

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

"PASAJE Y DISTRIBUCION DE SUSTANCIAS A TRAVES
DE LAS MEMBRANAS DEL *Echinococcus granulosus*
EN SU ESTADIO LARVAL. ENFOQUE BIOFISICO."



HORACIO FABIO CANTIELLO

-1980-

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

RECTOR: Dr. Guillermo G. Gallo

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DECANO: Dr. José Hugo Fernández de Liger

VICEDECANO: Dr. Néstor Ángel Menéndez

SEC. DE ASUNTOS ACADÉMICOS: Dr. Jorge E. Led

SEC. ADMINISTRATIVO: Sr. Omar Hugo Ramírez

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE

- PROFESOR TITULAR DEDICACION EXCLUSIVA -

<u>APELLIDO Y NOMBRE</u>	<u>CATEDRA</u>
Angulo Eusebia	Investigadora
Carroza Jesús S.M.	Int. a la Biofísica
Demarchi Raúl S.	Inmun. Gral y Aplic.
Errecalde Jorge E.	Microbiología
Etcheverry Garay María E.	Virología
Gallo Guillermo G.	Clin. Grand. Animales
Menendez Néstor A.	Anat. y Fisiol. Pat.
Quinteros Indalecio R.	Genet. y Biometría
Zaccardi Eduardo	Fisiología

- PROFESOR ASOCIADO DEDICACION EXCLUSIVA -

Martín Alcides	Anat. y Fisiol. Pat.
----------------	----------------------

- PROFESOR ADJUNTO DEDICACION EXCLUSIVA -

Boccia Francisco O.	Clin. Pequeños Anim.
Idiart Julio R.	Anat. y Fisiol. Pat.
Lagrecá Liliana	Zotec. Gral y Agrost.
Lasta Jorge A.	Higiene Epid. y S. Púb.
Monina Marta Inés	Clin. Grand. Animales

- PROFESOR TITULAR DEDICACION TIEMPO PARCIAL-

Aguirre Walter G.	Microb. especial
Alberdi Cecilia	Tec. y Sanid. Aliment.
Andreatta Jorge	Semiología y Proped.
Argeri Nelson J.	Análisis Clfn. I y II.
Bertolini José	Anatomía comparada
Delprato Ismael O.	Anat. Descript y Top.
Godoy Juan C.	Zotec. Espec. I parte.
Jensen Alicia D.	Bioestadística
Gimeno Emilio J.	Higiene Epid. y S. Púb.

Led Jorge E.
Ochoa Mario E.
Ottino Julio E.
Pracca Lydia C.
Rodriguez Benjamin
Tesoriero Catalina
Torres Jorge

Parasit. y Enf. Paras.
Director Inst. Sta. Cat.
Histología Normal
Clín. Pec. Animales
Zotec. Espec. II Pte.
Física y Quím. Aplic.
Int a la Bioquímica

- PROFESOR ADJUNTO TIEMPO PARCIAL-

Brandetti Eugenio
Champredonde Hugo
Durante Eduardo J.
Errecalde Jorge O. (h.)
Fernández Enrique J.
Gomez Carlos
Maggi Nilda B.
Marotta Eduardo G.
Martino Juan J.
Merlini José C.
Noia Miguel A.
Ortega César F.
Pennimpe María T. del A.
Piovano Nicolás
Reinoso Enso
Ruager Jorge

Anat. y Fisiol. Pat.
Patología General
Patolog. Quirúrg. y Pod.
Farmacol. Farm. y Terap.
Microbiología.
Inmunología II
Serv. Central de Cir.
Zotec. Especial I Parte
Microbiología
Patol. Reprod. y Obste.
Introd. a la Biofísica
Semiología y Proped.
Tecnol. y Sanidad Alim.
Introduc. a la bioquímica
Micol. Médica e Induc.
Anat. y Fisiol. Patolog.

-PROFESOR TITULAR DEDICACION SIMPLE-

Aguirre Walter G.
Alberdi Cecilio
Carroza Jesús S.M.
Errecalde Jorge E.
Harispe Carlos

Microbiol. aplicada.
Tecnol. Sanid Alim.
Introduc. a la biofísica
Enfermedades infect.
Enfermedades infect.

Iseas Fortunato E.	Patología Médica
Maleandi Florestan S.	Parasitología Comp.
Manzullo Alfredo	Inmunología I
Manzullo Alfredo	Inmunología II
Martino Olindo A.L.	Salud Pública
Ostrowski Jorge E.B.	Patol. Reprod. y Obst.
Panzoni Erico E.	Economía Agraria
Perotti Rodolfo	Zotec. Espec. III parte
Ruager Jorge	Patología General
Sarachu Alberto N.	Genética microbiana
Sciamarella Alfredo	Medicina operatoria
Torres Jorge	Físic. y Quím. aplic.
Toucedo Guillermo A.	Patolog. quirúrg. y pod.

-PROFESOR ADJUNTO DEDICACION SIMPLE-

Bacigalupo Néstor	Tecnol. y Sanid. Alim.
Baigun Roberto	Patolog. Reprod. y Obst.
Brandetti Eugenio	Parasit. y Enferm. Parasit.
Dibbern Alberto R.	Zotec. Espec. II Parte
Fernandez de Liger José H.	Clin. Grandes Animales
Finochietto Héctor D.	Patología Médica
Gamboa Rogelio A.	Clínica Grand. Animal
Grillo Virginia E.	Zotec. Especial III Parte
Lasta Jorge A.	Microbio. aplicada.
Maliandi Florestán S. (h.)	Higiene Epid. S. Púb.
Miranda Manuel F.	Tecnol. y Sanid. Alim.
Moiso Alejandro C.	Microbiología
Morelli Héctor A.	Zotec. Espec. III Parte
Novarini Miguel A.	Farmac. y Terap.
Oliva Graciela A.	Virología

Pennimpede Enrique F.F.

Pennimpede Enrique F.F.

Rojas Edmundo R.

Rutter Bruno

Tarsia Elba E.

Venturini Lucila

Villar Marta E.

Villar Marta E.

Inmunología I Parte

Inmunol. General y Aplic.

Fisiología

Patolog. Reprod. y Obst.

Introd. a la biofísica

Parasit. y Enferm. Parasit.

Análisis Clínicos I Parte

Análisis Clínicos II Parte

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias ha sido realizado en el Departamento de Biofísica del Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein.

Padrino de Tesis:

Dr. Ignacio L. Reisin

Mi reconocimiento;

A las autoridades de la Fundación Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein por haberme posibilitado la realización de este trabajo en sus instalaciones.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por haberme otorgado las Becas que permitieron la realización de esta tesis.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata por haberme posibilitado la presentación del presente trabajo en dicha Casa de estudios.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Ignacio L. Reisin por el ahfnco
puesto en mi formación y guía de la que
como resultados se comenzó y concluyó
este trabajo abriéndome el camino de
la investigación biofísica.

Al Dr. Néstor A. Menéndez por el gran
apoyo puesto en su función de Conseje_
ro de Tesis.

A mis compañeros del Departamento de
Biofísica por su espíritu de confrater_
nidad y colaboración en el trascurso
de mis tareas.

A la Srta. Mirta G. Ciardonei por la in_
valorable colaboración en el pasado del
manuscrito.

A mis amigos

PROLOGO	<u>Pág.</u>
<u>PARTE I</u>	
ECOBIOLOGIA DE <u>Echinococcus granulosus</u>	1
Ciclo biológico del <u>Echinococcus granulosus</u>	2
ESTRUCTURA TEGUMENTARIA DE HELMINTOS	
Generalidades.....	4
MORFOLOGIA DE <u>Echinococcus granulosus</u>	7
Quiste hidatídico.....	7
Membrana laminar y germinal.....	7
Vesículas hijas.....	7
TEGUMENTO DEL PROTOESCOLEX.....	8
Sistema osmorregulador.....	8
BIOQUIMICA DE CESTODES	
Generalidades bioquímicas.....	10
Metabolismo respiratorio.....	11
Bioquímica del <u>Echinococcus granulosus</u>	13
Vías metabólicas.....	13
Metabolismo respiratorio.....	15
Composición química. Contenido de agua y electrolitos.....	16
PROPIEDADES DE MEMBRANAS DE CESTODES	
Generalidades.....	19
Quiste hidatídico.....	21
<u>PARTE II</u>	
MATERIALES Y METODOS.....	26
Protoescólices.....	26
Soluciones.....	26
Drogas y reactivos.....	27
Procesamiento de las muestras.....	27
Determinación del espacio atrapado entre los protoescólices.....	28
-Procedimiento a.....	28
-Procedimiento b.....	28

Incorporación de K^{42}	29
Depleción de potasio y enriquecimiento con sodio.....	29
Determinación del volumen individual de los protoescólices.....	29
Estadística.....	31
RESULTADOS.....	32
Cambios en el contenido de agua, Na, K y Cl^{-}	32
Espacio atrapado entre protoescólices.....	35
Compartimentalización del catión potasio.....	41
Influjos de K^{42} . Acción de la ouabaína.....	47
Efecto de la ouabaína.....	49
DISCUSION.....	59
Incrementos del contenido de Na y Cl^{-} en el protoescolelex.....	60
Incremento del contenido de agua en el protoescolelex.....	60
Incremento en el volumen individual del protoescolelex.....	61
Flujo neto de agua en el protoescolelex.....	62
Distribución de agua, Na y Cl^{-} en el protoescolelex.....	63
Estado estacionario de potasio. Análisis compartamental. Acción de la ouabaína.....	64
Comportamiento del potasio. Transporte activo.....	68
Cinética de transporte activo de potasio.....	66
Apéndice I.....	72
Resumen y Conclusiones.....	70
Bibliografía.....	78
Abreviaturas.....	63

P R O L O G O

Todos los organismos vivos, cualquiera sea su grado de evolución, constituyen entidades altamente organizadas. Una de las manifestaciones fundamentales de esta organización es la existencia de compartimientos separados entre sí y del medio externo por membranas. Tanto una mitocondria, como un protozoo, una tenia o un cerebro constituyen ejemplos de tales compartimientos. Únicamente la permanente constancia en el estado estacionario de los mismos, o cambios sumamente controlados, pueden ser compatibles con la vida.

En los organismos superiores el intercambio de materia con el medio externo se realiza a través de membranas epiteliales. En los tenidos y otros parásitos similares esta función la cumplen las membranas tegumentarias, con propiedades, en líneas generales similares a las primeras, pero convertidas en los platelmintos en el órgano fundamental para el mantenimiento de la vida. Una de las funciones más importantes de cualquier organismo vivo es la regulación del transporte de electrolitos y agua. Hasta el momento es relativamente poca la información respecto del metabolismo y transporte en parásitos y el objeto de esta tesis es el de analizar los mecanismos para el balance hidroelectrolítico en el estadio larval del Echinococcus granulosus.

La misma consta de 2 partes; en la primera se desarrolla una introducción al metabolismo del parásito, el estado actual en el conocimiento sobre comportamiento de membranas en parásitos y su relación con los fenómenos de transporte de materia. La segunda, comprende los métodos, resultados y discusión de dichos estudios.

P A R T E I

ECOBIOLOGIA DE Echinococcus granulosus

Los ciclos biológicos de los parásitos Echinococcus^{*}, spp, abarcan un gran espectro de huéspedes intermediarios y definitivos de variada geografía, desarrollando una compleja especiación y subespeciación de dicho género (1). Esto se debe a las condiciones que han favorecido la expresión de mutantes, como así también su selección y establecimiento en distintos huéspedes, ya sea en el parásito adulto por su hermafroditismo, como en los organismos hidatídicos por su capacidad poliembrionaria.

Una de las caracterizaciones más recientes distingue hasta 3 especies:

- Echinococcus granulosus (Batsch-1786).
- Echinococcus multilocularis (Leuckart-1863).
- Echinococcus oligarthrus (Diesing-1863).

Se han descrito otras tres especies que, hasta el momento, no tienen validez taxonómica debido a que se desconoce las características de sus ciclos biológicos (2). La localización geográfica de estos parásitos se extiende a todos los continentes, manteniéndose en ciclos caninungulados, tanto domésticos como salvajes. (3). De todas las especies la única que se considera mundialmente distribuida es el Echinococcus granulosus. En este sentido los zorros juegan un papel aún confuso pero la alta tasa de infección en zorros grises (Dusicyon gymnocercus) por ejemplo, en algunas zonas de nuestro país y la gran población de los mismos en ciertas regiones, sugieren ser un importante medio de diseminación (2)(3). En América del Norte, está comprobado el ciclo biológico en los lobos y algunos ungulados salvajes . El ciclo intermediario está cubierto por varios hervíboros. Los bovinos domésticos, aún en áreas endémicas producen quistes generalmente infértiles. Sin embargo, hay otros autores que han descrito quistes altamente fértiles en diversos huéspedes intermediarios, llegando a ser su fertilidad de un 90% (3).

Dos especies de escaso interés para nosotros son: I) El Echinococcus multilocularis ciclo fundamentalmente zorro-roedor, que está restringido al hemisferio Norte, des-

* Parásitos que pertenecen al Phylum: Platelminetos, Clase: Cestodea, Subclase: Cestodaria, Orden: Cyclophilidea.

de Canadá hasta la Unión Soviética, y II) el Echinococcus oligarthrus que se desarrolla en felinos de Sud América. Este último recién ahora está comenzando a cobrar interés por su posible importancia en Salud Pública. Produce una hidatidosis humana autóctona de Panamá y países cercanos que es morfológicamente similar a la hidatidosis multilocular producida por el anterior () que ya ha sido encontrada en nuestro país en gatos monteses (Felix geoffroyi) capturados en La Pampa(2). Las últimas especies han sido descritas también en la Argentina por Szidat (4). De estas tres, la de mayor trascendencia sería el E. patagónicus (3). El único parásito que tiene una clara distribución cosmopolita es el Echinococcus granulosus. Aunque se lo encuentra más frecuentemente en las zonas templadas, su ciclo biológico involucra la presencia de huéspedes del estadio adulto de tenia (cánidos) y huéspedes del estadio larval (ungulados-eventualmente el hombre).

Ciclo biológico del Echinococcus granulosus

El parásito adulto llega a tener unos 6mm de longitud y habita en el intestino delgado de cánidos (4). Los proglótidos grávidos que salen con las heces son ingeridos por el huésped intermediario y desintegrados en su sistema digestivo liberando a los embriones encapsulados. Los embriones liberados emergen de sus cápsulas en el intestino delgado, de los huéspedes intermediarios como el bovino, ovino, porcino, equino o por el hombre, convirtiéndose en oncosferas. Estos atraviesan la pared intestinal y se pueden localizar en hígado y, por vía sanguínea llegan habitualmente al pulmón. Eventualmente lo hacen en otras localizaciones no tan frecuentes (5). En las distintas vísceras el parásito larval, vesiculizándose va creciendo lentamente dentro de la estructura de un quiste. De la membrana interna del mismo, propia del parásito, se originan múltiples quistes hijos o vesículas germinativas así como los escólices larvarios llamados protoescólices. El quiste larval primario tiene un desarrollo sumamente lento, pudiendo alcanzar 15 cm de diámetro en 10 o 20 años. El ciclo se cierra con la ingestión de dichos protoescólices en cánidos domésticos o salvajes (4)(3).

Las características del medio que los protoescólices encuentren en el intestino del huésped ya sea intermediario o definitivo es de importancia fundamental. Las vesicu

las germinativas ingeridas por los cánidos liberan los protoescólices por la acción de la pepsina gástrica, pero no evaginan en pH ácido. A pH neutro su evaginación es lenta, incrementándose notablemente con la presencia de sales biliares, Estas toleran muy bien el taurocolato, componente principal de la bilis canina, no así el desoxicolato o el glicocolato que son sales presentes fundamentalmente en la bilis de los hervíboros (producen la lisis del tegumento de los protoescólices y su consecuente muerte) (4). A partir de la profunda implantación del protoescolex evaginado, en una cripta de Lieber kjún comienza el desarrollo estrobilar del mismo. Este tipo de unión que llama Smyth "placentar" a su huésped le provee la interacción necesaria para su nutrición y crecimiento (0). Smyth y colaboradores han logrado un notable avance en el conocimiento sobre las necesidades metabólicas del parásito desarrollando técnicas específicas de cultivo para E.granulosus "in vitro" (Smyth y col (0,7,8,9) que posibilitan una evolución diferencial del protoescolex tanto hacia su forma adulta de tenia, como larval de hidátide. Este desarrollo ofrece un arma fundamental para el avance en los conocimientos del metabolismo de dicho parásito.

ESTRUCTURA TEGUMENTARIA DE HELMINTOS

Generalidades

Dado que los cestodes carecen de aparato digestivo, todos sus nutrientes deben entrar a los mismos a través de su superficie tegumentaria (4). Es más correcto referirse a esta estructura como "tegumento" y no "cutícula" como se la llamaba anteriormente dado que no es una cobertura inerte. Estudios de microscopía electrónica de varios miembros de la familia Taenidae, muestra que el tegumento de los mismos tiene una estructura sincicial con un citoplasma continuo de células con alta funcionalidad metabólica (10) que, básicamente, tienen la misma morfología dentro de las distintas clases del phylum Plathelminths (11). Por lo tanto, es de fundamental importancia conocer su estructura y composición para complementar los conocimientos sobre la fisiología de estos parásitos.

La misma está compuesta de tres capas: una membrana externa (que contiene un ribete en cepillo) una delgada lámina homogénea y su membrana basal (11). La primera fue descrita por varios autores conteniendo poros con forma de canales. Estos poros, cuya existencia no ha sido confirmada podrían no ser canales sino glóbulos del medio externo, los que serían absorbidos por pinocitosis . La superficie está cubierta en general por proyecciones que recuerdan enormemente las microvellosidades de la mucosa intestinal de los mamíferos (11). Esto es un hallazgo universal en los cestodes adultos. La superficie externa del tegumento se ve enormemente incrementada por estas microvellosidades (11). Las pequeñas evaginaciones de la membrana apical, llamadas microtricos o microvellosidades son comparados habitualmente con el ribete en cepillo de las células epiteliales mucosas de los vertebrados, Si bien hay varias similitudes entre estos tipos de diferenciación apicales hay algunas diferencias detectables en su estructura,, en los contenidos relativos de partículas y de filamentos estructurales. Estas microvellosidades recubren la superficie corporal, tanto del Echinococcus granulosus como del Echinococcus multilocularis.

