis-trimetil-silil-fluoroacetamida) (Sigma), que fué vertido sobre la fracción tóxica desecada. Transcurridas 12 horas, se procedió a extraer de nuevo con cloroformo a desecar con nitrógeno y a reconstituir la fracción en solución de Hank, utilizando ultrasonidos.

**d) -Acetilación (bloqueo de grupos  $\alpha$ amino):**

Se parte parte de una muestra tratada como se describe anteriormente.

Por otra parte se tomó un solución de metanol y ácido acético anhidro 3:1 V/V.



Esta mezcla fué adicionada a la fracción desecada, por un periodo de 5 minutos. Tras ello se retiró el reactivo mediante liofilización, siendo reconstituida la muestra en solución de Hank.

## **2.8.- ESTUDIO DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LA FRACCION TOXICA DEL LIQUIDO HIDATIDICO:**

### **2.8.1.- Estudio de la posible inducción a la producción de radicales libres en células linfoides:**

Con el fin de conocer el mecanismo de acción de la fracción ó fracciones tóxicas y, en base a datos ya obtenidos por algunos de nosotros, se inició el estudio de una serie de sustancias que afectan la síntesis de glutathione,  $H_2O_2$ , o el efecto de estas sustancias sobre los macrófagos, tratados con fracción tóxica.

#### **2.8.1.1.- Efecto del agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) sobre la citotoxicidad de la fracción obtenida de líquido hidatídico en macrófagos peritoneales de ratón:**

Se comenzó por ver el efecto de agua oxigenada, para lo cual se comenzó por realizar una batería de ensayos sobre macrófagos peritoneales de ratón.

En primer lugar, se procedió a ensayar distintas concentraciones de agua oxigenada, partiendo de 10mM, y terminando en 1mM, variando de 1 en 1mM, y disueltas todas ellas en solución de Hank. Estas fueron ensayadas sobre macrófagos peritoneales de ratón, para determinar cual de éstas, era la mayor concentración no tóxica, para estas células.

La mayor concentración no tóxica para estas células, resultó ser de 2mM.

Se partió de una placa de microtitulación sembrada con macrófagos peritoneales de ratón.

Por otra parte, se realizaron dos soluciones en Hank. La primera con agua oxigenada a una concentración de 2mM, y otra con la misma concentración de agua oxigenada, pero suplementada con fracción tóxica a dosis letal 50 (DL50).

Como controles se utilizaron macrófagos, que solo estuvieron en contacto con la



solución de Hank. Como control de citotoxicidad se utilizaron macrófagos puestos sólo en contacto, con solución de Hank, suplementada con la fracción tóxica en cuestión a dosis DL50.

El tiempo de desarrollo de la experiencia, se fijó en 3 y 6 horas, (tras estudiar el tiempo mínimo en que la fracción tóxica ejerce su acción).

**2.8.1.2.- Estudio del efecto de la catalasa sobre la capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón:**

Para el desarrollo de esta experiencia, se realizó un estudio previo de las cantidades máximas de catalasa no tóxica para las células. Para ello se partió de una dilución máxima de 5mM llegando a 0,5 mM.

La mayor concentración de catalasa no tóxica para macrófagos peritoneales de ratón, resultó ser de 1,5 mM.

Una vez conocida la mayor concentración de catalasa, no tóxica para estas células, los macrófagos peritoneales de ratón fueron puestos en contacto con una solución de catalasa, (1,5mM) en Hank, suplementada con DL50 de fracción tóxica.

Al igual que en el caso anterior, el período de contacto entre esta solución y las células, fué de 3 y 6 horas.

En los controles se utilizaron, células en contacto con solución de Hank, y células con fracción tóxica.

**2.8.1.3.- Estudio de la capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón, en un medio suplementado con glutatión reducido**

Como expusimos en el capítulo anterior, el sistema glutatión, dentro de una célula normal, actúa como principal regulador de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fundamentalmente en mitocondrias, donde se genera, entre otros lugares, peróxido de hidrógeno.

Con el fin de comprobar, si en células mantenidas en un medio suplementado con glutatión reducido, se produce alguna reducción de la capacidad citotóxica de la fracción



purificada de líquido hidatídico, diseñamos la siguiente experiencia.

Como en casos anteriores, hemos procedido a determinar la máxima concentración de glutatión reducido, no tóxica para macrófagos peritoneales de ratón. Resultando ser la dilución de 20mM, la mayor concentración no tóxica.

Para la realización de la experiencia se tomó una placa de microtitulación, sembrada con macrófagos peritoneales de ratón, a la que se adicionaron 50  $\mu$ l, de solución de Hank suplementada con 20 mM de glutatión reducido, por cada pocillo, y suplementada con DL50 de fracción tóxica.

El tiempo de interacción, fué el mismo que en casos anteriores.

#### **2.8.1.4.- Efecto del T-Butil Hidroperóxido, en la capacidad citotóxica de la fracción tóxica, sobre macrófagos peritoneales de ratón:**

Otro de los productos estudiados, fué el T-butil hidroperóxido, el cual actúa como un oxidante del glutatión, aunque de modo menos agresivo que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tras realizar 10 diluciones de este compuesto, sobre solución de Hank., comenzando por 10  $\mu$ M para terminar por una concentración de 1  $\mu$ M, se ensayó la citotoxicidad de estas, sobre macrófagos peritoneales de ratón, determinándose que era de 1  $\mu$ M.

Partiendo de una placa de microtitulación sembrada con macrófagos peritoneales ratón, se retiró el medio de cultivo, y se adicionaron 50  $\mu$ l de sol. de Hank, suplementado con 1  $\mu$ M de T-BHP. Transcurrida 1 hora, se retiró el medio que contenía el T-BHP y se adicionó medio suplementado con fracción tóxica a DL50 de concentración.

El tiempo de interacción fué de 3 y 6 horas.

Se tomaron como controles, macrófagos a los que, solo se les adicionó Hank, y otros a los que se les adicionó Hank suplementado con 1  $\mu$ M de T-BHP.

#### **2.8.1.5.- Efecto de los inhibidores del glutatión sobre la capacidad citotóxica de la de la fracción obtenida de líquido hidatídico:**

Se ha estudiado el efecto que presentaba la Butionina sulfoximida y el 1-cloro-2,4-dinitro-benceno, (inhibidores de la síntesis del glutatión), sobre el efecto de la fracción



citotóxica obtenida de líquido hidatídico.

**2.8.1.5.1.- Efecto de la butionina sulfoximida (BSO)**

Se determinó la mayor concentración de este producto no tóxica para macrófagos, concluyéndose que la máxima concentración de BSO no tóxica era de 0,2 mM.

Para la realización de la experiencia, se partió de una placa de microtitulación sembrada de macrófagos peritoneales de ratón, a la que se le retiró el medio de cultivo.

Posteriormente, se adicionaron a cada pocillo 50  $\mu$ l de una solución 0,2 mM de BSO en Hank, la cual contenía fracción tóxica a una concentración equivalente a la dosis letal 50.

Transcurridas 3 y 6 horas respectivamente, se realizó la tinción de las células con azul trypan, cuantificándose el % de células no viables respecto al control, sin fracción tóxica.

**2.8.1.5.2.- Efecto del 1-cloro-2,4-dinitro-benceno (CDNB):**

Se estudió así mismo el efecto que presentaba el 1-cloro-2,4-dinitro-benceno, adicionado al medio de interacción que contenía la fracción tóxica.

La concentración no tóxica de este producto para las células resultó ser 10  $\mu$ M.

Para la realización de la experiencia, se partió de una placa de microtitulación sembrada de macrófagos peritoneales de ratón, a la que se le retiró el medio de cultivo, siendo adicionadas 50  $\mu$ l de sol. de Hank, suplementado con 10  $\mu$ M de CDNB, más fracción tóxica a la dosis letal 50, dejando como tiempo de interacción 3 y 6 horas.

Como controles se utilizaron macrófagos, a los que solo se les adicionó solución de Hank, y otros a los que se les adicionó solución de Hank suplementado con 10  $\mu$ M de CDNB.

**2.8.2.- Determinación de malon-dialdehído (M.D.A.), como método indirecto de peroxidación de lípidos de membrana, inducida por la fracción tóxica del líquido hidatídico:**

Con este método indirecto, se pretende determinar la presencia de radicales libres, viendo el efecto que estos producirían, en la peroxidación de fosfolípidos de membrana (Uchiyama, M: y Mihara, M. 1.977).



Para la realización de esta experiencia, se partió de una placa de microtitulación, sembrada, con macrófagos peritoneales de ratón. Una vez retirado el medio de cultivo de estos macrófagos, se adicionaron 50  $\mu$ l por pocillo de solución de Hank, suplementados con la fracción tóxica.

Como en ocasiones anteriores, se tomaron como tiempo de interacción de la fracción tóxica, 3 y 6 horas. Transcurridas las cuales se retiró el medio de cultivo, y se añadieron 90  $\mu$ l de SDS-NaOH.

Por otra parte, se prepararon las siguientes soluciones:

ClNa	0.9% p/v
Solución de ácido sulfúrico	0.08% N
Acido fosfotungstico	10% v/v
Solución de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.) 0.67% (p/v) en agua destilada, A 50 ml de esta se añaden 50 ml de ácido acético glacial.)	

Así mismo, se realiza una curva standar, utilizando M.D.A. con los siguientes volúmenes:

0.25 nml/L  
0.5 nml/L  
1.0 nml/L

A este M.D.A., se le añaden 4 ml de ácido sulfúrico

Esta mezcla se agita suavemente por tres veces. Posteriormente, se le añaden 0,5 ml de ácido fosfotungstico, incubándose 5 minutos a 37°C.

Seguidamente se centrifuga a 3.000 rpm., por espacio de 10 minutos. El sobrenadante obtenido es retirado, añadiéndose al sedimento obtenido del standar o, en su caso, a el homogenado celular, 4 ml de agua destilada, y 1 ml de solución de T.B.A., incubándose por espacio de 1 hora a 95°C. Transcurrido este tiempo, se añaden 5 ml de butanol (Aldrich), y se centrifuga a 3.000 rpm. por espacio de 15 minutos.

El sobrenadante se lee en un fluorímetro a 515 nm.

Como control, se determinó la presencia de M.D.A. en macrófagos mantenidos en las



mismas condiciones, pero con sol. de Hank, sin suplementar con fracción tóxica.

**2.8.3.- Efecto de la fibronectina en la capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón:**

La fibronectina es una glicoproteína presente en el suero y membranas celulares, así como en tejido conectivo. Ha sido evidenciada su importancia en los procesos de adherencia de células al sustrato, estando involucrada en el reconocimiento y adherencia de ligandos.

Con el fin de determinar si un medio suplementado con fibronectina, modifica la capacidad citotóxica, de la fracción obtenida del líquido hidatídico, diseñamos una experiencia, en la que los macrófagos fueron preincubados con una serie de concentraciones de fibronectina.

Se emplearon las concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  en solución de Hank, con las que se incubaron los macrófagos. El tiempo de incubación fué de 30 minutos.

Tras esto, fué retirado el medio con la proteína, y adicionada la fracción tóxica a una dilución equivalente a la DL50

Como controles, se utilizaron macrófagos en solución de Hank más fibronectina, macrófagos en solución de Hank con fracción toxica, y macrófagos con solución de Hank solamente.

El tiempo de desarrollo de la experiencia fué de tres y seis horas.

**2.8.4.- Efecto del pretratamiento "in vivo", de macrófagos peritoneales de ratón, con 6-metil-prednisolona, sobre la citotoxicidad inducida por la fracción tóxica del líquido hidatídico, "in vitro":**

La 6-metil-prednisolona, es una molécula de conocida acción antiinflamatoria. Algunos autores como Vane, 1.971 y Flower, 1.972. ya observaron que, entre otras induce la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

La experiencia se realizó partiendo de una batería de 10 ratones, que fueron inyectados con 6-metilprednisolona hemisuccinato sódico, (Urbason<sup>®</sup>. Hoechst Ibérica), (10  $\mu\text{g/ml}$ ), administrada por vía intramuscular.



Transcurridas 3 horas de la inyección, fueron extraídos los macrófagos peritoneales de estos ratones, centrifugándose a 1.500 rpm., retirándose la sol. de Hank procedente de este lavado peritoneal, y conservándose a 0°C.

El boton conteniendo las células fué lavado con solución de Hank a 30°C, resuspendiéndose y cultivándose como se ha descrito anteriormente. Junto con estos macrófagos y como control se emplearon macrófagos procedentes de ratones a los que únicamente se le inyectó solución de Hank.

Tras retirarles el medio, les fué adicionada solución Hank procedente del lavado peritoneal anteriormente mencionado. Esta solución de Hank fué suplementada con fracción tóxica a dosis DL50. Al grupo control se les adicionó Hank fresco, suplementado con la misma dosis de fracción tóxica.

Como controles, se emplearon macrófagos con medio fresco y sin fracción tóxica, así como, macrófagos con medio proveniente del lavado peritoneal, de los ratones inyectados con 6-metil-prednisolona, y no suplementados con toxina.

El tiempo de desarrollo de la experiencia, fué de tres y seis horas. Tras ello, se determinó el porcentaje de células teñidas con azul trypan, respecto a los controles.

#### **2.8.5.- Acción del ionóforo A-23187 en el efecto citotóxico de la fracción obtenida de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón:**

En esta experiencia se pretendió comprobar si la fracción era tóxica por sí misma, o bien si la toxicidad se debía a productos como pueden ser las prostaglandinas, liberados de la célula, por efecto de esta fracción. Para esto se empleó el ionóforo A-23187 (Sigma);

En esta ocasión se procedió del siguiente modo:

Se tomó un placa de microtitulación sembrada con macrófagos peritoneales de ratón.

Por otra parte se realizó una solución de ionóforo A23187, a una concentración de 10  $\mu$ M, en solución de Hank, que fué suplementada con ácido linoleico (Sigma) (1mM), y fracción tóxica a la dosis DL50. De esta solución, fueron distribuidos 50  $\mu$ l a cada pocillo de la placa de microtitulación.

Se preparó otra solución que solo contenía ionóforo a la misma concentración, otra



solo con ácido linoleico a la concentración anteriormente indicada, y otra con fracción tóxica a la dosis 50 DL.

Los periodos de interacción fueron de tres y seis horas, tomándose como controles, macrófagos peritoneales de ratón, que solo estaban en contacto con: ionóforo por una parte, con fracción tóxica por otra y con sol. de Hank sin suplementar, por otra parte.

#### **2.8.6.- Estudio de la capacidad citotóxica de la fracción toxica de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón activados.**

En este apartado, se ha pretendido conocer cual es el efecto de la fracción tóxica de líquido hidatídico, sobre macrófagos activados con sustancias tales como  $\gamma$ -interferón y coadyuvante de Freund.

##### **2.8.6.1.- Efecto de la fracción toxica de líquido hidatidico sobre macrófagos peritoneales de ratón, activados con coadyuvante de Freund:**

A un lote de diez ratones, les fué inyectado intraperitonealmente 0,1 ml de coadyuvante de Freund (Gibco), durante 4 días, a una inyección diaria.

Transcurridos estos, se procedió a extraer estos macrófagos por el método que se describe en el apartado 2.2.4.2. Posteriormente, estas células fueron puestas en contacto con fracción tóxica a la dosis 50 DL.

El tiempo de interacción fué de tres y seis horas, tomándose como controles macrófagos de ratones no inyectados puestos en medio de mantenimiento con y sin fracción tóxica, y macrófagos de ratones inyectados con el antiinflamatorio en solución de Hank sin fracción tóxica.

##### **2.8.6.2.- Efecto de la fracción toxica de líquido hidatídico sobre macrófagos incubados previamente con $\gamma$ -interferón:**

Se partió de una placa de microtitulación sembrada de macrófagos peritoneales de ratón. Por otra parte, se realizó una solución de  $\gamma$ -interferón (Boheringer Mannheim) en PBS, a una concentración de 2000 U/ml. De esta solución fueron puestos 50  $\mu$ l por pocillo, dejando



un tiempo de contacto de 12 horas. Transcurrido este periodo se retiró el medio de interacción, poniendo solución de Hank con fracción tóxica, a dosis letal 50.

El tiempo de interacción fué de tres y seis horas, utilizándose como controles macrófagos no incubados previamente con  $\gamma$ -interferón, a los que se les adicionó fracción tóxica a las dosis anteriormente descritas, macrófagos no incubados con  $\gamma$ -interferón en solución de Hank sin fracción tóxica, y macrófagos incubados con  $\gamma$ -interferón en solución de Hank sin fracción tóxica

## **2.9.- EFECTO DE LA FRACCION TOXICA DE LIQUIDO HIDATIDICO, SOBRE DISTINTAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS CELULARES**

### **2.9.1.- Determinacion de la actividad enzimatica de la ciclo-oxigenasa.**

Este método espectrofotométrico, está basado en la reacción de transformación del ácido araquidónico en PGG<sub>2</sub>. La reacción está catalizada por el enzima ciclo-oxigenasa PGG<sub>2</sub>. Esta reacción conlleva la producción de hidroperóxido, éste es retirado mediante la acción del enzima peroxidasa.

Por otra parte, existe una relación estequiométrica, entre la actividad peroxidasa y la producción de PGG<sub>2</sub>.

Para cuantificar la actividad de este enzima, se utiliza un co-sustrato cromofórico, que permita establecer una relación estequiométrica, entre la variación de color y la producción de PGG<sub>2</sub> (Kulmacz, R. J., 1.987).

Se ha utilizado como co-sustrato cromofórico, el N,N,N',N' (Tetrametilfenilendiamina), (TMPD), (Sigma).

Se prepararon para ello las siguientes soluciones:

- Tris-HCl 0.1M a pH=8
- N,N,N',N' Tetrametilfenilendiamina a una concentración de 4 mg/ml en PBS.

A una cubeta de espectrofotómetro, se le adicionan 2 ml de la primera solución, seguidos de 20  $\mu$ l de la solución del cromóforo, añadiéndose a esto 20  $\mu$ l un homogenado celular en solución de Hank, realizado por sonicación.

Se agita durante 30 segundos, y se mide a 611 nm. (en este caso en un



espectrofotómetro Milton Roy 3000), calculando la oxidación del TMPD en función del tiempo.

En nuestro caso se realizaron 60 ciclos de lectura con un tiempo total de 15 minutos, estando el problema suplementado con 100  $\mu$ l de muestra de la banda 0,34, de la fracción cloroformica de líquido hidatídico.

La actividad específica del enzima en cuestión, se calculó según la fórmula:  $\Delta DO \times \text{min.} / \text{mg/ml}$  de proteína. (Considerando el 100% la actividad de la reacción control se determinó el tanto % de inhibición o de activación del enzima).

### **2.9.2.- Determinación de la actividad del enzima lipoxigenasa (Linoleato-oxígeno oxidoreductasa)**

La acción de este enzima no es otra que la de catalizar la incorporación de  $O_2$  en ácidos grasos polinsaturados (linoleato, araquidonato, etc.). Estos son transformados en ácidos hidroxieicotetranoicos.

Cuando se produce la oxidación, ésta va acompañada de un incremento en la absorción a ultravioleta, a una longitud de onda de 238 nm., a 25°C.

Protocolo:

Se preparan las siguientes soluciones:

- Borato sódico 0,167 mol, a pH=9.
- linoleato 0,17  $\mu$ l/ml (Sigma).
- Enzima lipoxigenasa (Boheringer Mannheim) 0,2 mol, en tampón borato.

En una cubeta de espectrofotómetro, se vierten 2 ml de tampón borato, 50  $\mu$ l de linoleato y 100  $\mu$ l de etanol.

Posteriormente, e inmediatamente antes de medir en el espectrofotómetro, se añade 1 ml de enzima, y se agita durante 30 segundos.

Se mide el incremento de absorbancia a 238 nm. y a 25°C.

Para la presente experiencia, se realizaron 60 ciclos de lectura durante 15 minutos.



**2.9.3.- Determinación de la actividad enzimática de la malatodeshidrogenasa, (l-Malato: NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa)**

Esta enzima, cataliza la reacción de conversión del l-Malato a oxalacetato, en la cual un equivalente de NAD<sup>+</sup> se transforma en NADH + H<sup>+</sup>.

Primeramente, se preparan las siguientes soluciones:

- Tampón fosfato 0,1 mol, a pH=7,5.
- Acido oxalacético 2 mg/ml (en tampón fosfato).
- NADH (Sal sódica) (Boheringer Mannheim) (10 mg/ml) en tampón fosfato.
- Enzima malato-deshidrogenasa, 0.2 mmol, en tampón fosfato.

Sobre una cubeta de espectrofotómetro, se vierten 3 ml de tampón fosfato, a los que se añaden 100  $\mu$ l de la solución de oxalacetato, más 50  $\mu$ l de NADH. Finalmente se añaden 20  $\mu$ l de enzima y se agita durante 30 segundos, midiéndose a 339 nm y 25°C

Como en los casos anteriores, se han realizado 60 ciclos de medida, durante 15 minutos.

**2.9.4.- Determinación de la actividad enzimática de la NAD(P)H Oxidoreductasa: (FMN oxidoreductasa)**

Esta enzima cataliza la reacción de oxido-reducción, necesaria para la conversión de la forma oxidada del flavin-mononucleótido (FMN) a la forma reducida (FMNH<sub>2</sub>).

Las soluciones utilizadas han sido:

- Tampón fosfato 50 mmol, a pH=7.
- EDTA 0,1 mmol. (Merck).
- NADH (sal sódica) 20 mmol, en tampón fosfato (Boheringer Mannheim).
- Albúmina bovina 30 mg/ml (en tampón fosfato) (Sigma).
- FMN (sal sódica) 7 mmol. (en tampón fosfato) (Boheringer Mannheim).
- Enzima 0.11 mmol., en glicerol al 40% (en tampón fosfato).

El procedimiento es el siguiente:

En una cubeta de espectrofotómetro poner 2.75 ml de tampón fosfato, a los que se le añaden 0.1 ml de la solución de NADH, más 0.1 ml de la solución de albúmina bovina, 0.05 ml de FMN. Por último, se adiciona la enzima, y se agita durante 30 segundos.



Se midió a 339 nm. y a 25 °C

Se han realizado 60 ciclos de medida, durante 15 minutos.

**2.9.5.- Determinación de la actividad enzimática de la lacto-deshidrogenasa, (l-Lactato NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa).**

La reacción catalizada por esta enzima, es la de conversión de lactato en piruvato. En esta reacción se liberan dos protones que son captados por el NAD<sup>+</sup>, transformándose en NADH+H<sup>+</sup>.

Para esta experiencia se han utilizado las siguientes soluciones:

- Tampón fosfato 0.1 mol, a pH=7.
- Piruvato (sal sódica), (Sigma) a una concentración de 2.5 mg/ml.
- NADH (sal sódica), 10 mg/ml
- Lactodeshidrogenasa, a una concentración de 0.2 mmol. en tampón fosfato.

El procedimiento ha sido el siguiente:

Sobre 3 ml de tampón fosfato, se adicionan 0.1 ml de la solución de piruvato, seguidos de 0.05 ml de la solución de NADH, más 0.02 ml del enzima lacto-deshidrogenasa.

Se lee a 339 nm a 25°C.

Se han medido 60 ciclos, por un tiempo de 15 minutos.

**2.10.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE MACROFAGOS:**

Con el fin de conocer los efectos, sobre macrófagos (en este caso peritoneales de ratón), decidimos observar, mediante la utilización de microscopía electrónica de transmisión, cuales eran los daños celulares en células tratadas, en comparación con células control.

**2.10.2.- Microscopía electrónica de transmisión**

Se partió de una suspensión de macrófagos peritoneales de ratón, siendo repartidos en frascos eppendorf estériles, en alícuotas que contenían 10<sup>6</sup> macrófagos por término medio.

Posteriormente se centrifugaron estos tubos, retirándose el medio de cultivo, que fue sustituido por medio de interacción y medio de interacción suplementado con la fracción



tóxica a dosis letal 50.

Transcurridas 3 y 6 horas, se retiró el medio de interacción y se lavó por tres veces con PBS (esteril), adicionándosele una solución tamponada de glutaraldehído al 2,5%, (descrita en el apartado anterior), con el fin de hacer una primera fijación de la muestra.

Posteriormente se procedió a lavar la muestra, durante 15 minutos, en solución Milloning, a temperatura ambiente.

Seguidamente, se realizó una segunda fijación, con tetróxido de osmio al 1% en PBS, a temperatura ambiente durante media hora.

Al igual que en el caso anterior se realizaron tres lavados pero, en esta ocasión, con agua destilada también a temperatura ambiente.

El proceso de deshidratación se realizó, siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado anterior, comenzando en un alcohol de 70°, hasta llegar al alcohol absoluto.

La muestra deshidratada, fué incluida en resina Spurr, procediéndose al corte del bloque, en un ultratomo LKB 8000, montándose sobre rejillas de cobre de 200 mesh. Los cortes fueron contrastados con tetróxido de osmio, manteniéndose durante 30 minutos en acetato de uranilo al 8%, para continuar en citrato de plomo, durante 5 minutos.

Las muestras fueron visualizadas en un microscópio Jerol 100 B, perteneciente a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

## **2.11.- CONTROLES REALIZADOS AL MATERIAL BIOLÓGICO**

Como se mencionó en el apartado 2.5., debido a algunos resultados poco claros, en cuanto a la localización de la fracción tóxica, la variabilidad que observamos de unos lotes a otros, decidimos realizar una serie de controles al material biológico a su procesado, y a los envases que lo contenían.

### **2.11.1.- Control de disolventes utilizados para extracción de la fracción soluble del líquido hidatídico en cloroformo.**

Para esto, se realizó un proceso completo de extracción, por el método descrito en el apartado 2.3.2., pero sin utilizar en este caso líquido hidatídico. Lo que se hizo fué repetir todo el proceso. Una vez concentrado el cloroformo que debía contener la fracción lipídica,



fué analizado mediante cromatografía de gases-masas, así como el metanol utilizado para la precipitación de lipolisacáridos.

Posteriormente, y dado que el método de elección que se siguió para separar esta fracción, fué mediante cromatografía en capa fina, se procedió a realizar todo el proceso, pero solo con los disolventes utilizados, realizándose una serie de cromatografías en gases-masas, de estos disolventes.

### **2.11.2.- Control de los envases que contenían el líquido hidatídico, utilizado en la realización del presente trabajo:**

Con el fin de conocer si los envases (cuya composición es polietileno de baja densidad) donde nos era suministrado el líquido hidatídico, aportaban algún tipo de compuesto al líquido hidatídico:

Se preparó una solución carente de componentes lipídicos, cuya composición fué de 35g albúmina de huevo (Sigma), (libre de lípidos) disueltos en 900 ml de solución salina al 0,9% (p/v).

Este líquido fué introducido en un frasco igual al que contenía el líquido hidatídico, y posteriormente sometido a congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , (sistema habitualmente utilizado para el almacenado del líquido hidatídico), por espacio de 5 días, (siendo descongelado diariamente, y realizando una extracción de lípidos, por el método ya descrito).

Un volumen similar de este líquido, fué introducido en un frasco de vidrio (Afora), y sometido a las mismas condiciones, realizándose extracciones de material lipídico, con la misma pauta que en el caso anterior.

Terminado de extraer todo el volumen que contenían los mencionados frascos, y concentrada la fracción clorofórmica, se procedió a cromatografiar cada uno de los extractos en capa fina, y a recuperar las bandas que se producían en la cromatografía.

El contenido de cada una de las bandas, fué recuperado siguiendo el método ya descrito, y ensayado frente a macrófagos peritoneales de ratón, para determinar si eran citotóxicos.

Las fracción o fracciones citotóxicas fueron inyectadas en RMN, para ver si existían



similitudes con las fracciones citotóxicas obtenidas del líquido hidatídico.

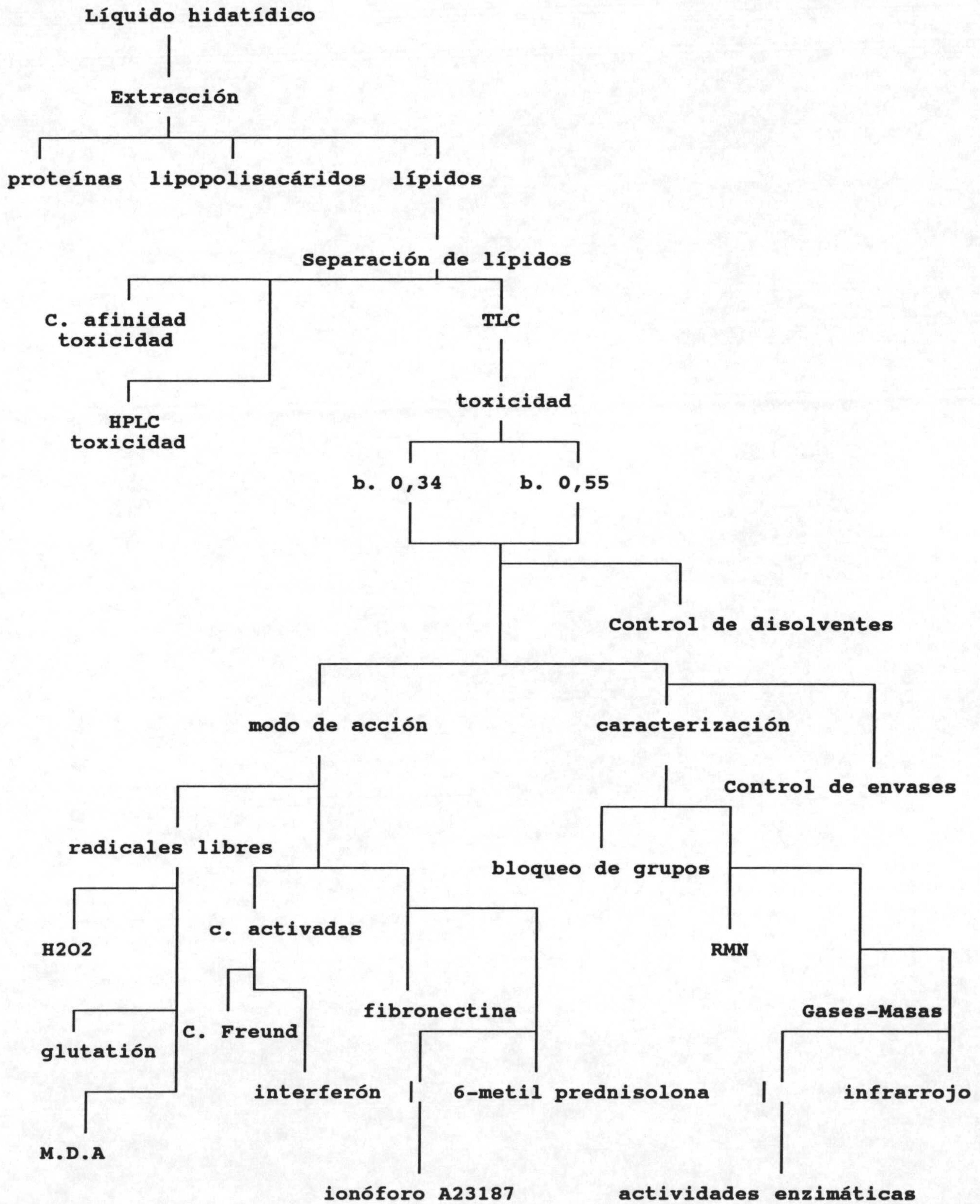
**2.11.3. - Estudio del efecto producido por el extracto obtenido de incubar la solución de albúmina en el envase que contenía el líquido hidatídico sobre la actividad de las enzimas: Ciclo-oxigenasa, Lipoxigenasa, Malato-deshidrogenasa, Lacto-deshidrogenasa y NADH-oxidasa:**

Se decidió estudiar, la actividad de las enzimas anteriormente mencionados, con el fin de valorar los cambios que las sustancias obtenidas de los envases, podían producir sobre las mismas.