Desde un comienzo se ha asociado a estas diminutas proyecciones de 1 µm de longitud con la absorción de nutrientes. Se está de acuerdo en que por un lado aumentan el área de absorción del tegumento, previenen la expulsión del parásito y producen una acción abrasiva sobre las células del huésped para incrementar la concentración de material

nutritivo cerca de su superficie (11).

Las microvellosidades están recubiertas por una membrana limitante que, a su vez, recubre todo el parásito. En algunos estadios larvales también se observa (11). Se considera a la epidermis como un sincicio que contiene numerosas vacuolas, vesículas y mitocondrias esparcidas en todo su volumen con una mayor tendencia a concentrarse en la zona apical.FIGURA 2.

La estructura de las microvellosidades es muy interesante. En todas las especies examinadas su parte distal es muy similar a las microvellosidades de las células intestinales de mamíferos con la única diferencia que tiene formaciones denso-oscuras vistas al microscopio electrónico que son las que le darían forma a sus terminaciones, haciéndolas rígidas. Esto serviría para retener su posición, interdigitándose con las del intestino (11).

La membrana plasmática externa tiene tanto invaginaciones pinocitóticas como pequeñas evaginaciones. Al no ser discretas, sino que guardan continuidad, forman parte del sincicio general de la epidermis. La ultraestructura en los estadios larvales no muestra diferencias sustanciales con la de los cestodes adultos. En cuanto a su composición, con métodos histoquímicos, se determinó que la membrana basal consiste fundamentalmente en una proteína muy similar al colágeno de los mamíferos.

El borde con las microvellosidades contiene un polisacárido no glucogénico y una proteína asociada a pequeñas cantidades de polifenoles, por otra parte, muchas especies de tenias contienen grandes concentraciones de grupos sulfhidrilos además de gran cantidad de lípidos en sus células tegumentarias. Se ha demostrado la presencia de una serie de enzimas como fosfatasas ácidas y alcalinas, cuya mayor actividad estaría en la epidermis de los proglótidos maduros. Aparecen además algunas esterasas no específicas, colinesterasas, amilopeptidasas, β -glucuronidasas como así también isocitrato, glutamato, α -cetoglutarato-succinato y lactato-deshidrogenasas, además de citocromooxidasas (13).Todas estas características son indicadoras del activo papel del tegumento en la absorción de sustancias.

Las características protectoras de la superficie tegumentaria posiblemente se deben a la presencia de una capa de mucopolisacáridos y a la continuidad de su membrana plasmática. Las células tegumentarias que rodean al parénquima, elementos fundamentales del estroma tienen extensiones con continuidad citoplasmática en la cobertura corporal de la estróbila. Su citoplasma distal tiene las proyecciones en forma de espinas en la superficie externa que se recubren con una membrana continua. La parte basal de dicho citoplasma está limitada por la membrana citoplasmática del mismo continuándose con el citoplasma perinuclear. Este a su vez descansa en una zona fibrosa con filamentos irregularmente distribuidos. Las fibras musculares se encuentran debajo. El citoplasma distal contiene muchas vesículas circulares, mitocondrias y cuerpos densos. Es de una importancia muy especial dado que es la parte citoplasmática modificada de las células tegumentarias la que está expuesta a los nutrientes y a los jugos digestivos en el intestino hospedador. Esto puede servir, no solamente para obtener el material nutritivo sino como una protección contra las enzimas del huésped además de ser una vía importante de eliminación de catabolitos.

Se han observado extensiones citoplasmáticas que conectan el citoplasma distal con el que rodea al núcleo, como así también gránulos adyacentes al citoplasma perinuclear de las células tegumentarias que son características del tipo de los gránulos de glucógeno. Todas las observaciones hasta el momento registran la presencia de mitocondrias en el citoplasma distal y en algunos casos, cerca de la base de dicha zona. Esta localización particular de las mismas está generalmente asociada a zonas citoplasmáticas que requieren un aporte de ATP importante.

MORFOLOGIA DE Echinococcus granulosus

Quiete hidatídico

-Membrana laminar y germinal-

La membrana germinal reviste el interior del quiste hidatídico recubriendo su superficie laminar que es la capa más externa en contacto con los tejidos del huésped. La microscopía electrónica muestra que el tegumento tiene características similares a las de los protoescólices (14). Esta membrana, sin solución de continuidad se une con la superficie de las vesículas prolíferas y con el tegumento del protoescolex.

La membrana germinal contiene una porción apical que se adosa por medio de estructuras digitiformes. Estas estructuras están rodeadas por una membrana y un espacio claro que asemejan a las paredes de las proyecciones tegumentarias del protoescolex. La zona apical se mantiene sobre la superficie de la membrana laminar. Esta es sumamente PAS +. A la microscopía electrónica aparece como capas superpuestas de material delgado en forma de fibras (14). FIGURA 1.

-Vesículas hijas-

La pared de las vesículas hijas es una membrana altamente vacuolada que contiene núcleos a intervalos irregulares. El contenido de la misma, que es PAS positivo, está formado por restos, aparentemente de protoescólices degenerados.

Se observan habitualmente células nucleadas cerca del punto de unión del protoescolex con la pared de la vesícula. Estos contienen frecuentemente estructuras cristaloides que se han observado también en el citoplasma perinuclear de las células tegumentarias. Sin embargo, no han sido observadas en los protoescólices incubados más de un mes (14). FIGURA 1.

TEGUMENTO DEL PROTOESCOLEX

La estructura general de una célula tegumentaria del protoescolex de E. granulosus se puede observar en la FIGURA 2. Las extensiones citoplasmáticas de las células que están en el parénquima, debajo de las bandas musculares, se comunican con la matriz del tegumento. La superficie externa del citoplasma distal muestra proyecciones del mismo tipo que los ténidos adultos.

La cantidad de material PAS positivo es fácilmente visible. Es una fina malla filamentosa que no cubre toda la superficie del protoescolex sino sólo el área que no posee proyecciones superficiales. En los protoescólices que han sido cultivados durante más de un mes en medios especiales se ha perdido esta cobertura y las proyecciones están completamente desarrollados en toda su zona posterior. En cuanto a las ventosas, sus paredes están formadas por el citoplasma distal del tegumento (12).

Sistema osmorregulador

Los plathelminths, tanto en sus estadios larvales como adultos, están dotados de un "sistema excretor canalicular acuífero" formado de túbulos comunicantes entre sí y con el exterior y provisto de elementos celulares particulares, llamados "células flamíferas" o "células vibrátiles". Este sistema ejerce la función de regular el contenido de agua del parásito y de eliminar catabolitos (protonefridio(15)).

El sistema protonefridial del protoescolex de Echinococcus granulosus está compuesto por cuatro canales longitudinales, dos por lado, que se anastomosan en proximidad del rostelo invaginado en un canal circular y en su otro extremo, en proximidad del pedúnculo, se fusionan para dar uno por lado. Al atravesar el pedúnculo se continúan en la membrana prolígera. Este sistema es constante en su morfología. Los capilares excretores están formados por células parenquimatosas diferenciadas y por células flamíferas. Estas son elementos móviles o vibrátiles que dan movimiento al sistema (15).

Las células flamíferas y los túbulos colectores se hallan frecuentemente en el parénquima de los protoescólices. Las cilias de las mismas tienen el patrón común de conformación de "9 + 2" fibrillas.

Las paredes de los túbulos colectores tienen evaginaciones que se extienden dentro

del lumen. Estos conductos están delineados a partir de la modificación citoplasmática de las células nucleadas.

Los túbulos colectores descansan dentro del parénquima, en la membrana fibrosa originada en el tegumento. Esta, en el estadio quístico de Echinococcus granulosus tiene la misma conformación que en el estadio adulto, sin embargo, se observan algunas diferencias importantes entre la superficie tegumentaria del protoescolex y la tenia.

La cubierta PAS positiva que tiene el protoescolex en su superficie tegumentaria no ha sido demostrada aún en el adulto. Además de las proyecciones en el tegumento que cubren toda la superficie corporal del adulto, y que en el protoescolex se ven sólo en la zona posterior, se observan protuberancias en forma de nudos. Estos serían presumiblemente, las proyecciones no desarrolladas aún.

El material PAS positivo que contienen las vesículas hijas y que se adosa a los protoescólices, sería el responsable de las propiedades de adhesividad de estos cuando están frescos. Su función aún no se conoce, pero se ha planteado que varios mucopolisacáridos y mucoides, son inhibidores de la acción enzimática proteolítica, sugiriéndose que esta secreción tegumentaria de algunos cestodes y trematodes podría actuar como mecanismo de defensa contra las enzimas del huésped.

Hay por último, un hallazgo adicional en los protoescólices que difiere respecto de la tenia adulta, y es la ausencia de "canales" o "poros" en el tegumento de los mismos. En ninguna de todas las secciones examinadas por microscopía electrónica se encontró abertura alguna. Pero no hay aún clara evidencia que confirme su inexistencia. Se ha considerado la presencia de "canales"-poro" en Dipilidium caninum en proximidad de las células tegumentarias, pero no hay datos de la continuidad de dichos canales dado el espesor de las membranas que las formarían. Aún considerando su existencia como posible, el número de los mismos no sería muy grande, por lo que la estructura tegumentaria se toma en general como un gran sincicio (11).

BIOQUIMICA DE CESTODES

Generalidades bioquímicas

Desde un tiempo relativamente largo se sabe que el metabolismo parasitario depende del aporte de nutrientes del huésped. Si bien las vías metabólicas difieren bastante entre sí, Krebs y Najjar en 1948 (10) fueron los primeros en encontrar que en distintas especies animales las enzimas con igual función eran antigénicamente diferentes. En el caso particular de los helmintos parásitos existe una notable dependencia de las vías metabólicas respecto de las condiciones ambientales en las que se encuentra (presencia de sustratos, tensión de oxígeno, anhídrido carbónico, pH, etc.)

Los hidratos de carbono constituyen la mayor y en algunos casos la única fuente de energía en helmintos. A estos se los puede dividir de acuerdo a las características de su metabolismo hidrocarbonado en dos grandes grupos.

El primer grupo está compuesto por fermentadores homolácticos (v.g. schistosoma mansoni), que dependen enteramente de la glucólisis, produciendo lactato a partir de la reducción del piruvato formado en la reoxidación y deshidratación del gliceraldehido 3 P, situación similar a la producción láctica del músculo en condiciones anaeróbicas. Una variante particular es la producción de etanol de ciertos Acantocephala que asemeja la fermentación alcohólica de levaduras (17) El segundo grupo de parásitos, del que forman parte el Ascaris lumbricoides, la Fasciola hepática, la Hymenolepis diminuta o el Echinococcus granulosus, fijan anhídrido carbónico y se caracterizan por poseer un ciclo del ácido tricarboxílico, parcial y que opera de manera inversa a lo que ocurre en mamíferos. Tienen una secuencia glucolítica similar a la de estos hasta la formación fosfoenol piruvato (PEP). Este no es defosforilado directamente a piruvato, sino que por la acción de la enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) fija CO₂ formándose oxalacetato (17)(18). Este por presencia de la malato deshidrogenasa se reduce rápidamente a malato, que trae aparejado la reoxidación del NADH citoplasmático inicialmente formado en la glucólisis. El malato entra en la mitocondria donde se produce una reacción de dismutación (18) de la que parte del mismo es decarboxilado (por la enzima málica) a piruvato y NADH. El malato está en equilibrio con el fumarato (vía fumarasa) que se reduce a succinato. Esta reducción está asociada a la síntesis de ATP.

En aquellos parásitos que fijan CO₂ los productos metabólicos terminales más impor-

tantes son en general el succinato y el piruvato. El primero es el producto final más abundante, en cambio, el piruvato se produce en menor cantidad. El succinato puede ser metabolizado en helmintos para dar propionato y ácidos grasos volátiles (α -metil valerato, α -metilbutirato, valérico, caproico) o propanol, pero el piruvato puede ser convertido en alanina, acetato, formato, acetona, etanol o en ácidos grasos volátiles.

Los sistemas de fermentación mixtos tienen varias ventajas, en primer lugar, tanto la decarboxilación de succinato a propionato como la de piruvato a acetato son dos reacciones productoras de energía y sus productos de decarboxilación están acoplados a la producción de ATP. Esto incrementa enormemente la relación de moles de ATP producidos por mol de glucosa. Muchas de estas conversiones utilizan o generan equivalentes reductores (producción de alcoholes, lactato, acetato, etc.) dando al parásito cierta flexibilidad en sus acoplamientos redox.

Si bien el catabolismo hidrocarbonado se produce en general en anaerobiosis, algunos operan como anaerobios aún a altas tensiones de O_2 mientras que otros consumen cantidades apreciables. Esto produce cambios en los productos finales de dicho metabolismo. Lo que frecuentemente ocurre y es de esperarse, es que, en presencia de oxígeno, la producción de ácidos orgánicos, que requiere sustratos reductores como succinato, lactato y ácidos grasos volátiles disminuya y en cambio, la producción de acetato no esté afectada o aún que aumente.

Metabolismo respiratorio

Bajo condiciones anaeróbicas la Moniezia expansa produce un 50% más de lactato que en condiciones aeróbicas mientras que el succinato se mantiene sin cambios. Este parásito es capaz de mantener un metabolismo energético eficiente en ambas condiciones. Por ejemplo, la incorporación de oxígeno en Ascaris o Fasciola muestra una serie de características peculiares. En Ascaris por ejemplo la velocidad de oxidación dependería de sus oxidasas terminales más que de las limitaciones de la difusión de oxígeno. Cheach en una serie de trabajos observó que gran cantidad de parásitos intestinales tienen un sistema citocromo funcionando. Pero estas cadenas difieren de las clásicas de mamíferos en que tienen oxidasas terminales múltiples.

En Fasciola y Moniezia la cadena de citocromos tiene dos ramas, una similar a la de mamífero con el citocromo a_3 como oxidasa terminal y la otra rama con su oxidasa, el citocromo o . En Ascaris además aparece una tercera rama que es el citocromo a_1 . Es probable que haya otro tipo de citocromo, el b asociado al camino clásico. En todos estos parásitos el citocromo o aparece como una vía significativa.

La fosforilación oxidativa ha sido demostrada tanto en cestodes como en trematodes y las cadenas similares a las de mamíferos son capaces de producir una fosforilación oxidativa y poseen sitios clásicos de acoplamiento. Pero no hay aún evidencia de que ocurra en el citocromo o . Este camino alternativo no está asociado a la fosforilación oxidativa y por lo tanto tampoco lo está al control respiratorio. Una posibilidad de acción ^{del} mismo podría ser la producción de calor o estaría asociado a la producción de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 . (17).

En los parásitos como Ascaris, Fasciola o Moniezia, que fijan CO_2 sus sistemas de transporte electrónico están involucrados en la reducción de fumarato a succinato. En general los helmintos parásitos son capaces de producir una fosforilación oxidativa pero su contribución al balance energético total todavía no fue debidamente evaluado. Lo que sí se sabe es que aún en condiciones aeróbicas se producen atabolitos reducidos como productos finales. Es obvio que dicha fosforilación no puede producir la energía suficiente para los requerimientos del parásito. Este no puede ser capaz de reducir el flujo metabólico a través del camino glucolítico durante los períodos de aerobiosis o podría ser que existiese un "efecto Crabtree". (17).

En algunos parásitos el oxígeno es necesario para su motilidad, en otros no. En aquellos en los que se requiere O_2 para el movimiento, éste suministraría la energía adicional ya sea para una actividad muscular aumentada o para su coordinación nerviosa.

En resumen, se puede decir que los procesos oxidativos para el balance energético difieren, ya no solo respecto de los mamíferos sino claramente entre distintos parásitos y pueden ser diferentes de uno a otro.

Biocquímica del Echinococcus granulosus

Hasta la década del cuarenta, la única información existente acerca de la bioquímica del Echinococcus granulosus en su estadio larval se refería a la composición química del líquido hidatídico. Flossner (1924 y 1925) (19,20) demostró la presencia de ácido acético, propiónico, valérico, succínico y ácidos grasos en el líquido hidatídico. Luego Codonnis y Polidorés (21) identificaron urea, ácido úrico, creatinina y betaina en el mismo. Por otro lado Coutelén (1931) describió la presencia de glucógeno y grasas en la membrana germinal del quiste y Camëlik (1952) (22) demuestra su bajo contenido lipídico en base, fundamentalmente a colesterol. Pero en general no se avanzó más en el conocimiento del parásito hasta los trabajos de Agosin.

Vías metabólicas

Los protoescólices de Echinococcus granulosus almacenan grandes cantidades de glucógeno, sustancia que sería su principal fuente energética (23). Por otra parte es interesante la observación de Agosin y col (23) de que los protoescólices parecieran no utilizar glucosa exógena.

Tanto en aerobiosis como en anaerobiosis el consumo de glucógeno es grande (24), y no se modifica significativamente entre ambos estados, pero los productos del catabolismo hidrocarbonado son diferentes.

El ácido pirúvico sólo se excreta en condiciones aeróbicas, y el ácido succínico en ambas (siendo este último un catabolito anaeróbico fundamentalmente). En presencia de oxígeno se excretan ácidos láctico, succínico, acético y pirúvico además de alcohol etílico en menor proporción. De todos estos, el primero es, cuantitativamente, el más importante. Por otra parte, en anaerobiosis no se excreta ácido pirúvico ni cetoácidos y los productos más importantes son los ácidos láctico y succínico.