El método que se siguió para determinar esto fué el mismo que el descrito en los apartados: 2.9.1. al 2.9.5.

## **2.12.- PLANIFICACION DE EXPERIENCIAS:**







## 2.13. SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS

### 2.13.1.- Solución de Hank:

- ClNa	8.0 g
- ClK	0.40 g
- Cl <sub>2</sub> Ca	0.14 g
- SO <sub>4</sub> Mg. 7H <sub>2</sub> O	0.20 g
- PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.06 g
- PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.06 g
- Glucosa	1.00 g
- CO <sub>3</sub> HNa	0.35 g
- Neomicina	0.50 ml
- Rojo fenol	1.00 ml
- H <sub>2</sub> O bidestilada	1000.00 ml
pH final 7,3	

### 2.13.2.- Líquido de desarrollo para cromatografía en capa fina:

- Hexano (Merck)	800 ml
- Dietil eter (Merck)	200 ml
- Acido acético (Merck)	2 ml

### 2.13.3.- Tampón de la muestra para electroforesis:

- Tris-ClH	62 mM
- SDS	2% p/v
- 2-mercaptoetanol	5% v/v
- Glicerol	17% v/v
- Azul de bromofenol	0.024% p/v

### 2.13.4.- Líquido de centelleo:

-Etanol (Merck)	200 ml
-Tritón x-100 (Sigma)	600 ml
-Tolueno (Merck)	1400 ml
-PPO (2,5 difeniloxazol (Sigma)	12 g
-POPOP (1,4,-bis[4-metil-5-fenil-2-oxazol]benceno(sigma)	0,5 g



**2.13.5.- PBS:**

NaCl	8g
KCl	0,2g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .	1,16 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .	0,16g
H <sub>2</sub> O	1.000 ml

**2.13.6.- PBS-EDTA:**

PBS	200 ml
EDTA	0,1g



### **3.- RESULTADOS:**



### 3.1.- Determinación de proteínas, lípidos y lipopolisacáridos que componen el líquido hidatídico

Antes de comenzar a establecer resultados, referentes a la posible estructura y modo de acción del factor citotóxico, presente en el líquido hidatídico, quisimos conocer, de modo genérico, la composición cuantitativa de cada una de las fracciones componentes del líquido hidatídico, utilizado en nuestro estudio, composición global que se refleja en la siguiente tabla.

**TABLA I:** Composición del líquido hidatídico

---

Proteínas	2,8 ± 0.3 g/l
Lipopolisacáridos	5,3 ± 0.4 g/l
Lípidos	4,6 ± 0.2 g/l

---

### 3.2.- Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía en capa fina

El método utilizado para intentar separar los distintos componentes de la fracción lipídica del líquido hidatídico fué la cromatografía en capa fina, utilizándo para ello placas Whatman de 20 x 20, con silica gel G-60.

Como líquido de desarrollo se utilizó una mezcla de dietil eter, hexano y ácido acético en porporción 20:80:2

Los resultados obtenidos tras cromatografiar la fracción clorofórmica obtenida del líquido hidatídico, son los que se detallan a continuación.



**GRAFICO N°1**

0.91	●
0.75	●
0.70	●
0.60	●
0.55	●
0.40	●
0.34	●
0.29	●
0.22	●
0.14	●
Origen	●

Esquema de la situación de cada una de las bandas obtenidas al cromatografiar en capa fina la fracción clorofórmica de líquido hidatídico.



Figura nº 1 (bajo luz ultravioleta)  
Fracción clorofórmica de líquido hidatídico

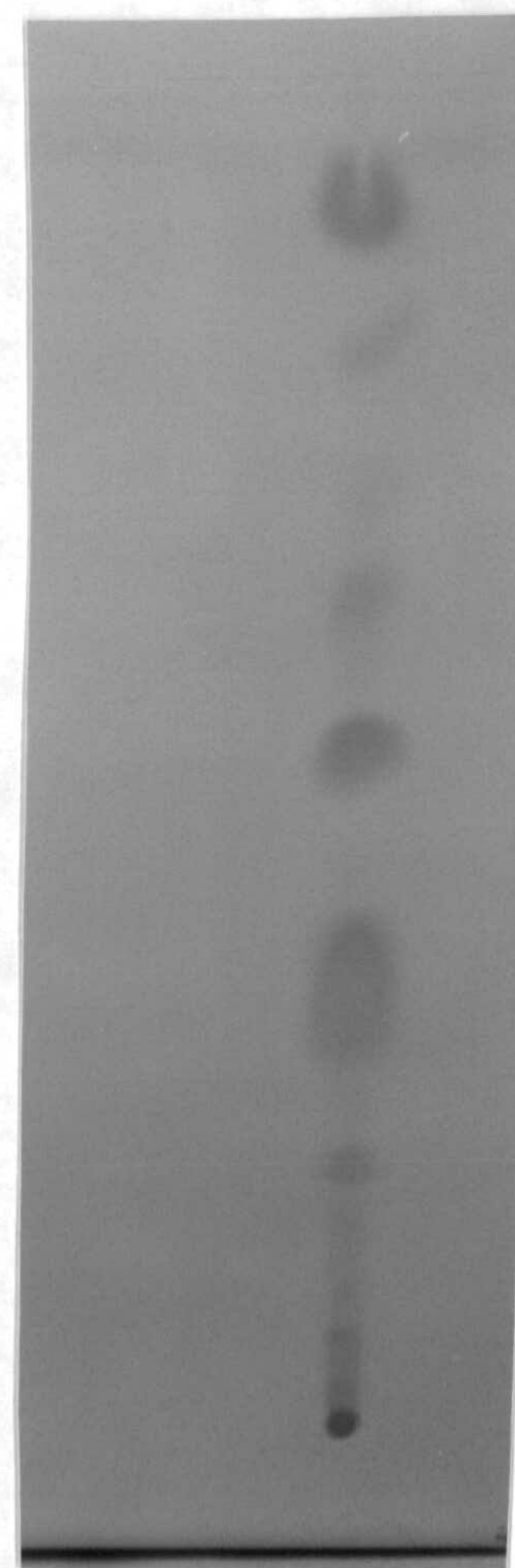


Figura nº 2 Fracción clorofórmica  
del líquido hidatídico teñida con  
iodo metálico.

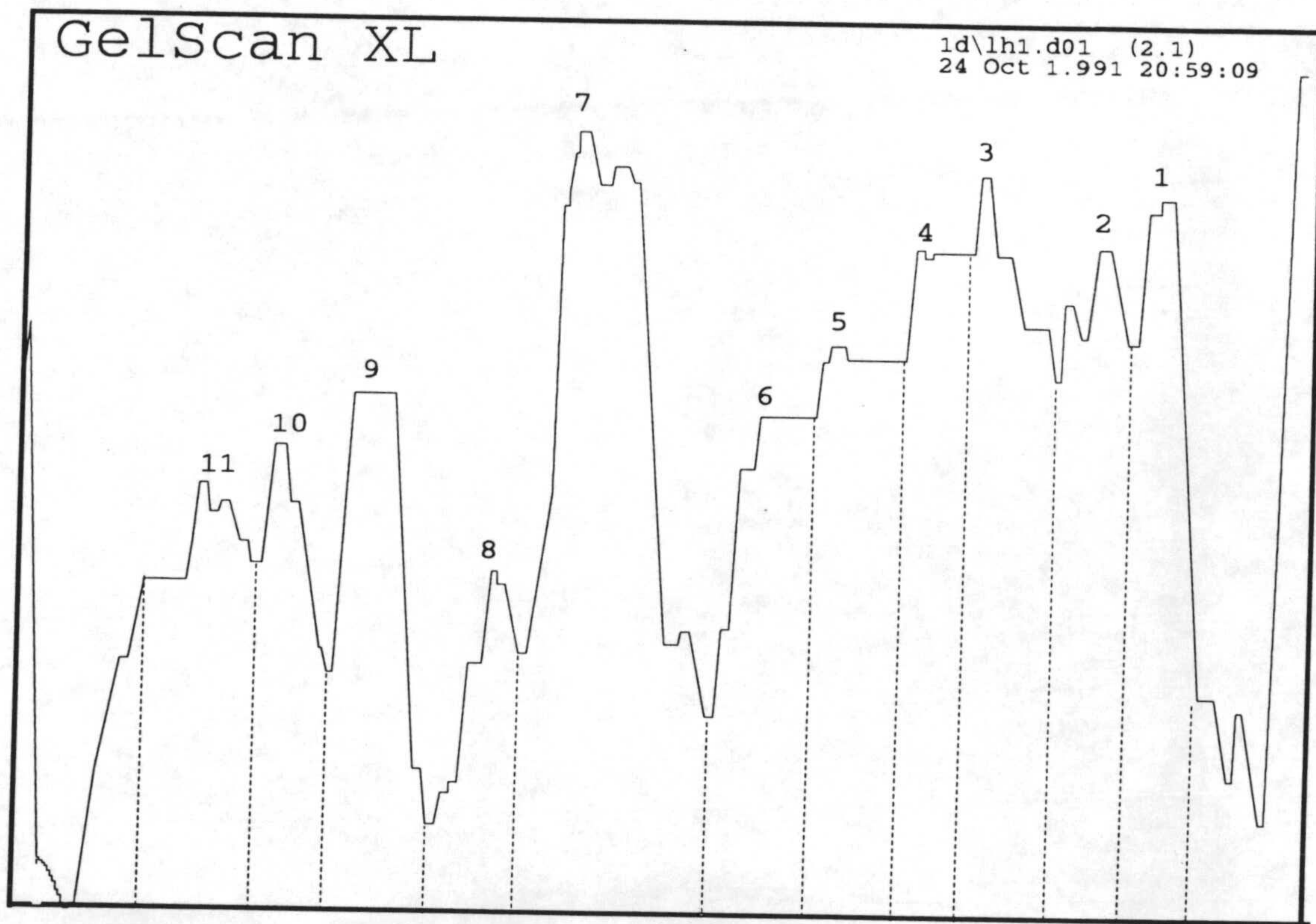


*Resultados*

---

El negativo obtenido de fotografiar esta placa, fué leído en un fotodensitómetro de transmisión laser LKB, obteniéndose la curva reflejada en la fig. nº3

Figura nº3 Curva obtenida tras leer en un fotodensitómetro laser la cromatografía en capa fina de de la fracción clorofórmica del líquido hidatídico.





## Resultados

---

La situación y área relativa de cada una de las bandas, queda reflejada en la Tabla nº2:

**TABLA II:**Situación y área relativa de cada pico

Banada	rf	Situación en mm	área	%
1º)	origen	0	0.21	12.1
2º)	0.14	25	0.31	18.2
3º)	0.22	39	0.085	4.1
4º)	0.29	52	0.16	8.1
5º)	0.34	62	0.19	10.1
6º)	0.40	74	0.38	24.1
7º)	0.55	99	0.18	10.3
8º)	0.60	108	0.04	2.1
9º)	0.70	128	0.18	5.2
10º)	0.75	136	0.074	3.5
11º)	0.91	165	0.056	2.3



### **3.3.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS**

Una vez recuperado el compuesto que contenían cada una de las bandas, como se describe en 2.4.1.6., fué comprobado el efecto que éstas producían sobre macrófagos peritoneales de ratón; sobre macrófagos de la línea celular RAW 246'7, y sobre células de origen no linfóide, tales como la línea celular Vero y fibroblastos obtenidos de embrión de ratón.

El medio de interacción utilizado en todas las ocasiones ha sido solución balanceada de Hank.

La citotoxicidad fué evaluada mediante la técnica de exclusión de Azul Trypan, y la de liberación de Cr<sup>51</sup>.



Resultados

3.3.1.- Ensayo de citotóxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre macrófagos peritoneales de ratón

TABALA II: Porcentaje de células teñidas con Azul Trypan respecto a las células control

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	1.8 ± 0.1	2.5 ± 0.6
Banda de rf 0,91	9.2 ± 0.3	11.2 ± 0.7
Banda de rf 0,75	0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1
Banda de rf 0,70	11.3 ± 0.7	14.1 ± 0.9
Banda de rf 0,60	6.2 ± 0.6	9.7 ± 0.2
Banda de rf 0,55	80.9 ± 1.7	91.7 ± 2.4
Banda de rf 0,40	2.1 ± 0.4	5.5 ± 0.2
Banda de rf 0,34	67.9 ± 1.2	94.1 ± 2.9
Banda de rf 0,29	1.1 ± 0.8	3.4 ± 0.9
Banda de rf 0,22	4.9 ± 0.4	4.6 ± 0.3
Banda de rf 0,14	0.9 ± 0.2	1.8 ± 0.6
Origen	6.1 ± 0.5	6.9 ± 0.3



Resultados

3.3.2.- Determinación de la capacidad citotóxica de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre macrófagos peritoneales de ratón

TABLA III: Porcentaje de liberación específica de Cr<sup>51</sup> de células tratadas respecto a células control

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	1.7% ± 0.7	4.6% ± 1.2
Banda de rf 0,91	11.2% ± 2.3	12.3% ± 3.8
Banda de rf 0,75	1.2% ± 0.9	2.4% ± 1.3
Banda de rf 0,70	9.2% ± 2.7	13.1% ± 3.4
Banda de rf 0,60	5.3% ± 2.6	8.4% ± 2.2
Banda de rf 0,55	81.4% ± 6.1	92.4% ± 8.9
Banda de rf 0,40	1.5% ± 0.8	4.2% ± 1.5
Banda de rf 0,34	56.9% ± 7.6	87.2% ± 9.7
Banda de rf 0,29	2.3% ± 1.8	3.5% ± 1.8
Banda de rf 0,22	5.6% ± 2.4	6.2% ± 2.9
Banda de rf 0,14	1.5% ± 0.7	2.6% ± 0.9
Origen	3.2% ± 1.5	9.2% ± 2.4



**3.3.3.- Ensayo de citotóxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre macrófagos de la línea celular RAW 246'7**

**TABLA IV:** Porcentaje de células teñidas con Azul Trypan respecto a los controles

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	3.1% ± 0.4	3.5% ± 0.5
Banda de rf 0,91	8.4% ± 0.6	10.2% ± 0.7
Banda de rf 0,75	0.8% ± 0.2	3.6% ± 0.8
Banda de rf 0,70	10.8% ± 1.2	9.9% ± 0.4
Banda de rf 0,60	1.4% ± 0.7	3.9% ± 0.8
Banda de rf 0,55	65.3% ± 1.2	71.6% ± 0.9
Banda de rf 0,40	2.8% ± 0.4	3.4% ± 0.2
Banda de rf 0,34	41.1% ± 0.8	60.3% ± 1.1
Banda de rf 0,29	2.4% ± 0.2	2.7% ± 0.1
Banda de rf 0,22	4.0% ± 0.3	4.6% ± 0.3
Banda de rf 0,14	3.2% ± 0.2	8.8% ± 1.3
Origen	0.9% ± 0.4	6.4% ± 0.7



**3.3.4.- Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre macrófagos de la línea celular RAW 246'7**

**TABLA V:** Porcentaje de liberación específica de Cr<sup>51</sup> de células tratadas respecto a células control.

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	4.2% ± 0.7	6.4% ± 1.2
Banda de rf 0,91	7.9% ± 1.8	9.7% ± 1.3
Banda de rf 0,75	1.6% ± 0.8	2.7% ± 1.0
Banda de rf 0,70	12.2% ± 2.3	14.2% ± 2.8
Banda de rf 0,60	2.7% ± 1.2	6.4% ± 1.7
Banda de rf 0,55	63.1% ± 5.9	82.1% ± 7.4
Banda de rf 0,40	1.3% ± 0.4	2.9% ± 0.9
Banda de rf 0,34	58.3% ± 6.7	72.9% ± 8.8
Banda de rf 0,29	1.6% ± 0.4	3.6% ± 1.7
Banda de rf 0,22	5.9% ± 1.6	6.2% ± 1.5
Banda de rf 0,14	2.4% ± 0.6	3.1% ± 1.9
Origen	2.8% ± 1.4	5.7% ± 1.4



**3.3.5.- Determinación de la capacidad citotóxica de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre células no linfoides**

Decidimos ensayar si la citotoxicidad que manifiestan estas fracciones es selectiva, frente a células no pertenecientes al sistema inmunitario. Para ello decidimos hacer una experiencia con la misma pauta de las anteriores, pero utilizando células pertenecientes a la línea celular Vero, así como, fibroblastos obtenidos de embriones de ratón.

El método de determinación de la citopatogenicidad se realizó mediante tinción con Azul Trypan, dado que como se puede ver en los resultados anteriores, no se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos con Azul Trypan y los obtenidos con Cr<sub>51</sub>. Dado que el azul trypan es más económico, y menos peligroso en su manipulación, optamos por este método.



**3.3.5.1.- Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre células pertenecientes a la línea celular Vero**

**TABLA VI:** Porcentaje de células teñidas con Azul Trypan respecto de células control.

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.4
Banda de rf 0,91	6.1 ± 1.3	8.2 ± 0.6
Banda de rf 0,75	2.7 ± 1.1	3.6 ± 0.8
Banda de rf 0,70	5.2 ± 0.8	6.4 ± 0.9
Banda de rf 0,60	4.3 ± 0.7	5.2 ± 0.6
Banda de rf 0,55	6.8 ± 1.3	7.0 ± 0.9
Banda de rf 0,40	9.4 ± 0.8	10.7 ± 0.6
Banda de rf 0,34	1.2 ± 0.3	7.8 ± 0.9
Banda de rf 0,29	8.2 ± 0.5	9.3 ± 0.7
Banda de rf 0,22	5.3 ± 1.1	6.1 ± 0.9
Banda de rf 0,14	7.7 ± 0.2	8.0 ± 1.5
Origen	4.2 ± 0.2	9.3 ± 1.3



Resultados

3.3.5.2.- Ensayo de citotoxicidad de las bandas obtenidas por cromatografía en capa fina sobre fibroblastos de embrión de ratón

TABLA VII: Porcentaje de células teñidas con Azul Trypan respecto de células control

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.2
Banda de rf 0,91	3.2 ± 0.7	5.1 ± 0.8
Banda de rf 0,75	3.8 ± 0.4	3.1 ± 0.3
Banda de rf 0,70	2.1 ± 0.5	7.1 ± 1.0
Banda de rf 0,60	5.2 ± 0.4	6.5 ± 0.5
Banda de rf 0,55	8.2 ± 0.9	9.1 ± 0.7
Banda de rf 0,40	6.2 ± 0.6	8.4 ± 0.3
Banda de rf 0,34	3.6 ± 0.8	4.0 ± 0.5
Banda de rf 0,29	9.6 ± 0.8	9.4 ± 0.6
Banda de rf 0,22	3.5 ± 0.8	5.4 ± 0.6
Banda de rf 0,14	9.4 ± 1.1	9.0 ± 0.3
Origen	6.2 ± 0.5	8.1 ± 0.7



**3.4.- Purificación de la fracción tóxica mediante cromatografía en HPLC:**

Otro de los métodos utilizados para intentar la separación de los componentes existentes en la fracción cloroformica de líquido hidatídico, fue la cromatografía en HPLC (método que se repitió 20 veces con el fin de tener la suficiente muestra para ensayo, dado que solo se podían inyectar 5µl en cada ocasión).

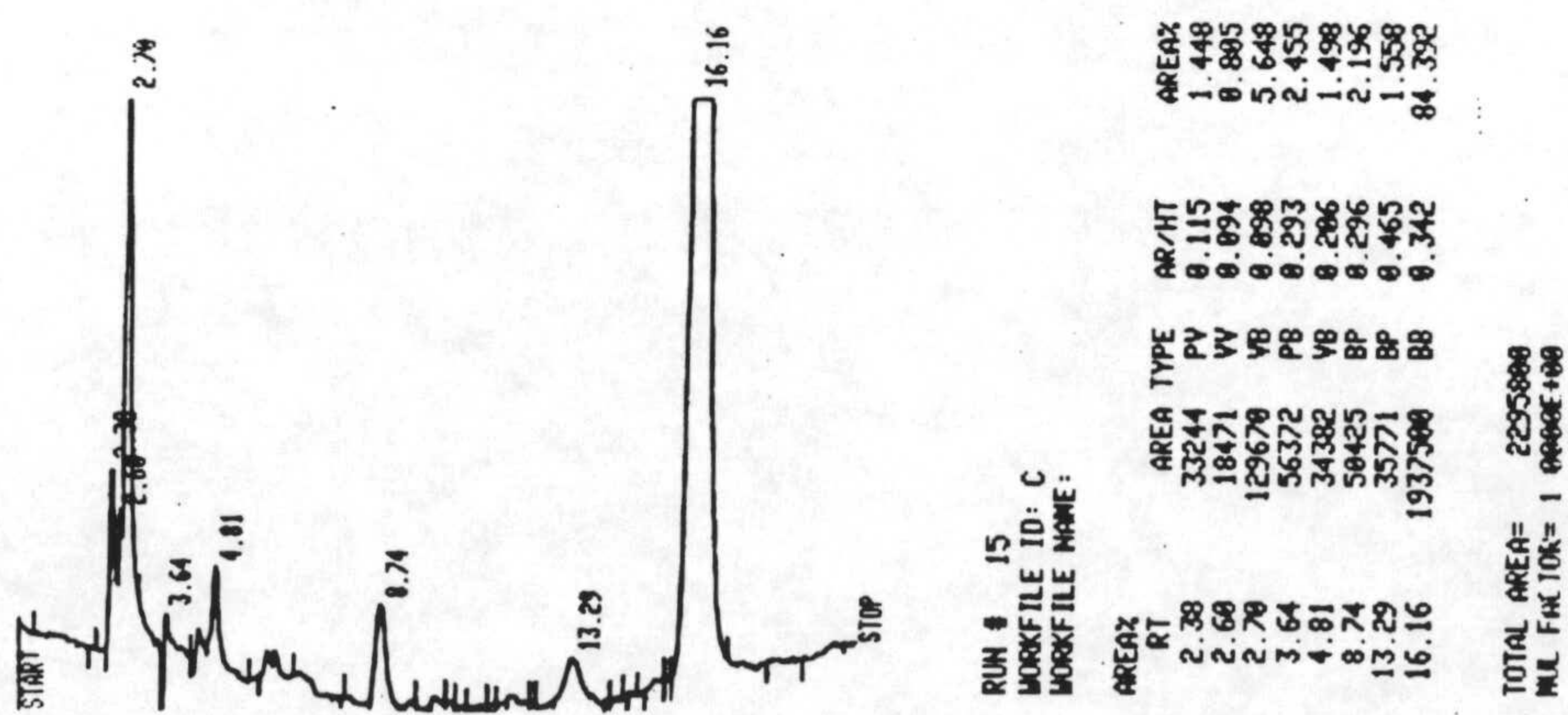
Como fase móvil utilizamos : Acetonitrilo: Agua: Acético (33:67:0.1).

Se obtuvieron 8 picos cuyos tiempos de retención son los siguientes:

**TABLA VIII**

Picos	Tiempo de retención
1º.-	2.38
2º.-	2.60
3º.-	2.70
4º.-	3.64
5º.-	4.81
6º.-	8.74
7º.-	13.29
8º.-	16.16

**GRAFICO 2**



Cromatograma de HPLC de la fracción cloroformica de Líquido Hidatídico



**3.4.1.- Ensayo de citotoxicidad de los picos obtenidos por cromatografía en HPLC sobre macrófagos peritoneales de ratón:**

Fue determinada la capacidad citotóxica de los productos de cada uno de los picos obtenidos por cromatografía en HPLC, siendo previamente retirados los restos de fase móvil como se describe en 2.4.3.1.

**TABLA IX**

**% de células teñidas con Azul Trypan**

**Horas de contacto**

		3	6
T I E M P O  D E  R E T E N C I O N	Control sin toxina	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.4
	2.38 minutos	19.3 ± 0.6	19.9 ± 0.3
	2.60 minutos	14.4 ± 0.3	21.1 ± 0.7
	2.70 minutos	12.4 ± 0.5	14.1 ± 0.8
	3.64 minutos	15.5 ± 0.2	18.9 ± 0.8
	4.81 minutos	45.4 ± 0.9	47.2 ± 1.3
	8.74 minutos	35.7 ± 0.9	41.3 ± 1.4
	13.29 minutos	40.4 ± 2.7	42.3 ± 0.9
16.16 minutos	22.4 ± 0.7	31.7 ± 1.6	



*Resultados*

---

**3.5.- Ensayo de citotóxicidad del antígeno obtenido mediante cromatografía de afinidad:**

**TABLA X:** Porcentaje de células tratadas con la fracción eluida, teñidas con Azul Trypan respecto a las células control:

Horas de contacto

	3	6
Control sin toxina	2.8 ± 0.4	2.7 ± 0.6
Antígeno eluido	39.7 ± 0.8	42.5 ± 0.7



**3.6.- CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DE LA FRACCION TOXICA**

**3.6.1.- Tinciones específicas de TLC para descartar presencia de grupos nitrogenados:**

**3.6.1.1.- Método de revelado con ninidrina:**

Se procedió a teñir una placa de TLC, en la que se habían desarrollado los componentes existentes en la fracción clorofórmica de líquido hidatídico, tal y como se describe en el apartado 2.7.1. a). la inexistencia, como puede verse en la siguientes figuras, de marcas, nos indica que no existen compuestos con restos nitrogenados.

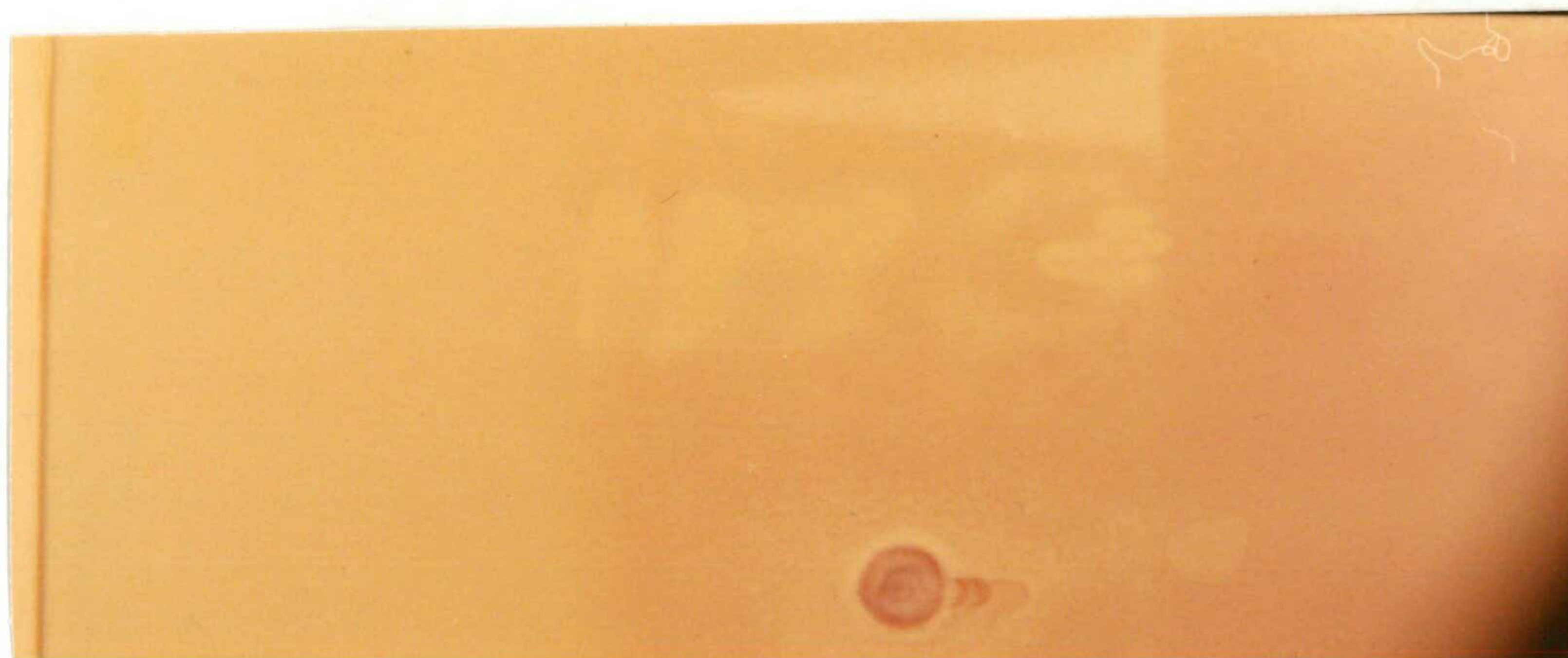


Figura nº5 Placa de TLC revelada con ninidrina    Figura nº6 Placa de TLC revelada con iodo



### 3.6.1.2.- Método de revelado con fluorescamina

Otro de los métodos para detectar la presencia de grupos nitrogenados, es la tinción de placas de TLC con fluorescamina tal y como se describe en 2.7.1. b). En esta ocasión, tampoco se ha observado la presencia de ningún compuesto de este tipo, quedando esto de manifiesto en las figuras nº7 y nº8.

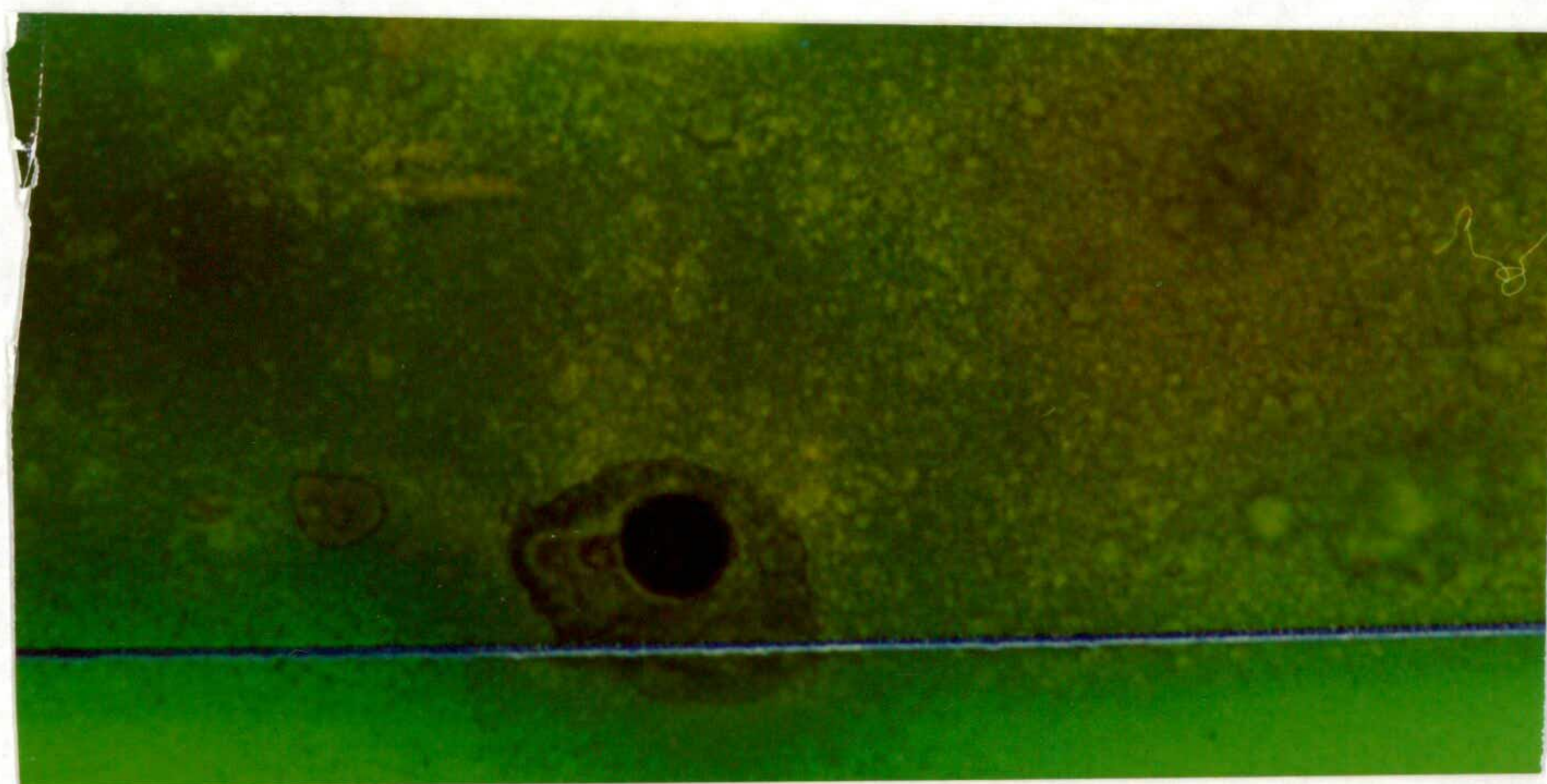


Figura nº7 TLC revelado con fluorescamina

Figura nº8 TLC revelado con iodo



### 3.6.2.- Bloqueo de grupos activos

#### 3.6.2.1.- Bloqueo del grupo carboxilo utilizando diazometano

Una vez tratada la muestra como se describe en 2.7.5. a) (en esta ocasión solo se determinó el efecto citotóxico de las fracciones cromatografiadas en TLC y con  $r_f$  0,34 y 0,55, dado que son las únicas que manifestaron una actividad clara) se procedió a determinar si esta fracción aun mantenía sus propiedades citotóxicas sobre macrófagos peritoneales de ratón.

**TABLA XI:** Porcentaje de células incubadas con fracción toxica de líquido hidatídico tratada con diazometano, teñidas con Azul Trypan:

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	1.2 ± 0.3	1.8 ± 0.9
Banda 0,34 no tratada	89.3 ± 1.2	96.4 ± 0.8
Banda 0,55 no tratada	91.1 ± 1.8	100
Banda 0,34 tratada	2.6 ± 0.7	5.3 ± 0.7
Banda 0,55 tratada	1.9 ± 0.4	4.3 ± 0.1



**3.6.2.2.- Bloqueo del grupo carboxilo utilizando metanol: HCl**

Con la muestra procesada según el método descrito en 2.7.5. b), se determinó la capacidad citotóxica de la fracción sobre macrófagos peritoneales de ratón.

**TABLA XII:** Porcentaje de células incubadas con toxina de líquido hidatídico tratada con metanol:HCl, teñidas con Azul Trypan:

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	2.2 ± 0.3	3.4 ± 0.2
Banda 0,34 no tratada	92.4 ± 0.8	95.1 ± 1.7
Banda 0,55 no tratada	87.5 ± 0.9	93.7 ± 1.5
Banda 0,34 tratada	26.1 ± 0.4	26.8 ± 0.5
Banda 0,55 tratada	32.1 ± 1.2	33.7 ± 0.9



### 3.6.2.3. -Bloqueo de grupos hidroxilo

Una vez tratada la muestra como se describe en 2.7.5. c) se procedió del mismo modo que en el apartado anterior.

**TABLA XIII:** Porcentaje de células incubadas con toxina de líquido hidatídico tratada con BSTFA, teñidas con Azul Trypan:

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	2.3 ± 0.9	5.1 ± 1.1
Banda 0,34 no tratada	91.6 ± 0.8	97.4 ± 1.4
Banda 0,55 no tratada	89.4 ± 1.7	94.1 ± 0.9
Banda 0,34 tratada	87.7 ± 1.2	94.4 ± 0.8
Banda 0,55 tratada	92.1 ± 1.7	100



**3.6.2.4. -Acetilación (bloqueo de grupos  $\alpha$ amino)**

Una vez la muestra tratada como se describe en el apartado 2.7.5. d) se determinó la capacidad citotóxica que manifestaban las dos fracciones.

**TABLA XVI:** Porcentaje de células incubadas con toxina de líquido hidatídico tratada con metanol:acético anhidro, teñidas con Azul Trypan:

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	1.2 $\pm$ 0.6	2.9 $\pm$ 0.4
Banda 0,34 no tratada	85.1 $\pm$ 1.3	94.5 $\pm$ 0.6
Banda 0,55 no tratada	91.8 $\pm$ 0.7	100
Banda 0,34 tratada	96.2 $\pm$ 1.6	98.3 $\pm$ 1.2
Banda 0,55 tratada	89.1 $\pm$ 0.79	97.2 $\pm$ 1.6



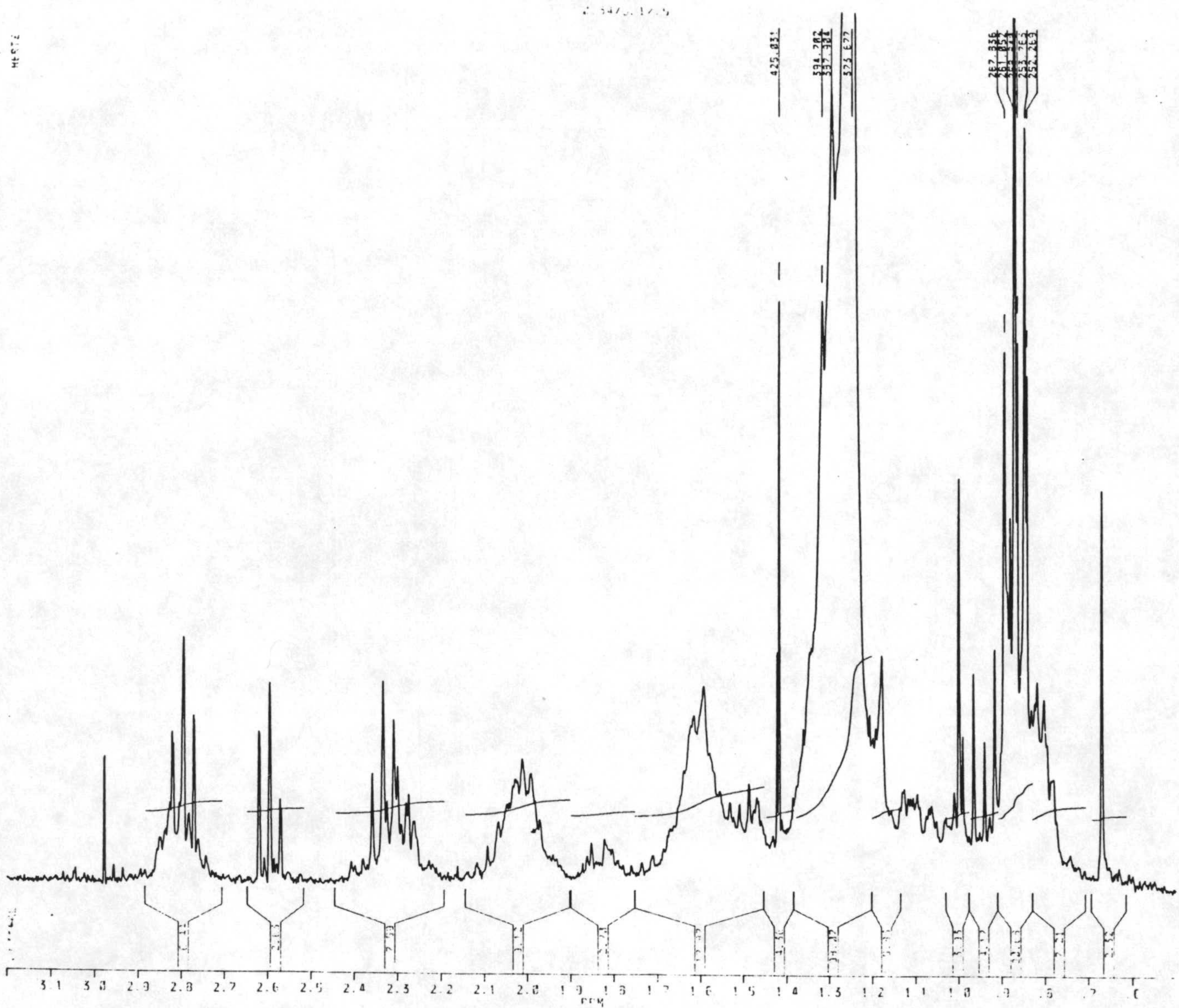
**3.7.- ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LA  
BANDAS QUE HAN MOSTRADO ACTIVIDAD:**