Del carbono metabolizado a partir del glucógeno sólo se recupera el 70% en catabolitos producidos en aerobiosis, en cambio en anaerobiosis el 91%, por lo que su metabolismo intermedio se vale en general de ambas fermentaciones

El producto metabólico más importante en los protoescólices es el ácido láctico. Las reacciones que conducen a su formación son en general similares a las descriptas para

tejidos mamíferos, pero existen diferencias importantes. Una de estas son las diferencias observadas en las hexoquinasas. Agosin determinó las mismas por varios métodos encontrando, tanto en homogeneizados acuosos como en extractos cetónicos (menos activos) la fosforilación de glucosa, manosa, fructosa, y glucosamina pero no de deoxiglucosa. Se encontró diferencias con hexoquinasas de levadura, cerebro, etc. (24)(25). Las características cinéticas también las hacen diferir no sólo de las hexoquinasas de vertebrados si no de las de otros parásitos. De los dos grupos más generales en que se podrían clasificar las hexoquinasas, aquellas que pueden catalizar inespecíficamente la fosforilación de varias hexosas (v.g. levadura o cerebro) y las que catalizan una sola específicamente (v.g. fructoquinasa de hígado y de Schistosoma mansoni) las de los protoescólices de Echinococcus granulosus entrarían en el segundo. Aún así hay diferencias con las de Schistosoma mansoni por que los protoescólices son incapaces de fosforilar la 2-deoxiglucosa. Dentro de sus características peculiares, extractos libres de células de éstos, son capaces de desaminar la glucosamina-6-P a glucosa-6-P. Estos extractos pueden además convertir la Fructosa-1-P en Fructosa-6-P lo que sugiere la presencia de una aldolasa Fructosa-1-P. Agosin y col (26) pudieron además demostrar la presencia de glucosa-6-P y 6-P-glucodeshidrogenasa, ambas dependientes de TPN. Se observó la presencia de ribulosa-5-P. En otras condiciones también se obtuvo sedoheptulosa; ambos intermediarios del ciclo de las pentosas. Otro hallazgo fue el de triosa a partir de ribulosa-5-P y el extracto cetónico, siendo ésta, una mezcla de gliceraldehido-P y dihidroxicetona-P.

Se ha podido comprobar que la fosforilación oxidativa está presente en los mecanismos de producción de ácido láctico a partir del gliceraldehido-P o de la fructosa-6-P.

Este parásito es capaz de fijar CO_2 y se han descripto cuatro vías diferentes para fijarlo. El metabolito reactante sería tanto el PEP como el piruvato. Es así que a partir de PEP, por acción de la PEP carboxiquinasa o la PEP carboxilasa se formaría oxalacetato; a partir del piruvato, por acción de la piruvato carboxilasa se formaría oxalacetato también; finalmente por efecto de la enzima málica se carboxila y reduce el piruvato originando malato como producto. Para la formación de succinato, Agosin y Repeto (25) demostraron que la fijación del CO_2 se haría a partir de esta última enzima que, por otra parte, tendría diferencias con la de Hymenolepis.

Se han observado además diferencias entre las distintas especies de Echinococcus, multilocularis y granulosus, y de este último se han descrito también cambios en las variedades obtenidas de distintos huéspedes, equino ovino Mc. Manus y Smyth, 1978 (27).

Por ejemplo, la variedad equina tiene más lípidos y polisacáridos y menos contenido de proteínas que la ovina. El E. multilocularis tiene mayor cantidad de lípidos y proteínas pero menor contenido de polisacáridos que en E. granulosus "equino" siendo su contenido de proteínas similar. Los estudios metabólicos indican que ninguno de los tres utilizan la glucosa exógena pero consumen grandes cantidades de glucógeno. Se observó además que el E. granulosus "equino" tendría una marcada dependencia en su metabolismo de los hidratos de carbono respecto de los demás. Se observó por ejemplo que la variedad ovina de E. granulosus consumía mayor cantidad de oxígeno respecto de las demás, y sus productos metabólicos eliminados son diferentes, produciendo más acetato y menos lactato. De forma similar, el E. multilocularis secreta más acetato y menos lactato que la variedad equina de E. granulosus. Ambas variedades de E. granulosus producen en aerobiosis cantidades similares de succinato siendo mayor en el E. multilocularis.

Metabolismo respiratorio

La incorporación de oxígeno por los protoescólices de Echinococcus granulosus es grande con un Q_{O_2} calculado aún a tensiones de oxígeno menores que la atmosférica de cerca de 210 a 38°C en RK. La conservación de los mismos a 5°C durante 24 h no hace de crecer la velocidad de consumo de los mismos. El RQ total de los protoescólices fue de 0.88. (23) y la producción de CO_2 en RK sin CO_3H^- a 38°C fue mayor, dando un Q_{CO_2} de 1.65. La composición iónica del medio tiene influencia importante en el consumo de oxígeno de los mismos. La mayor velocidad se obtiene en líquido hidatídico pero es sólo ligeramente mayor a la encontrada en RK. No hay diferencias apreciables en las velocidades de consumo de oxígeno en RK a distintos pH, entre 4.5 y 3.5 (23). Los inhibidores de los grupos sulfhidrilos, como el iodoacetato, la iodoacetamida o el p-cloromercuribenzoato son altamente efectivos, especialmente en condiciones anaeróbicas (su giriendo un activo proceso glucolítico). El malonato (que inhibe fundamentalmente el sistema succinoxidasa) fue completamente inefectivo, mientras que el fluoroacetato

(que interfiere con el metabolismo del citrato) inhibió un 42% (28). El consumo de oxígeno es sólo parcialmente inhibido por el cianuro de potasio ya que Agosin y col. obtuvieron un 47% de inhibición con una concentración de 0.5mM que es completamente efectiva en otros sistemas respiratorios (28).

Los últimos estudios indican que la cadena respiratoria y el transporte electrónico en otros helmintos parásitos está ramificada y poseería otra oxidasa terminal (10) aparte de la vía clásica inhibible por cianuro que se la encuentra en los mamíferos. La vía alternativa insensible al cianuro es inhibible por otras drogas como el O-hidroxifenilo (28) o el ácido salicilhidroxámico (28) SHAM.

El empleo de cianuro, ácido salicilhidroxámico y dinitrofenol permitió subdividir el consumo total de oxígeno de los protoescólices de Echinococcus granulosus en tres fracciones (29): una cianuro sensible, otra sensible a SHAM y una tercera residual insensible a estas drogas. En presencia del DNP se notó un incremento significativo del consumo total del 51%. Toda la estimulación producida con el primero es inhibible con cianuro, pero el DNP no ejercería ninguna acción sobre las fracciones cianuro insensibles. De esto se puede inferir que una fracción importante del consumo de oxígeno tiene propiedades similares a la vía oxidativa que se encuentra en sistemas más evolucionados como en los mamíferos y que es posible de desacoplar con DNP.

Una fracción menor, pero significativa del consumo total de oxígeno (aproximadamente 20% del consumo en controles) correspondería a una vía no acoplada a la fosforilación y cuya oxidasa terminal no se inhibe con CNK como la clásica. Esta vía alternativa en muchas especies de parásitos está asociada a una oxidasa terminal del tipo de citocromo o. Bryant (1970) (30) informó la presencia de una banda de absorción en 557 um en protoescólices de Echinococcus granulosus que sugeriría la presencia de este citocromo en el parásito. Si bien ésta no estaría asociada a la respiración del mismo, la relación posiblemente, como en otros modelos biológicos, estaría con la producción de calor o de energía subsidiaria para su motilidad o coordinación nerviosa (10).

Composición química. Contenido de agua y electrolitos

El porcentaje de materia seca de los protoescólices de Echinococcus granulosus "variedad ovina" fue informado por Agosin y col. en aproximadamente un 15 a 16% (menor que

en otros escólices) lo que sería debido al menor contenido de sustancias inorgánicas. Alrededor del 14% de ese contenido son lípidos y el aproximadamente 63% de proteínas, valor que es superior al de otros parásitos (23).

Hay un gran contenido de polisacáridos que oscila en el 20% de la materia seca. Esto es debido a que, en general almacenan grandes cantidades de glucógeno. Las muestras de polisacáridos separadas por electroforesis en papel discriminó dos bandas, una de las cuales es glucógeno y la otra sería un polisacárido que contendría galactosa y glucosamina. En cuanto al contenido de agua e iónico, Reisin y Rotunno (1980) encontraron que los protoescólices de E. granulosus recién recolectados tienen un menor contenido de potasio y más alto contenido de sodio. Pero luego de preincubarlos 3h a 37°C alcanzan valores que mantienen un estado estacionario por lo menos por otras 3 horas. Los valores de dichos contenidos (Reisin y Rotunno, 1979) para sodio, potasio y cloruro son de 123; 209 y 78 $\mu\text{moles/gps}$ respectivamente. El contenido de agua de los tacos de centrifugación (Ver materiales y métodos) fue de 2.370 ml/g peso seco que representa el 70.3% del peso húmedo del taco. Parte de éste, el 17.8% corresponde al espacio atrapado entre los mismos, por lo tanto el contenido de agua del protoescolex es del 63.9% de su peso húmedo. Estos valores son mucho menores que los obtenidos por Agosin y col. (1957) (23). El porcentaje de materia seca sería del 4.8% con un contenido de agua, por lo tanto, del 85.2%. La diferencia estaría, sin duda, en los sistemas de recolección de muestras (23).

El protoescolex tiene alto contenido en potasio y bajo de sodio, el de cloruro, el anión fundamental, está presente en cantidades mucho menores. A fin de dar una idea de la distribución de los mismos, Reisin y Rotunno calcularon las concentraciones de iones como si estos estuviesen distribuidos en un sólo compartimiento. Los valores obtenidos son 118 mM, 73 mM y 44 mM para el potasio, sodio y cloruro respectivamente. Estas cifras ya señalan la concentración mínima para cada uno de los mismos en por lo menos, uno de los compartimientos. La concentración de potasio sería aproximadamente 23.5 veces mayor, y la del sodio sería la mitad del medio RK. Relaciones similares se obtienen normalmente en todos los compartimientos intracelulares.

Las cantidades de sodio y cloruro perdidas por los protoescólices incubados en sacarosa

0.3M está alrededor de 15 a 20 $\mu\text{moles/gps}$ en los primeros minutos, lo que se explicaría únicamente por la presencia de más de un compartimiento dentro de los mismos. Realmente el protoescolex es una estructura anatómica muy compleja, pero, habría por lo menos dos compartimientos: uno intra y otro extracelular (Morseth, 1967). (12).

PROPIEDADES DE MEMBRANAS DE CESTODES

Generalidades

En general las parasitosis se definen frecuentemente en términos nutricionales, y como en todos los sistemas biológicos los mecanismos por los que el organismo incorpora sus nutrientes es de importancia fundamental para su evolución y propagación, los problemas relacionados con las diferentes características del transporte de sustancias a través de membranas biológicas (v.g. el tegumento de los cestodes) son de gran importancia para comprender la fisiología y eventualmente la farmacología de los mismos.

Se ha podido caracterizar, por ejemplo, un proceso de transporte facilitado para los aminoácidos L-valina L-leucina en Calliobothrium verticillatum (31). Las evidencias establecidas por Read y col. son: I) la existencia de una relación no lineal de velocidad de entrada en función de la concentración externa del sustrato, II) inhibición competitiva (específica) entre varios aminoácidos además de que una serie de inhibidores disminuye la velocidad de entrada de estos y III) la permeabilidad a la L-leucina varía con el pH. Todo esto sugiere la existencia de un proceso de difusión facilitada.

En algunos casos este mecanismo puede describirse con una cinética de Michaelis-Menten (1913) (32), expresada por una ecuación del tipo

$$V = V_{m} \frac{1}{\frac{K_m}{S} + 1}$$

donde V es la velocidad de transporte; S es la concentración del sustrato transportado en el medio externo, V_m la velocidad máxima de transporte y K_m la constante de Michaelis. Esta ecuación que describe una cinética saturable, involucra la presencia de un complejo químico llamado "transportador" o "carrier" (33) cuya concentración determina el proceso, por lo tanto se impone un límite máximo de sitios. Cuando la concentración externa del sustrato se incrementa la velocidad de transporte alcanza su máximo valor (atribuible a la saturación de los sitios por el sustrato).

Esta ecuación debe verificar una relación lineal cuando se grafica de acuerdo a Lineweaver-Burk . (34)

La revisión de Pappas y Read, 1975, (33) provee varios ejemplos en distintos cestodes y nematodos.

En general, si bien es sumamente útil caracterizar en estos términos un sistema de transporte se deben comprobar varios fenómenos. Para el caso específico del transporte activo es fundamental asociarlo directamente al gasto energético que lo posibilite y a la real acumulación del sustrato en contra de su gradiente electroquímico (30) ambos fenómenos son experimentalmente bastante difíciles de establecer. El problema particular que nos atañe está relacionado con la caracterización de los fenómenos del transporte de agua y electrolitos en el Echinococcus granulosus. Los datos histoquímicos y microfotográficos fueron los primeros en aportar conocimientos sobre el tema. Se observó que policationes (coloides catiónicos) como la poli-lisina L se adosaban al tegumento de Hymenolepis diminuta bloqueando su efecto catiónico (37) y que por otra parte, la ferritina (coloide aniónico) no era absorbido en cantidades significativas a pH mayores de 5. Esto permitió postular que el aspecto superficial del plasmolema del parásito es fundamentalmente electronegativo (37). Esta distribución particular de cargas se debería a los grupos carboxílicos asociados al glicocalix de su tegumento externo.

En Hymenolepis diminuta no se observa gránulos mitocondriales en ninguna de sus células pero se los ha encontrado en varios parásitos (30). En general, estos gránulos están presente en células con gran actividad absorptoria, excretoria o secretora (v.g. intestino, riñón, glándulas endócrinas, hígado). Los gránulos son fosfatos de calcio y magnesio y según Lehninger (39) la acumulación del primero en particular involucraría dos pasos. Primero se adosaría a las membranas en ausencia de aniones permeantes (acetatos o fosfatos) y aparecería en la matriz mitocondrial cuando están presentes. Pero si bien no existen estos gránulos, sus mitocondrias tienen capacidad de acumular tanto aniones como cationes del medio. Estas mitocondrias (similares a las de los vertebrados) acumulan Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} además de acetato y fosfato.

Los aniones sulfato y ferrocianuro son acumulados también por estas mitocondrias y se los podría considerar como permeables reemplazando al fosfato en el proceso de acumulación de cationes.

Tanto el Ba^{2+} como el Pb^{2+} se adosan al glicocalix de las microvellosidades a pH neutro, pero se encuentran además en él, sitios catiónicos, dado que iones como el ferrocianuro también se adosan. Se pudo confirmar entonces que el glicocalix, rico en hidratos de carbono tiene una cobertura polianiónica. Además se sabe que ciertos aminoácidos de proteínas de cadenas laterales como de fosfolípidos de membranas tienen una alta afinidad por los iones inorgánicos.

Todos estos primeros datos aportaron conocimientos preliminares importantes sobre las características de afinidad de cargas en membranas de cestodes pero, únicamente los conocimientos sobre permeabilidad de las mismas son básicos y fundamentales para entender su fisiología.

La permeabilidad de las membranas biológicas y sus características de transporte dependen de muchos factores relacionados con el soluto y con la membrana. Por parte del soluto, tales como la concentración del mismo a ambos lados de la barrera, el tamaño de la molécula, su coeficiente de partición o su polaridad. En cuanto a las características de la membrana, intervienen su composición química y su estructura.

Quiste hidatídico

El caso especial del quiste hidatídico primario experimental de ratón (40) y secundario en distintos huéspedes (41) ha servido como modelo para caracterizar algunas peculiaridades de sus sistemas de transporte que posibilitaron conocer un poco más sobre su metabolismo. Los primeros trabajos de Schwabe (42,43) permitieron conocer de manera indirecta algunos datos sobre permeabilidad al agua y permeabilidad selectiva al potasio y a la urea.

Según ese autor, la membrana germinal sería la responsable del control de permeabilidad y la osmorregulación, y el papel de la membrana laminar como estructura inerte sería del crecimiento del quiste.

Concretamente, los estudios de permeabilidad al agua y electrolitos de las paredes

del quiste hidatídico pueden obtenerse a partir de la caracterización de sus barreras y los mecanismos de movimiento dentro del mismo. Los datos que aportan ayudan a elucidar las relaciones entre su estructura y su función obteniendo conocimientos específicos del movimiento y distribución o, como en el caso de drogas, las características de su transporte o su concentración efectiva. Para ello Rotunno y colaboral, desarrollaron una técnica específica a tal estudio (44) que les permitió medir los flujos de agua y electrolitos en quistes secundarios de Echinococcus granulosus de infecciones experimentales de ratón.

El análisis compartamental empleado es de tres compartimientos: la cavidad del quiste, su pared y el medio de incubación. A partir del análisis cinético, estos autores calcularon los influjos de agua, Cl^- y Na^+ . Así obtuvieron un valor de $1.8 \times 10^{-4} \text{ cm/seg}$ para la permeabilidad del THO.

Utilizando básicamente la misma metodología se caracterizó la entrada de sodio (como Na^2) a los quistes, comprobándose la existencia de dos compartimientos, uno pequeño y rápido y otro mucho más lento y grande en el que la entrada se hace lineal en función del tiempo. El valor del influjo fue de

Se utilizó Cl^{36} para un procedimiento idéntico que permitió calcular el influjo del mismo cuyo valor es de 0.035 ± 0.04 (8) umol/incm^2 .

A partir de estos estudios, se pudo comprobar entonces, la alta permeabilidad difusional al agua y la relativamente baja permeabilidad al Na^+ y al Cl^- lo que concuerda con los primeros datos de Schwabe.

Lo fundamental es que se pudo utilizar esta metodología para el estudio, no sólo de hormonas (el mismo trabajo de Rotunno y col) sino que posteriormente Reisin y col estudiaron la permeabilidad a la única droga hasta el momento, presuntamente efectiva en el tratamiento quimioterápico de la hidatidosis humana, el mebendazol (45). En dicho trabajo se midieron en primer término flujos osmóticos en quistes experimentales secundarios de rata y luego la permeabilidad al mebendazol C^{14} .

Se pudieron obtener las constantes que relacionan el movimiento de la droga en función de su concentración externa. La utilidad de los datos y por ende la metodología seguida se resumen en que se pudo saber que la droga seguiría la Ley de Fick o sea una cinética

de difusión simple, que no se observó ningún "binding" de la misma dentro del quiste y ningún tipo de transporte activo para su entrada. Además que la permeabilidad al me bendazol es sólo un poco menor a la del agua para quistes hidatídicos secundarios, 1.33×10^{-4} cm/seg (Reisin y col. 45) respecto de 1.88×10^{-4} cm/seg, Rotunno y col 44) y mucho mayor que al sodio o al cloruro por lo que se pudo elucidar entonces que las paredes del quiste hidatídico no serían el factor limitante para la acción de la droga in vivo.