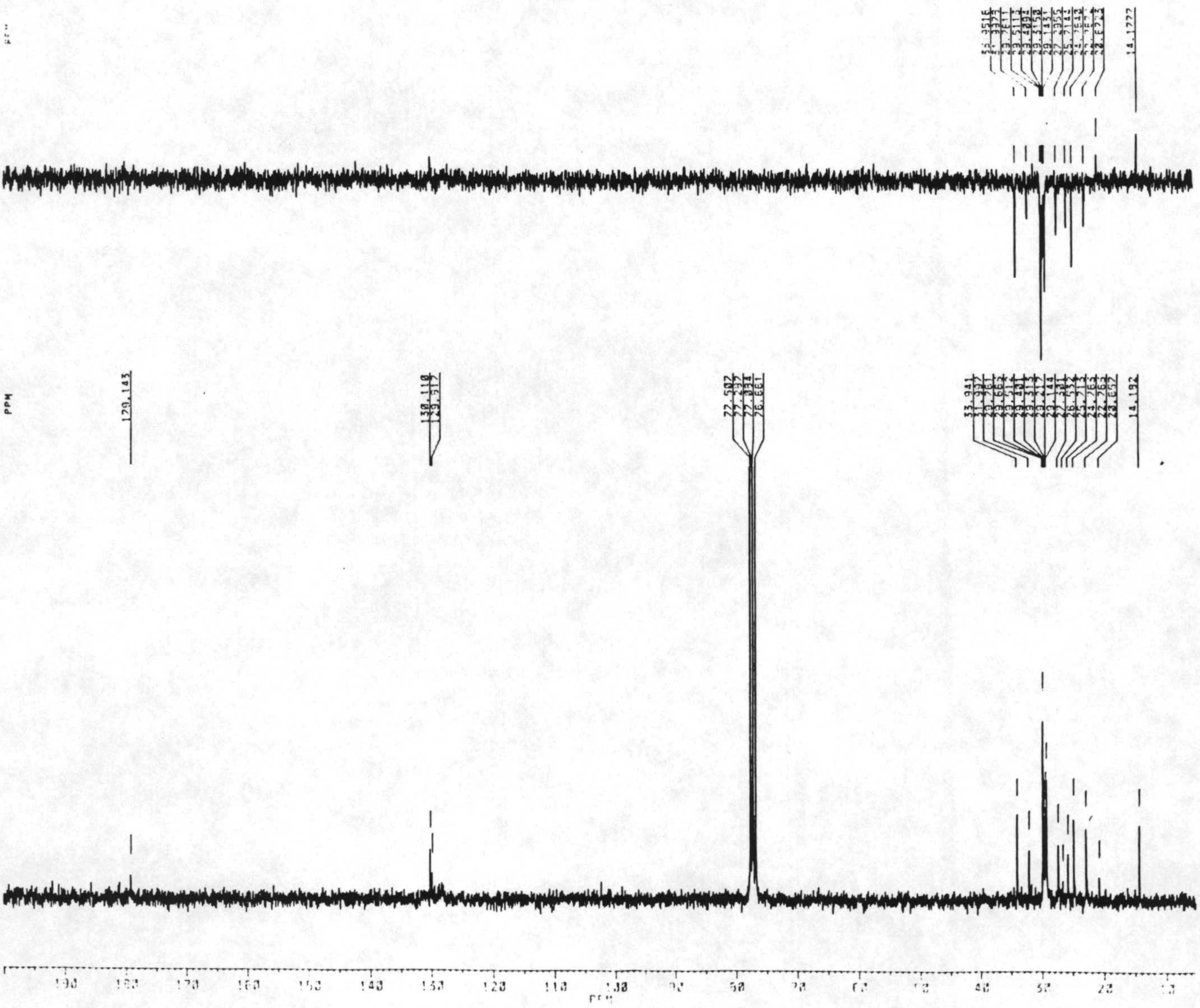


3.7.2.- Espectro RMN Protones de la banda 0,34





3.7.3.- Espectro RNM  $C^{13}$  de la banda 0,55

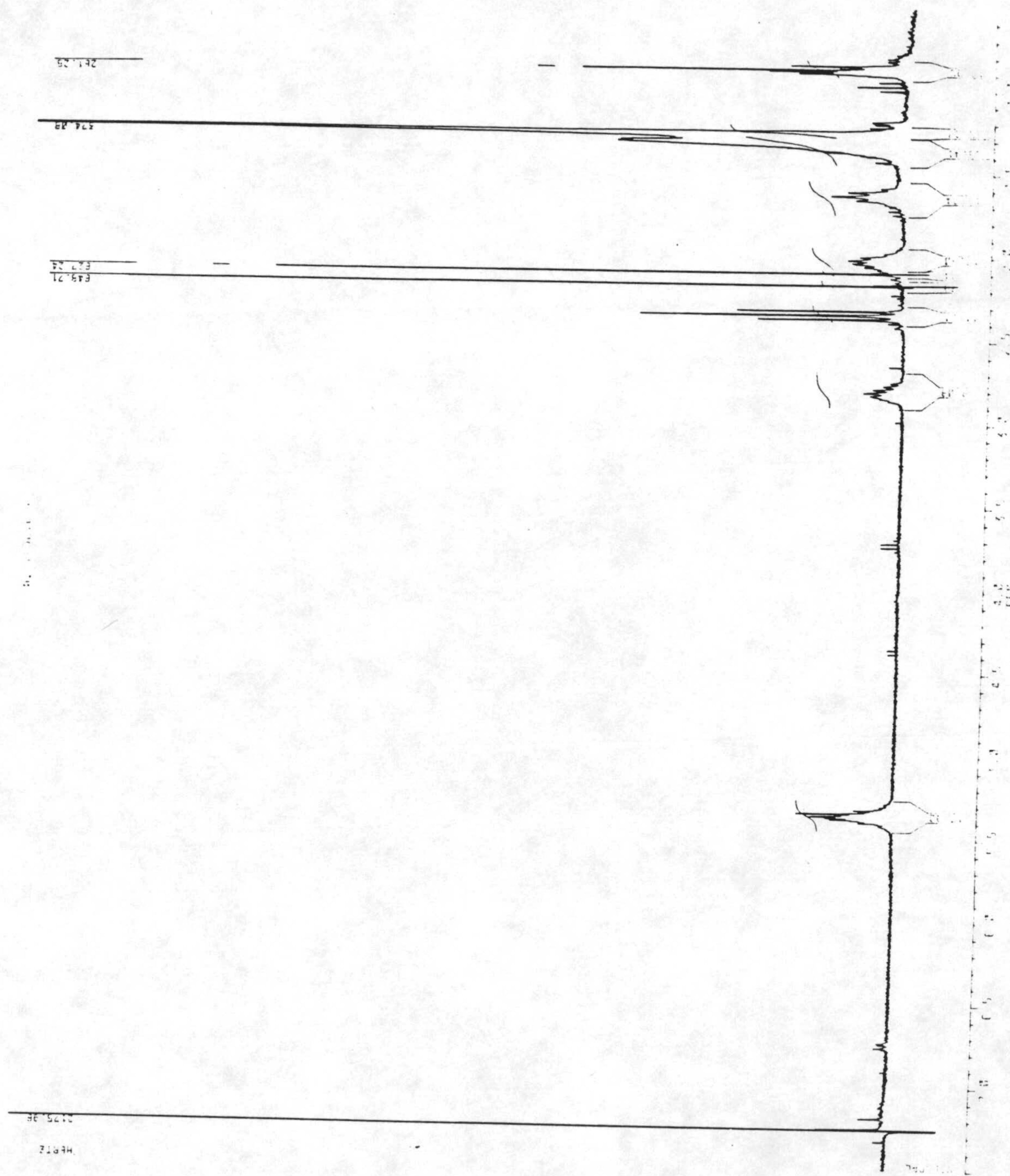




Resultados

---

3.7.4.- Espectro RMN Protones de la banda 0,55

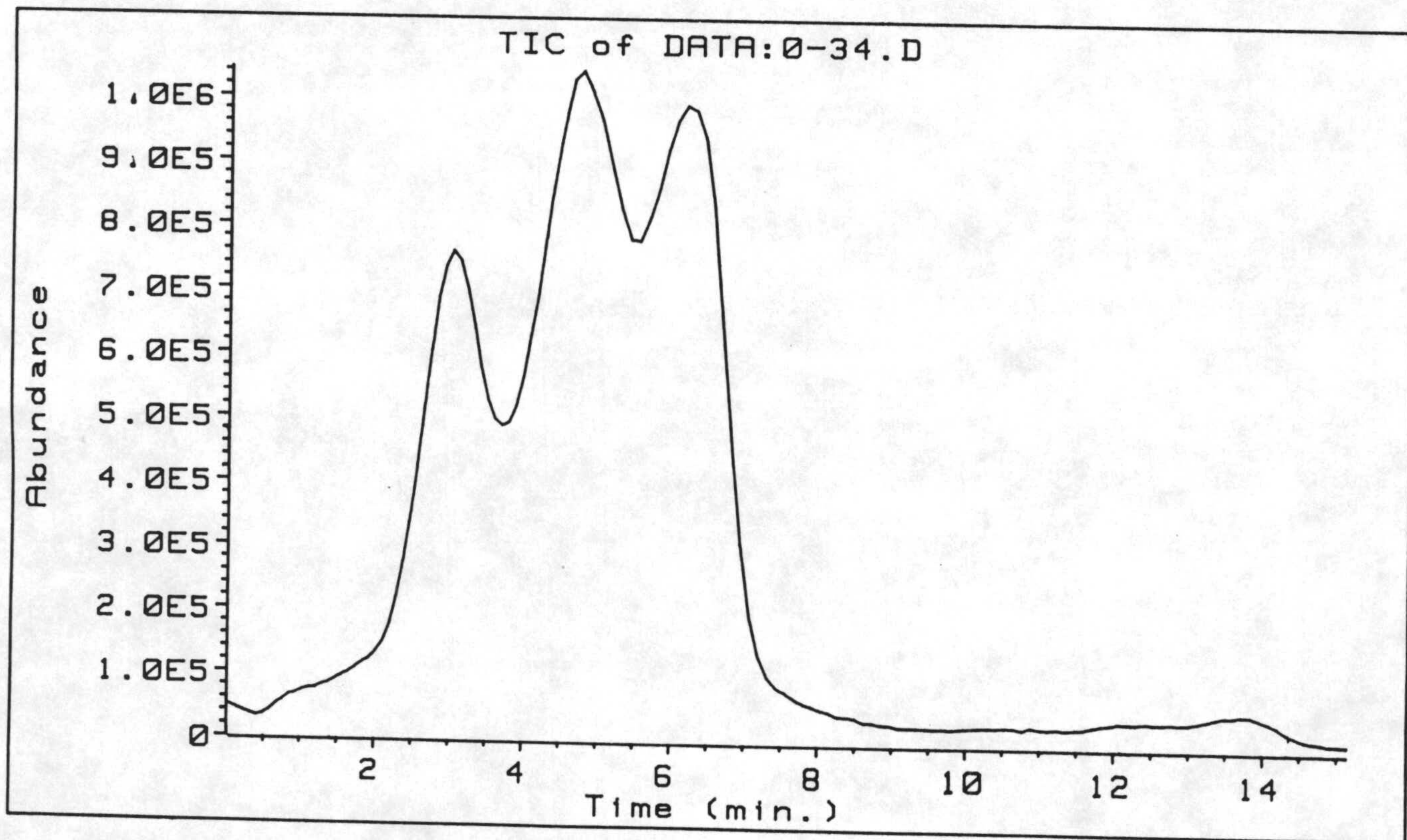




**3.8.- ESPECTROS DE VOLATILIZACION Y MASAS POR INYECCION  
DIRECTA DE LAS BANDAS QUE HAN MOSTRADO ACTIVIDAD:**

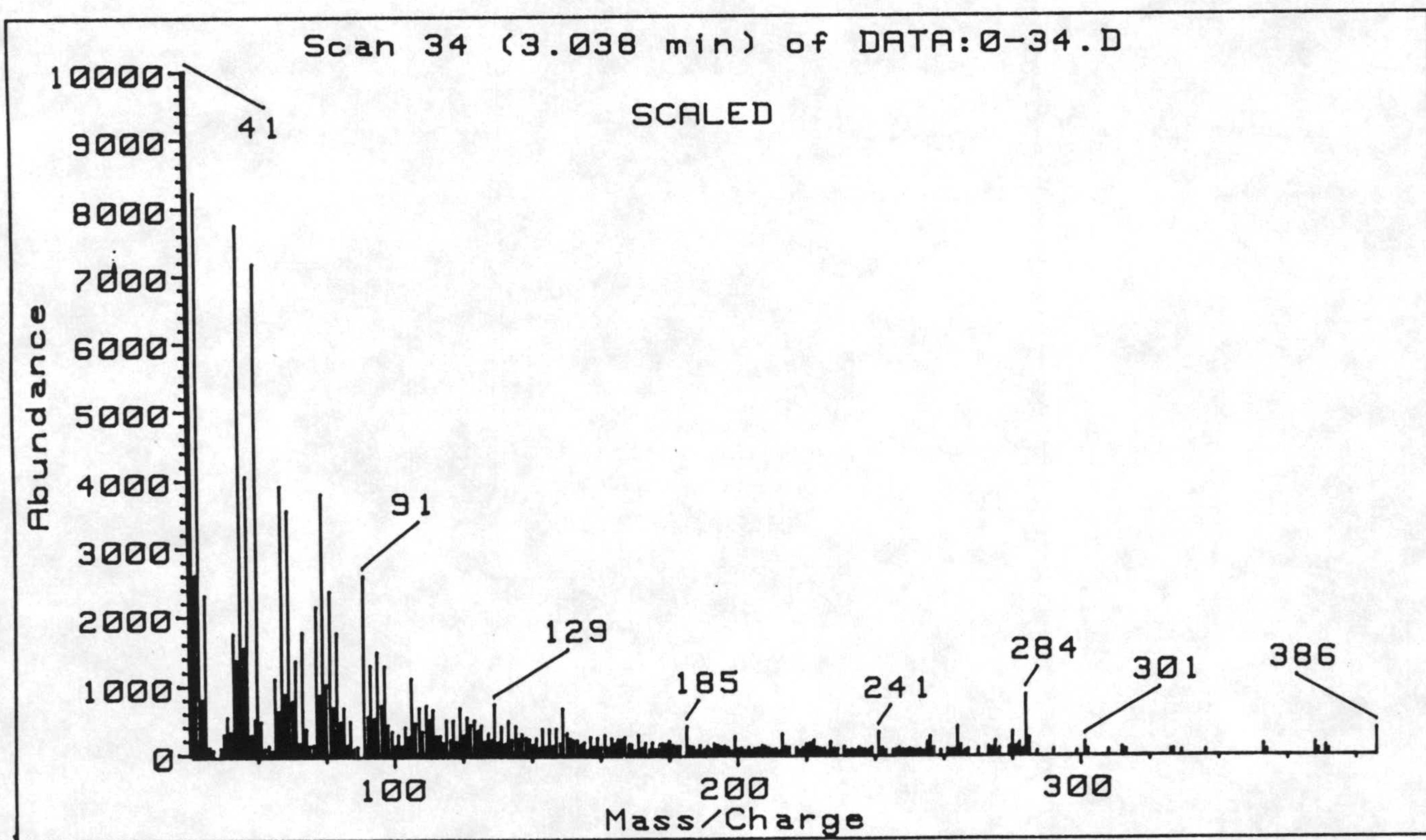


3.8.1.- Curva de volatilización de la banda 0,34



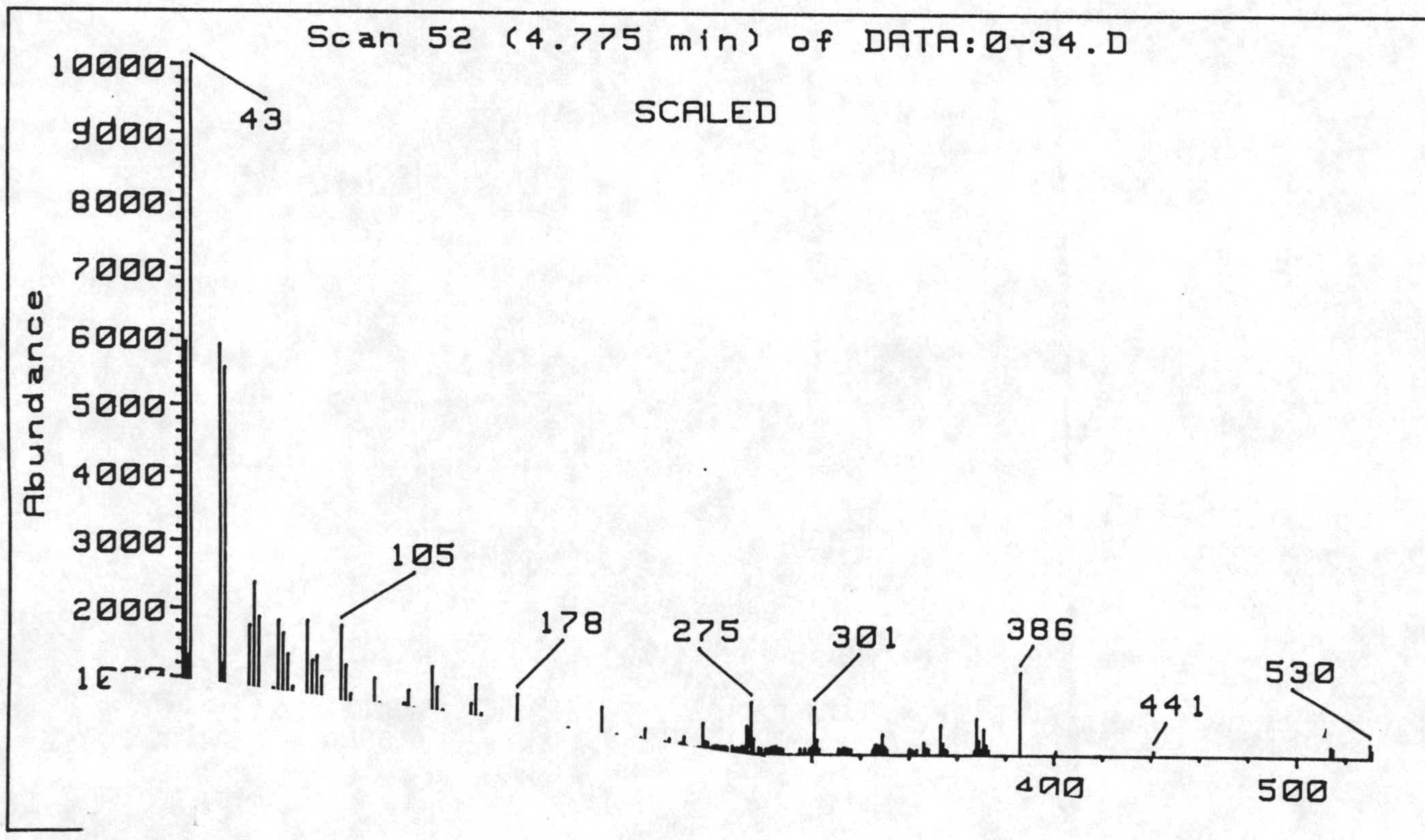


3.8.2.- Espectro de masas del pico n°1 de la banda 0,34



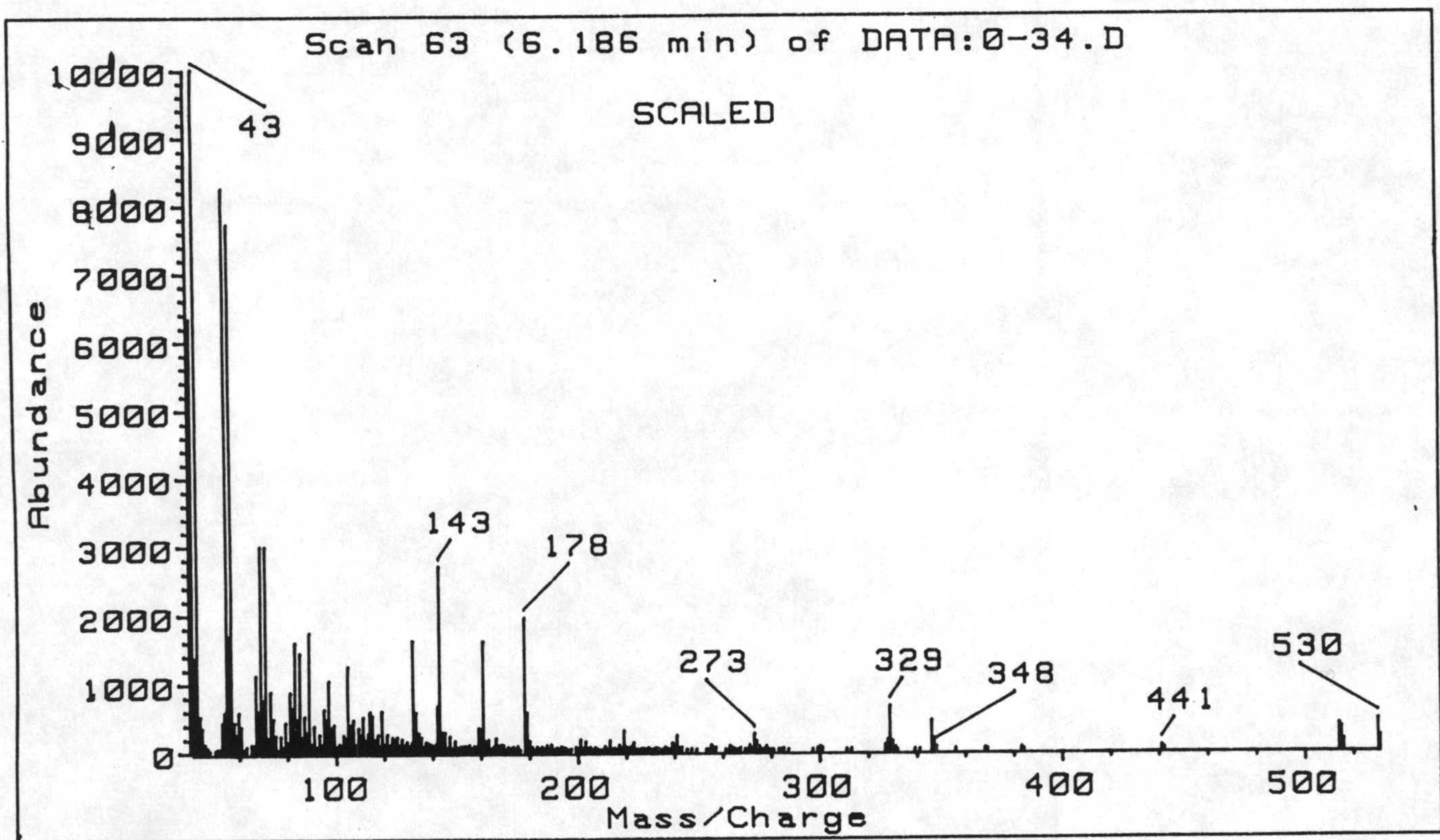


3.8.3.- Espectro de masas del pico nº2 de la banda 0,34



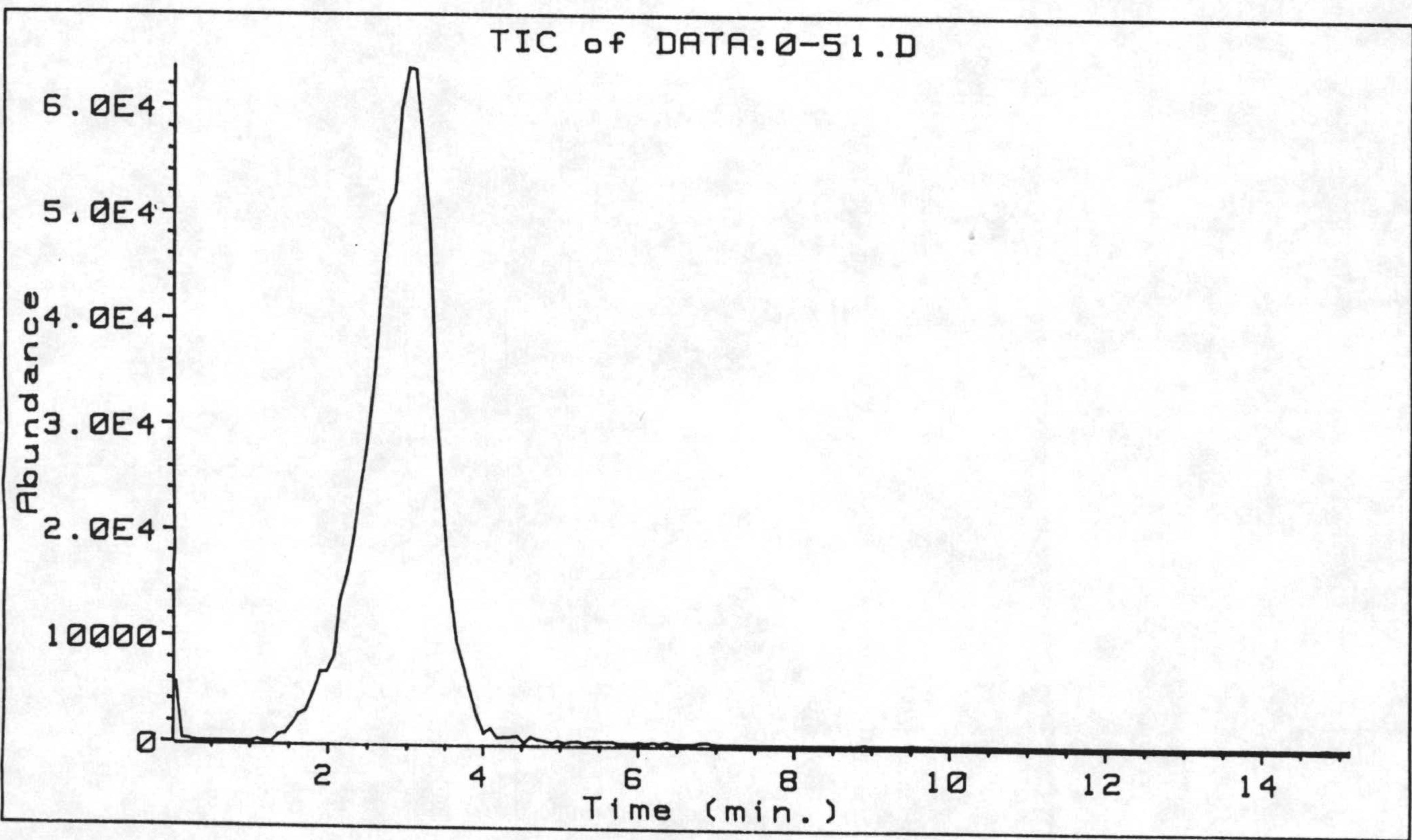


3.8.4.- Espectro de masas del pico n°3 de la banda 0,34



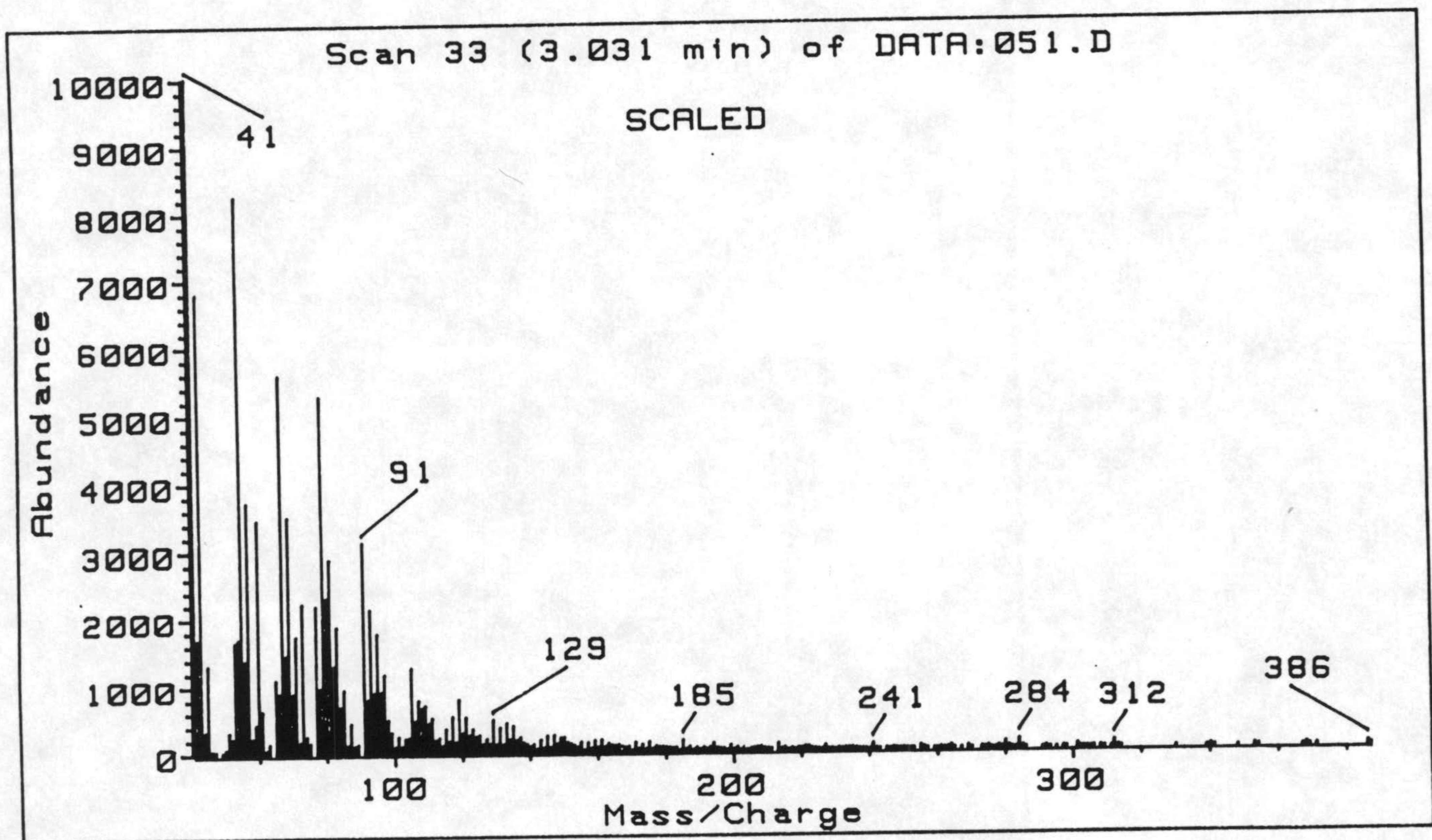


3.8.5.- Curva de volatilización de la banda 0,55:





3.8.6.- Espectro de masas del pico aparecido en la banda 0,55

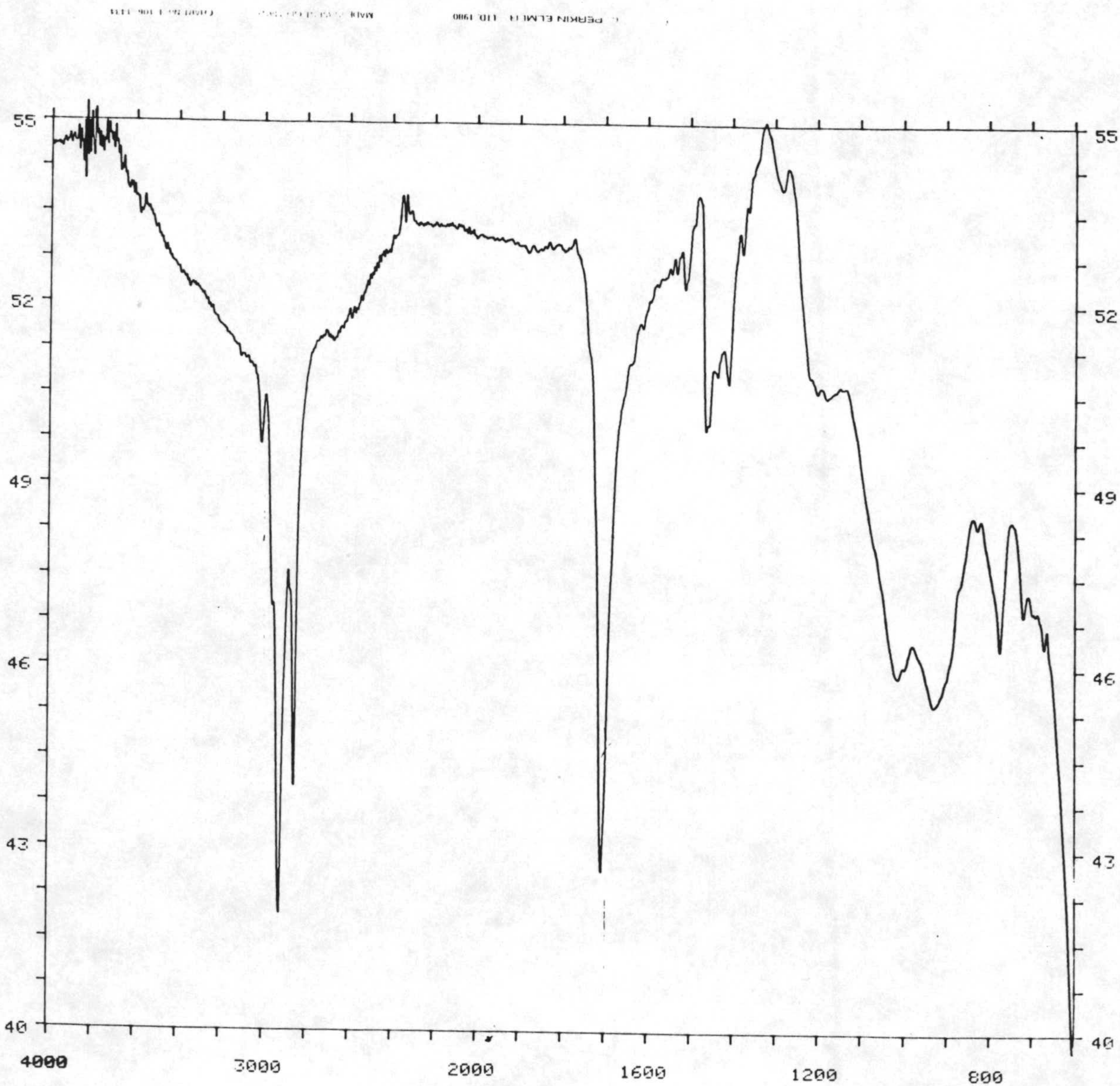




**3.9. - ESPECTROS DE INFRARROJO DE LAS BANDAS 0,34 Y 0,55**

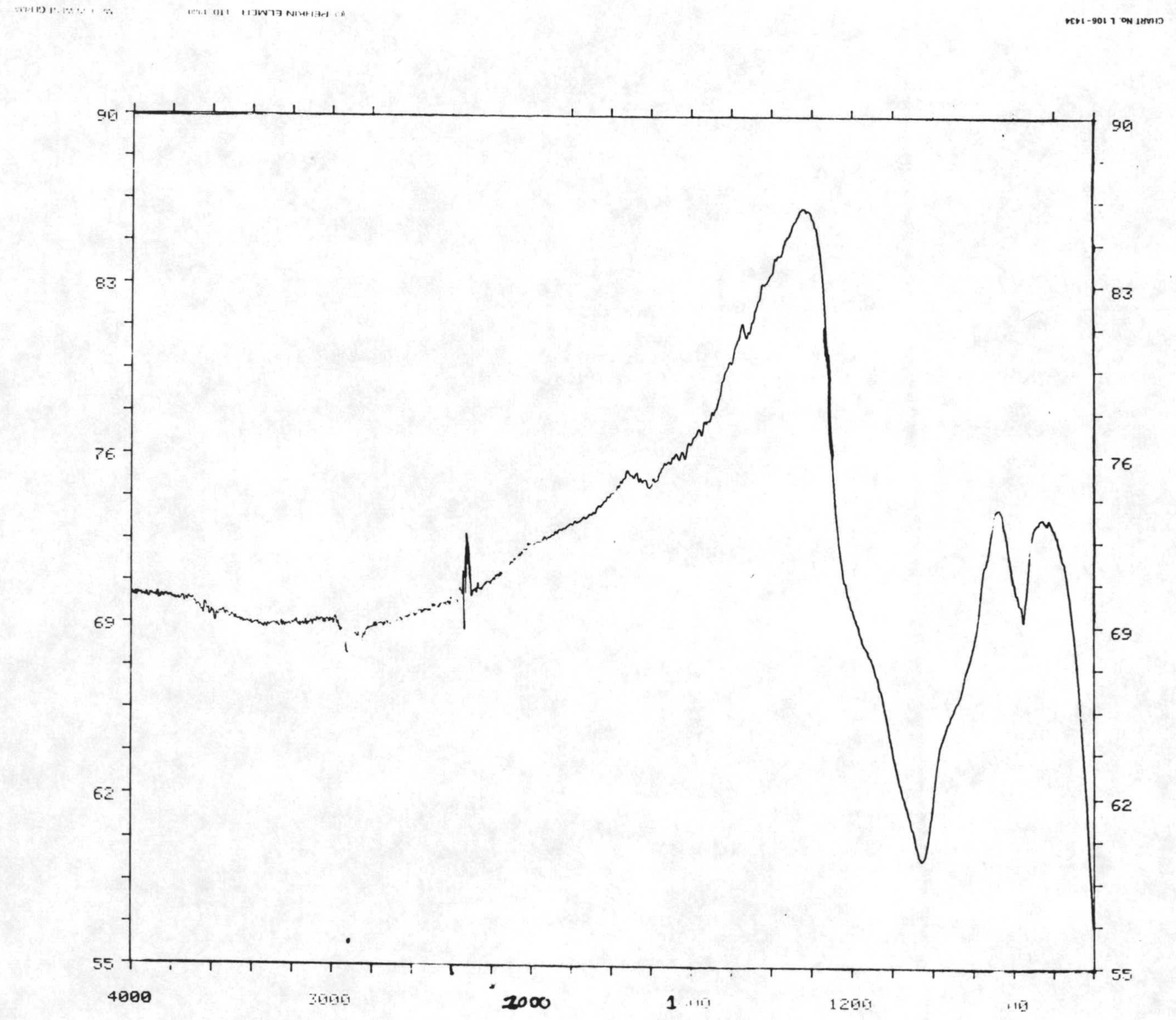


3.9.1. - Espectro de infrarrojo de la banda de r.f. 0,334





3.9.2. - Espectro de infrarrojo de la banda 0,55





**3.10.- ESTUDIO DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCION**



### 3.10.1.- Incorporación de Timidina [H]<sup>3</sup> por macrófagos peritoneales de ratón

Una vez que conocíamos cuales eran las fracciones con capacidad citotóxica para macrófagos, y que dentro de los dos tipos de macrófagos utilizados en las anteriores experiencias, son más sensibles los macrófagos peritoneales de ratón, quisimos conocer si se producía alguna modificación metabólica en estas células, al ponerlas en contacto con las fracciones tóxicas purificadas por TLC. Para esto diseñamos una experiencia de acuerdo con el apartado 2.5.1.2. obteniéndose los siguientes resultados:

**TABLA XV:** Porcentaje de incorporación de Timidina [H<sup>3</sup>] en células tratadas con toxina de líquido hidatídico, respecto a células control:

	Horas de contacto	
	1	3
Control sin toxina	7.1 ± 1.3	9.4 ± 3.4
Banda 0,34 a DL50	37.2 ± 3.8	48.6 ± 2.7
Banda 0,55 a DL50	41.0 ± 5.7	49.5 ± 4.1



**3.10.2.- Estudio de la inducción a la producción de radicales libres por la fracción tóxica sobre macrófagos peritoneales de ratón**

**3.10.2.1.- Efecto del agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre la citotoxicidad de la fracción obtenida de líquido hidatídico frente a macrófagos peritoneales de ratón**

Una vez preparada la experiencia como se describe en 2.8.1.1. los resultados obtenidos fueron:

**TABLA XVI: Porcentaje de células incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

3

6

Control sin toxina	2.3 ± 0.7	7.3 ± 0.6
Banda 0,34 DL50	57.5 ± 0.9	54.2 ± 1.4
Banda 0,55 DL50	54.2 ± 1.5	58.5 ± 0.8
Banda 0,34 DL50 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	51.3 ± 1.7	50.8 ± 1.0
Banda 0,55 DL50 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48.2 ± 0.5	50.1 ± 0.7



**3.10.2.2.- Efecto de la catalasa en la capacidad citotóxica de la fracción obtenida de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón**

**TABLA XII: Porcentaje de células incubadas con toxina de líquido hidatídico y catalasa, teñidas con Azul Trypan:**

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	0.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2
Banda0,34DL50	51.3 ± 0.9	54.2 ± 0.8
Banda0,55DL50	50.2 ± 0.5	52.8 ± 0.8
Banda0,34DL50 + Catalasa	52.1 ± 1.2	49.3 ± 0.6
Banda0,55DL50 + Catalasa	51.1 ± 1.8	57.6 ± 1.8



**3.10.2.3.- Efecto del glutatión reducido sobre la capacidad citotóxica de la fracción clorofórmica obtenida de líquido hidatídico, frente macrófagos peritoneales**

**TABLA XIII: Porcentaje de células incubadas con toxina de líquido hidatídico y glutatión reducido, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

	3	6
Control	3.5 ± 0.6	5.2 ± 0.3
Banda 0,34 DL50	54.5 ± 0.8	61.0 ± 1.2
Banda 0,55 DL50	56.2 ± 0.7	63.2 ± 1.5
Banda 0,34 DL50 + Glutatión	50.1 ± 0.6	53.9 ± 1.2
Banda 0,55 DL50 + Glutatión	53.8 ± 1.6	55.3 ± 1.9



**3.10.2.4.- Capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón, incubados con T-Butil Hidroperóxido**

**TABLA XIX: Porcentaje de células incubadas con T-Butil Hidroperóxido y toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

	3	6
Control sin toxina	1.1 ± 0.3	4.1 ± 0.6
Banda 0,34 DL50	47.2 ± 0.8	50.1 ± 1.6
Banda 0,55 DL50	53.4 ± 1.9	58.3 ± 1.1
Banda 0,34 DL50 + TBH	51.2 ± 1.1	52.3 ± 1.8
Banda 0,55 DL50 + TBH	52.2 ± 1.2	56.4 ± 0.7



**3.10.3. Efecto de los inhibidores del glutatión sobre la citotoxicidad de la fracción obtenida de líquido hidatídico**

**3.10.3.1.- Efecto de la butionina sulfoximida (BSO), sobre la capacidad citotóxica de la fracción clorofórmica obtenida de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón**

**TABLA XX: Porcentaje de células incubadas con BSO y toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

3

6

Control sin toxina	1.2 ± 0.5	2.2 ± 0.9
Banda 0,34 DL50	48.7 ± 1.5	48.8 ± 0.9
Banda 0,55 DL50	47.1 ± 1.6	49.0 ± 0.7
Banda 0,34 DL50 + BSO	51.1 ± 0.5	53.1 ± 1.5
Banda 0,55 DL50 + BSO	50.2 ± 1.1	50.7 ± 1.6



**3.10.3.2.- Capacidad citotóxica de la fracción clorofórmica obtenida de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón, en un medio de interacción suplementado con 1-cloro-2,4-dinitro-benceno (CDNB):**

**TABLA XXI: Porcentaje de células incubadas con CDNB y toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

	3	6
Control sin toxina	3.1 ± 0.2	6.2 ± 0.4
Banda 0,34 DL50	54.6 ± 1.1	58.1 ± 1.9
Banda 0,55 DL50	53.7 ± 1.3	54.9 ± 1.7
Banda 0,34 DL50 + CDNB	52.6 ± 0.8	57.8 ± 1.2
Banda 0,55 DL50 + CDNB	52.1 ± 0.9	57.6 ± 0.8



**3.10.4.- Estudio de fenómenos de peroxidación, de lípidos de membrana, mediante la cuantificación de los niveles de Malón-Dialdehído (MDA)**

Trás realizar en un fluorímetro, la lectura de cada uno de los problemas respecto a su control, obtuvimos los siguientes resultados.

**TABLA XXII: Niveles de Malón-Dialdehído en células tratadas con fracción tóxica:**

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	2.3nM ± 0.2	2.2nM ± 0.3
Banda 0,34 DL50	2.1nM ± 0.7	2.9nM ± 0.1
Banda 0,55 DL50	2.8nM ± 0.4	2.6nM ± 0.2



**3.10.5.- Capacidad citotóxica de la fracción obtenida de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales, provenientes de ratones inyectados con 6-metil-prednisolona:**

**TABLA XXIII: Porcentaje de células tratadas con antiinflamatorio e incubadas con toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

3

6

Control sol. Hank sin toxina	1.1 ± 0.3	4.1 ± 0.6
Banda 0,34 DL50 en sol. Hank fresco	47.2 ± 0.8	50.1 ± 1.6
Banda 0,55 DL50 en sol. Hank fresco	51.2 ± 1.9	52.3 ± 1.8
Control sol. lavado peritoneal sin toxina	2.4 ± 0.2	5.6 ± 0.7
Banda 0,34 DL50 en sol. lavado peritoneal	51.5 ± 1.2	53.1 ± 0.8
Banda 0,55 DL50 en sol. lavado peritoneal	49.5 ± 0.8	51.2 ± 1.8



*Resultados*

---

**3.10.6.- Efecto de la Fibronectina sobre la citotóxicidad de la fracción obtenida de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón**

**TABLA XXIV: Porcentaje de células incubadas con fibronectina y toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

	3	6
Control sin toxina	0.8 ± 0.5	1.2 ± 0.3
Control + fibronectina	3.1 ± 0.8	4.6 ± 0.4
Banda 0,34 DL50	59.2 ± 1.8	62.4 ± 1.5
Banda 0,55 DL50	52.4 ± 1.5	55.6 ± 1.7
Banda 0,34 DL50+Fibronec. 10µg	47.1 ± 0.8	54.2 ± 1.2
Banda 0,55 DL50+Fibronec. 10µg	51.2 ± 1.9	56.8 ± 1.6
Banda 0,34 DL50+Fibronec. 50µg	35.3 ± 1.6	41.1 ± 2.2
Banda 0,55 DL50+Fibronec. 50µg	38.7 ± 1.4	31.2 ± 0.9
Banda 0,34 DL50+Fibronec. 100µg	21.3 ± 1.5	26.4 ± 0.9
Banda 0,55 DL50+Fibronec. 100µg	22.6 ± 1.3	23.1 ± 0.6



*Resultados*

---

**3.10.7.- Efecto de la fracción tóxica de líquido hidatídico, sobre macrófagos peritoneales de ratón incubados con el ionóforo A23187**

**TABLA XXV: Porcentaje de células incubadas con A23187 y toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

	3	6
Control sin toxina	2.3 ± 0.8	4.6 ± 0.7
Control sin toxina + ionóforo	6.3 ± 1.0	5.4 ± 0.8
Banda 0,34 DL50	52.0 ± 2.3	54.6 ± 1.2
Banda 0,55 DL50	49.5 ± 0.7	51.2 ± 2.4
Banda 0,34 DL50 + ionóforo	58.6 ± 1.9	62.3 ± 1.1
Banda 0,55 DL50 + ionóforo	54.6 ± 0.6	56.7 ± 1.5



**3.10.8.- Capacidad citotóxica de la fracción obtenida de líquido hidatídico, sobre macrófagos activados**

**3.10.8.1.- Efecto de la fracción tóxica de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón obtenidos de ratones inyectados con la fracción lipídica de coadyuvante de Freund**

**TABLA XXVI: Porcentaje de células activadas con coadyuvante de Freund e incubadas con toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

	Horas de contacto	
	3	6
Control sin toxina	1.2 ± 0.2	3.5 ± 0.5
Control sin toxina + C.freund	8.1 ± 0.9	11.3 ± 0.6
Banda 0,34 DL50	51.2 ± 0.9	57.3 ± 1.6
Banda 0,55 DL50	53.2 ± 1.7	54.2 ± 1.4
Banda 0,34 DL50 + C. freund	62.6 ± 2.7	64.4 ± 0.8
Banda 0,55 DL50 + C. freund	63.2 ± 1.8	66.2 ± 2.4



**3.10.8.2.- Capacidad citotóxica de la fracción de líquido hidatídico sobre macrófagos peritoneales de ratón, incubados con  $\gamma$ -interferon**

**TABLA XXII: Porcentaje de células activadas con  $\gamma$ -interferón e incubadas con toxina de líquido hidatídico, teñidas con Azul Trypan:**

**Horas de contacto**

	3	6
Control sin toxina	2.4 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.2
Control sin toxina + $\gamma$ -INF	5.3 $\pm$ 0.4	7.6 $\pm$ 0.4
Banda 0,34 DL50	46.3 $\pm$ 1.2	48.5 $\pm$ 0.9
Banda 0,55 DL50	50.1 $\pm$ 0.8	52.3 $\pm$ 1.1
Banda 0,34 DL50 + $\gamma$ -INF	51.3 $\pm$ 1.8	51.2 $\pm$ 0.7
Banda 0,55 DL50 + $\gamma$ -INF	50.3 $\pm$ 0.8	52.4 $\pm$ 1.7



**3.11.- DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS**



Resultados

**3.11.1.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima ciclo-oxigenasa, frente a la banda 0,34**

En la presente tabla se muestra la absorbancia/tiempo de la reacción enzimática, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.9.1., datos en base a los cuales ha sido calculada la actividad enzimática de una reacción control y de la reacción problema (en la que se encontraba la fracción 0,34 de el extracto clorofórmico del líquido hidatídico), este mismo método ha sido utilizado en los siguientes subapartados de determinación de actividades enzimáticas.