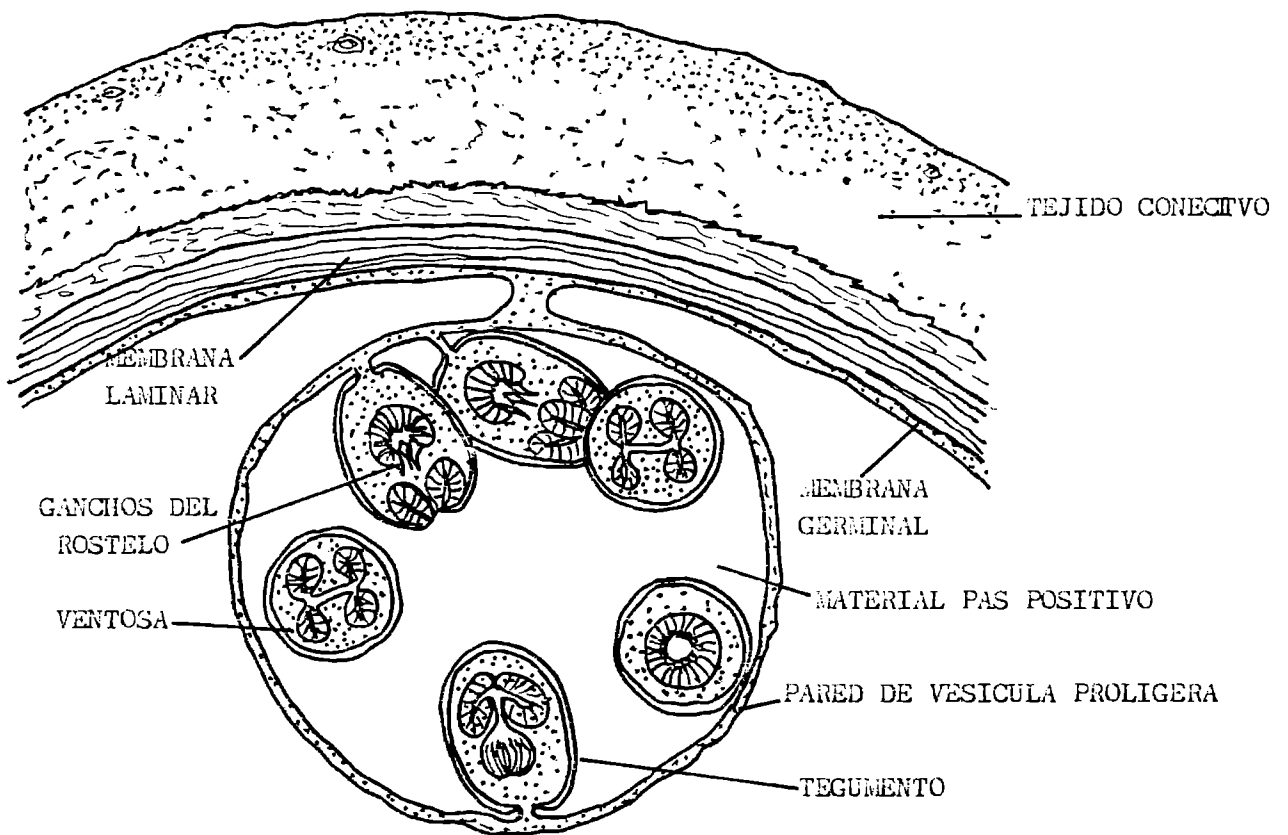


FIGURA 1. Relación entre las distintas estructuras que se observan en un quiste hidatídico. Vista en corte. Redibujado del trabajo de Morseth (11)(12).

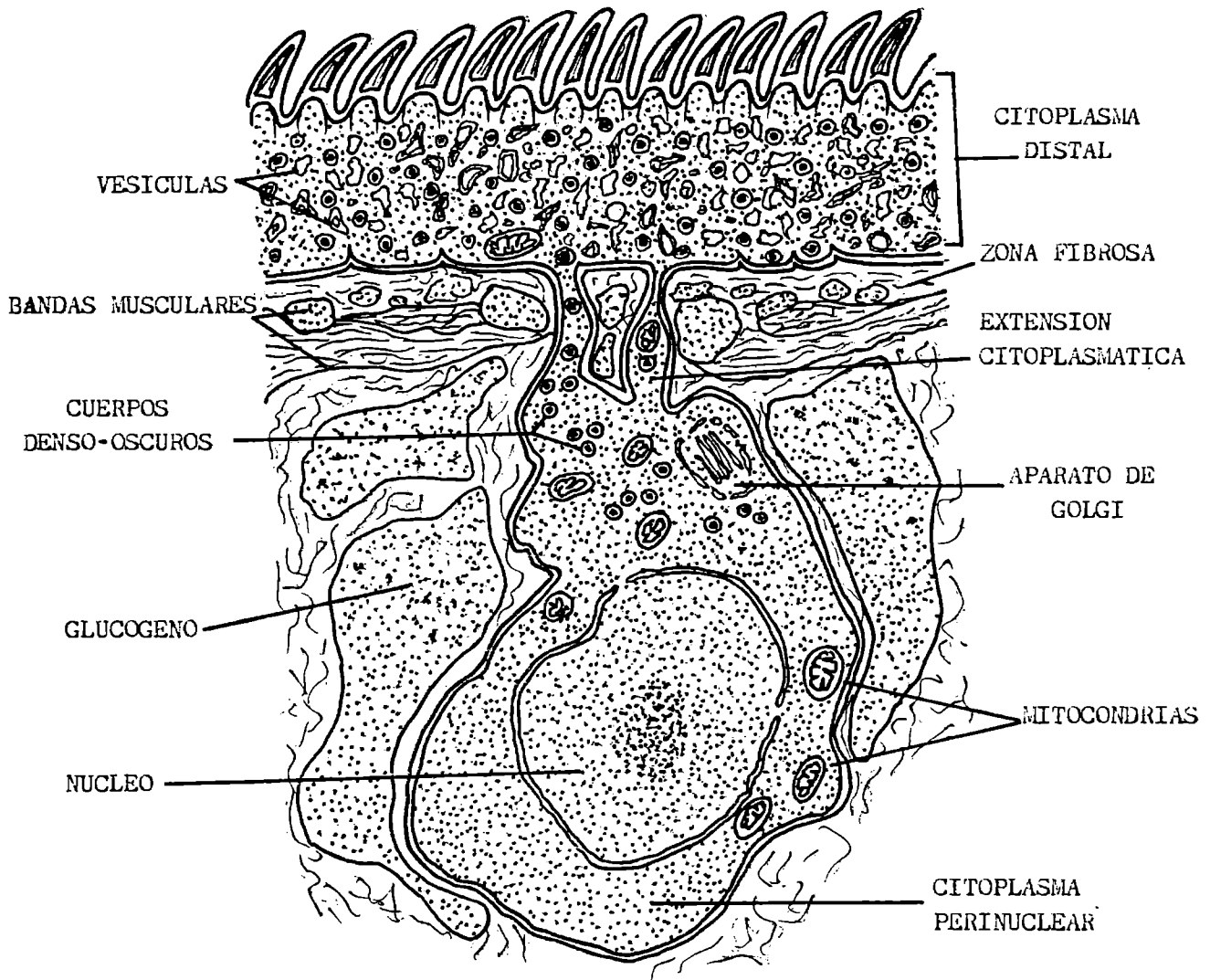


FIGURA 2. Vista en corte del ordenamiento celular del tegumento del protoescolax de Echinococcus granulosus. Similar al de la tenia adulta. Redibujado del trabajo de Morseth (11)(12).

P A R T E I I

MATERIALES Y METODOS

Protoescólices

Los protoescólices de Echinococcus granulosus (variedad ovina, Smyth y Davis, 1974) (46) fueron obtenidos de quistes hidatídicos de hígados y pulmones de ovejas infectadas. Las vísceras recién obtenidas del matadero se transportaron rápidamente al laboratorio donde se procedió a separar los protoescólices. El fluido hidatídico se aspiró de los quistes por medio de una aguja conectada a un sistema de succión que lo colectó en frascos de 500 ml. Una vez decantada la suspensión, se descartó el fluido hidatídico y los protoescólices sedimentados se resuspendieron en solución Ringer Krebs (RK). La suspensión se filtró a través de dos trozos de gasas a fin de retener las membranas de los quistes y otros restos de tejido. Una vez filtrada, la suspensión se dejó reposar a fin de que sedimentasen los protoescólices. Luego se descartó el sobrenadante resuspendiendo los protoescólices en solución RK fresca. Este proceso se repitió dos veces a fin de lavar adecuadamente los protoescólices. Finalmente fueron transferidos a un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad que se dejó en reposo a fin de permitir la sedimentación espontánea de los protoescólices. Alcanzada esta condición se midió el volumen de la masa total de protoescólices obtenido. Habitualmente se colectó entre 3 y 10 ml de protoescólices sedimentados que se suspendieron en solución RK o "minimun essential medium" (MEM) en concentraciones de 1% v/v.

Soluciones

La composición de la solución RK en mM es: ClNa, 121; CO₃HNa, 22.5; ClK, 5; PO₄H₂Na, 1.2; Cl₂Mg, 1.2; Cl₂Ca, 2.5 y glucosa 5.6. La solución "minimun essential medium" (MEM) (Earle) se preparó a partir de la preparación comercial de GIBCO (N 400-1100) como se indica: 800 ml agua destilada; 2.2 g CO₃NaH; 10.2g, MEM , 20 ml, H.E.P.E.S. a pH 7.2 con HCl. Las concentraciones de Na y K de este medio de cultivo medidas por fotometría de llama son de 153 y 5.3 mM respectivamente, en tanto que la de Cl⁻ es 125 mM. Todas las soluciones con pH final 7.2 a 7.4. Las soluciones se burbujearon habitualmente con carbógeno (O₂ 95% CO₂ 5%). En algunas experiencias la solución RK se burbujeeó con N₂ 95%, CO₂ 5%. Ambas soluciones contenían penicilina 1500 UI/ml y estreptomycinina 50 ug/ml.

La solución de centelleo líquido se preparó según el método de Bray (1960) (47); Naftaleno, 60g; PPO, 4g; POPOP, 200 mg; metanol 100 ml; etilenglicol 20 ml; dioxano hasta 1 litro.

Drogas y Reactivos

Todas las drogas y reactivos usados fueron de calidad proanálisis. Los inhibidores se usaron en las siguientes concentraciones: Iodoacetato, 3mM (BDH Labs), ouabafina 0.1 mM (K&K Labs) ácido etacrínico, 0,5 o 2,0 mM (Merk), ácido salicilhidroxámico, 2.5 mM (Aldrich, USA), cianuro de potasio 3mM (Fisher Sci), 2-4-dinitrofenol 1.5 mM (Fisher Sci).

Los reactivos radiactivos como Metoxiinulina H^3 , metoxiinulina C^{14} provinieron de New England Nuclear (EUA).

Procesamiento de las muestras

Se siguió el procedimiento desarrollado por Reisin, Cantiello y Rotunno (1977)(48) y Reisin y Rotunno (1980)(49). Muestras de 5 ml de la suspensión de protoescólices se transfirieron a tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 40xg por 1 minuto a los distintos tiempos de incubación. Finalizado el mismo, la suspensión fue rápidamente transferida a una jeringa de plástico de 5 ml de capacidad en cuyo pico se conectó un pequeño tubo de polietileno de 3 cm de longitud. El extremo libre de este tubo se hallaba sellado, de manera que permitió coleccionar los protoescólices en la porción inferior de los tubos de polietileno una vez centrifugados. Los protoescólices se centrifugaron a 1500 xg durante 2 minutos. Luego de tomarse alicuotas de los sobrenadantes para determinar la concentración de inulina- 3H , o K^{42} se separó el pequeño tubo de polietileno y se cortó de manera de aislar sólo la porción que contenía el taco de protoescólices. Este se expulsó del interior del tubo mediante un ajustado mandril y se depositó sobre una pequeña plancheta de teflón previamente pesada. La muestra fue inmediatamente pesada en una ultramicrobalanza Mettler N5 SA (precisión 2 ug), se secó a $98^{\circ}C$ en una estufa seca hasta alcanzar peso constante y fue nuevamente pesada. El contenido de agua del taco se calculó por la diferencia entre ambos pesos. Cada disco de teflón con el taco de protoescólices se introdujo en un tubo de poliestireno al que se agregó 2 ml de NO_3H 0.1.N. Luego de 48 horas de extracción, se determinaron

por fotometría de llama las concentraciones de Na y K (fotómetro de llama EEL) de alícuotas del extracto. El cloruro (Cl^-) fue titulado mediante un titulador Aminco Cortlove. El agua de los protoescólices se calculó sustrayendo del agua total el espacio de inulina- ^3H . (Ver FIGURA 3).

Determinación del espacio atrapado entre los protoescólices

Las cantidades de agua y electrolitos se determinaron siempre de los tacos de centrifugación de los protoescólices. Por lo tanto, estas incluyen tanto el agua como los electrolitos del medio de incubación atrapado en él. Por consiguiente la medición precisa del contenido de agua en los protoescólices requiere la adecuada estimación del espacio atrapado entre los protoescólices del taco de centrifugación. Se utilizaron dos procedimientos diferentes, descritos previamente por Reisin y Rotunno (1980): a) el lavado de los electrolitos atrapados en dicho espacio con sacarosa 0.3 M a 4°C , o b) medición del espacio de inulina H^3 .

Procedimiento a: muestras de 5 ml de la suspensión se recolectaron periódicamente en tubos de centrifuga de 50 ml y centrifugados a 40 xg durante 1 minuto. Los protoescólices fueron resuspendidos en 5 ml de sacarosa 0.3 M a 4°C durante 3 minutos. Durante todo este período los protoescólices y la solución de sacarosa fueron energicamente mezclados con una pipeta. Una vez finalizado este período la suspensión fue rápidamente transferida a las jeringas previamente preparadas con los tubos de polietileno como se describió en Procesamiento de muestras.

Procedimiento b: éste se basó en la determinación del espacio atrapado con inulina H^3 . Esta se la agregó en cantidades trazadoras al medio de incubación de los protoescólices a distintos tiempos de incubación o en algunos casos cuando estaban suspendidos en la solución de sacarosa 0.3 M. Reisin y col (49) demostraron que el espacio atrapado y el contenido de agua son similares para los tacos de centrifugación de protoescólices suspendidos en cualesquiera de las soluciones mencionadas. En todos los casos se agregó al medio 0.5 uCi de inulina H^3 la que se dejó por un período de 3 a 10 minutos. Luego se procesaron las muestras como se explicó en el apartado anterior. Alícuotas del sobrenadante (100 ul) y del extracto de protoescólices (100 ul) se introdujeron en viales a los que se agregó 10 ml de solución Bray para centelleo líquido

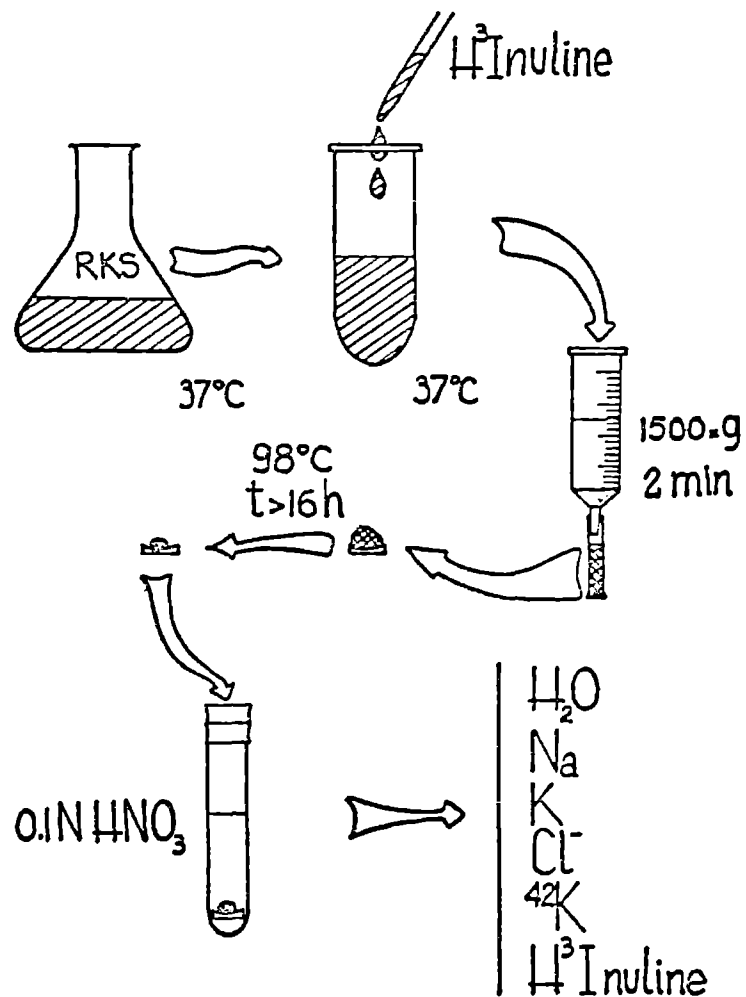


FIGURA 3

procesamiento de las muestras

do. La actividad de las muestras se midió en un contador de centelleo líquido ISOCAP 300 (SEARLE). El espacio atrapado de las muestras se calculó a partir de la relación

$$V_i = 2 \times \frac{CPM_i}{CPM_g} \quad \text{ml}$$

donde V_i representa el volumen de distribución de la inulina ^{125}I y CPM_i y CPM_g las cuentas por minuto de la alícuota del extracto y del baño respectivamente.

Incorporación de K^{42}

Los estudios de incorporación de K se realizaron agregando K^{42} como ClK^{42} a los medios de incubación RK en cantidades trazadoras.

La actividad del K^{42} se midió en un contador automático de centelleo (radiaciones γ) Nuclear Chicago, en condiciones de detección optimizadas para dicho trazador. Se realizaron las correcciones por el decaimiento natural de radioisótopo K^{42} (vida media 12.5 h) a partir de la relación

$$A_0 = A \quad e^{0.693t/T}$$

donde A_0 es la actividad total a tiempo 0, A es la actividad en el momento de la lectura, t es el tiempo de la lectura, T es el período de semidesintegración y e 0.693 es el $\ln 2$.

Depleción de potasio y enriquecimiento con sodio

Para producir la estimulación de los sistemas de transporte, para la medición de influjos o la obtención de cinéticas de incorporación de potasio se deplecionó a los protoescólices incubándolos durante unas 20 h en medios libres del mismo, RK 0 mM de potasio equilibrado con sodio a 4°C obteniendo protoescólices enriquecidos con sodio (y deplecionados de potasio).

Determinación del volumen individual de los protoescólices

El procedimiento utilizado se basa en que la forma de los protoescólices invaginados se pueden asimilar a la de un elipsoide de revolución sobre su eje o diámetro mayor lo que se observa en la FIGURA 4

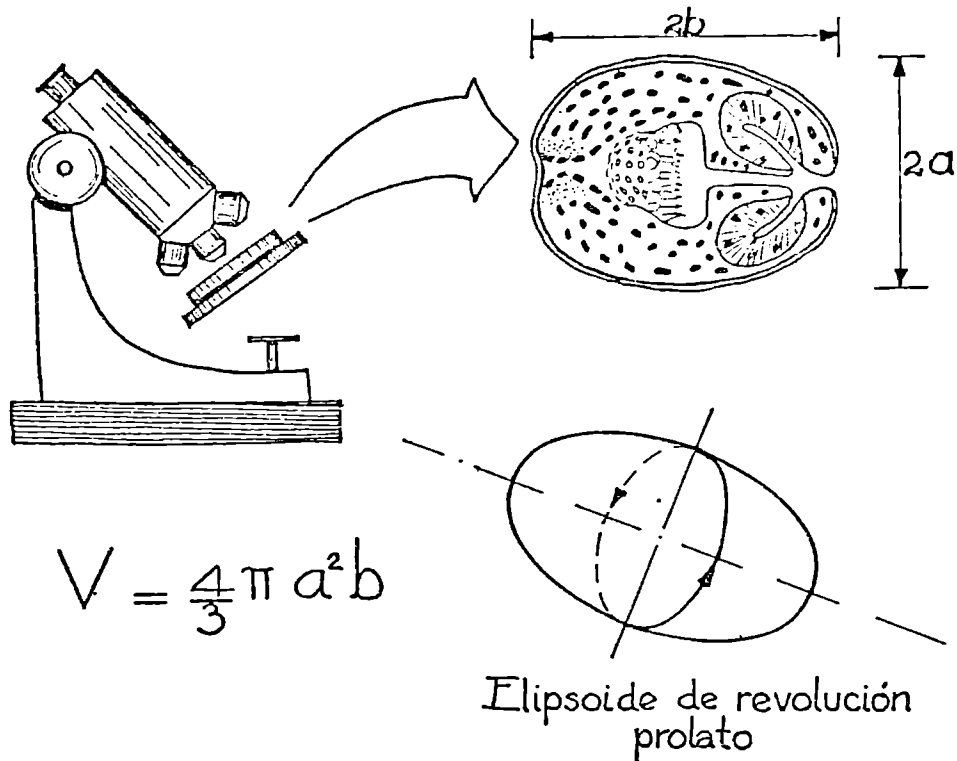


FIGURA 4

Cálculo del volumen del protoescolex invaginado a partir de asimilar el mismo a un elipsoide de revolución prolato.

De esta manera el volumen individual de los protoescólices se calculó a partir de la cuidadosa medición de los diámetros mayor y menor de éstos mediante la ayuda de un microscopio equipado con un micrométrico ocular previamente calibrado. Para un elipsoide de revolución prolato el volumen V_P está dado por la relación:

$$V_P = \frac{4}{3} \pi \cdot a^2 \cdot b$$

donde a representa al semieje menor, b el semieje mayor y π es 3, 141592. Para realizar estas mediciones, pequeños volúmenes de la suspensión de protoescólices se retiraron simultáneamente con las tomas de las muestras para la determinación del agua y electrolitos. Una pequeña gota de la suspensión se depositó sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Se tomó la precaución de separar éste último del portaobjetos mediante un reborde marcado por un lápiz de grasa a fin de evitar

que la presión de cubreobjetos deformase a los protoescólices. El microscopio (Erma, Japón) con una óptica objetivo 10 x y ocular 10 X, estaba provisto de una platina caliente (Lipuforn) regulada a 37°C. El micrométrico (100 divisiones) se calibró mediante un micrométrico objetivo de 1mm dividido en 100 unidades (Erma, Japón). Se determinó que cada división del micrométrico ocular equivalía a 7.0 um. Ubicado el portaobjetos con los protoescólices sobre la platina caliente se realizaron por lo menos 30 mediciones que insumieron unos 20 minutos. Cada medición se realizó haciendo coincidir una de las divisiones de micrométrico ocular con uno de los límites de un protoescolex a nivel de su mayor sección y luego contando el número de divisiones hasta el extremo opuesto. Inmediatamente se giró el ocular 90 grados y se volvió a repetir el procedimiento de manera que sucesivamente se determinaran ambos diámetros de cada protoescólex. A partir de los valores de los semiejes mayor y menor y mediante la ecuación se calculó el volumen de los mismos.

Estadística

Los datos se informan como media \pm un error estándar de la media (número de casos).

La media se calculó con la fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{N}$$

donde N es el N° de casos y x_i cada valor individual.

El error estándar se obtuvo de la ecuación:

$$E.S. = \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad \text{donde SD (desviación estándar) se calculó}$$

de

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - N (\sum x_i)^2}{N (N-1)}}$$

Las rectas de regresión y coeficientes de correlación lineal se calcularon con una calculadora Texas modelo SR 51-II. El grado de significancia "p" se obtuvo a partir del cálculo del valor "t" de Student y su respectiva probabilidad se halló en tablas de Student para los grados de libertad $n=N-2$ donde N es el número total de casos.

RESULTADOS

Cambios en el contenido de agua, Na, K y Cl⁻

La FIGURA 5 muestra la evolución del contenido de agua, Na, K y Cl⁻ en los tacos de agua, Na, K y Cl⁻ en los tacos de centrifugación de los protoescólices incubados en solución MEM por períodos de hasta 24 horas.

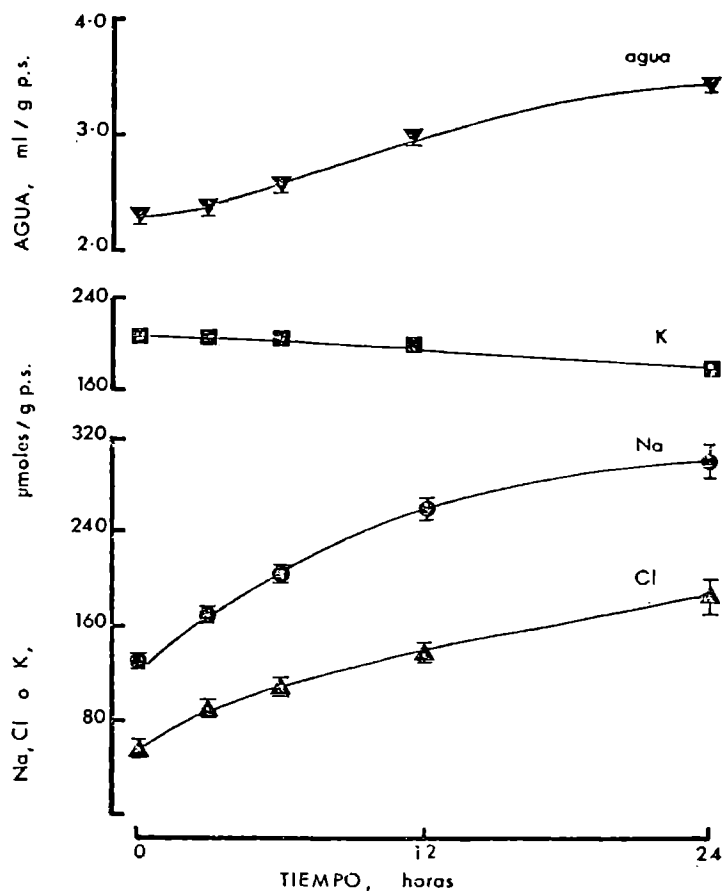


FIGURA 5

Cambios en los contenidos de agua, potasio, sodio y cloruro en protoescólices incubados.

Se puede observar que tanto el contenido de agua como los contenidos de Na y Cl⁻, sufren notables incrementos. En 24 horas el contenido de agua se eleva de 2.328 ± 0.057 (4) a 3.438 ± 0.022 (4) ml/g de peso seco, lo que representa un aumento de 1.110 ml/g de peso seco. Por otra parte, los contenidos de Na y Cl⁻ se incrementan de 129 ± 2 (4) y 55 ± 4 (4) a 300 ± 14 (4) y 164 ± 10 (4) μmoles/g de peso seco res

pectivamente, por lo que se puede calcular que en 24 horas de incubación el contenido de Na ascendió en 171 μ moles/g de peso seco en tanto que el Cl^- lo hizo en 129 μ moles/g de peso seco. En contraste con estos aumentos el contenido de K se mantiene relativamente estable ya que en igual período sólo disminuye en 32 μ moles/g de peso seco (de 208 ± 3 (4) a 176 ± 4 (4) μ moles/g de peso seco). Este fue en realidad el máximo cambio observado en el contenido de K, ya que en otras experiencias similares los cambios en el contenido de este ion fueron mucho menores como se puede apreciar en la TABLA I.

Experiencia	Tiempo de Incubación	K en	K
		protoescólices	cambio neto
	horas	μ moles/g p.s.	μ moles/g p.s.
H2	0	208 ± 3 (4)	
	24	176 ± 4 (4)	-32
H8	0,5	218 ± 3 (8)	
	24	214 ± 1 (8)	-4
H13	0	202 ± 4 (4)	
	24	207 ± 6 (4)	5
H14	1	230 ± 3 (4)	
	24	221 ± 1 (4)	-9

TABLA I. Contenidos de potasio en protoescólices incubados "in vitro". Valores iniciales y a las 24 horas de incubación.

Además las diferencias de K observadas entre los protoescólices incubados durante 24 horas respecto de aquellos retirados durante los períodos iniciales sólo son significativas en dos de las cuatro experiencias cuyos resultados figuran en esta TABLA (experiencias H₂: $0.001 > p$ y H₁₄: $0.02 > p > 0.01$).

A fin de establecer la relación existente entre los incrementos de agua, Na y Cl^- que tienen lugar en los protoescólices incubados hasta 24 horas se realizó la posible correlación entre los contenidos de Na y agua por una parte y entre los contenidos de Na y Cl^- por otra, lo que se puede observar en las próximas figuras, a la izquierda y derecha respectivamente.

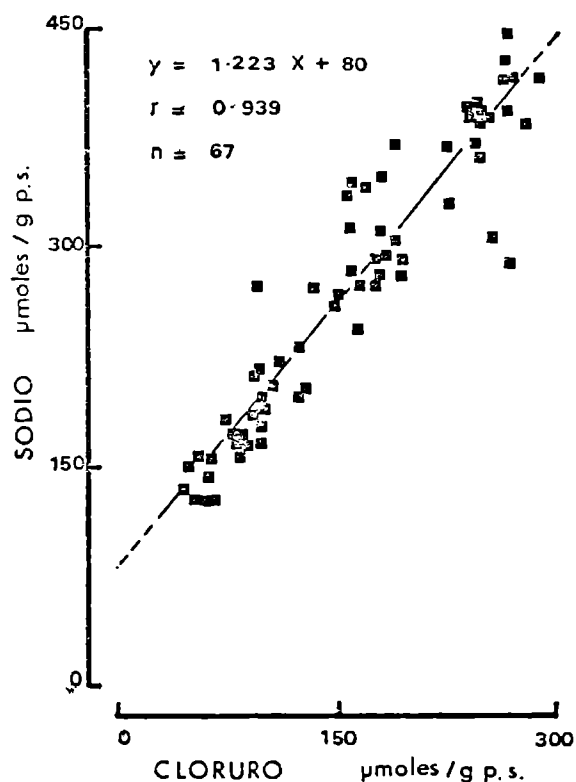
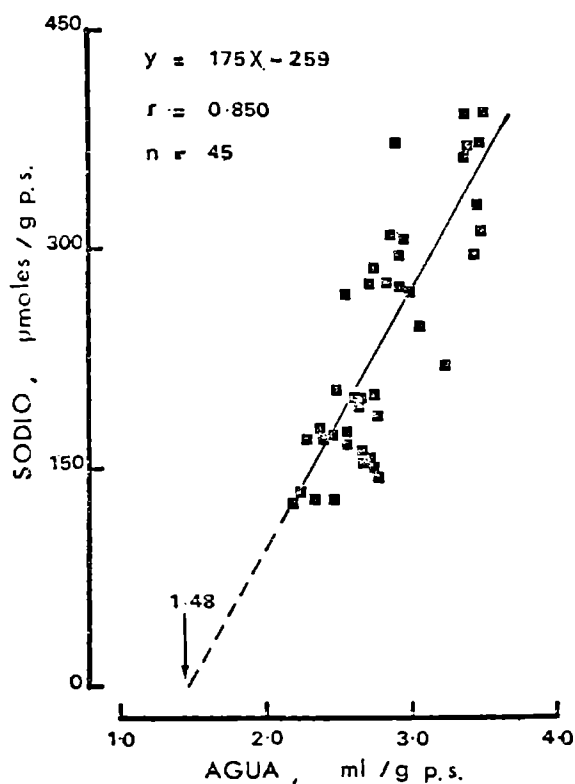


FIGURA 6. Relación entre los contenidos de sodio y agua, y sodio y cloruro en protoescólices.

Cada punto de los gráficos de esta FIGURA representa la relación entre el contenido de Na y agua (izquierda) o Na y Cl^- (derecha) de cada taco individual de protoescólices tomado entre 0 y 24 horas de distintas experiencias independientemente del tiempo o del medio de incubación y de la forma de medición del espacio atrapado.

Las rectas que se muestran en cada uno de los gráficos fueron calculadas por regresión. Se puede observar que la correlación entre el contenido de Na y agua es altamente significativa ya que para un coeficiente de correlación lineal de 85 y 43 grados de libertad la probabilidad p es menor de 0.01. Es interesante observar que a la pendiente de la recta de regresión le corresponden dimensiones de concentración en mM ($\mu\text{moles/g}$ de peso seco dividido ml/g de peso seco). de manera que el valor de 175 para el coeficiente de regresión representa 175 mM de Na. Dicho en otras palabras, los protoescólices incubados en solución MEM (o RK) por perío

dos de hasta 24 horas se comportan como si absorbieran del medio de incubación una solución conteniendo 175 mM Na. El gráfico de la derecha permite establecer la relación entre el incremento de Na y el de Cl^- . Nuevamente se puede ver que el incremento de Na se halla íntimamente asociado al de Cl^- ($r= 0.939$). La pendiente de la recta de regresión en este caso establece la relación entre los equivalentes de Na Cl^- absorbidos. El valor de 1.22 indica que por cada equivalente de Na que ingresaría a los protoescólices desde el medio de incubación también se absorbería un equivalente de Cl^- .

Estos resultados sugieren que los protoescólices incubados "in vitro" por períodos que alcanzan hasta 24 hrs incorporan del medio de incubación un fluido que contiene aproximadamente 175 y 143 mM de Na y Cl respectivamente, valores que son muy similares a los contenidos de Na y Cl^- en los medios en los que se suspenden los protoescólices (153 de Na y 125 de Cl^- para MEM y 145 de Na y 133 de Cl para RK).

Se consideró entonces la posibilidad de que los incrementos en los contenidos de Na y Cl^- y particularmente el de agua fuesen el resultado de un aumento en el volumen del espacio atrapado entre los protoescólices en los tacos de centrifugación. (Ver materiales y métodos). A fin de establecer si esta posibilidad era válida se estudió el comportamiento del espacio atrapado mediante la medición del volumen de distribución de inulina- ^3H .

Espacio atrapado entre los protoescólices

Las experiencias se realizaron incubando protoescólices durante 3 y 24 horas en solución RK a 37° C. El espacio de inulina- ^3H se determinó mediante incorporaciones de 15 a 35 minutos a fin de constatar si la distribución de este trazador alcanzó su equilibrio. En la siguiente TABLA se muestran los resultados.

Tiempo de Incubación	Tiempo de carga con inulina- ^3H	Espacio de inulina - ^3H
horas	min.	ml/gp.s.
3	15	1,201 ± 0,152 (6)
	30	1,332 ± 0,188 (6)
24	15	1,018 ± 0,027 (4)
	35	1,081 ± 0,114 (6)

TABLA 2. Espacio de inulina ^3H en los tacos de centrifugación de protoescólices

Se puede observar que, para cada tiempo de incubación, los espacios de inulina-³H obtenidos por incorporaciones entre 15 y 35 minutos no difiere significativamente ($0.6 > p > 0.5$). Comparando los espacios de distribución de la inulina-³H de las muestras, incubados 3 y 24 horas se puede establecer que las diferencias tampoco son significativas ($0.2 > p > 0.1$). Si el incremento del agua en los tacos de centrifugación se debiera al aumento del espacio atrapado entre los protoescólices debería observarse un valor mucho más alto para el espacio de inulina-³H en las muestras incubadas por 24 horas respecto de aquellas que sólo fueron incubadas 3 horas. Sin embargo, esto sólo no ocurre sino que los datos del espacio de inulina-³H para las muestras de 24 horas de incubación son ligeramente menores, aún cuando no son significativamente diferentes.

De esta experiencia se pudo concluir entonces que el notable aumento que se observa en el contenido de agua de los tacos de centrifugación de protoescólices incubados "in vitro" en MEM o RK hasta 24 horas no era el resultado de modificaciones del espacio atrapado sino de un real incremento del agua en el protoescólex.

Dada la magnitud del aumento en el contenido de agua en estas estructuras, era de esperarse observar cambios, en su volumen individual durante estas primeras 24 horas de incubación.