**TABLA XXIII: Absorbancia frente a tiempo:**

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control Ac . Araquid.	C. Araquid .+enzima	Araquid.+e nzima+0,34		Control Ac . Araquid.	C. Araquid .+enzima	Araquid.+e nzima+0,34
	0,064	0,052	0,084		0,043	0,259	0,201
	0,06	0,053	0,086		0,044	0,266	0,208
	0,05	0,054	0,081		0,044	0,272	0,21
A	0,05	0,06	0,085	A	0,044	0,282	0,216
	0,05	0,073	0,111		0,044	0,291	0,218
B	0,049	0,078	0,112	B	0,044	0,299	0,22
	0,049	0,085	0,115		0,045	0,302	0,221
S	0,049	0,093	0,107	S	0,045	0,308	0,223
	0,047	0,104	0,114		0,045	0,312	0,226
O	0,047	0,108	0,117	O	0,046	0,314	0,226
	0,047	0,118	0,12		0,046	0,316	0,226
R	0,045	0,12	0,122	R	0,046	0,317	0,229
	0,045	0,129	0,127		0,046	0,319	0,23
B	0,045	0,132	0,13	B	0,046	0,32	0,23
	0,045	0,134	0,136		0,047	0,322	0,23
A	0,045	0,142	0,14	A	0,047	0,324	0,231
	0,044	0,148	0,145		0,046	0,325	0,231
N	0,043	0,153	0,15	N	0,047	0,324	0,232
	0,043	0,163	0,155		0,046	0,329	0,232
C	0,043	0,171	0,16	C	0,046	0,332	0,232
	0,043	0,182	0,165		0,046	0,332	0,233
I	0,043	0,191	0,169	I	0,046	0,333	0,235
	0,043	0,199	0,174		0,046	0,331	0,235
A	0,043	0,204	0,181	A	0,045	0,332	0,235
	0,043	0,213	0,184		0,046	0,334	0,235
	0,043	0,221	0,188		0,046	0,334	0,235
	0,043	0,229	0,191		0,046	0,334	0,235
	0,043	0,234	0,194		0,046	0,34	0,235
	0,043	0,245	0,196		0,046	0,34	0,235
	0,043	0,252	0,2		0,046	0,341	0,235

La actividad enzimática ha sido calculada con arreglo a la fórmula descrita en el apartado 2.9., siendo la del enzima control de  $3,92 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , y la de la reacción problema de  $1,90 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$  lo que da un porcentaje de inhibición de 51,5%



Resultados

**3.11.2.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima lipoxigenasa frente a la banda 0,34**

De acuerdo con el protocolo descrito en 2.9.2. se ha determinado la actividad enzimática de la reacción enzimática suplementada con la fracción 0,34.

**TABLA XXIX: Absorbancia frente a tiempo:**

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control Ac . linoleic	linol.+enz ima+0,34	linoleico+ enzima		Control Ac . linoleic	linol.+enz ima+0,34	linoleico+ enzima
	0,32	0,338	0,356		0,347	0,485	0,57
	0,321	0,339	0,358		0,346	0,489	0,572
	0,335	0,34	0,36		0,346	0,493	0,573
	0,346	0,341	0,362		0,346	0,498	0,574
	0,35	0,342	0,368		0,346	0,498	0,575
A	0,351	0,351	0,378	A	0,346	0,5	0,576
	0,351	0,352	0,387		0,346	0,5	0,578
B	0,35	0,353	0,389	B	0,346	0,502	0,577
	0,35	0,355	0,396		0,346	0,503	0,578
S	0,351	0,359	0,406	S	0,346	0,503	0,579
	0,352	0,36	0,418		0,346	0,506	0,58
O	0,352	0,369	0,428	O	0,342	0,506	0,581
	0,349	0,374	0,436		0,343	0,508	0,581
R	0,349	0,379	0,444	R	0,346	0,509	0,582
	0,348	0,385	0,451		0,344	0,508	0,583
B	0,347	0,39	0,462	B	0,344	0,507	0,584
	0,346	0,399	0,473		0,344	0,509	0,586
A	0,345	0,409	0,485	A	0,343	0,507	0,586
	0,342	0,416	0,496		0,343	0,508	0,586
N	0,343	0,425	0,516	N	0,343	0,51	0,588
	0,346	0,431	0,529		0,342	0,511	0,589
C	0,346	0,439	0,544	C	0,343	0,509	0,59
	0,347	0,445	0,548		0,343	0,509	0,59
I	0,346	0,448	0,552	I	0,344	0,508	0,591
	0,344	0,452	0,557		0,343	0,508	0,59
A	0,342	0,456	0,56	A	0,343	0,507	0,59
	0,343	0,462	0,562		0,343	0,508	0,591
	0,343	0,467	0,563		0,342	0,507	0,592
	0,344	0,472	0,569		0,343	0,509	0,592
	0,345	0,474	0,57		0,346	0,51	0,59

La actividad enzimática de la reacción control ha sido  $4,03 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , la de la reacción problema ha sido de  $3,23 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , lo que da un porcentaje de inhibición del 20%



**3.110.3.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima malato-deshidrogenasa frente a la banda 0,34**

**TABLA XXX: Absorbancia frente at tiempo:**

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control ta mp.+enzim	problema	reacción control		Control ta mp.+enzim	problema	reacción control
	0,074	0,09	0,098		0,075	0,229	0,224
	0,074	0,092	0,095		0,074	0,234	0,228
	0,072	0,094	0,098		0,076	0,238	0,234
	0,076	0,094	0,101		0,075	0,248	0,233
	0,075	0,094	0,106		0,076	0,249	0,236
A	0,075	0,101	0,107	A	0,075	0,255	0,241
	0,076	0,102	0,108		0,075	0,259	0,245
B	0,075	0,104	0,109	B	0,075	0,264	0,248
	0,075	0,106	0,111		0,075	0,268	0,25
S	0,075	0,119	0,115	S	0,074	0,268	0,255
	0,075	0,12	0,118		0,075	0,271	0,261
O	0,077	0,123	0,121	O	0,075	0,272	0,269
	0,077	0,125	0,123		0,074	0,272	0,269
R	0,077	0,135	0,132	R	0,076	0,274	0,27
	0,078	0,134	0,135		0,075	0,273	0,27
B	0,077	0,139	0,135	B	0,074	0,271	0,27
	0,076	0,145	0,141		0,071	0,272	0,272
A	0,075	0,15	0,148	A	0,075	0,272	0,273
	0,076	0,154	0,151		0,074	0,273	0,275
N	0,074	0,159	0,158	N	0,074	0,273	0,275
	0,075	0,165	0,163		0,074	0,272	0,274
C	0,075	0,169	0,168	C	0,074	0,272	0,274
	0,076	0,171	0,174		0,074	0,271	0,275
I	0,075	0,178	0,182	I	0,075	0,27	0,273
	0,075	0,185	0,184		0,075	0,271	0,273
A	0,076	0,19	0,196	A	0,076	0,27	0,272
	0,075	0,199	0,191		0,076	0,271	0,273
	0,076	0,209	0,199		0,077	0,27	0,272
	0,075	0,216	0,206		0,077	0,272	0,271
	0,074	0,223	0,216		0,077	0,273	0,272

La actividad enzimática de la reacción control es de  $7,07 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , y la de la reacción problema de  $6,96 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , con lo que se produce una inhibición del 2%



Resultados

3.11.4.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima NADPH-oxidasa, frente a la banda 0,34

TABLA XXXI: Absorbancia frente a tiempo:

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control ta mp.+enzim	problema	reacción control		Control ta mp.+enzim	problema	reacción control
	0,074	0,075	0,072		0,074	0,136	0,16
	0,074	0,078	0,074		0,074	0,136	0,162
	0,075	0,084	0,075		0,074	0,136	0,163
	0,074	0,089	0,077		0,075	0,136	0,162
	0,074	0,095	0,078		0,075	0,136	0,162
A	0,075	0,1	0,08	A	0,075	0,136	0,161
	0,075	0,105	0,082		0,075	0,137	0,161
B	0,075	0,109	0,085	B	0,076	0,137	0,161
	0,074	0,113	0,089		0,076	0,137	0,162
S	0,074	0,118	0,093	S	0,075	0,136	0,162
	0,074	0,123	0,096		0,075	0,136	0,161
O	0,074	0,128	0,101	O	0,075	0,136	0,162
	0,073	0,131	0,106		0,074	0,136	0,16
R	0,073	0,133	0,111	R	0,074	0,135	0,161
	0,073	0,134	0,117		0,074	0,135	0,161
B	0,073	0,135	0,122	B	0,074	0,135	0,161
	0,073	0,135	0,126		0,074	0,135	0,162
A	0,074	0,136	0,13	A	0,074	0,136	0,161
	0,074	0,136	0,134		0,075	0,136	0,161
N	0,074	0,137	0,139	N	0,075	0,136	0,16
	0,075	0,136	0,142		0,075	0,136	0,161
C	0,075	0,135	0,146	C	0,075	0,135	0,161
	0,075	0,136	0,148		0,075	0,135	0,161
I	0,075	0,136	0,152	I	0,074	0,135	0,161
	0,075	0,136	0,154		0,074	0,135	0,161
A	0,075	0,136	0,155	A	0,075	0,136	0,16
	0,074	0,134	0,156		0,075	0,136	0,16
	0,074	0,135	0,157		0,075	0,136	0,16
	0,074	0,135	0,158		0,074	0,136	0,16
	0,074	0,135	0,159		0,075	0,135	0,16

La actividad enzimática de la reacción control es de  $5,40 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , y la de la reacción problema de  $3,05 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , lo que nos indica que se produce una inhibición en la actividad de este enzima del 30.%



3.11.5.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima lacto-deshidrogenasa, frente a la banda 0,34

TABLA XXXII: Absorbancia frente a tiempo:

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control ta mp.+enzim	problema	reacción control		Control ta mp.+enzim	problema	reacción control
	0,053	0,047	0,051		0,049	0,126	0,132
	0,053	0,049	0,05		0,049	0,126	0,132
	0,052	0,054	0,05		0,049	0,127	0,131
	0,051	0,058	0,051		0,048	0,127	0,131
	0,051	0,061	0,053	A	0,048	0,128	0,131
A	0,05	0,066	0,058		0,048	0,128	0,131
	0,05	0,069	0,061	B	0,048	0,129	0,131
B	0,05	0,074	0,068		0,049	0,129	0,132
	0,051	0,076	0,072	S	0,049	0,129	0,132
S	0,05	0,081	0,078		0,049	0,13	0,132
	0,049	0,086	0,081	O	0,049	0,13	0,131
O	0,049	0,089	0,087		0,048	0,129	0,131
	0,049	0,095	0,092	R	0,048	0,129	0,131
R	0,049	0,101	0,098		0,048	0,13	0,132
	0,049	0,106	0,104	B	0,049	0,13	0,131
B	0,049	0,112	0,109		0,049	0,13	0,131
	0,048	0,117	0,113	A	0,049	0,13	0,13
A	0,048	0,122	0,117		0,049	0,13	0,13
	0,048	0,124	0,122	N	0,05	0,131	0,13
N	0,049	0,125	0,127		0,05	0,131	0,131
	0,049	0,126	0,131	C	0,05	0,131	0,131
C	0,049	0,125	0,132		0,05	0,13	0,131
	0,049	0,126	0,132	I	0,05	0,131	0,131
I	0,048	0,126	0,131		0,051	0,132	0,131
	0,048	0,127	0,132	A	0,051	0,132	0,132
A	0,048	0,127	0,133		0,051	0,131	0,132
	0,048	0,124	0,133		0,051	0,131	0,132
	0,049	0,126	0,133		0,051	0,131	0,13
	0,049	0,126	0,132		0,052	0,131	0,132
	0,049	0,126	0,132		0,052	0,13	0,131

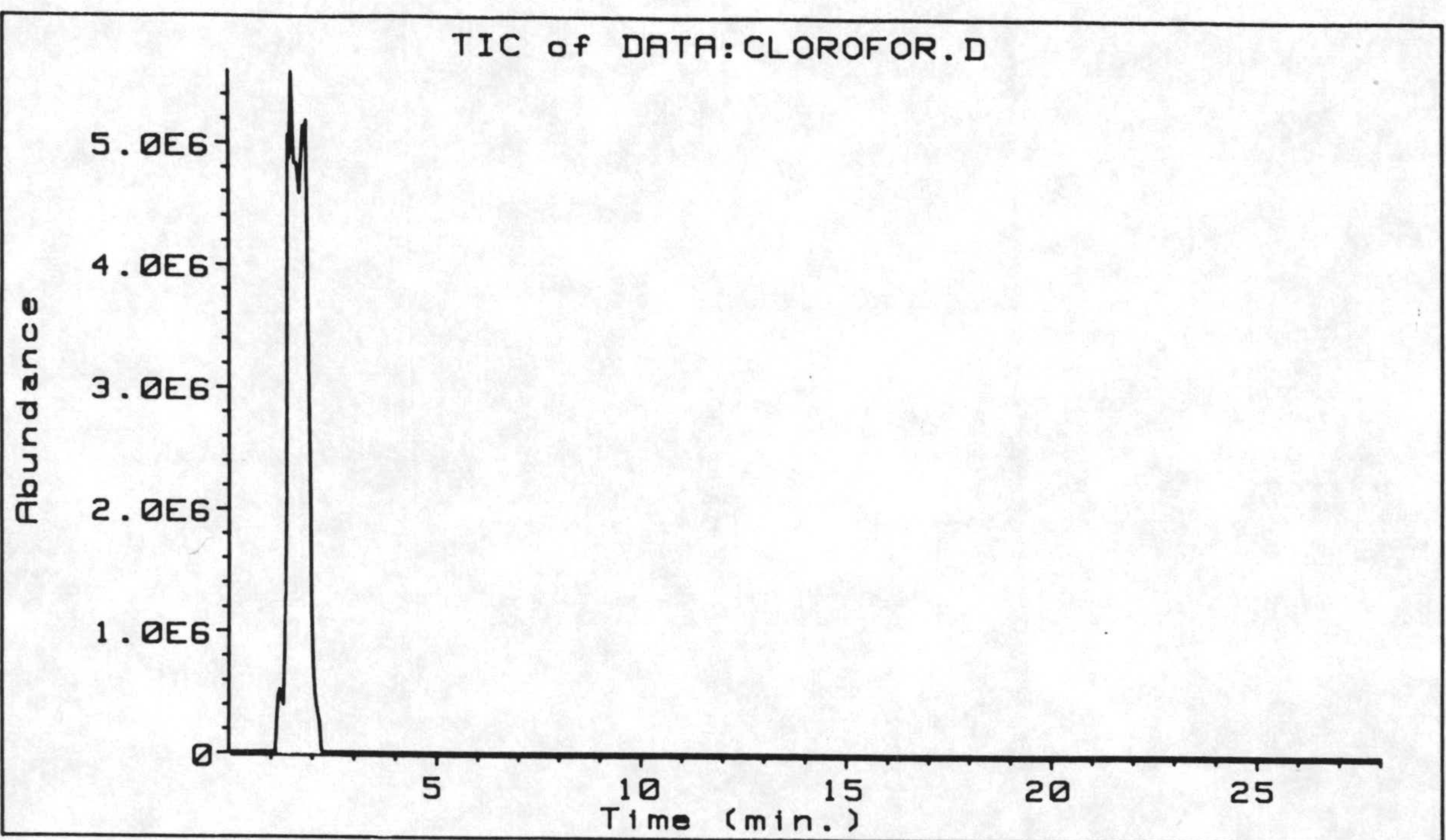
La actividad enzimática de la reacción control ha sido de  $5,20 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , la de la reacción problema de  $5,28 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint}^{-1}$ , lo que indica que se ha producido una activación del 1.5%



**3.12.- CONTROLES REALIZADOS A DISOLVENTES Y ENVASES:**

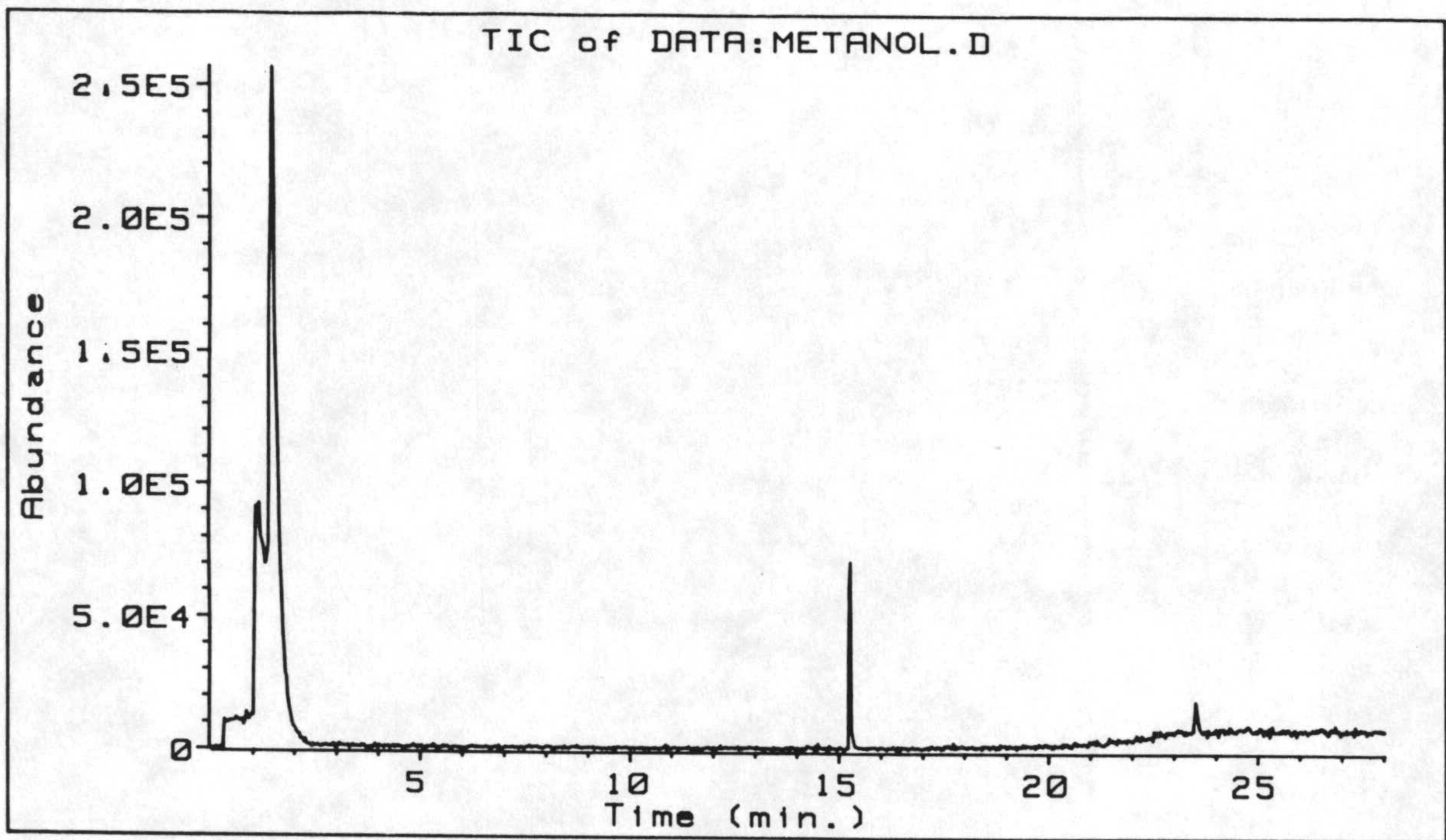


3.12.1.- Espectro de Gases-Masas del cloroformo



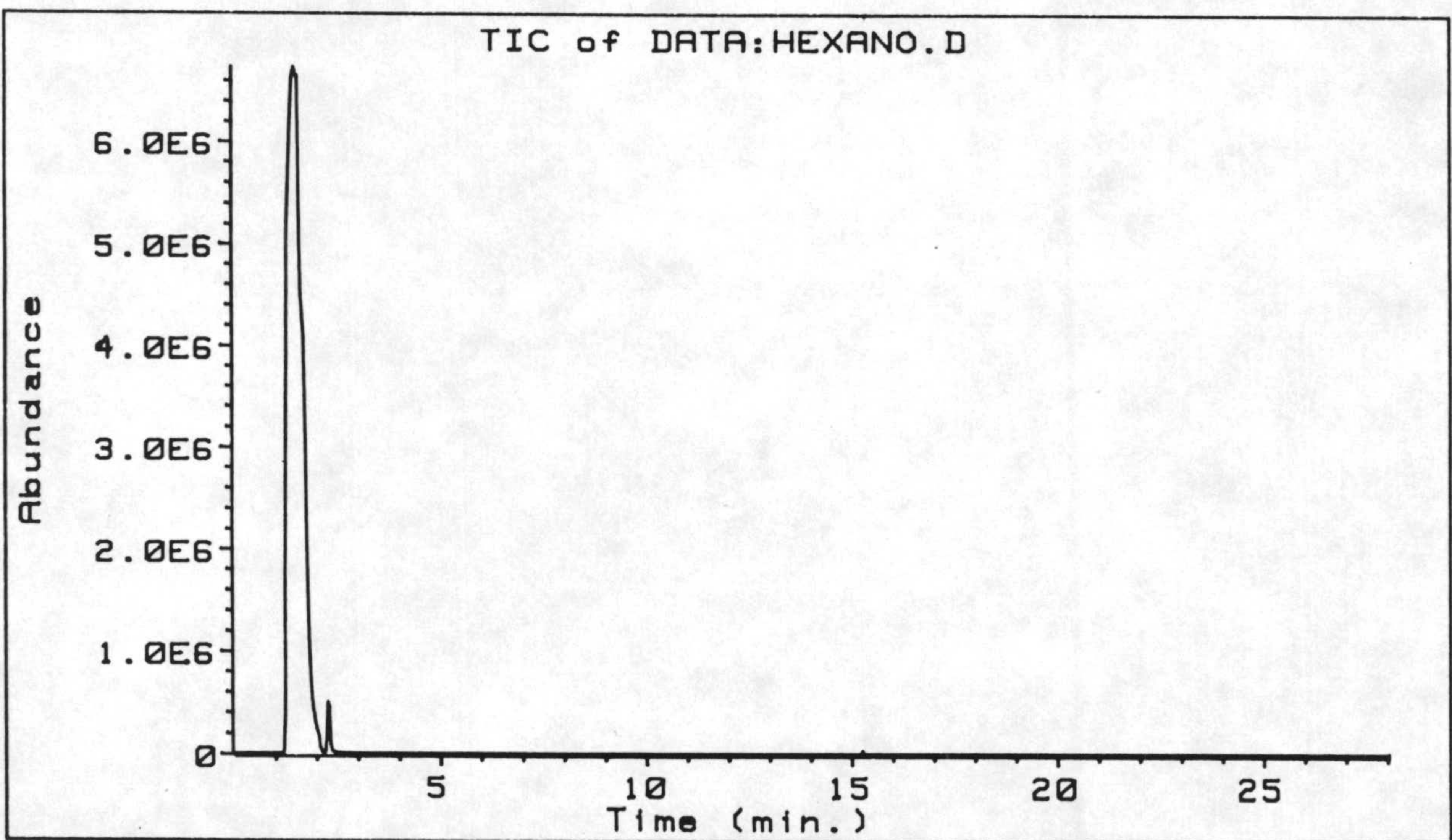


3.12.2.- Espectro de Gases-Masas del metanol



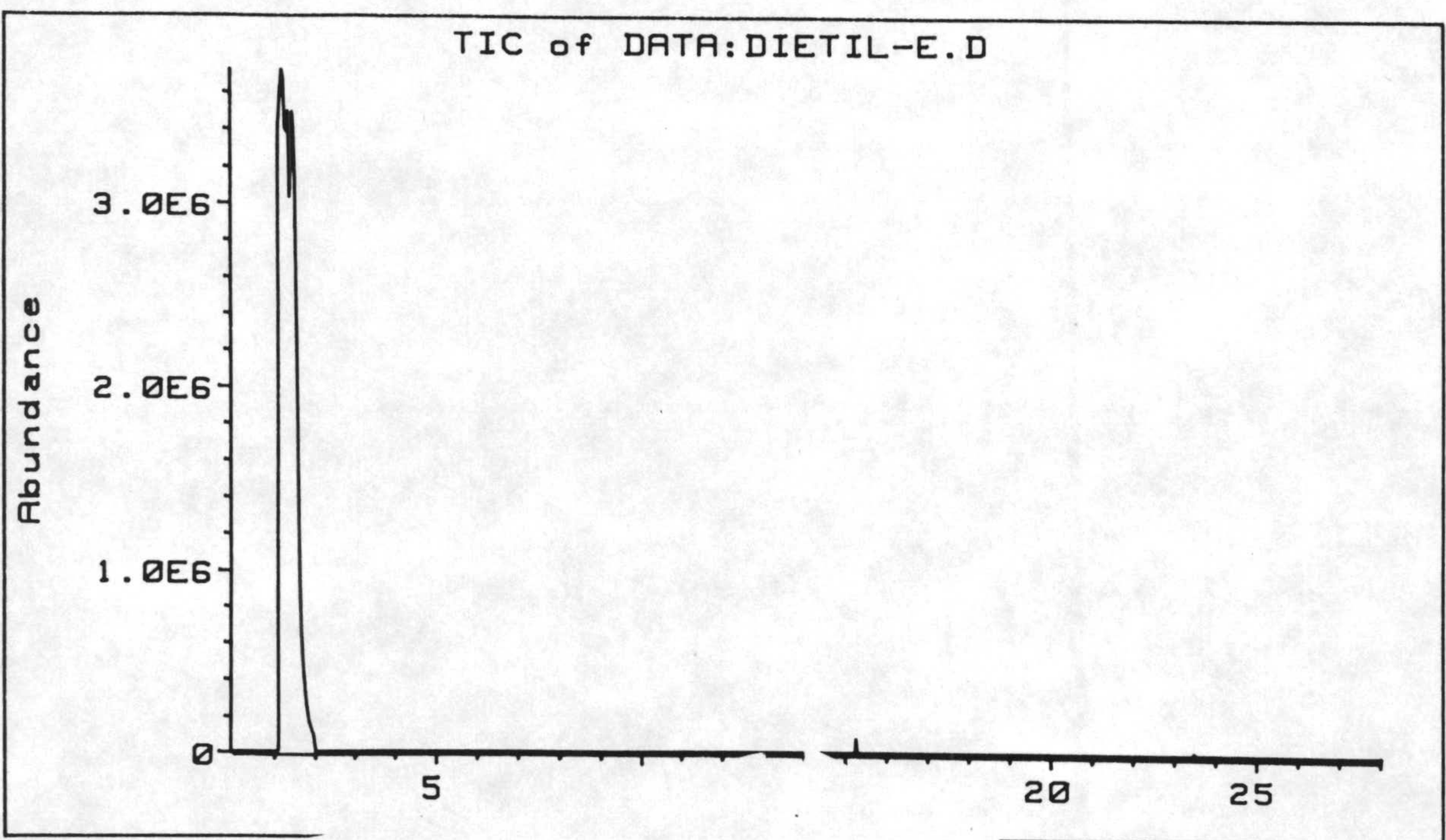


3.12.3.- Espectro de Gases-Masas-Masas del hexano



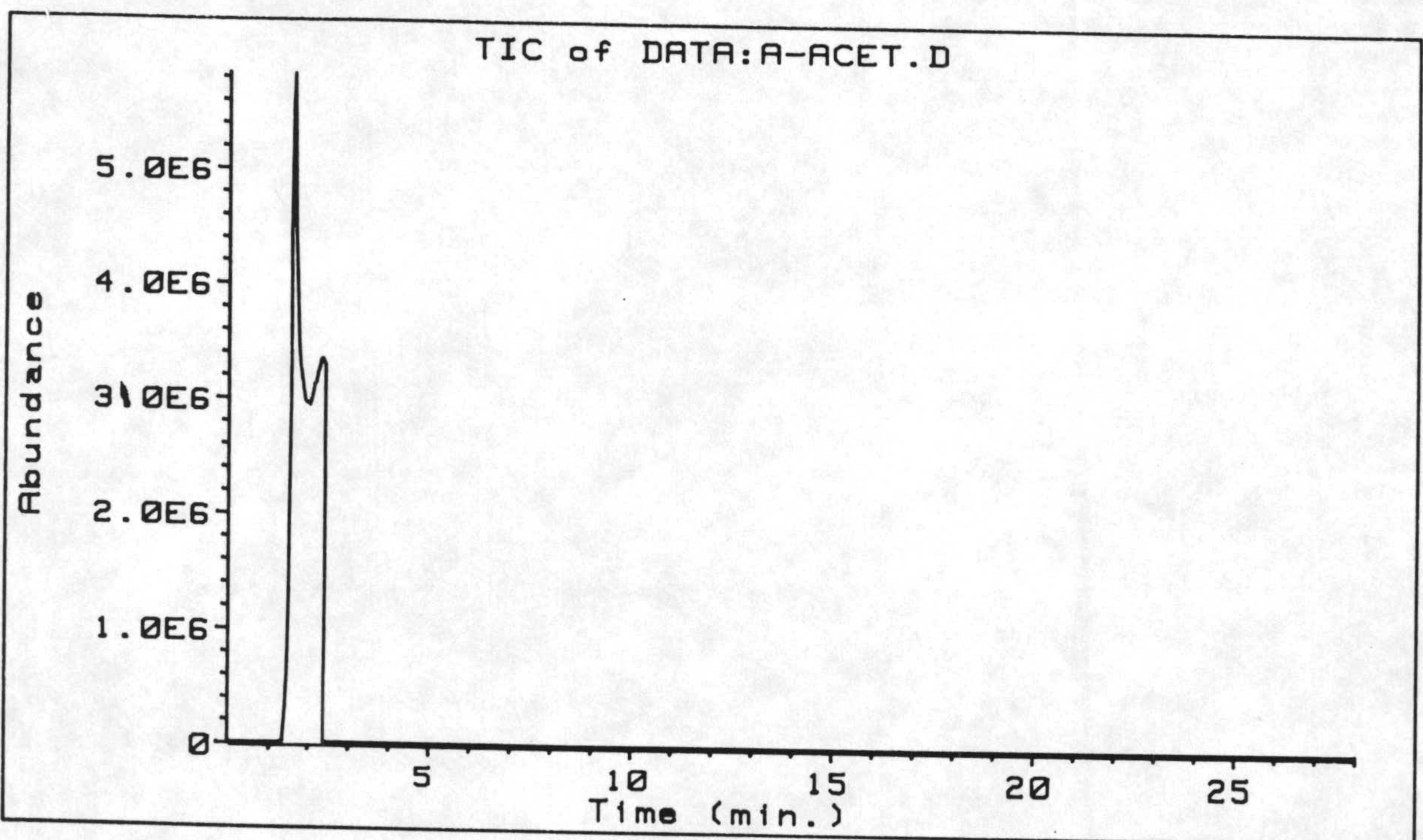


3.12.4.- Espectro de Gases-Masas del dietileter





3.12.5.- Espectro de Gases-Masas del ácido acético









### 3.13. CONTROLES REALIZADOS AL MATERIAL BIOLÓGICO

3.13.1 - Cromatografía en capa fina del extracto obtenido, tras incubar la solución de albúmina, en el envase del líquido hidatídico:

0.91	●
0.83	●
0.78	●
0.61	●
0.52	●
0.38	●
0.33	●
0.24	●
0.21	●
0.14	●
0.13	●
0.11	●
Origen	●

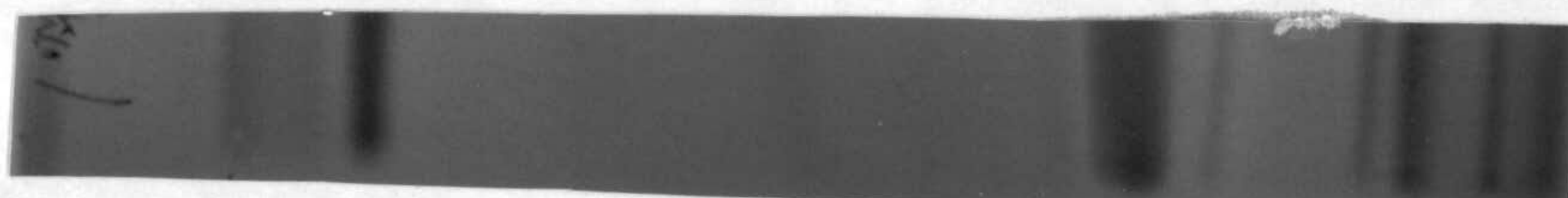
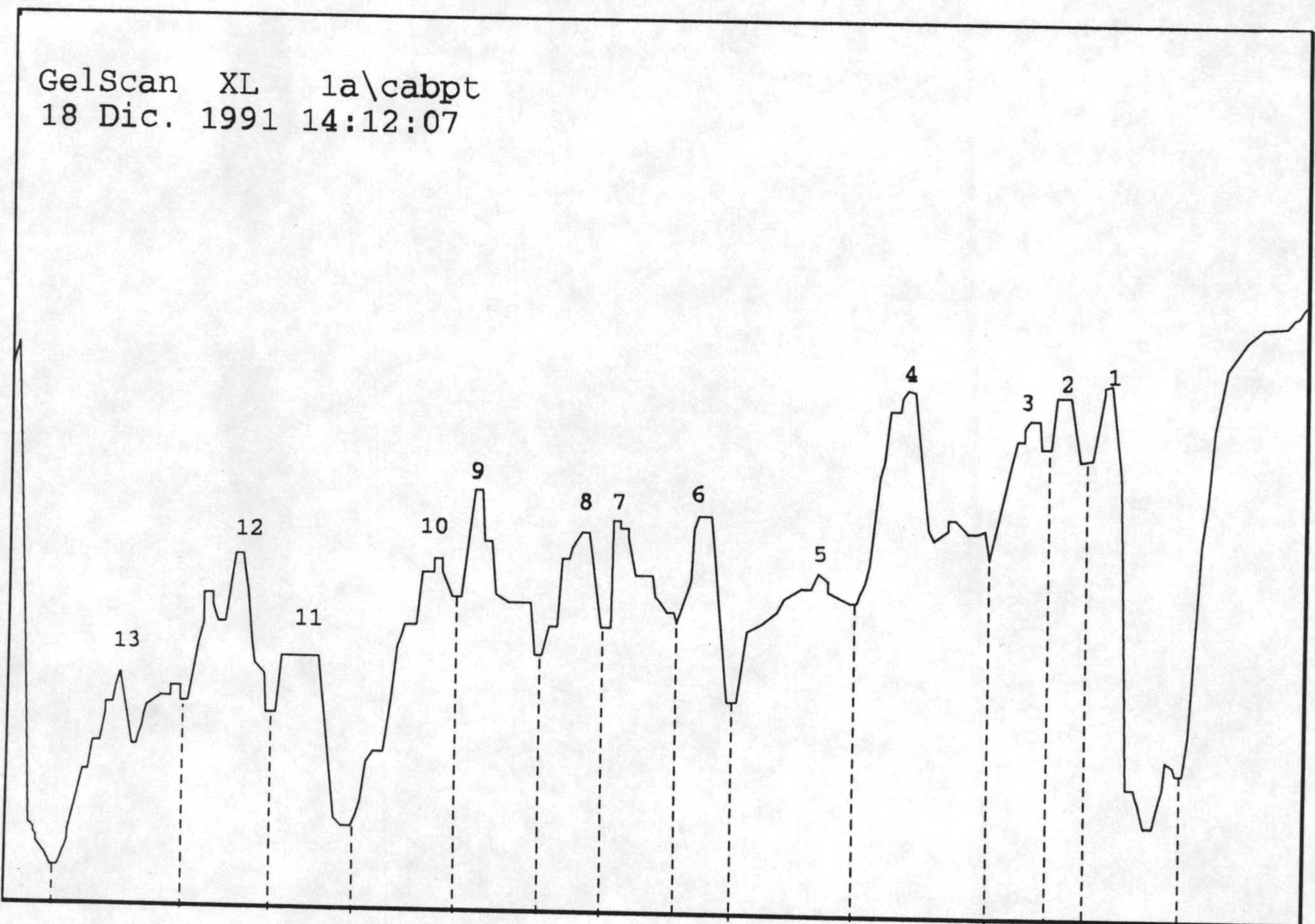


Figura nº10 TLC de el extracto procedente de la solución de albúmina incubada en el envase del líquido hidatídico.



3.13.2.- Perfil laser de la cromatografía en capa fina del extracto de la solución de albúmina en el envase de líquido hídrico





3.13.2. Area y situación relativa de cada banda.

TABLA XXXIII

Banda	rf	Situación en mm	área	%
1º)	origen	0	0.12	9.2
2º)	0.11	19	0.17	11.3
3º)	0.13	23	0.02	3.4
4º)	0.14	28	0.11	7.2
5º)	0.21	35	0.08	6.2
6º)	0.24	39	0.17	14.1
7º)	0.33	48	0.13	9.3
8º)	0.38	52	0.14	12.7
9º)	0.52	94	0.07	5.1
10º)	0.61	121	0.02	3.3
11º)	0.78	142	0.16	12.3
12º)	0.83	156	0.21	17.4
13º)	0.91	165	0.12	8.2



Resultados

3.13.4.- Estudio de la actividad citotóxica de cada una de las bandas obtenidas al cromatografiar el extracto de la solución de albúmina, en el envase de líquido hidatídico, frente a macrófagos peritoneales de ratón

TABLA XXXIV: Porcentaje de células incubadas con las fracciones obtenidas de cromatografiar la fracción clorofórmica de la solución de albumina, teñidas con Azul Trypan:

Horas de contacto

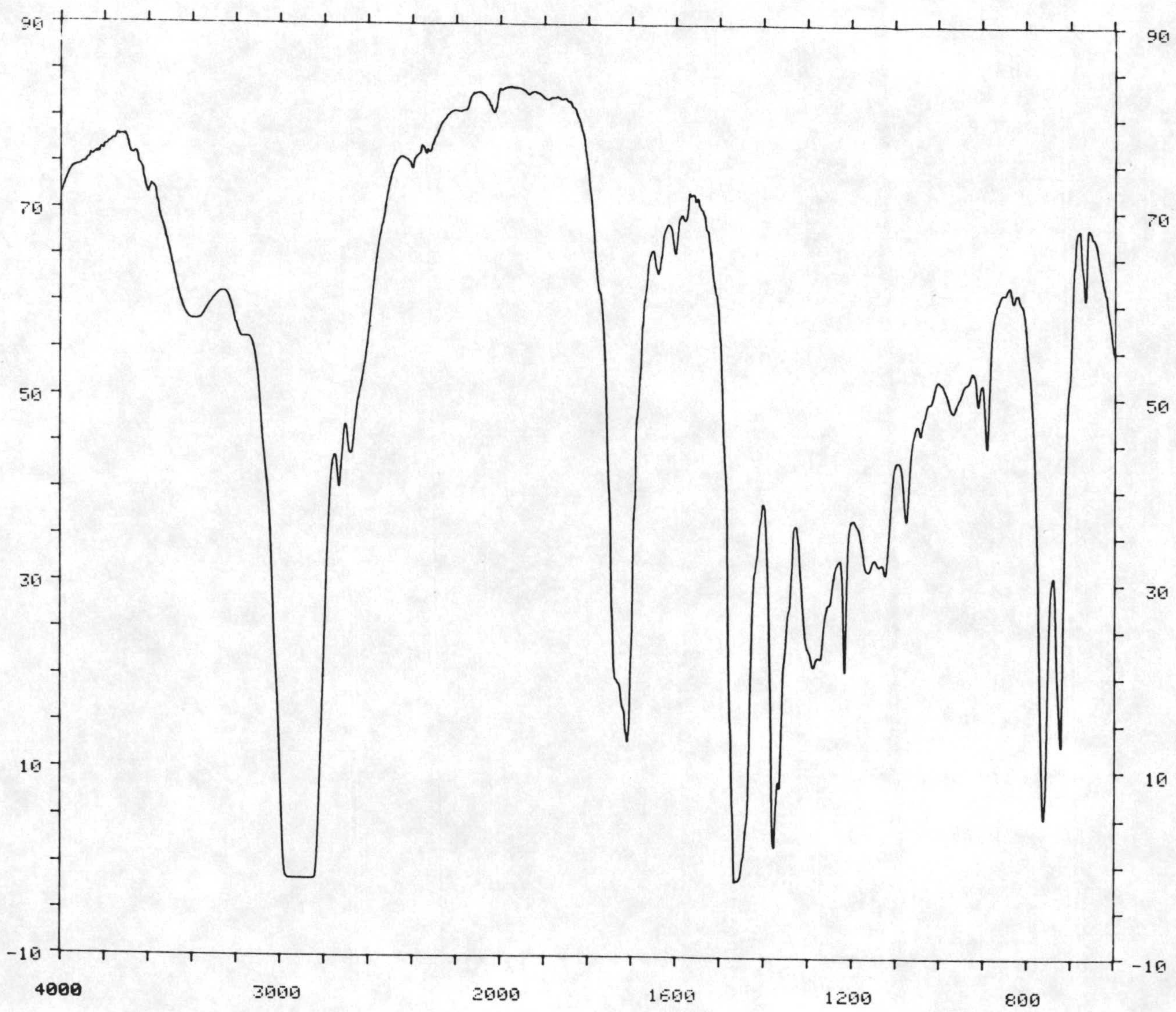
	3	6
Control sin toxina	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.2
Banda de rf 0,91	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.3
Banda de rf 0,83	45.2 ± 1.1	48.7 ± 0.9
Banda de rf 0,78	8.4 ± 0.4	10.2 ± 0.8
Banda de rf 0,61	11.3 ± 0.7	13.7 ± 0.8
Banda de rf 0,52	15.1 ± 0.6	17.3 ± 0.2
Banda de rf 0,38	7.9 ± 0.4	9.1 ± 0.7
Banda de rf 0,33	79.4 ± 1.5	83.2 ± 1.2
Banda de rf 0,24	17.3 ± 0.3	19.0 ± 0.7
Banda de rf 0,21	6.2 ± 0.5	8.1 ± 0.7
Banda de rf 0,14	8.2 ± 0.8	10.0 ± 0.4
Banda de rf 0.13	5.8 ± 0.7	6.4 ± 0.9
Banda de rf 0,11	3.8 ± 0.3	4.7 ± 0.2
Origen	10.1 ± 0.2	12.8 ± 0.6







3.18. - Espectro de infrarrojo de la banda 0,33 obtenida del extracto de la solución de albúmina, en el envase del líquido hídrico





Resultados

3.19.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima ciclo-oxigenasa frente a la banda 0,33, proveniente el envase que contenía el líquido hidatídico

TABLA XXXV: Absorbancia frente a tiempo:

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control Ac . Araquid.	C. Araquid .+enzima	Araquid.+e nzima+PLX6		Control Ac . Araquid.	C. Araquid .+enzima	Araquid.+e nzima+PLX6
	0,074	0,062	0,074		0,043	0,259	0,206
	0,052	0,059	0,076		0,044	0,266	0,21
	0,042	0,064	0,081		0,044	0,272	0,219
	0,047	0,07	0,085		0,044	0,282	0,22
	0,046	0,072	0,091		0,044	0,29	0,223
A	0,044	0,08	0,096	A	0,044	0,299	0,224
	0,044	0,085	0,099		0,045	0,302	0,224
B	0,044	0,093	0,107	B	0,045	0,308	0,226
	0,045	0,101	0,114		0,045	0,312	0,227
S	0,045	0,106	0,117	S	0,046	0,314	0,227
	0,045	0,112	0,12		0,046	0,316	0,228
O	0,046	0,118	0,122	O	0,046	0,317	0,23
	0,045	0,125	0,127		0,046	0,319	0,231
R	0,045	0,129	0,13	R	0,046	0,32	0,232
	0,045	0,133	0,136		0,047	0,322	0,232
B	0,045	0,14	0,14	B	0,047	0,324	0,234
	0,044	0,148	0,145		0,046	0,325	0,234
A	0,043	0,153	0,15	A	0,047	0,327	0,235
	0,043	0,162	0,155		0,047	0,329	0,236
N	0,043	0,171	0,16	N	0,047	0,33	0,236
	0,043	0,182	0,165		0,047	0,332	0,236
C	0,043	0,19	0,169	C	0,047	0,333	0,237
	0,043	0,199	0,174		0,047	0,334	0,239
I	0,043	0,208	0,181	I	0,047	0,336	0,24
	0,043	0,216	0,184		0,047	0,338	0,241
A	0,043	0,221	0,188	A	0,047	0,339	0,242
	0,043	0,229	0,192		0,047	0,339	0,242
	0,043	0,238	0,198		0,047	0,341	0,242
	0,043	0,245	0,2		0,047	0,343	0,242
	0,043	0,252	0,204		0,047	0,345	0,242

La actividad enzimática de la reacción control ha sido  $4,38 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , y la de la reacción problema  $2,48 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , lo que implica una inhibición de 43,27%



3.20.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima lipoxigenasa frente a la banda 0,33, proveniente el envase que contenía el líquido hidatídico

TABLA XXXVI: Absorbancia frente a tiempo:

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control Ac . linoleic	linol.+enz ima+PLX6	linoleico+ enzima		Control Ac . linoleic	linol.+enz ima+PLX6	linoleico+ enzima
	0,264	0,35	0,348		0,298	0,482	0,547
	0,35	0,353	0,348		0,298	0,483	0,546
	0,351	0,357	0,348		0,3	0,482	0,548
	0,35	0,364	0,352		0,302	0,483	0,548
	0,349	0,368	0,358		0,301	0,484	0,548
A	0,347	0,378	0,364	A	0,298	0,484	0,551
	0,339	0,389	0,372		0,298	0,484	0,548
B	0,339	0,398	0,382	B	0,298	0,485	0,548
	0,328	0,412	0,388		0,298	0,484	0,548
S	0,325	0,42	0,399	S	0,296	0,486	0,548
	0,314	0,427	0,416		0,297	0,485	0,548
O	0,31	0,435	0,428	O	0,299	0,485	0,548
	0,303	0,446	0,439		0,3	0,485	0,551
R	0,303	0,451	0,449	R	0,302	0,485	0,552
	0,303	0,457	0,46		0,299	0,486	0,548
B	0,303	0,462	0,468	B	0,298	0,486	0,548
	0,303	0,467	0,48		0,297	0,486	0,547
A	0,302	0,47	0,492	A	0,297	0,487	0,548
	0,301	0,473	0,502		0,299	0,487	0,547
N	0,299	0,475	0,516	N	0,3	0,486	0,547
	0,298	0,476	0,519		0,3	0,487	0,548
C	0,299	0,476	0,523	C	0,3	0,487	0,551
	0,298	0,479	0,526		0,3	0,486	0,551
I	0,297	0,48	0,531	I	0,302	0,486	0,551
	0,297	0,48	0,533		0,303	0,486	0,551
A	0,293	0,481	0,539	A	0,303	0,486	0,551
	0,299	0,481	0,542		0,301	0,485	0,552
	0,299	0,482	0,543		0,299	0,487	0,548
	0,3	0,482	0,544		0,299	0,487	0,549
	0,297	0,482	0,545		0,299	0,486	0,549

La actividad enzimática de la reacción control ha sido  $3,5 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , y la de la reacción problema  $2,42 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , lo que implica una inhibición de 30%



Resultados

3.21.- Determinación de la actividad de la enzima malato-deshidrogenasa frente a la banda 0,33, proveniente el envase que contenía el líquido hidatídico

TABLA XXXVII: Absorbancia frente a tiempo:

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control ta mp.+enzim	problema	reacción control		Control ta mp.+enzim	problema	reacción control
	0,084	0,09	0,088		0,081	0,239	0,236
	0,085	0,091	0,089		0,081	0,239	0,24
	0,084	0,084	0,09		0,081	0,242	0,24
	0,086	0,084	0,089		0,082	0,243	0,242
	0,086	0,089	0,09		0,08	0,245	0,242
A	0,086	0,091	0,09	A	0,081	0,245	0,243
	0,086	0,096	0,092		0,081	0,246	0,245
B	0,085	0,098	0,095	B	0,082	0,245	0,245
	0,085	0,102	0,104		0,082	0,246	0,245
S	0,085	0,111	0,109	S	0,084	0,248	0,245
	0,085	0,116	0,112		0,084	0,249	0,249
O	0,086	0,118	0,115	O	0,085	0,248	0,249
	0,089	0,123	0,123		0,085	0,251	0,249
R	0,089	0,131	0,129	R	0,086	0,25	0,251
	0,088	0,134	0,132		0,086	0,25	0,251
B	0,087	0,139	0,139	B	0,086	0,25	0,251
	0,086	0,145	0,148		0,085	0,25	0,25
A	0,084	0,149	0,15	A	0,083	0,251	0,249
	0,084	0,153	0,155		0,083	0,252	0,25
N	0,083	0,16	0,159	N	0,083	0,25	0,251
	0,082	0,169	0,163		0,083	0,25	0,251
C	0,081	0,174	0,169	C	0,083	0,25	0,25
	0,079	0,179	0,176		0,083	0,252	0,25
I	0,08	0,182	0,181	I	0,081	0,253	0,251
	0,08	0,189	0,188		0,081	0,252	0,251
A	0,08	0,211	0,196	A	0,082	0,252	0,251
	0,08	0,219	0,191		0,082	0,251	0,252
	0,081	0,226	0,212		0,082	0,251	0,251
	0,081	0,234	0,226		0,086	0,252	0,25
	0,082	0,236	0,239		0,086	0,251	0,251

La actividad enzimática de la reacción control ha sido  $6,43 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , y la de la reacción problema  $5,98 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , lo que implica una inhibición de 6,92%



3.22.- Determinación de la actividad de la enzima lacto-deshidrogenasa frente a la banda 0,33, proveniente el envase que contenía el líquido hidatídico

TABLA XXXVIII: Absorbancia frente a tiempo:

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control ta mp.+enzim	problema	reaccion control		Control ta mp.+enzim	problema	reaccion control
	0,06	0,064	0,06		0,06	0,122	0,148
	0,06	0,069	0,062		0,06	0,123	0,149
	0,06	0,074	0,064		0,059	0,122	0,151
	0,06	0,079	0,067		0,059	0,123	0,15
	0,06	0,084	0,072		0,059	0,121	0,15
A	0,061	0,087	0,076	A	0,059	0,121	0,151
	0,06	0,092	0,081		0,059	0,122	0,152
B	0,06	0,096	0,086	B	0,059	0,122	0,153
	0,06	0,099	0,092		0,059	0,122	0,152
S	0,06	0,104	0,096	S	0,059	0,123	0,152
	0,061	0,107	0,101		0,06	0,123	0,151
O	0,061	0,11	0,106	O	0,06	0,122	0,152
	0,06	0,112	0,109		0,06	0,122	0,151
R	0,06	0,115	0,112	R	0,059	0,122	0,152
	0,061	0,117	0,117		0,059	0,123	0,152
B	0,06	0,12	0,121	B	0,058	0,123	0,152
	0,06	0,121	0,124		0,059	0,122	0,152
A	0,06	0,122	0,126	A	0,059	0,122	0,151
	0,061	0,121	0,128		0,06	0,121	0,151
N	0,061	0,12	0,129	N	0,06	0,121	0,151
	0,06	0,12	0,132		0,06	0,121	0,152
C	0,06	0,121	0,134	C	0,06	0,121	0,152
	0,061	0,121	0,137		0,061	0,122	0,151
I	0,062	0,12	0,139	I	0,061	0,121	0,151
	0,062	0,121	0,142		0,06	0,12	0,152
A	0,061	0,12	0,143	A	0,06	0,12	0,151
	0,06	0,12	0,144		0,06	0,12	0,151
	0,06	0,121	0,146		0,059	0,121	0,152
	0,06	0,121	0,147		0,06	0,121	0,152
	0,06	0,122	0,148		0,06	0,121	0,151

La actividad enzimática de la reacción control ha sido  $5,17 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , y la de la reacción problema  $3,90 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , lo que implica una inhibición de 24,4%



3.23.- Determinación de la actividad enzimática de la enzima NADPH-oxidasa frente a la banda 0,33, proveniente el envase que contenía el líquido hidatídico:

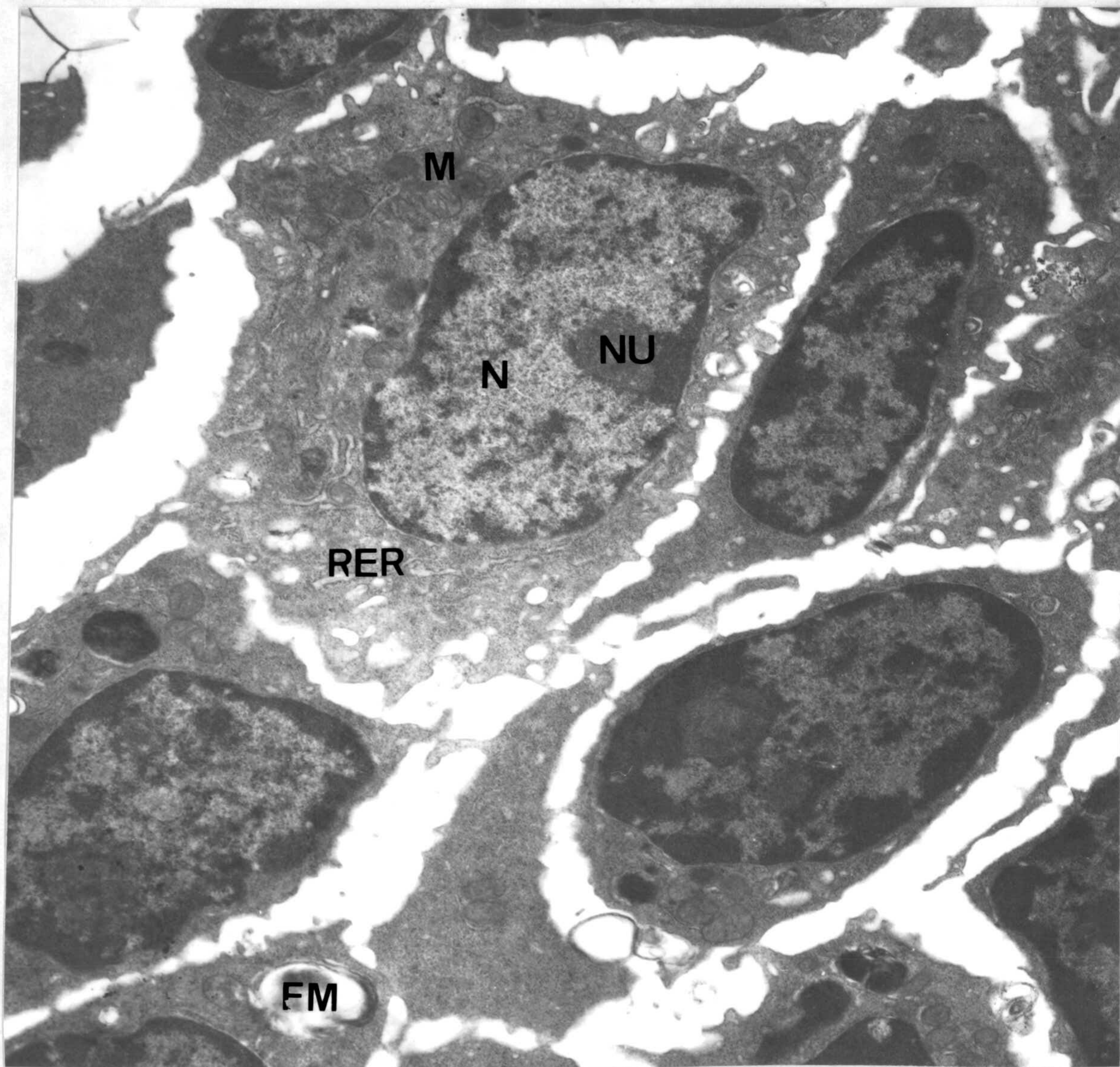
TABLA XXXIX: Absorbancia frente a tiempo:

7,5 minutos			7,5 minutos				
	Control ta mp.+enzim	problema	reacción control		Control ta mp.+enzim	problema	reacción control
	0,021	0,024	0,032		0,023	0,078	0,078
	0,02	0,025	0,034		0,023	0,078	0,079
	0,021	0,026	0,036		0,023	0,078	0,079
	0,021	0,028	0,037		0,023	0,078	0,078
	0,021	0,033	0,038		0,022	0,078	0,077
A	0,02	0,035	0,04	A	0,022	0,078	0,078
	0,021	0,038	0,042		0,022	0,078	0,077
B	0,021	0,042	0,043	B	0,022	0,078	0,077
	0,021	0,048	0,044		0,022	0,078	0,077
S	0,02	0,054	0,046	S	0,022	0,077	0,077
	0,02	0,059	0,047		0,022	0,077	0,078
O	0,02	0,063	0,048	O	0,021	0,077	0,077
	0,021	0,065	0,049		0,021	0,077	0,076
R	0,021	0,067	0,052	R	0,021	0,077	0,075
	0,021	0,069	0,055		0,021	0,078	0,075
B	0,021	0,071	0,061	B	0,021	0,078	0,075
	0,021	0,072	0,067		0,021	0,078	0,076
A	0,022	0,073	0,072	A	0,021	0,078	0,076
	0,022	0,075	0,074		0,022	0,078	0,075
N	0,022	0,075	0,079	N	0,022	0,078	0,076
	0,023	0,075	0,079		0,022	0,077	0,077
C	0,023	0,076	0,08	C	0,022	0,077	0,077
	0,023	0,076	0,079		0,021	0,076	0,078
I	0,023	0,076	0,078	I	0,021	0,076	0,078
	0,023	0,077	0,078		0,02	0,076	0,078
A	0,024	0,077	0,078	A	0,02	0,076	0,077
	0,024	0,078	0,078		0,02	0,076	0,078
	0,024	0,078	0,078		0,02	0,076	0,078
	0,023	0,079	0,078		0,02	0,076	0,078
	0,023	0,079	0,077		0,02	0,076	0,078

La actividad enzimática de la reacción control ha sido  $6,12 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , y la de la reacción problema  $4,96 \times 10^{-4} \text{mM/ml} \times \text{mint.}^{-1}$ , lo que implica una inhibición de 18%

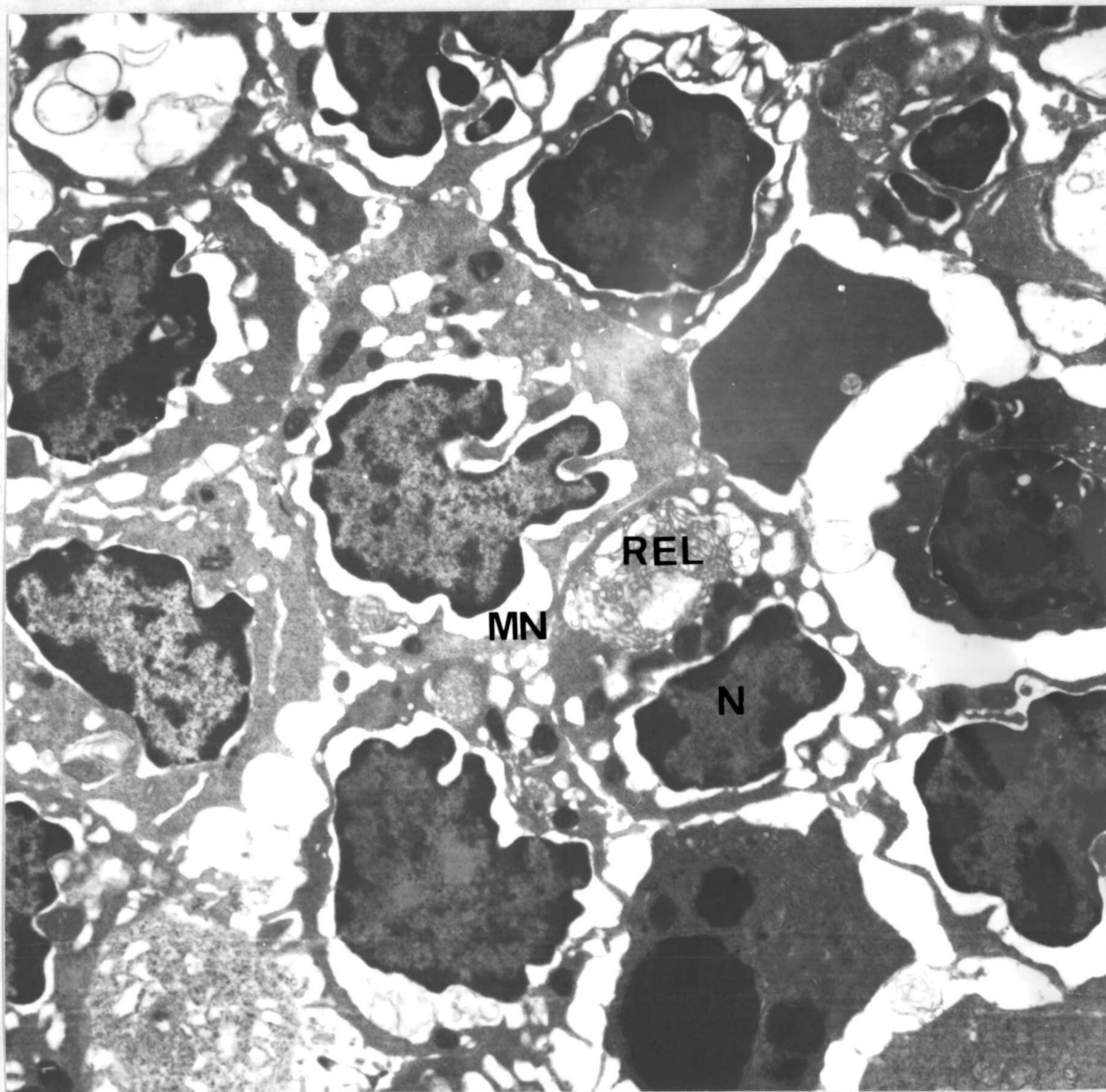


3.24.-Microscopía electrónica de transmisión



Células control

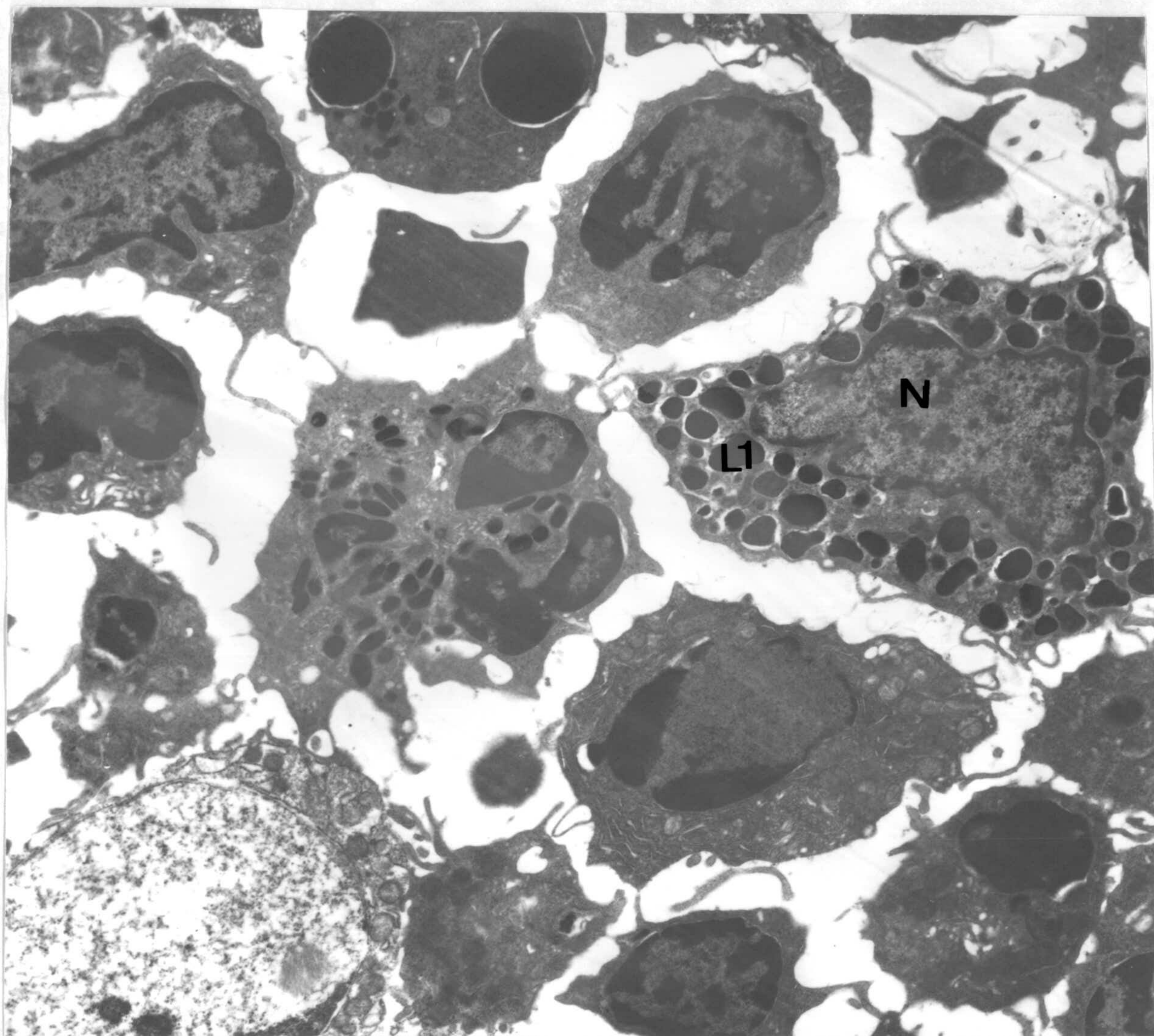




Células tratadas con LH



Células tratadas con extracto de albúmina





**Descripción de controles:**

Del lavado peritoneal realizado a ratones Balb/c se identifican ultraestructuralmente distintas poblaciones de origen leucocitario y monocitario en proporciones variables. De igual forma es posible identificar algunos hematies. Las células linfoides evidenciadas a nivel ultraestructural corresponden a linfocitos T circulantes que no presentan alteración a nivel nuclear ni citoplásmica, conservando su núcleo la disposición cromatínica normal y su citoplasma la cantidad y el escaso número de organelas que lo caracteriza. No se observan linfocitos B maduros (células Plasmáticas).

La población macrofágica, en número la más importante, muestra núcleos en posición excéntrica con nucléolo en la mayoría de los elementos celulares y la heterocromatina dispuesta en vecindad al nucleolema. A nivel citoplásmico destaca la presencia de Retículo endoplásmico rugoso y liso, la moderada cantidad de mitocondrias que conservan sus crestas...o morfología; se observa la presencia de ribosomas sueltos y proporción variable de lisosomas de carácter primario de aspecto granular y electrón-denso. La membrana citoplasmática emite prolongaciones cortas y gruesas que no evidencian sistemas de unión especializado entre ellas subyacente a los cuales se observan pequeñas vesículas de micropinocitosis. Es también destacable como existe en todas las células estudiadas la integridad de las unidades de membranas y la escasa presencia de elementos celulares lisados.

**Descripción de células tratadas con fracción tóxica de líquido hidatídico (LH):**

La incubación con LH a dosis letal 12.5 durante 3 horas de exposición demostró a nivel ultraestructural un efecto intenso y generalizado sobre las distintas poblaciones leucocitarias e histiocitaria conseguidas con el lavado... En particular es destacable la dilatación del Retículo endoplásmico liso inicio de formación de cuerpos mielínicos y afectación simultánea de la membrana nuclear con separación balonizada del nucleolema que circunda al núcleo de forma homogénea, dato morfológico no evidenciado en las células control. Los lisosomas macrofágicos pueden observarse en algunas células englobando partículas (lisosomas



## *Resultados*

---

secundarios).

En La monocapa celular es posible observar también células "necrobióticas", que han perdido parcialmente la integridad de la membrana citoplásmica. De igual forma son más manifiestos los restos y detritus celulares.

El núcleo no se ve afectado aparentemente con esta dosis y tiempo de exposición conservado las características antes mencionadas en el apartado anterior.

### **Células tratadas con el extracto de albúmina:**

A diferencia del tratamiento con LH, la expo a dosis letal 50% no demuestra efecto evidente sobre las células, las membranas celulares y de organelas conservan estructura y disposición semejante a lo observado en las células tomadas como referencia control. Destaca la mayor proporción de elementos macrofágicos cargados de lisosomas primarios y la presencia de polimorfonucleares eosinófilos con lisosomas con las características inclusiones cristaloides.



#### **4.- DISCUSSION**



*E. granulosus*, como ha quedado dicho en el capítulo I, es un helminto que en su estado adulto, parásita a los cánidos. Así mismo en el estadio de metacestode, parasita a una amplia gama de hospedadores intermediarios entre la que se encuentra el hombre. Los mecanismos por los cuales la larva o hidátide es capaz de vencer la barrera inmunitaria y sobrevivir en el interior de un hospedador inmunocompetente, es actualmente sujeto de estudio.

Algunos autores sostienen la posibilidad de la presencia de antígenos ó al menos de epítomos comunes entre el parásito y algunas proteínas, inclusive hormonas, del hospedador, es decir reactualizan la hipótesis de Damian (1.987) que pensaba en la expresión de sustancias antigénicas comunes entre el parásito y el huésped.

Actualmente se cree que al igual que ocurre con otros cestodes como *Spirometra mansonioides* en la que una serie de proteínas segregadas por el parásito, tienen un epítomo común con la somatomedina y con la hormona del crecimiento, que hace que incluso esta proteína segregada por el parásito sea capaz de tener actividad biológica similar a la de la hormona natural del huésped.

La activación policlonal inespecífica por parte de los lipopolisacáridos de *E. granulosus* ha sido demostrada por Dixon y col.(1.982).

Por otra parte, la capa fibrosa que rodea al quiste, si bien impide la penetración de células linfoides en quistes vivos, con lo que no contactan con la capa germinativa responsable de la producción de protoscólices por parte del parásito, no impide la penetración de inmunoglobulinas del huésped e incluso de las proteínas que constituyen el complemento (Health, 1.986).

Existen aún dudas de como el complemento no actúa en el interior del quiste, si existen anticuerpos específicos frente a los antígenos del parásito y el complemento. De hecho, la incubación de protoscólices libres de líquido hidatídico "in vitro" junto con anticuerpos más complemento, inducen la lisis del parásito.

Se sospecha que los lipopolisacáridos del líquido hidatídico y los corpúsculos calcáreos constituidos por fosfato de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ , que acompañan normalmente a los protoscólices y cápsulas de incubación formando la denominada "arena hidatídica", pueden neutralizar



también la acción del complemento frente a la membrana germinativa y los protoscólices.

En nuestro caso hemos pretendido estudiar un factor citotóxico presente en el líquido hidatídico, ya estudiado por otros autores. Así, Dévé (1.946) estudio una zona necrótica en los tejidos circundantes al lugar de desarrollo del quiste hidatídico.

Annen y col. (1.981) encontraron una citotoxina en el líquido hidatídico ensayada frente a linfocitos T. Estos consideran que dicha citotoxina aparecía ligada a una proteína, tras cromatografiar el líquido hidatídico a través de una columna de Sephadex G50.

En 1.985 y gracias a un acuerdo de colaboración entre la Universidad de Granada u la Universidad de Gante, se encuentra que probablemente el factor tóxico descrito por Annen, aparece asociado a la fracción lipídica del líquido hidatídico. Dicha fracción, al parecer es específica para linfocitos y macrófagos, al igual que se describe en los trabajos de Lloyd y col. (1.988) los cuales hablan de un factor tóxico excretado por *Taenia taeniformis* y relacionado con un glicolípido. Parece ser que dicho factor tóxico pudiera estar relacionado con un mecanismo de supervivencia del parásito en el interior de un hospedador inmunocompetente. Dicho factor es específico para linfocitos y macrófagos; parece mostrar una cierta especificidad para dichas células, dependiendo de la cepa del parásito para diferentes poblaciones celulares.

En el presente trabajo hemos pretendido conocer aspectos de su estructura química, así como otros aspectos de su mecanismo de acción. (Tema que ha sido objeto de estudio en nuestro grupo de trabajo).

Como fuente de líquido hidatídico y dada la escasez de dicho material biológico en nuestro entorno, utilizamos un pool de líquido hidatídico procedente de la empresa Giresa de Madrid (como quedó dicho en el capítulo II).

Tras conocer los diferentes competentes del líquido hidatídico precipitados con sulfato-amónico, extraer con cloroformo y precipitar azúcares con metanol, encontramos un total de 2,8 mg/ml de proteínas, 5,3 de azúcares y 4,6 de lípidos. Si bien dichos resultados no concuerdan con el total de proteínas y lípidos publicados recientemente por Janssen y col. (1990), debe ser achacable a los diferentes métodos de extracción y medida; estos autores no concentraron ni fraccionaron la muestra, con lo que la variabilidad con respecto a los lípidos

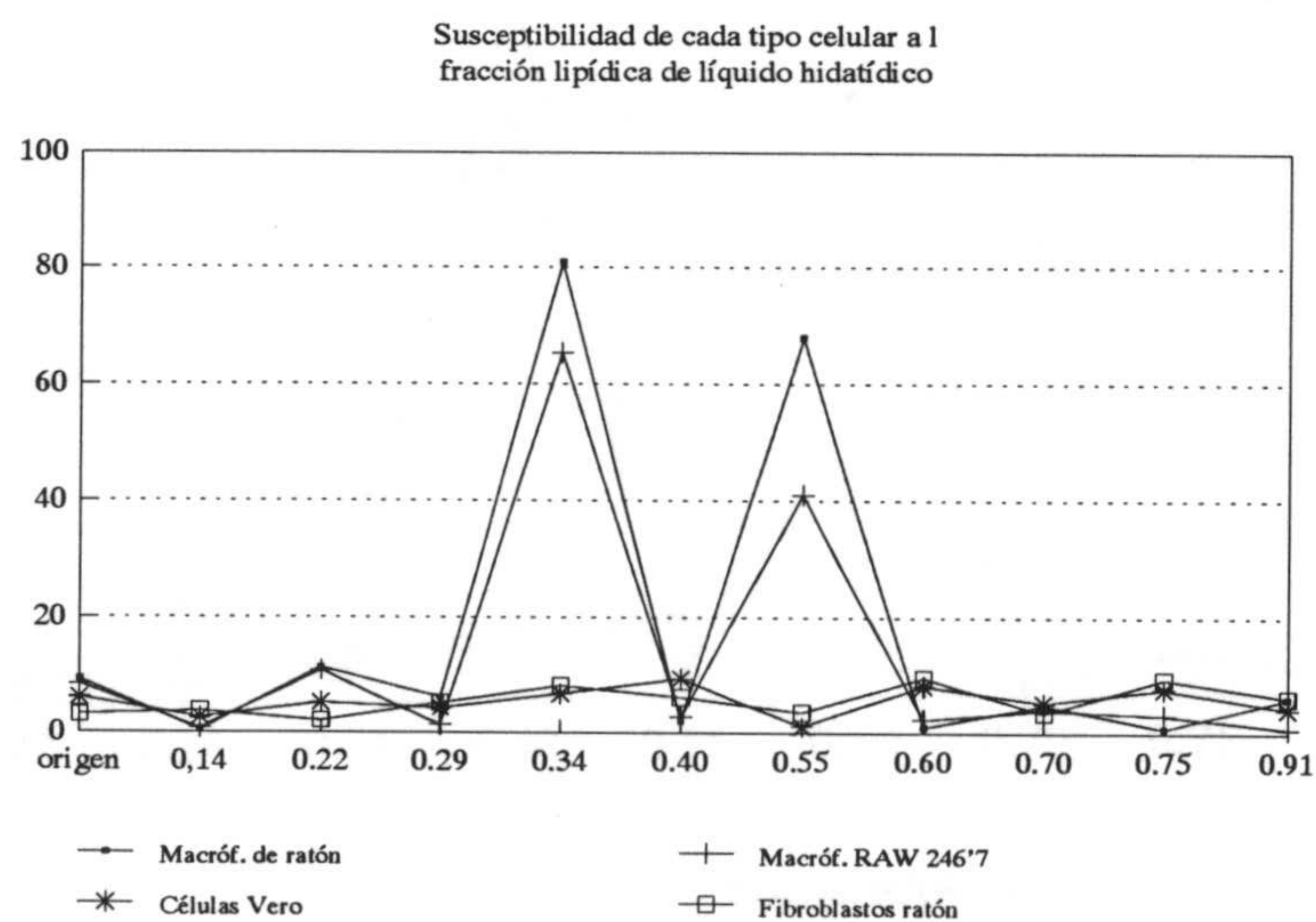


## Discussion

puede ser achacable a los métodos de concentración y fraccionamiento que en nuestro caso hemos seguido, de aquí que los lípidos totales dados por Janssen y col. (1.990) se refieren a todos los lípidos existentes en el líquido hidatídico, mientras que en nuestro caso están repartidos en la fracción lipoproteica y lipopolisacarídica.

Con objeto de contar con fracción tóxica suficientemente purificada para poder establecer una caracterización físico/química de la misma y conocer algo más de su modo de acción, se decidió utilizar el método de cromatografía en capa fina, previamente ensayado en trabajos anteriores con buenos resultados, así mismo, fué el más repetitivo en todas las ocasiones (De Rycke y col. 1.985).

Con el líquido de desarrollo utilizado (Hexano: dietileter:acético), confirmamos la presencia de 2 fracciones citotóxicas con un  $r_f$  de 0,34 y 0,55, simultáneamente ha sido comprobado el efecto citotóxico de cada una de las bandas con diferentes tipos celulares (macrófagos peritoneales de ratón, macrófagos de la línea celular RAW, células Vero y fibroblastos obtenidos de embrión de ratón), observándose solamente efecto citopatológico sobre macrófagos peritoneales de ratón y macrófagos de la línea celular RAW como queda de manifiesto en la Fig I.





La diferente susceptibilidad en las diferentes tipos celulares siendo los mas lábiles las células de origen linfoide como los macrófagos peritoneales de ratón y los de la línea celular RAW, se explicaría o bien por la presencia de determinados receptores en la membrana existentes en las células linfoides y no existentes en las otras, ó bien las diferentes características metabólicas de las células no linfoides. Sin embargo recientemente se ha publicado un trabajo según el cual no parece estar implicado un receptor específico en las células linfoides para la toxina de líquido hidatídico (Janssen y col 1.990), lo cual, como posteriormente veremos, nos hace sospechar que la diferente susceptibilidad se deba a características biológicas de las células.

En trabajos anteriores pudimos comprobar como la toxina de líquido hidatídico podía provocar un influjo de  $Ca^{++}$  seguida de una aumento de la captación de Uridina (Janssen 1.991) que rápidamente decae, produciendo un perfil similar a la activación de una célula linfoide.

El aumento porcentual de la incorporación de timidina en macrófagos peritoneales de ratón que normalmente no incorporan timidina, dado que no se duplican; esta incorporación aparentemente anómala podría deberse a una captación inespecífica similar a la que ha sido observada por Janssen (1.991) tras la incubación con albúmina marcada, como consecuencia de daños producidos en la membrana del macrófago, sin embargo el hecho de que sea material precipitable con TCA sugiere que dicha incorporación va acompañada de síntesis de macromoléculas en la célula. Dado que la población celular obtenida del lavado peritoneal es mixta entre macrófagos y linfocitos y dado que el porcentaje de incorporación es de 5 veces más que el de la población control podría sugerir que dicha captación fuese debida a la activación de linfocitos por parte de la toxina, y no a la activación de los macrófagos de la población total obtenida del lavado peritoneal.

Los ensayos de purificación mediante cromatografía en HPLC, mostró la presencia de 9 picos repetitivos, sin embargo el no disponer de un HPLC preparativo y dada la escasez de muestra y las dificultades de eliminar en su totalidad la fase móvil utilizada, dicho método



no condujo a un sistema eficaz de purificación de la fracción tóxica a gran escala, para poder realizar la caracterización de la fracción tóxica del líquido hidatídico.

La caracterización físico/química mediante tinción con nihidrina y fluorescamina no revela la existencia de grupos amino ligados a la fracción tóxica, por lo que era descartable que fuese ligada a una cadena peptídica, datos que coinciden con otros anteriormente obtenidos por nosotros, si bien la toxina puede ser eluida mediante cromatografía de exclusión molecular junto a una fracción proteica. La precipitación de esta proteína y posterior extracción con disolventes lipofílicos arrastra el todo el porcentaje de toxicidad, lo que parece indicar que la unión a proteínas se debe hacer de una forma inespecífica, no siendo esta proteína parte estructural de la toxina de líquido hidatídico.

Continuando los trabajos de caracterización físico/química de la toxina de líquido hidatídico, decidimos estudiar la presencia de grupos funcionales, mediante bloqueo selectivo de los mismos, comprobando si se producía variación en cuanto al efecto de la misma sobre células de origen linfoide. Cuando esta fracción fué tratada con diazo-metano ó metanol-clorhidrico que bloquean selectivamente los grupos carboxilo, se observó que la actividad citotóxica disminuía considerablemente, lo que hace suponer que dicha actividad pueda residir en estos grupos, dado que el bloqueo de los grupos OH mediante incubación de esta fracción con BSTFA y de los grupos alfa-amino con metanol-acético anhidro (Barrow, S.e. y col. 1.987) no conduce a una merma en la capacidad citotóxica de dicha fracción.

Simultáneamente a esto, se realizaron una serie de estudios utilizando cromatografía de gases-espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y espectrometría de infrarrojo.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante inyección directa en gases, se observó que la banda 0,34 mostraba 3 picos en su curva de volatilización, lo que nos indica que no se trata de un producto puro. Por otra parte, los espectros de masas de cada uno de los picos mostraron la existencia de productos isómeros entre sí, dado que presentaban el mismo pico molecular.

Respecto a la banda de rf 0,55, se observó un solo pico en su curva de volatilización, pico que coincidía en tiempo de retención con el primero obtenido en la banda 0,34, así como su



cromatograma de masas, lo que parece sugerir que se trata del mismo producto.

El espectro de C13 de la banda 0,55 muestra la presencia de carbonos olefínicos a 29, así como carbonos alílicos, se observa la presencia de grupos metilo en bajas proporciones, así como carbonos pertenecientes a grupos carboxilo. El espectro de protones de esta banda está completamente de acuerdo con lo dicho anteriormente, según esto podemos sospechar que se trata de una molécula lipídica, probablemente simétrica (dado que existen carbonos alílicos, se puede presumir que exista un ciclo, y que en este se pueda establecer un plano de simetría).

El espectro de C13 de la banda 0,34 muestra gran similitud con el de la banda 0,55, si bien la presencia de carbonos oxigenados, así como la presencia de carbonos olefínicos no asignables a las señales principales, pero si en proporción a la señal anteriormente mencionada, y el mayor tamaño de la señal ácida, podría tratarse de una cadena presumiblemente unida a la estructura mayor y de unos 7 átomos de carbono, con un grupo ácido en su porción terminal. (estos resultados se ven confirmados con los obtenidos en el espectro de masas de los picos mayores de dicha banda).

Hay que señalar que la señal atribuible a un grupo ácido, podría ser también asignable a el grupo ácido del ácido acético, existente en el líquido de desarrollo utilizado para cromatografiar esta fracción, si bien el hecho de que bloqueando estos grupos con diazometano y metanol-clorhídrico, podría indicar que pertenece a la molécula en cuestión.

En cuanto al espectro de infrarrojo de la banda 0,34, podemos decir que en torno a 1.600 se observa un pico probablemente de esteres o bien de algún ácido, así como un pequeño pico en 3000 que podría ser de algún carbono insaturado, estas señales no son visibles en el espectro de la banda 0,55.

En los controles realizados a los envases, aparece una banda con cierta citotoxicidad, pero con un *rf* diferente. En los espectros de RMN realizados a esta, se observan notables diferencias con los de las bandas procedentes de líquido hidatídico, si bien se observa en el espectro de infrarrojo la aparición de la señal a 1.600 que indica la presencia de grupos ester o bien ácidos, el resto del perfil se puede considerar diferente.

En el espectro de RMN realizado a la fracción retenida por la albúmina, no se



observan las insaturaciones, así como las proporciones que presentan las distintas señales en C13 son diferentes.

Por otra parte, continuando con el posible mecanismo de acción de la fracción tóxica, se pensó que quizás la consecuencia de la muerte celular rápida fuera debida a la producción de radicales superóxido como consecuencia de la activación celular.

Los dos mecanismos más importantes en el metabolismo de los hidroperóxidos, son la catalasa y el sistema glutatión-peroxidasa. La localización de la catalasa y peroxidasa en citosol y mitocondrias facilita su cooperación en el metabolismo de los hidroperóxidos, actuando uno u otro sistema según la concentración y localización de agua oxigenada producida.

Los mecanismos de defensa frente al agua oxigenada son diferentes, según se genere de forma continua por la actuación de la glucosa-oxidasa, o actúe como conjunto ya preformado. Cuando se produce su génesis enzimática, el sistema glutatión es el más importante lo que puede estar relacionado con la habilidad de este sistema en la desintoxicación de lípidos hidroxilados, actuando uno u otro sistema según el lugar y la concentración de agua oxigenada producida (Arrick, 1.982).

Estudiando la funcionalidad de los sistemas glutatión y catalasa, determinamos la susceptibilidad de la célula al glutatión, agua oxigenada, TBH, catalasa, BSO y al CNDB. Tras estudiar diferentes concentraciones de agua oxigenada y comprobar la máxima de estas no tóxica para las células, se decidió escoger esta, al objeto de preincubar las células con dicha concentración y comprobar el efecto de la misma sobre el tratamiento de los macrófagos con la fracción tóxica del líquido hidatídico. Indudablemente, el tratamiento con agua oxigenada conduce a una mayor actividad de la catalasa, enzima que genera, a partir de este substrato, agua más iones oxígeno, con lo que el sistema glutatión debe actuar. Al objeto de impedir la actuación de la catalasa, se utilizó el TBH que al no ser substrato de la catalasa es eliminado por el sistema glutatión. Normalmente la presencia continua de TBH conduce a una caída en la concentración de glutatión citoplasmático, pero no altera la concentración de glutatión mitocondrial. Indudablemente el aumento de la concentración de TBH conduce a una alteración de la concentración de glutatión mitocondrial (Oshino y Chance, 1.977).



## Discussion

---

En nuestro caso, el tratamiento de las células con agua oxigenada y posterior incubación con la fracción tóxica, si bien no produce unos porcentajes elevados de protección, parece que induce una pérdida de eficacia en la capacidad lítica de la toxina, esta diferencia se podría deber a una oxidación de los dobles enlaces que parece ser presenta la fracción tóxica.

En el tratamiento con catalasa, no se observa ni aumento ni disminución significativa de la toxicidad.

El TBH, sustancia ligeramente oxidante y no substrato de la catalasa, no llega a inducir la protección observada con el agua oxigenada.

El sistema glutatión reducido constituye, como ha quedado dicho, un sistema de eliminación de los iones superóxido. El tratamiento de las células con dicha sustancia, en presencia de la fracción tóxica de líquido hidatídico, induce como en el caso del agua oxigenada, una ligera protección.

El BSO es de todos los productos que se utilizan para rebajar los niveles de glutatión, el menos tóxico. La inhibición se realiza a nivel de la Gamma-glutamyl-cisteina-sintetasa. La disminución de glutatión viene como consecuencia del consumo del mismo y la imposibilidad de síntesis de novo del mismo.

Lo mismo ocurre con el sistema CNDB, a concentraciones superiores a  $30\mu\text{M}$  produce una inhibición de la actividad de la glutatión reductasa. El tratamiento con ambas sustancias no produce ninguna protección.

La peroxidación de lípidos ocurre en los tejidos animales esta relacionada con la producción de iones superóxido, esta peroxidación se encuentra asociada a una serie de enfermedades tisulares degenerativas cardíacas, vasculares, hepáticas etc... La peroxidación de los lípidos de la membrana celular se atribuye como principal causa del envejecimiento, esta se produce por la absorción de oxígeno molecular en radicales libres produciendo una poliinsaturación labil en las cadenas de ácidos grasos.

Entre los numerosos métodos utilizados para medir la generación de estos radicales libres y como consecuencia indirecta la peroxidación lipídica, se encuentra la determinación de los precursores de malón-dialdehído mediante el test del ácido barbitúrico. Cuando las



células se incubaron con dosis letal 50 de las bandas 0,34 y 0,55 y se determinó los niveles de MDA, se pudo comprobar que no se producían diferencias significativas entre los niveles de MDA entre los macrófagos control y los puestos en contacto con la fracción tóxica del líquido hidatídico.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio, sugieren que el tratamiento de las células con fracción tóxica conlleva a un aumento de la actividad fosfolipasa en el sobrenadante. Por otra parte, se conoce que en el proceso de activación celular, los macrófagos, una vez reaccionan al antígeno se induce la producción de prostanoïdes (prostaglandina, tromboxano y leucotrienos). Todo esto llevaría a la inflamación necesaria en la respuesta inmune. La mayor parte de las sustancias antiinflamatorias se ha sospechado que no tienen un efecto *per se*, sino que se debe a inhibiciones en el metabolismo de estos prostanoïdes, como ocurre con la inhibición de la PG2 producida por el ácido acetil salicílico, el cual inhibe específicamente la ciclo-oxigenasa. Otra serie de sustancias entre las que se encuentran los corticóides, de reconocida acción antiinflamatoria, parecen tener un efecto directo sobre los macrófagos, induciendo la producción de una serie de proteínas responsables de dicha acción, entre otras la lipocortina.

Recientemente Flower en 1.988 ha hecho una revisión de la misma como inhibidores de la síntesis de protaglandinas. Por otra parte, la macrocortina, proteína que forma parte de la familia de las lipocortinas. Esta está almacenada en el interior de los macrófagos. Parece ser que provoca una inhibición directa de la actividad fosfolipasa, en especial la fosfolipasa A2. La a la producción de la lipocortina y en especial la liberación de macrocortina, se induce por la presencia de glucocorticóides entre otros la 6-metil-prednisolona (Vane, J.R., 1.971).

Al objeto de estudiar si estas proteínas aparecen involucradas en una posible protección frente a la toxina de líquido hidatídico, planificamos una experiencia en la que una serie de ratones fueron inyectados con 6-metil-prednisolona. El medio resultante del lavado peritoneal, donde teóricamente se debe encontrar la macrocortina, fué utilizado para incubar macrófagos peritoneales de ratón en presencia de fracción tóxica no observándose protección alguna.

Como se ha dicho anteriormente, los macrófagos "activados" activan la síntesis de



## *Discussion*

---

prostaglandinas, uno de los métodos utilizados para esto es la preincubación de los mismos con ionóforo A23187, que aumenta el  $Ca^{++}$  citoplasmático, produciéndose la liberación de prostanoïdes.