Para establecer los posibles cambios en el volumen de los protoescólices se desarrolló un procedimiento que permite calcular los volúmenes individuales de los protoescólices a partir de la medición de los diámetros de los mismos. La técnica fue descrita en la sección Material y Métodos y los resultados obtenidos son referidos a continuación:

Tiempo de Incubación horas	Diámetro		Protoescólex	Volumen cm ³ x 10 ⁹	n
	Mayor cm	Menor 10 ⁴			
0	170±3	113±2		1.143± 0.021	30
3	179±4	120±9		1.350± 0.044	30
6	179±4	125±2		1.443± 0.042	30
12	183±4	129±2		1.596± 0.052	30
24	178±3	144±2		1.964± 0.071	41

TABLA 3

La TABLA 3 muestra los resultados de las mediciones de los diámetros mayor y menor de protoescólices incubados entre 0 y 24 horas. Se puede observar que si bien ambos diámetros se incrementan con el tiempo de incubación el que más aumenta es el diámetro menor. El máximo aumento para el diámetro mayor se verificó en protoescólices incubados 12 horas sobrepasando en 13 um los diámetros correspondientes medidos inicialmente, lo que representa un aumento máximo de un 7.0% del valor inicial. Por otra parte, el diámetro menor crece hasta alcanzar un valor 31 um mayor que el correspondiente a las mediciones iniciales, lo que en este caso equivale a un incremento del 27.4 respecto del medido en el tiempo inicial.

El volumen de los protoescólices aumenta con el tiempo de incubación. Este incremento puede apreciarse más claramente en la próxima FIGURA donde se representa el volumen de los protoescólices para tiempos de incubación entre 0 y 24 horas.

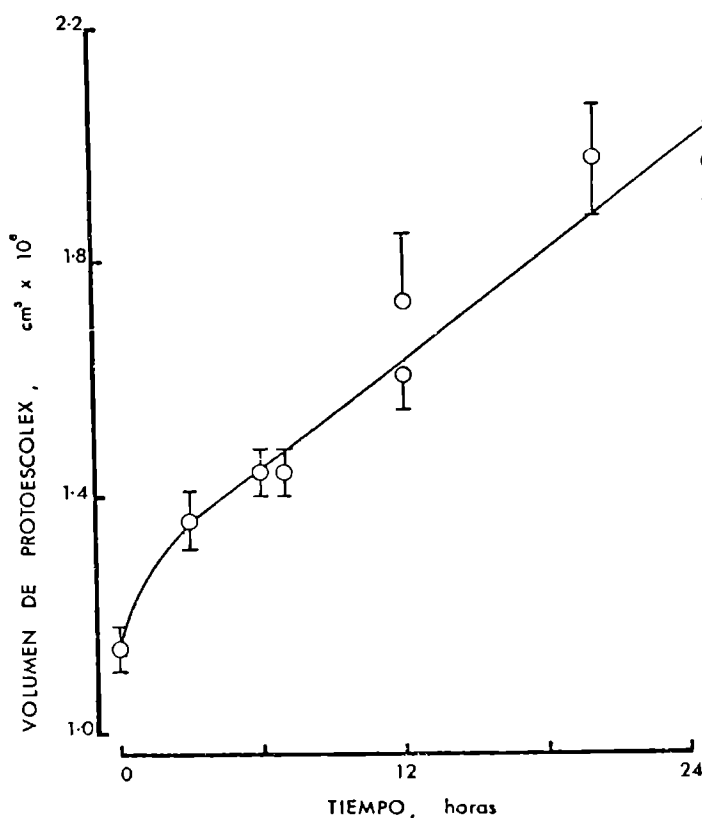


FIGURA 7. Volumen de los protoescólices incubados "in vitro" en función del tiempo de incubación.

Los datos corresponden a dos experiencias distintas. Se puede ver que entre 3 y 24

horas el proceso puede ser aceptablemente descrito por una recta. A partir de esa se calculó la recta de regresión con todas las medias entre 3 y 24 horas. El coeficiente de correlación de 0.9718 indica una muy buena significancia ($0.01 > p$). La pendiente de la recta representa la velocidad con la que cambia el volumen de un protoescolelex en función del tiempo, esto es, el flujo de volumen J_v , cuyo valor fue de $0.032 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{protoescolelex h}$. Este valor permitió establecer relaciones cuantitativas entre los cambios que pueden detectarse por la medición de los diámetros de los protoescolíces por un lado y los incrementos establecidos por los cambios del contenido de agua en los tacos de protoescolíces centrifugados por otro.

En la FIGURA 8 se representan los cambios de volumen que sufren los protoescolíces respecto del volumen inicial en función de los incrementos del contenido de agua en los tacos de protoescolíces centrifugados.

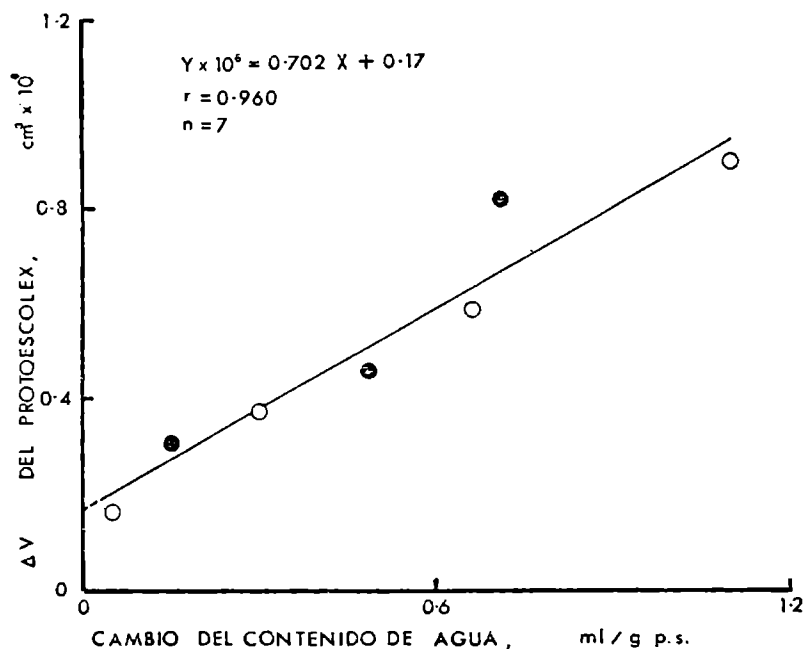


FIGURA 8. Correlación entre los cambios en el volumen individual del protoescolelex y los cambios en el contenido de agua en los tacos de centrifugación. Los datos corresponden a los medios de dos experiencias distintas.

Tanto las muestras de protoescolíces para la determinación del contenido de agua como aquellas destinadas a la medición de los diámetros fueron colectados simultáneamente. La recta fue calculada por regresión y se puede conbrar que el coefi

ciente de correlación obtenido (0.960) señala una muy alta significación (0.001 > p). El significado de la pendiente de la recta se sumamente importante. Las dimensiones de la misma se obtienen de dividir $\text{cm}^3/\text{protoescolex}$ (ordenada) por ml/g de peso seco (abscisa) lo que da g de peso seco/ protoescolex . Este resultado es de gran interés ya que la pendiente del gráfico debería representar el peso seco de un protoescolex. Si esto era correcto, entonces era posible comparar el contenido de agua del protoescolex calculado a partir de dos técnicas diferentes, Por un lado, el contenido de agua se calculó de los pesos fresco y seco de los tacos de protoescolíces centrifugados, luego se sustraer al contenido de agua total el valor del espacio de inulina- ^3H que representa el espacio atrapado. Un ejemplo de este cálculo se muestra en la próxima TABLA comprobándose que para protoescolíces incubados 3 horas en solución RK el contenido de agua es de 1.602 ± 0.120 ml/g de peso seco (12).

	ml/g p.s.
Contenido de agua en taco	2.668 ± 0.047 (4)
Espacio de inulina- ^3H en taco	1.266 ± 0.110 (12)
Contenido de agua en protoescolíces	1.602 ± 0.120 (12)
Volumen de protoescoléx	
$(1.014 \pm 0.035) \times 10^{-3}$ ml	(30)
Peso seco de protoescoléx	
$(0.702 \pm 0.090) \times 10^6$ g	(7)
Contenido de agua calculado	1.444 ml/g p.s.

TABLA 4

Por otra parte, el contenido de agua del protoescolex se calculó como el cociente del volumen individual de los protoescolíces (obtenido de las mediciones de sus diámetros) y el valor de la pendiente de la FIGURA 8 que corresponde al peso seco por protoescolex. En esta TABLA se puede ver también que el contenido de agua así obtenido para protoescolíces incubados 3 horas es muy similar (1.444 ml/g de peso seco) al determinado por las diferencias de peso de los tacos de centrifugación. Esta comparación cuantitativa ofrece otra importante evidencia de la estrecha vinculación que existe entre el aumento de agua en los tacos de los protoescolíces y el proceso de vesiculización.

Estado estacionario en el contenido de potasio. Compartimentalización del mismo

En contraste con el incremento neto en los contenidos de agua y CLNa en los protoescólices incubados "in vitro" hasta 24 hrs., se observó que los contenidos de potasio se mostraron notablemente estables como se ve en la FIGURA 9.

Si se tiene presente que el K es un catión de localización fundamentalmente intracelular, puede considerarse que los niveles de su contenido en un tejido es un parámetro adecuado para evaluar la integridad del mismo. Reisin, Cantiello y Rotunno (1977) y Reisin y Rotunno (1960) establecieron que el balance de K en protoescólices de Echinococcus granulosus es dependiente de la actividad de una bomba de Na-K y que el deterioro de la preparación se puede ver reflejado en la caída del contenido de K y en un aumento casi equivalente del Na (Ver FIGURAS 9 y 14).

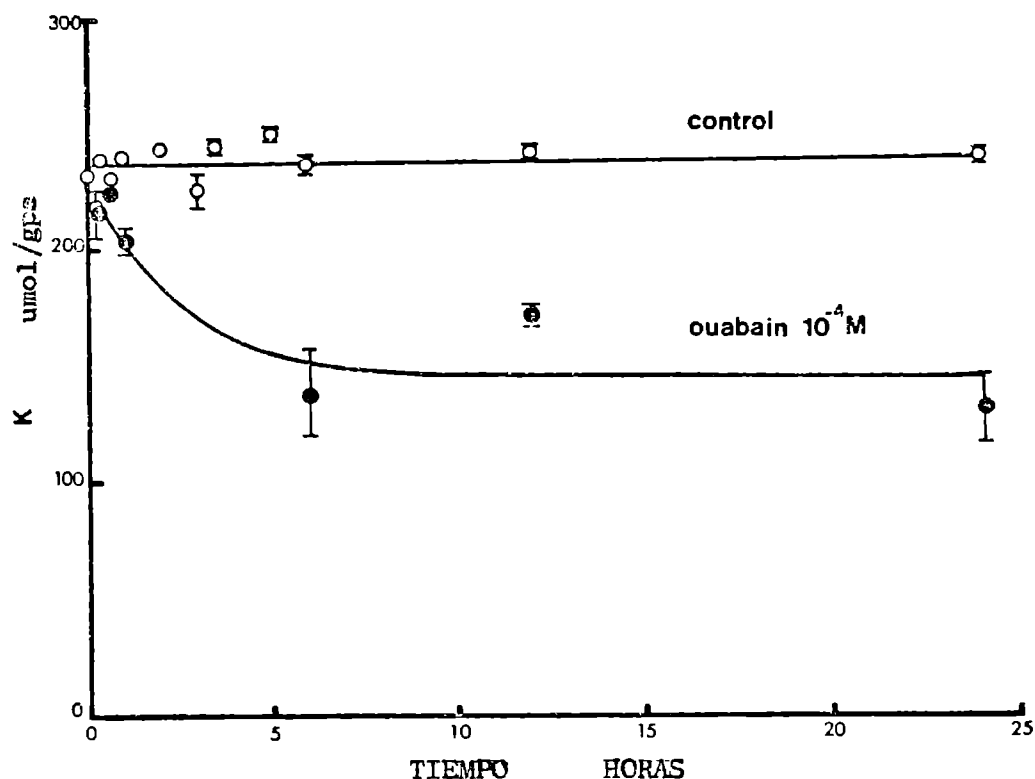


FIGURA 9. Evolución del contenido de potasio. Condiciones control y en presencia de ouabaina 10⁻⁴M.

En la FIGURA 9 se nota la sensible constancia en los contenidos de K químico entre 0 y 24 hrs para los incubados en condiciones control y la caída neta del con

tenido de potasio en los incubados con $10^{-4}M$ de ouabaina. Los incubados en condiciones de control mantienen el estado estacionario en todo el tiempo de incubación estando su contenido francamente estable en 235 $\mu\text{moles/gps}$ (TABLA 5). En los incubados con ouabaina se observa una caída neta en el contenido de potasio que alcanza un cuasiestado estacionario en aproximadamente 144 $\mu\text{moles/gps}$ logrando dicho estado entre 1.5 y 5 h de incubación (FIGURA 9). Los valores se resumen en la siguiente TABLA

Condición	Contenido Potasio		
	umole/g p.s.		
control	235 \pm 2	(84)	100
ouabaina, $10^{-4}M$	144 \pm 11	(16)	61

TABLA 5

donde se deduce de dichos contenidos que hay cerca de un 40% (91 $\mu\text{moles/gps}$ del contenido total de potasio de los protoescólices que es ouabaina sensible.

Compartimentalización del catión potasio

Si el sistema está en estado estacionario la medición de la incorporación de K^{42} permite establecer el número y tamaño de los compartimientos en que ese ión se halla distribuido, como también las constantes de velocidad de su intercambio. Bajo condiciones adecuadas además, es posible estimar los flujos unidireccionales de potasio.

El criterio se basa en el hecho de que cuando se introduce un isótopo radiactivo en un sistema biológico, éste produce una perturbación en la constitución isotópica de la especie química a la que tendería a equilibrarse.

Una de las ayudas más grandes para la simplificación matemática en el estudio de flujos es el tener el sistema en estado estacionario lo que se caracteriza por el mantenimiento de la constancia en la composición y volumen de los compartimientos. Es decir que se plantea una situación donde la velocidad de entrada de una sustan

cia tiene que ser similar a la de salida (lo que ocurre con el potasio).

Cuando se agrega un trazador a un sistema en ese estado, la fuerza para el movimiento del mismo es el gradiente de actividad específica del trazador, esto es, el número relativo de moléculas de trazador por unidad de cantidad de la especie química a la que pertenece (por ej. CPM/ $\mu\text{mol K}$).

Por lo tanto las ecuaciones que gobiernan el movimiento del trazador para un análisis compartamental en dicho estado seguirán una cinética de primer orden. O sea que en estado estacionario, el movimiento del trazador es independiente del orden real de la reacción que se estudia.

Siendo el potasio un catión fundamentalmente intracelular (50) nos sirvió en las investigaciones previas como un parámetro para evaluar la integridad de los protoescólices y atendiendo además al contenido de masa muscular que se observa en los mismos en el estadio en el que los estudiamos. Analizamos la distribución en los contenidos de potasio. partir de entonces, usando ^{42}K (Ver materiales y métodos) se realizaron experiencias de incorporación del mismo a los protoescólices hasta 24 hrs. en condiciones de incubación control y en presencia de ouabaina 10^{-4}M .

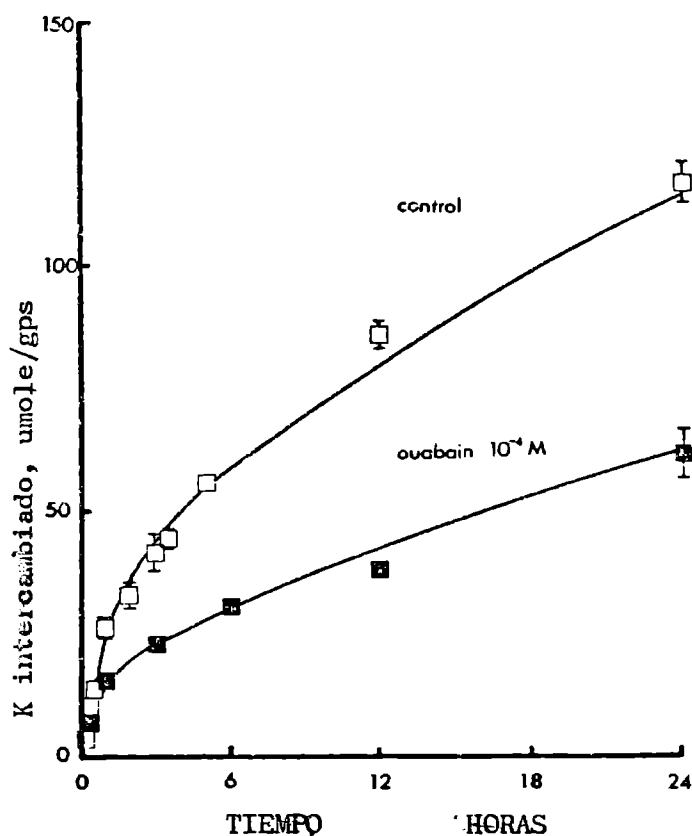


FIGURA 10. Incorporación de K^{42} . Condiciones control y en presencia de ouabaina 10^{-4}M .

En este gráfico se puede observar que ninguna de ambas curvas alcanza la condición de estado estacionario hasta las 24 h observándose además, una diferencia significativa entre ambas, donde se nota la inhibición producida en el K^{42} intercambiado en los incubados con ouabaina 10^{-4} M.

A partir de la curva de incorporación en condiciones de incubación control, se hizo un análisis compartamental para estudiar la distribución del ión potasio dentro de los protoescólices en esas condiciones. Para ello se graficaron las recíprocas de los porcentajes de equilibración, o sea, las fracciones expresadas en % del K^{42} que todavía no intercambió en los protoescólices para alcanzar el estado estacionario del mismo (Ver Apéndice I) ($J_{12} = J_{21}$), en una escala semilogarítmica en función del tiempo.