Al objeto de comprobar si estas ó algún producto análogo de estas, era el inductor de la muerte celular. Para esto se diseñó una experiencia en la que macrófagos peritoneales de ratón fueron incubados durante 10 minutos con A23187, más ácido linoléico, no observándose, tras suplementar con la toxina, variación alguna de la toxicidad de la misma. La incubación con dicho ácido viene condicionada por el hecho de que este ácido lo utiliza la célula como substrato habitual para la producción de prostaglandinas, no siendo necesario, por tanto, secuestrarlos de la membrana celular. Por todo lo cual consideramos que el mecanismo de muerte celular no es debido a este aumento en la producción de prostaglandinas, sino que el aumento del influjo de  $Ca^{++}$  intracelular se deba a un efecto indirecto como consecuencia de una acción ionofórica directa de la propia toxina, desorganizando temporalmente la membrana celular.

La fibronectina es una proteína identificada en 1.948, aislada como contaminante del fibrinógeno e identificada como una globulina precipitable por frío. Como su propio nombre indica es una proteína fibrosa capaz de unir. Esta proteína de 440.000 Da. se encuentra en la membrana celular, en las matrices extracelulares y en el plasma, así como fluido sinobial, semen, saliva y exudados inflamatorios. La vida media de esta es 48 a 72 horas, presentando entre otras, la función de unir células, unir plaquetas, permitir la quimiotaxis, mantener la estructura del citoesqueleto etc... esta aumenta la unión de linfocitos a macrófagos y la expresión de receptores FC en macrófagos, considerándose de una capital importancia en las interacciones entre monocitos y macrófagos, e incrementando la quimiotaxis. Ayuda a mantener la capacidad oxidativa de los macrófagos frente a bacterias. Se encuentra en pacientes con enfermedades bacterianas, reumáticas. Su papel debe ser aun dilucidado. En base a todo lo dicho, como proteína de superficie celular e involucrada en procesos de unión, decidimos preincubar con 10, 50 y 100 $\mu$ g de fibronectina macrófagos peritoneales de ratón por un tiempo de 30 minutos. El medio de incubación fué retirado adicionándose fracción tóxica de líquido hidatídico a dosis letal 50. Del estudio de los resultados obtenidos se deduce



## *Discussion*

---

que esta proteína juega un papel de protección frente a la toxina, dado que se produce hasta un 70% de protección celular. Esto puede deberse al bloqueo específico de lugares de unión de la toxina con la membrana celular.

En un trabajo recientemente publicado, donde se demuestra que no se puede confirmar la existencia de receptores específicos para la toxina, en la membrana celular. Se demuestra como el tratamiento de la membrana celular con proteasas, implica un aumento en la susceptibilidad celular a la toxina, por el contrario, cuando se trata con lectinas o con poli-l-lisina, los niveles de toxicidad disminuyen.

Un fenómeno similar a este quizás sería el que ocurre con la fibronectina, impidiendo la accesibilidad de la toxina a la membrana celular.

Los población celular que aparece en la cavidad peritoneal presenta, entre otros macrófagos tisulares, inflamatorios, así como hasta el 50% de linfocitos. Estos macrófagos pueden presentar una activación específica frente a un antígeno concreto, o una activación inespecífica producida por ejemplo con coadyuvante de Freund o con Gamm interferón. Los macrófagos activados con coadyuvante de Freund, cuando fueron tratados con la fracción tóxica, mostraron un ligero aumento en la susceptibilidad a esta frente a los procedentes de un lavado peritoneal de ratones no inyectados con este.

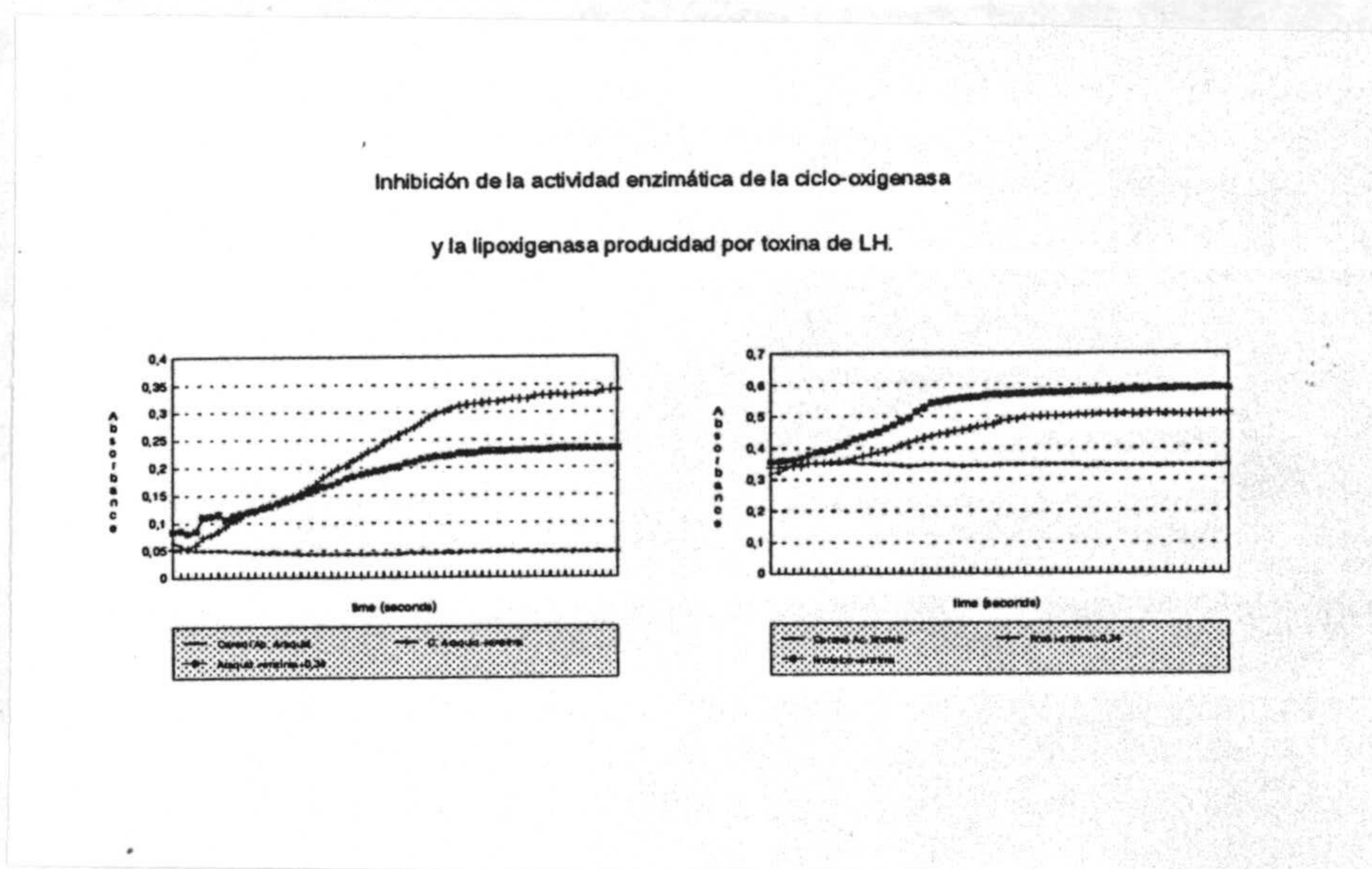
Teóricamente la activación de un macrófago conlleva, no solamente la producción de prostaglandinas, sino que existe un aumento de receptores FC en la membrana de los mismos. Dichos receptores son los responsables de la unión de la inmunoglobulina que opsoniza una partícula, ligándola a la membrana del macrófago y su posterior fagocitosis. La mayor sensibilidad de estos macrófagos podría deberse (aunque los resultados son contradictorios con los anteriores) quizás a un aumento de alguna zona de la membrana por lo cual la toxina se liga a la misma, ó quizás a una mayor fluidez de la membrana plasmática que tiene lugar en los macrófagos activados, que permita una mayor accesibilidad de la toxina, en resumen, una mayor actividad metabólica. Sin embargo los datos obtenidos con el A23187 y con el gamma-interferon pueden deberse a que la activación del A23187 no produzca una entrada temporal de  $Ca^{++}$ , sino que el inóforo intercalado en la membrana plasmática permita una entrada



## Discussion

---

permanente del ión. En cuanto a la actividad del gamma interferón, no produce un aumento de receptores FC, aunque sí un aumento de la bursa respiratoria. Dado que los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran el papel de la lipoxigenasa y/o la ciclo-oxigenasa en el modo de acción de la toxina de líquido hidatídico, decidimos ensayar si estas toxinas tenían efecto inhibitorio sobre estos enzimas. Se observó como se producía un efecto inhibitorio notable sobre la ciclo-oxigenasa (Ver fig. 2).



De igual forma se puede ver un efecto similar sobre la lipoxigenasa y sobre la NADPH-



## *Discussion*

---

oxidada, no viéndose afectada la lacto-deshidrogenasa. Curiosamente la NADPH-oxidasas junto con la lipoxigenasa y la ciclo-oxigenasa tienen un papel esencial en la activación de macrófagos, interviniendo en la producción de prostaglandinas, mientras que para la LDH y malato-deshidrogenasa no parecen tener papel alguno en este proceso.

La relevancia de estos resultados aumentaría con un estudio más amplio en cuanto al efecto inhibitorio de otros enzimas, sin embargo hay argumentos que pueden confirmar la asociación con los enzimas involucrados en el metabolismo del ácido araquidónico y el modo de acción de la toxina.

La carencia de efecto sobre la LDH y Malato-DH podría también confirmar datos anteriores, que indicaban que el metabolismo energético celular no interviene en el proceso de citotoxicidad.

En cuanto a los controles realizados al material biológico, podemos observar como el proceso inhibitorio que se produce en los enzimas ensayados es diferente, cuestión que justificaría las diferencias observadas en la espectroscopía de esta sustancia.

Tras el estudio detallado de microscopía electrónica de transmisión, las células tratadas con la fracción tóxica de líquido hidatídico, manifiestan daño, en el sentido de permeabilización, es decir, se observa una pérdida de la homeostasis celular con entrada de líquido, posiblemente provocado por una pérdida en la capacidad reguladora de la homeostasis por parte de la membrana citoplasmática.



#### **4.- CONCLUSIONES:**

1ª) Que el líquido hidatídico presenta un factor lipídico purificable mediante cromatografía en capa fina, y responsable de daños citopatológicos frente a células de origen macrofágico.

2ª) Que los daños que se producen en la célula, parece ser que están relacionados con deterioros de la membrana plasmática.

3ª) Que el factor tóxico no necesita la unión a una proteína para ser efectivo.



## 1.5.- BIBLIOGRAFIA:

Ali-Khan, Z. 1978. Pathological changes in the lymphoreticular tissues of swiss mice infected with *E. granulosus* cyst. Z. Parasitenkd. **58**: 47-54.

Ali-Khan, Z. 1974. Host-parasite relationship in echinococcosis. II. Cyst weight, hematologic alteration and gross changes in the spleen and lymph nodes of C57L mice against graded doses of *E. multilocularis* cyst. J. Parasitol. **60**: 236-242.

Ali-Khan, Z. and Siboo, R. 1981. *E. multilocularis*: distribution and persistence of specific host immunoglobulins on cyst membranes. Exp. Parasitol. **51**: 159-168. (dos veces)

Ali-Khan, Z., Siboo, R., Gomersall, M. and Faucher, M. 1983. Cystolytic events and possible role of germinal cells in metastasis in chronic alveolar hydatidosis. Ann. Trop. Med. Parasitol. **77**: 497-512.

American Type Culture Collection Catalogue of Strains II THIRD EDITION, 1981. Ed. Staff, Hay, R., Macy, M. and Shannon, J. Eds. for cells lines. pp. 409.

Annen, J.M., Kholer, P. and Eckert, J. 1981. Cytotoxicity of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in vitro. Z. Parasitenkd. **65**: 79-88.

Araj, G.F., Matossian, R.M. and Fraya, G.J. 1977. The host response in secondary hydatidosis of mice. I.- Circulating antibodies. Z. Parasitenkd. **52**: 23-30.

Arrick, B.A.; Nathan, C.F.; Griffith, O.W.; Cohn, Z.A. 1982. Glutathione depletion sensitizes tumor cells to oxidative cytolysis. J. Biol. Chem., **257**: 1231-1237.

Baron, R.W. and Tanner, C.E. 1976. The effect of immunosuppression of secondary *E. multilocularis* infections in mice. Int. J. Parasitol. **6**: 37-42.

Slater, T.F. and Cheeseman, K.H. 1987. Gas chromatography and mass spectrophotometry of eicosanoids. Prostaglandin and related substances. Ed. C. Benedetto, Ed. McDonald-Gibson, S. Nigam and T.F. Slater. IRL Press. Oxford (England). pp. 243-258.

Ben-Ismael, R., Carme, B., Neils, G. and Gentilini, M. 1980. Nonspecific serological reactions with *E. granulosus* antigens: role of anti-P<sub>1</sub> antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **29**: 239-245.

Bergmeyer, H. U. Methods of Enzymatic Analysis. 1988 Ed. Hans Ulrich Bergmeyer. Third Edition. Weinheim (Federal Republic of Germany). pp: 234-235, 236-238, 239-241, 246-247, 252-253.

Boletín Epidemiológico Semanal. 1991. Editado por el Ministerio de Sanidad y Consumo.



Bortolussi, R., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Van Asbeck, B.S. and Verhoef, J. 1987. Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme system. *Infect. Immun.* **55**: 3197-3203.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* **72**: 248-254.

Brunk, U., Collins, V. P., y Arro, E. 1981. The fixation, dehydration, drying and coating of cultered cells for SEM. *Journal of Microscopy.* **123**: 121.

Butterwood, A.E. 1984. Cell mediated damage to helminths. *Adv. Parasitol.* **23**: 144-235.

Cameron, G.C. and Staveley, J.M. 1957. Blood group p sustance in hydatid cyst fluids. *Nature* **179**: 147-148.

Chance, B., Seis, H. and Boveris, A. 1979. Hyperoxide metabolism in mamalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605.

Chordi, A. and Kagan, I.G. 1965. Identification and characterization of antigenic components of seep hydatid fluid by electrophoresis. *J. Parasitol.* **51**: 63-71.

Clegg, J.A., Smithers, S.R. and Terry, J. 1971a. Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* **1**: 43-49.

Clegg, J.A., Smithers, S.R. and Terry, J. 1971b. Acquisition of human antigen by *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Nature* **232**: 653-654.

Coltorti, E.A. and Varela-Díaz, V.M. 1975. Penetration of host IgG molecules into hydatid cyst. *Z. Parasitenkd.* **48**: 47-51.

Cox, D.A., Dixon, J.B., Gadzama, J.N.A., Jenkins, P. and Ross, G. 1987. Macrophages as effectors and regulators of the immune response to *E. granulosus*. *Brit Soc. Parasitol., Spring Meeting 25-27 March, Edinburgh*, pp 54.

Cox, D.A., Dixon, J.B. and Marshall-Clarke, S. 1986. Transformation induced by *E. granulosus* protoscolices in unprimed spleen cells: identity and MHC restriction of participating cell types. *Immunol.* **57**: 461-466.

Damian, R.T. 1964 Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Natural.* **98**: 129-149.

Damian, R.T. 1987. Molecular mimicry revisited. *Parasitol. Today.* **3**: 263-266.

Davis, S.W. and Hammerberg, B. 1988. Activation of the alternative pathway of complement by larval *T. taeniaeformis* in resistant and suceptible strains of mice. *Int. J. Parasitol.* **18**: 591-597.



De Boer, R.J. and Hogeweg, P. 1987. Immunological discrimination between self and not-self by precursor depletion and memory accumulation. *J. Theor. Biol.* **124**: 343-369.

De Rycke, P.H., Janssen, D., Gamarro, F. and Osuna, A. 1985. Lethal effects of *Echinococcus granulosus* cyst fluid on mouse macrophages. *Biol. Jb. Dodanaea.* **53**: 169-176.

Deschiens, R. and Poirier, M. 1947. L'intoxication experimentale par le liquide hydatique. *C. R. Soc. Biol.* **141**: 1161-1163.

Deschiens, R. and Poirier, M. 1949. Les alterations spleniques et sanguines dans l'intoxications experimental du Cobaye par le liquide hydatique. **143**: 25-26.

Dessein, A.J., Samuelson, J.F., Buttewood, A.E., Hogan, M., Sherry, B.A., Vadas, M.A. and David, J.R. 1981. Immune evasion by *S. mansoni*: Loss of susceptibility to antibody schistosomula cultures in medium free of macromolecules. *Parasitol.* **82**: 357-374.

Dévé, F. 1946. L'échinococcose primitive. París: Masson

Dighero, M.W. and Bradstreet, C.M. 1979. The serodiagnosis of human disease: 1. The routine use of latex-agglutination and complement-fixation in diagnosis. *J. Helmintol.* **53**: 283-286.

Dixon, J.B., Jenkins, P. and Allan, D. 1982. Immune recognition of *E. granulosus*. 1.- Parasite-activated, primary transformation by normal murine lymph node cells. *Parasite Immunol.* **4**: 33-45.

Engelkirk, P.G., Williams, J.F. and Sing, M.M. 1981. Interaction between *T. taeniaeformis* nad host cell in vitro rapid adherence of peritoneal cells to strobilicerci. *Int J. Parasitol.* **11**: 463-474.

Fazekas, De St. Groth, B. and Loblay, R. 1984. Induction of memory and effector supressor T cell by perinatal exposure to antigen. *European J. Immunol.* **14**: 228-235.

Flower, R.J. 1988. Lipocortin. Cytokines and lipocortins in inflammation and Differentiation. (Ed. Wilwy-Liss) pp 11-25

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of tatal lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.

Fulford, D.E., Marciano-Cabral, F. and Bardley, S.G. 1985. Cytopatogenicity of *N. fowleri* for cultured rat neuroblastoma cell. *J. Protozool.* **32**: 176-180.

Gabir, T.G., Babior, B.M. 1981. The killing of pathogenes by pahgocytes. *Ann. Rev. Med.* **32**: 313-326.

Gore, R.W., Sadun, E.H. and Haff, R. 1970. *Echinococcus granulosus* and



*Echinococcus multilocularis*: soluble antigen fluorescent antibody test. *Exp. Parasitol.* **28**: 272-279.

Gansmüller, A., Anteunis, A., Venturiello, S.M., Bruschi, F. and Binagh, I.R.A. 1987. Antibody-dependent in vitro cytotoxicity of newborn larval nature of the cells involved. *Parasite Immunol.* **9**: 281-292.

Grossman, Z., Greeblat, Ch.L. and Cohen, I.R. 1986. Parasite immunology and lymphocyte population dynamics. *J. Theor. Biol.* **121**: 123-139. (dos veces)

Hammerberg, B., Mosoke, A.J. and Williams, J.F. 1977. Activation of complement by hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* **63**: 327-331. (dos veces)

Hammerberg, B. and Williams, J.F. 1978a. Interaction between *T. taeniaeformis* and the complement system. *J. Immunol.* **120**: 1033-1038.

Hammerberg, B. and Williams, J.F. 1978b. Physicochemical characterization of complement-interacting factors from *T. taeniaeformis*. *J. Immunol.* **120**: 1039-1045.

Harris, A. 1973. Behaviour of cultured cells on substrate of variable adhesiveness. *Exp. Cell Res.* **77**: 285

Heath, D.D. 1986. Immunology of *E. granulosus* infections. In: the biology of *E. granulosus* and hydatid disease, pp 164-188. Thompson, R.C.A., editor. Allen & Unwin, London.

Hess, H.H. and Lewin, E. 1965. Microassay of biochemical structural components in nervous tissue. II. Methods for cerebroside, proteolipid proteins and residue proteins. *J. Neurochem.* **12**: 205-211.

Hunt, S.V. Lymphocytes. Preparation of lymphocytes and accessory cells. 1987. Ed. G.G. Klaus. IRL Press. Oxford (England). pp: 1-34.

Janssen, D. 1991. De toxiciteit van hydatidecysten en haar rol in gastroparasietrelatie bij larvale *Echinococcus granulosus* infecties. Tesis doctoral

Kassis, A.I. and Tanner, C.E. 1976. The role of complement in hydatid disease: in vitro studies. *Int. J. Parasitol.* **6**: 25-35. (dos veces)

Kobaishi, Y. and Maudsley, D.V. 1969. In Methods of biochemical analysis. Glick, D. ed., John Wiley and Sons, New York. **17**: 55

Kroeze, E. and Tanner, C.E. 1987. *E. multilocularis*: susceptibility and responses to infection in inbred mice. *Int. J. Parasitol.* **17**: 873-883.

Kulmacz, R.J. and Lands, W.E.M. . 1987. Cyclooxygenase: measurement, purification and properties. Ed. C. Benedetto, r:g McDonald-Gibson, S. Nigam and T.F. Slater. IRL Press.



Oxford (England). pp. 209-227.

Leid, R.W. and Suquet, C.M. 1986. A superoxide dismutase of metacestodes of *T. taeniaeformis* Mol. Biochem. Parasitol. **18**: 301-311.

Leid, R.W., Grant, R.F. and Suquet, C.M. 1987. Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by *T. taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin. Parasite Immunol. **9**: 195-204.

Leid, R.W., Suquet, C.M., Bouwer, H.G.A. and Hinrichs, D.J. 1986. Interleukin inhibition by parasite proteinase inhibitor, taeniaestatin. J. Immunol. **137**: 2700-2710.

Lichtenberg, F. Von. and Ritchie, L.S. 1961. Cellular resistance against schistosomula of *S. mansoni* in *Macaca mulatta* monkeys following prolonged infections. Am. J. Trop. Med. & Hyg. **10**: 859-869.

Lopera, R.D., Meléndez, R.D., Fernández, I., Sirit, J. and Perera, M.P. 1989. Orbital hydatid cyst of *E. oligartus* in a human Venezuela. J. Parasitol. **75**(3): 467-470.

Loyd, S. and Soulsby, E.J.L. (1988) Immunological responses of the host. Parasitology in focus- facts and trends (ed. Mehlhorn, H.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp 619-650.

Matossian, R.W., McLaren, M.L., Draper, C.C., Bradstreet, C.M., Dighero, M.W., Kane, G.J., Mackinlay, L.M. and Rickard, M.D. 1979. The serodiagnosis of human hydatid disease. 2. Additional studies on selected sera using indirect haemagglutination (IHA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and defined antigen substrate spheres (DASS). J. Helminthol. **53**: 287-291.

Matossian, R.M., Alami, S.Y. and Araj, G.F. 1976. Serum immunoglobulin levels in human hydatidosis. Int. J. Parasitol. **6**: 367-371.

McManus, D.P. and Smyth, J.D. 1986. Hydatidosis: Changing concepts in epidemiology and speciation. Parasitol. Today. **2**(6).

Mota, I., Sadun, E., Bradshaw, R.M. and Gore, R.W. 1969. The immunological response of mice infected with *Trichinella spiralis*. Parasite immunol. **1**: 3-12.

Nathan, C.F., Arrick, B.A., Murray, H.V., Desantis, N.M. and Cohn, Z.A. 1980. Tumor cell anti-oxidant defenses. J. Exp. Med. **153**: 766-782.

Nichol, C.P. and Swell, M.M.H. 1984 Immunosuppression by larval cestodes of *Babesia micortii* infection. Ann. Trop. Med. Parasitol. **78**: 228-233.

Oriol, R., Williams, J.F., Pérez, M.V. and Oriol, C. 1971. Purification of lipoprotein antigens of *E. granulosus* from sheep hydatid fluid. Am J. Trop. Med. Hyg. **20**: 569-574.

Ortega-Pierres, C.D., Makenzie and Parkhouse, R.M. 1984. Protection against



*Trichinella spiralis* induced by monoclonal antibody that promotes killing on newborn larvae by granulocytes. *Parasite immunol.* **6**: 275-284.

Oshino, N.; Chance, B. 1977. Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide, demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver, and their implications for the physiological function of catalase. *Biochem. J.* **162**:509-525.

Osuna, A. Gamarro, F., Janssen, D., Castanys, S. and De Rycke, P.H. 1985. *Echinococcus granulosus*: cytotoxic effects of hydatid cyst fluid on intermediate host cells. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **65**: 410

Osuna, A., Gamarro, F., Jassen, D., Carreras, M.A., Castanys, S., Adroher, F.J. and De Rycke, P.H. 1987. Cytotoxicity of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid: species specific activity and biochemical characterization. *Rev. Iber. Parasitol.* **47**: 47

Perricone, R., Fontana, L., De Carolis, C. and Ottaviana, P. 1980. Activation of alternative complement pathway by fluid from cysts. *New England J. Med.* **302**: 808-809.

Powell, W.S. 1985. In *Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism*, Lands, W.E.M. ed., Martinus Nijhoff Publishing, Boston, p. 375.

Rau, M.E. and Tanner, C.E. 1976. *E. multilocularis* in the cotton rat: the in vitro protoscolicidal activity of peritoneal cells. *Int. J. Parasitol.* **6**: 195-199.

Reuben, J.M. and Tanner, C.E. 1979. Immunoprophylaxis with BCG of experimental *E. multilocularis* infections. *Australian Vet. J.* **55**: 105-108.

Richards, S.K., Arme, C. and Bridges, f.j. 1983. *E. granulosus*: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cyst. *Parasitol* **86**: 407-414.

Rickard, M.D. and Williams, J.F. 1982. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv. Parasitol.* **21**: 229-296.

Rickard, M.D., Honey, R.D., Brumley, J.L. and Mitchell, G.F. 1984. Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. II. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using various antigens. *Phatology* **16**: 211-216.

Rickard, M.D. and Lightowers, M.W. 1986. Immunodiagnosis of hydatid disease. En: Thompson, R.C.A. ed. *The biology of E. granulosus and hydatid disease*. Allen & Unwin, London, pp 217-249.

Riley, E.M., Dixon, J.B., Killi, D.F. and Cox, D.A. 1984. Immune response to *E. granulosus*: histological and immunocytochemical observation. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **78**: 210-212.

Russi, S., Siracusano, A. and Vicari, G. 1974. Isolation and characterization of blood



P<sub>1</sub> active carbohydrate antigen of *Echinococcus granulosus* cyst membrane. J. of Immunol. **112**: 1061-1069.

Slater, T.F. and Cheeseman, K.H. 1987. Lipid peroxidation. Prostaglandin and related substances. Ed. C. Benedetto, r:g: McDonald-Gibson, S. Nigam and T.F. Slater. IRL Press. Oxford (England). pp. 243-258.

Samuelson, J.C. and Caufield, J.P. 1982. Loss of covalently labelled glycoproteins and glucolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *S. mansoni* J. Cell Biol. **94**: 363-369.

Sasagawa, S., Suzuki, K. and Fujikura, T. 1987. *Ascaris suum*: human lymphocyte mitogenic factor content. Exp. Parasitol. **64**: 71-77.

Schantz, P.M. 1983. Human behavior nad parasitic zoonoses in North America. En Human Ecology and Infections Diseases. Reprinted by the U.S. Departement of Health and Human Services. Public Health Service.

Schantz, P.M. and Gottstein 1985. Echinococcosis (hydatidosis). In immunoserology of parasitic diseases, K.F. Walls and P.M. Schantz (eds.), in press. New York: Academic press.

Schleil, R.F. and Wensink, P.C. 1981. Practical Methods in Molecular Biology. Philp Manor Ed. New York. pp. 61-62

Siracusano, A., Teggi, A., Quinteri, F., Notargiacomo, S., De Rosa, F. nad Vicari, G. 1988. Cellular immune responses of hydatid patiens to *E. granulosus* antigen. Clin. Exp. Immunol. **72**: 400-405.

Smyth, J.D. 1979. An in vitro approach to taxonomic problems in trematodes and cestodes, specially *Echinococcus*. 17<sup>th</sup> Symp. Brit. Soc. Parasitol.

Sneider, T.G., Williams, J.C., Karns, P.A., Romaine, T.L., Trammel, H.E. and Kearny, M.T. 1986. Immunosuppression of lymphocyte blastogenesis in cattle infected with *Ostertagia ostertagi* and/or *Trichostrongylus axei*. Veter. Immunol. Immunopathol. **11**: 251-264.

Stahl, E. 1969. In Thin-layer Chromatography. Stahl, E. ed., Springer-Verlag, New York, p 5.

Suquet, C., grenn-Edwards, C. and Leid, R.W. 1984. Isolation and practical characterization of *T. taeniaeformis* metacestode proteinasa inhibitor. Int. J. Parasitol. **14**: 165-172.

Thomas, E.L., Leherer, R.I. and Rest, R.F. 1988. Human neutrophil antimicrobial activity. Rev. Infect. Dis. **10**: S450-s456.



Thompson, R.C.A. 1976. Inhibitory effect of BCG on development of secondary cyst of *E. granulosus*. *Veter. Recors.* **99**: 273.

Thompson, R.C.A. 1977 Hydatidosis in Great Britain. *Helminthol. Abs.* **46(A)**: 837-861.

Thompson, R.C.A. 1986. Biology and systematics of *Echinococcus*. En Tompson R.C.A. editor. *The biology of Echinococcus and hydatid disease*. Allen & Unwin, London, pp 5-43.

Thompson, R.C.A. and Lymbery, A.J. 1988. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus* *Adv. Parasitol.* **27**: 210-258.

Torres-Rodríguez, J.M. and Winsnivesky, C. 1978. Cinética de la respuesta serológica de ratón tras la infección primaria experimental con embriones de *E. granulosus*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **53**: 479-486.

Uchiyama, M. y Mihara, M. 1977 Determinación of Malonaldehyde Precursor in Tissue by Thiobarbituric Acid Test. Academic Press. New York. Pp. 271-278.

Vane, J.R. 1971. Inhibitions of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nature (New Biol.)* pp. 231-235.

Von Siebol, Ju, C.T.E. 1853. Über die Verwandlung der *Echinococcus-Brut* in Tenien. *Z. Wiss. Zool.* **4**: 409-425.

Virchow, R. 1855. Die multiloculäre, ulcerirende *Echinokokkenschwulst* der Leber. *Verh. Physiol. -Med. Ges. Würzburg.* **6**: 428-429.

Yasumura, Y. and Kawakita, Y. 1963. *Nippon Rinsho.* **21**: 1209-1963.

Zöllner, N. and Kirsch, K. 1962. *Z. Ges. Exp. Med.* **135**: 545.