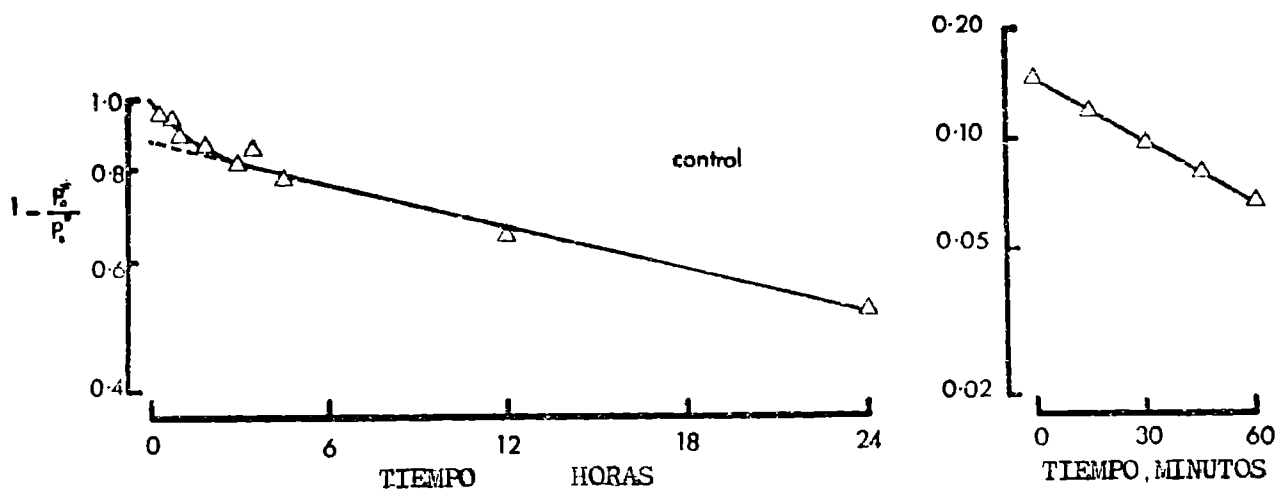


FIGURA 11. Análisis compartamental, para el contenido de potasio en protoescólices en condiciones control.

De la descomposición de la curva, surge por extrapolación a t_0 el tamaño de uno de los compartimientos, y por diferencia entre dicha extrapolación y la curva original aparece otra recta graficada a la derecha en otra escala de tiempo mucho menor. De las pendientes de ambas rectas (de la lra. curva y de la graficada a la derecha en escala expandida hasta 60 minutos) se obtienen las λ , o sea las constantes de velocidad para la equilibración de cada compartimiento. Con estos datos se puede calcular la vida media de cada uno de los mismos y el tiempo de equilibración para cada uno de las fracciones. Dicho análisis compartamental se analiza de

la siguiente forma: De la curva de la FIGURA 11 izquierda se observa que la misma se puede descomponer a partir de la resta de extrapolación de la misma cuando se hace recta. Esto es válido en la medida que podamos asumir p_1 , en otras palabras, que la curva de equilibración de K^{L2} intercambiado para los protoescólices incubados en condiciones control (estado estacionario FIGURA 9) FIGURA 10, no observa ningún compartimiento oculto y tienda asintóticamente a la equilibración total luego de 24 h con la cinética descrita previamente. La curva de la izquierda de la FIGURA 11 es entonces de la forma

$$P_p^* = Q_2 (1 - e^{-\lambda_1 t}) + Q_3 (1 - e^{-\lambda_2 t}) + p_s,$$

donde $p_s = 100\%$. De la curva experimental se resta la asíntota extrapolada que a tiempo 0 nos da un valor $100\% - 61\% = 39\%$ del valor del contenido total de potasio de los protoescólices control $Q_t = 235 \mu\text{moles/gps}$. Por lo que $Q_2 = 34 \mu\text{moles/gps}$. La asíntota cae a un valor $17 \mu\text{moles/gps}$ (la mitad) a los 1.14 h por lo tanto su pendiente es $\frac{\ln 2}{1.14} = 0.606 \text{ h}^{-1}$. La asíntota cuya ecuación es $34 (1 - e^{-0.606t})$

representa el primer compartimiento. El 61% restante del contenido total $Q_3 = 201 \mu\text{moles/gps}$ representan el contenido del segundo compartimiento que se intercambia a partir de la $\lambda_2 = 0.0205 \text{ h}^{-1}$ calculada de forma similar a la anterior. Los valores se resumen en la TABLA 6.

<u>Compartimiento de K rápido</u>		<u>Compartimiento de K lento</u>	
<u>contenido</u> <u>umoles/gps</u>	<u>cte de velocidad</u> <u>(h⁻¹)</u>	<u>contenido</u> <u>umoles/gps</u>	<u>cte de velocidad</u> <u>(h⁻¹)</u>
34	0.7966	201	0.0215

TABLA 6. Resumen del análisis compartimental de la FIGURA 11.

Por lo tanto, el contenido total de potasio de los protoescólices incubados en condiciones control se compartimentaliza en por lo menos dos compartimientos a partir de

$$Q_t = Q_2 (1 - e^{-\lambda_1 t}) + Q_3 (1 - e^{-\lambda_2 t}) =$$

$$= 34 (1 - e^{-0.7966 t}) + 201 (1 - e^{-0.0201 t})$$

($\mu\text{moles/gps}$)

La hipótesis que permite plantear la existencia de los dos compartimientos (o sea los contenidos) Q_2 y Q_3 de 34 y 201 $\mu\text{moles/gps}$ respectivamente, con sus constantes de velocidad λ_1 y λ_2 presupone que estos estén en configuración paralela con el compartimiento Q_1 (contenido de potasio del medio de incubación), ver Apéndice I, intercambiando independientemente cada uno de ellos con éste. Sin embargo, existe otra alternativa y es la posibilidad de que los compartimientos estén en serie con su medio, esto es, que el compartimiento rápido se halle entre el medio y el compartimiento lento. Esto trae aparejado una corrección que en algunos casos puede ser importante. El tratamiento que se emplea para su corrección fue desarrollado por Huxley (05) para el caso particular del estudio de compartimentalización de un tejido muscular. En este caso la hipótesis primera de que la actividad total del tejido

$$P_2 + P_3 = Q_2 (1 - e^{-\lambda_1 t}) + Q_3 (1 - e^{-\lambda_2 t})$$

y que equivaldría a que:

$$P_2 = Q_2 (1 - e^{-\lambda_1 t})$$

$$P_3 = Q_3 (1 - e^{-\lambda_2 t})$$

no sería correcta y en realidad ambos compartimientos y sus constantes dependerían de los tamaños y velocidades relativos entre sí a partir de una relación en que:

$$P_3 = \frac{Q_2 Q_3 (\lambda_1 - \lambda_2)^2}{Q_2 \lambda_1^2 + Q_3 \lambda_2^2} \quad \text{no}$$

directamente $P_3 = Q_3$ a tiempo infinito (Ver Apéndice I). Se aplicó este tratamiento para la compartimentalización de potasio en el protoescolex pero en nuestro caso, dadas las diferencias de tamaño entre ambos compartimientos, y fundamentalmente la existencia de dos constantes de velocidad tan diferentes, la corrección calculada es mínima (TABLA 7).

Compartimentalización	Compartimiento pequeño umoles/gps	Compartimiento grande umoles/gps
en paralelo	34	201
en serie	45	150

TABLA 7

Si bien la compartimentalización en paralelo subestima el tamaño del más pequeño se compuso entonces una cinética teórica para la incorporación del K en condiciones control como la que se observa en la próxima FIGURA.

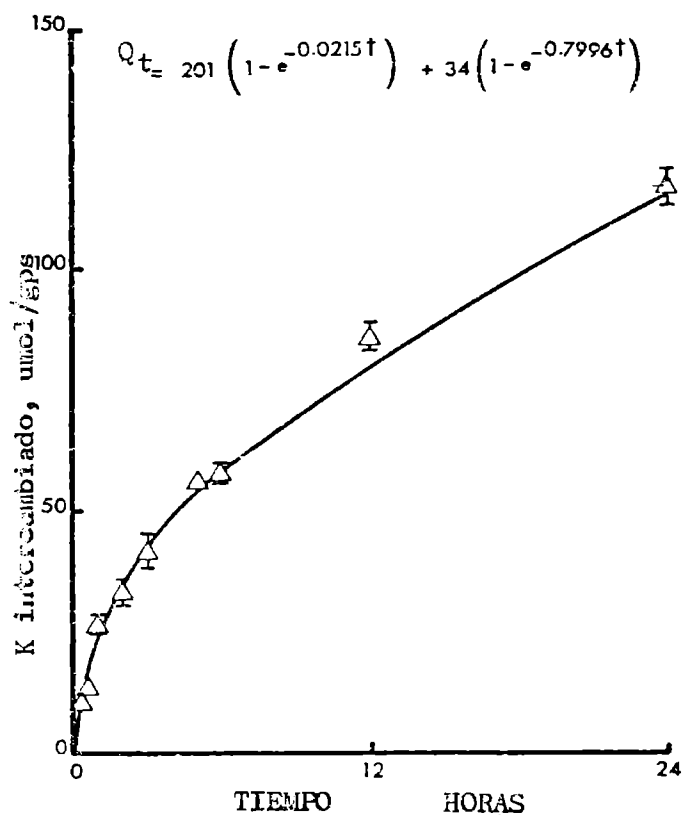


FIGURA 12. Análisis compartimental. Cinética teórica en línea continua que ajusta los puntos experimentales.

donde, por un lado, se grafican experiencias distintas y por otro lado, los puntos de incorporación experimentales para cinco experiencias distintas y por otro lado,

en línea continua la cinética teórica que obedece a la ecuación exponencial de la misma

$$Q_t = 201 (1 - e^{-0.0215t}) + 34 (1 - e^{-0.7990t})$$

El primer término de la ecuación expresa el tamaño y la velocidad de equilibración del compartimento grande y lento; el segundo término contempla el contenido y la constante de velocidad del otro compartimento que manmanos pequeño y rápido.

Influjos de K^{42} . Acción de la ouabaina

Otra información que es sumamente importante para la evaluación de los fenómenos de transporte y la caracterización de las membranas comprometidas es la obtención de los datos de influjos (J_{in}) o sea, una medida de la velocidad de entrada del trazador o la sustancia en estudio, en este caso a los protoescólices.

De las curvas de la FIGURA 10 o sea de las gráficas de equilibración para K^{42} tanto en condiciones de incubación control o con $10^{-4}M$ de ouabaina, únicamente los primeros tiempos de incubación (hasta no más de 1 hora) nos dan una medida de los J_{in} , dado que solamente en esos tiempos de incubación el K^{42} que se intercambia con el medio nos da una medida de la entrada. Es decir a tiempos cortos, la actividad específica dentro de los protoescólices es muy baja y por lo tanto, uno de los términos de la ecuación $J_n = J_{in} - J_{out}$; el J_{out} es 0 y se anula. Esto es de bido a que en realidad los flujos de la especie química son proporcionales a los de actividad específica del trazador y en esos tiempos la p^* escolex es aproximadamente 0 o por lo que el flujo de salida se hace cero. De ahí que estemos haciendo entonces una observación de la entrada de K^{42} a los mismos. En la FIGURA siguiente se observan las dos rectas de incorporación de K^{42} tanto en los protoescólices incubados en condiciones control y los incubados con $10^{-4}M$ ouabaina.

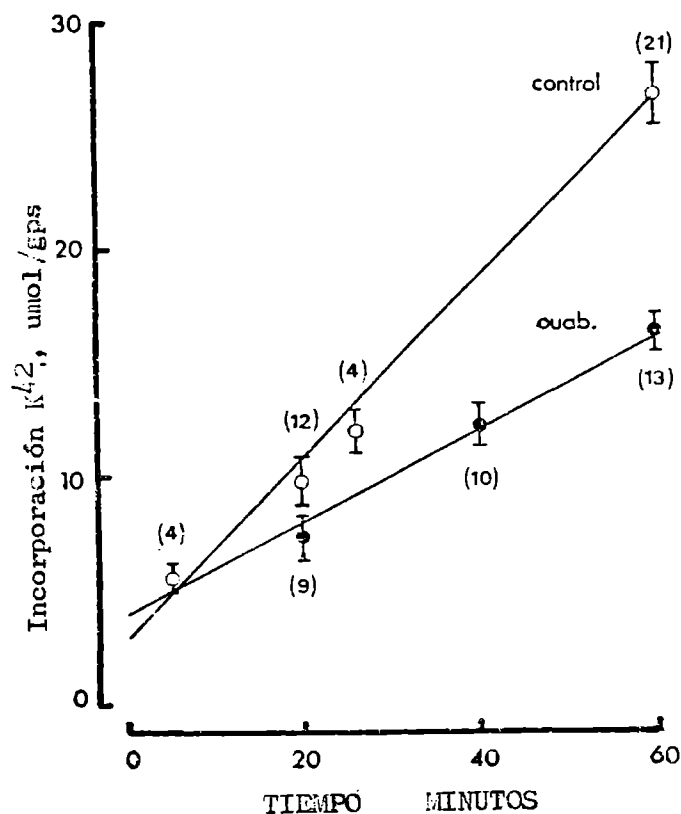


FIGURA 13. Incorporación de K^{42} en protozoos frescos. Control y en presencia de ouabaína $10^{-4}M$.

Las pendientes de ambas rectas en unidades de flujos expresados en $\mu\text{moles } K^{42}$ por gps nos dan los valores de los influjos que se muestran en la TABLA 5. Aquí se observa que los influjos (expresados en 2 unidades diferentes para poder comparar con otros datos de la bibliografía (Discusión) en ambas condiciones son muy diferentes, lo que por otra parte se observa en la FIGURA de las pendientes de los mismos ($p < .001$). De la entrada total de K se puede calcular que el 54% aproximadamente es ouabaína-sensible (surge de la diferencia de ambos influjos expresados en %) por lo que se pudo inferir que la mitad de la entrada de potasio a los protozoos realiza a través de transporte activo ligado a la bomba Na-K que es sensible a la ouabaína.

Condición	influjo de K		n
	umoles/g p.s.h	pmole/cm ² s	
Control	24 ± 3	9 ± 1	41
ouabaína 10 ⁻⁴ M	11 ± 2	4 ± 1	32

TABLA 8

Efecto de la ouabaína

Como se demostró previamente, el agua no ingresa sola al protoescolex sino que lo haría acompañada de Na y Cl⁻ (FIGURA 6).

Las experiencias que se refieren a continuación tuvieron por objeto establecer si un importante mecanismo de la regulación del balance de Na y K en el protoescolex como lo es la bomba de Na ouabaína-sensible (Reisin y Cantiello y Rotunno, 1977), Reisin y Rotunno, 1980), participa en el proceso de vesiculización. La FIGURA 14 muestra la evolución de los contenidos de K y Na de protoescólices incubados hasta 24 horas en presencia (círculos llenos) y ausencia de ouabaína (círculos abiertos). La concentración de ouabaína fue de 10⁻⁴M.

Se puede observar que ya a las 3 horas de incubación los contenidos de potasio de los protoescólices incubados en presencia de ouabaína han disminuído significativamente respecto de sus controles y esta diferencia se mantiene hasta la finalización de la experiencia. Por otra parte, los contenidos de sodio de los parásitos incubados en presencia del inhibidor muestran a las 3 horas un importante aumento en el contenido de Na en relación a los controles. También esta diferencia se mantiene sin mayores variantes hasta las 24 horas. Esto se puede apreciar más claramente en la TABLA 9 en la que se muestran las diferencias de contenido de potasio y sodio de los protoescólices incubados en presencia de ouabaína y sus respectivos controles.

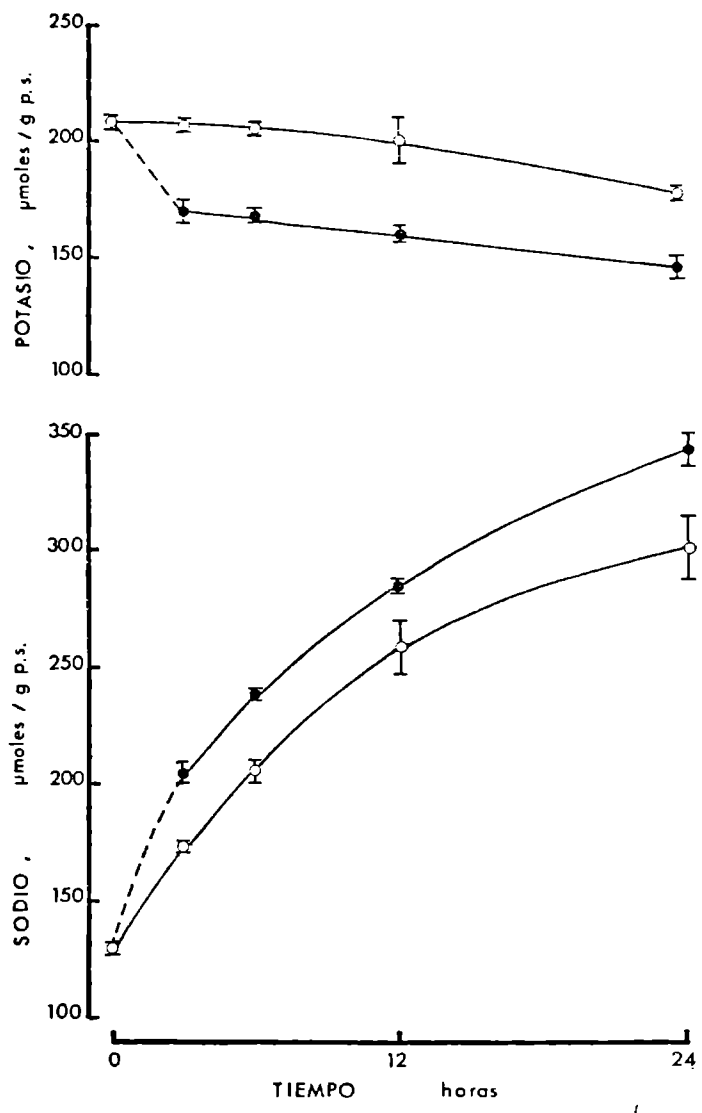


FIGURA 14. Efecto de la ouabaina ($10^{-4}M$) sobre los contenidos de sodio y potasio. Los círculos abiertos representan los contenidos de potasio y sodio controles mientras que los círculos llenos representan los incubados en presencia de ouabaina.

Tiempo de incubación	Diferencia respecto del control		n
	K	Na	
horas	umoles/g de peso seco		
3	-30 ± 5	33 ± 0	4
6	-37 ± 2	33 ± 7	4
12	-39 ± 13	27 ± 15	4
24	-35 ± 10	43 ± 25	4

TABLA 9. Diferencias en el contenido de potasio y sodio producidas por la ouabaína en protoescólices incubados "in vitro".

Se observa también una mayor dispersión de los datos correspondientes a las diferencias en el sodio en comparación con los valores de las diferencia de potasio. Esto se debería a que mientras el único cambio importante en el contenido de potasio se debe a la presencia de ouabaína, el contenido de sodio se ve afectado por dos procesos aparentemente diferentes; uno sería el efecto de la ouabaína y otro estaría dado por el ingreso de Na que acompaña al proceso de vesiculización. Los resultados de la FIGURA 14 y la TABLA 9 indican que la ouabaína no afectaría los cambios de Na involucrados en el proceso de vesiculización.

En primer lugar se puede comprobar que el aumento de Na en ambas condiciones, luego del aumento a las tres horas tienen cinéticas similares (FIGURA 14). En segundo lugar la acción de la ouabaína pareciera actuar únicamente sobre una fracción del contenido de Na y K del protoescolelex y ese efecto tiene su máxima expresión antes de las 3 horas de tratamiento (TABLA 9).

La próxima FIGURA muestra el efecto que tiene la ouabaína ($10^{-4}M$) sobre los contenidos de potasio y sodio durante las primeras 3 horas de incubación.

Se comprueba que, tal como sugiere la experiencia anterior, la ouabaína ejerce su acción en media hora de incubación y que a la hora y media se alcanzaron niveles cuasiestacionarios.

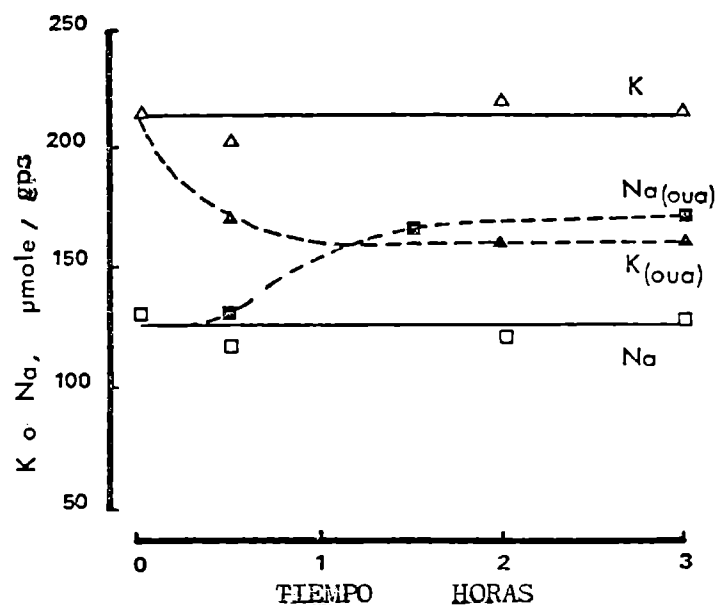


FIGURA 15. Contenidos de potasio y sodio en protozoos incubados hasta 3 h en ausencia y presencia de ouabaina $10^{-4}M$.

Ya se sabía que parte del contenido de sodio de potasio de los protozoos estaba ligado a su actividad metabólica (Reisin, Cantiello, Rotunno, 1977, Reisin y Rotunno, 1980, FIGURA 20). Las primeras comprobaciones experimentales fueron, por un lado, la dependencia del contenido de electrolitos respecto de la temperatura, incrementándose el contenido de sodio y disminuyendo el de potasio en el interior de la preparación a $4^{\circ}C$ y por otro lado, la efectividad de los glicósidos cardíacos, concretamente la ouabaina, inhibidor específico de la bomba Na K

en los mismos.

Como todas las células en general concentran potasio eliminan sodio contra sus respectivas gradientes electroquímicas y, en particular, el influjo del primero (v.g. glóbulo rojo, músculo, etc.) depende de la concentración externa de potasio, se realizaron incorporaciones de K^{42} para analizar la relación que tenía éste en función de la concentración de potasio externa.

Se realizaron incorporaciones en protoescólices deplecionados de potasio y enriquecidos con sodio a fin de obtener un influjo ouabaino-sensible mayor, se los incubó durante unas 20 h a $4^{\circ}C$. Las incorporaciones se realizaron en ausencia y en presencia de ouabaina $10^{-4}M$.

En la FIGURA 16 se puede observar la dependencia del influjo de K^{42} en función de la concentración externa de potasio.

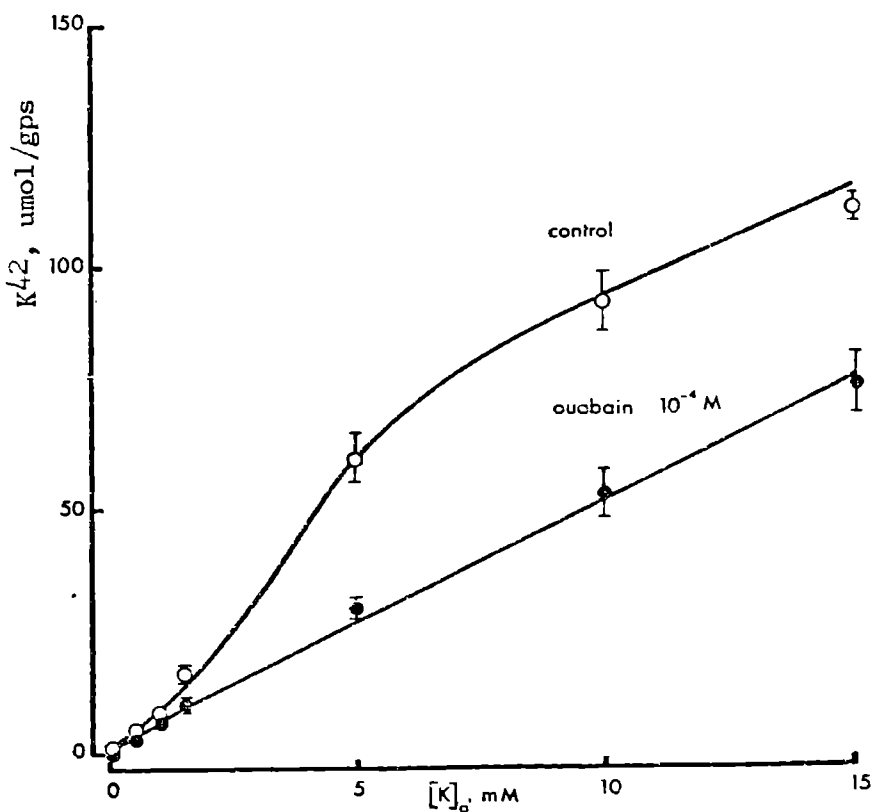


FIGURA 16. Protoescólices ricos en Na. Incorporación de K^{42} en función de la concentración de potasio externa

donde se grafican en círculos abiertos los influjos en protoescólices incubados en condiciones control y en círculos cerrados los incubados con ouabaina 10^{-4} M. Se observa una clara diferencia entre ambas curvas siendo la segunda la de los influjos ouabaino resistentes. De la diferencia entre ambas curvas (control y ouabaina) se obtiene un J_1 max que alcanza alrededor de los 30 $\mu\text{moles/g p.s.h}$ con una relación sigmoidea (lo que se observa en otros modelos biológicos) respecto de la concentración externa de potasio.

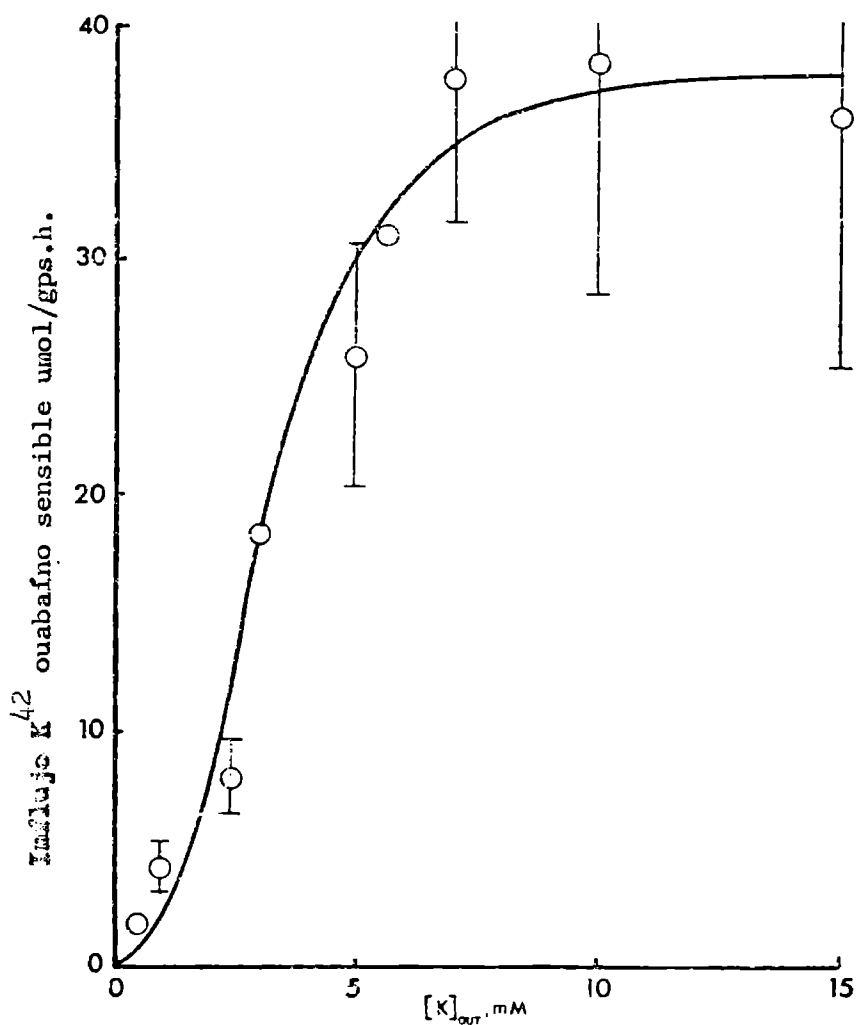


FIGURA 17. Protoescólices ricos en Na. Influjo de ouabaina inhibible en función de la concentración externa de K,

Se observó la dependencia de los sistemas de transporte respecto del contenido de sodio interno en los protoescólices deplecionados de potasio en medios libres del mismo de dos maneras. Primero, se comprobó la estimulación producida en el influjo de K^{42} . En la próxima figura se observa la notable estimulación producida en la incorporación de K^{42} por la disminución en el contenido de po

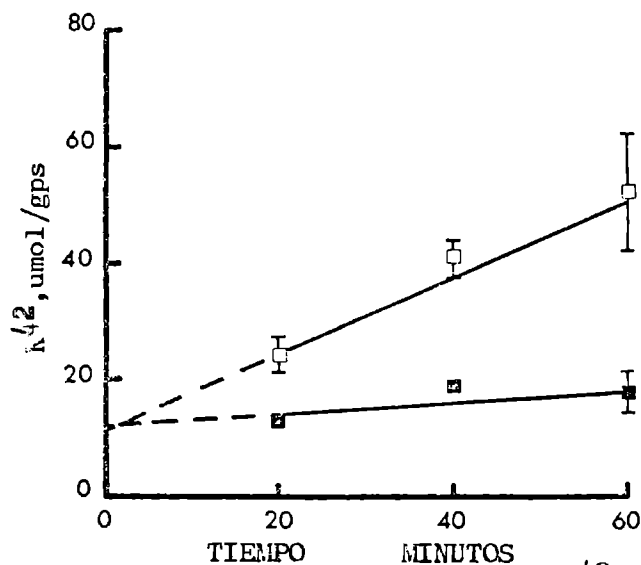


FIGURA 18. Incorporación de K^{42} en protoescólices previamente enriquecidos con Na. Control y en presencia de ouabaina $10^{-4} M$.

tasio y el aumento en el de sodio. Los valores de los influjos calculados de las pendientes de incorporación de una hora, se resumen en la próxima TABLA donde se comparan con los respectivos valores en condiciones de incubación a $37^{\circ}C$, frescos.

	Control	ouabaína
	µmoles/g p.s.h	
frescos	24.3 ± 3 (41)	11.1 ± 2.0 (32)*
deplecionados	64.0 ± 3 (15)*	27.9 ± 2.2 (14)*

TABLA 10. Todos los datos tienen entre sí diferencias altamente significativas (test "t" $p < .001$)

En segundo término se comprobó la dependencia de los influjos de K^{42} en función del contenido total de sodio interno.

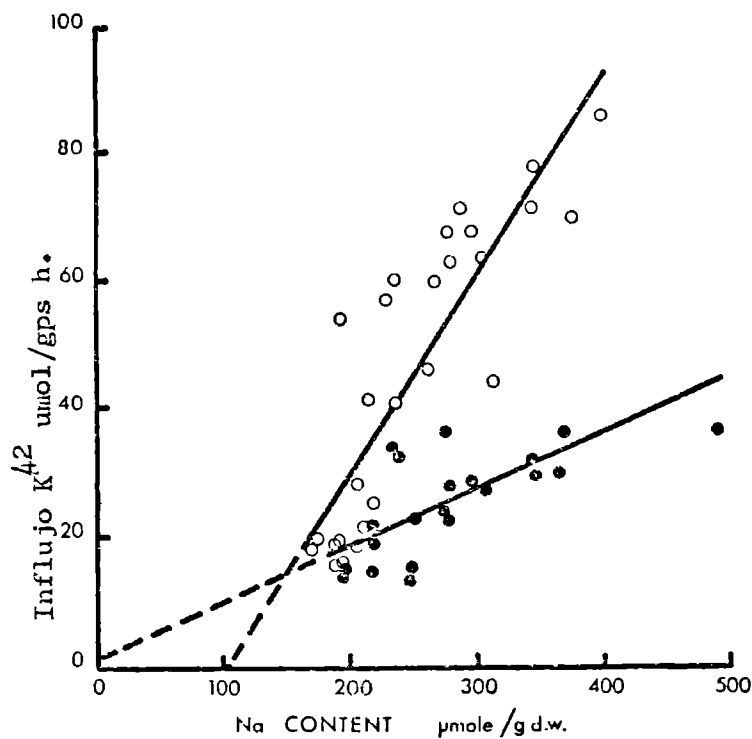


FIGURA 19. Dependencia de los influjos de K^{42} respecto del contenido de sodio interno para protozoos frescos y ricos en Na.

En la FIGURA 19 se observa que ambas rectas de regresión lineal son altamente

significativas entre sí, ($p < .001$) observando que la correlación lineal y positiva que manifiesta que la pendiente de regresión, en las condiciones control que es significativamente distinta de la de los incubados con ouabaína y a su vez ésta es significativamente distinta de 0. Es de hacerse notar que el valor de extrapolación para ordenada o en la correlación lineal de los incubados en condiciones control, que es significativamente distinto de 0, indicaría el valor de un compartimiento de sodio no asociado actividad de la bomba.

Por último se puede ver en el próximo gráfico la evolución en el contenido de potasio químico en los protoescólices previamente deplecionados en condiciones de control nuevamente círculos abiertos (medio con 5mM potasio a 37°C) y en presencia de ouabaína 10^{-4} M, círculos cerrados.

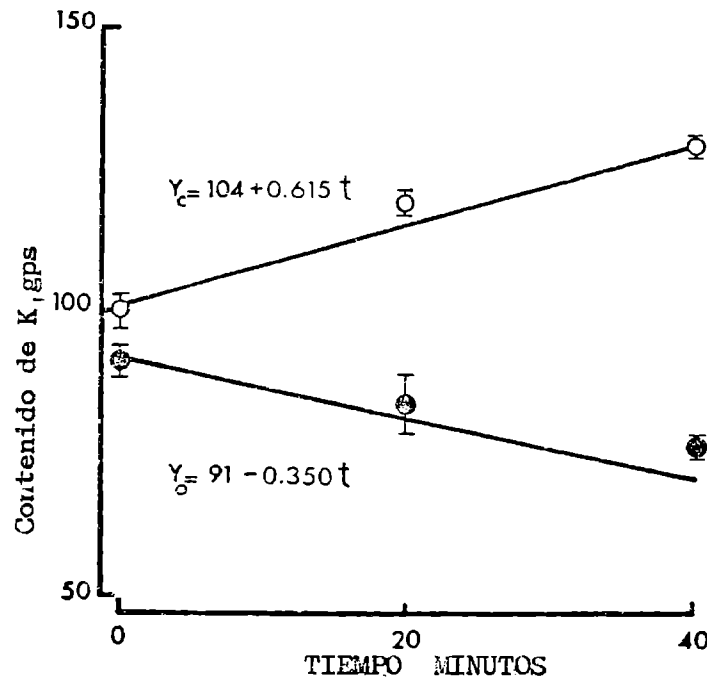


FIGURA 20. Evolución del contenido de potasio en protoescólices ricos en Na (deplecionados de potasio). Control y en presencia de ouabaína 10^{-4} M.

Aquí podemos observar que el contenido de potasio en los controles comienza a aumentar mientras que en los incubados con ouabaína disminuye. De las pendientes de las rectas se pudo calcular los valores de los flujos netos y a su vez con estos valores y los de los flujos de las curvas, FIGURAS 13, 18 y TABLA 10, se calcularon los flujos de los protoescólices para el catión potasio, observándose que la ouabaína no sólo disminuye la entrada del mismo, sino que aumenta su salida.

DISCUSION

El protoescólex del Echinococcus granulosus es un componente muy peculiar del ciclo biológico del parásito (Dévé 1901 (51)1902(52), 1946, Smyth 1962, que bajo condiciones adecuadas tiene la remarcable propiedad de evolucionar de su estadio larval hacia su etapa adulta de tenia o bien originar nuevos quistes hidatídicos.

La capacidad del protoescólex de originar nuevos quistes hidatídicos es el mecanismo por el cual la enfermedad se disemina en el huésped intermediario, proceso que se conoce como hidatidosis secundaria Dévé, 1946 (53). El proceso de diferenciación del protoescólex tanto hacia una etapa u otra puede producirse no sólo "in vivo" sino "in vitro". En 1966 Smyth, Howkins y Barton (8) establecieron las condiciones de cultivo bajo las cuales se puede controlar el proceso de diferenciación del protoescólex.

De esta manera fue posible inducir al organismo a evolucionar tanto hacia el estadio adulto como ocasionar su involución hacia la producción de nuevos quistes hidatídicos. A los estadios iniciales de este último proceso se los denominó vesiculización del protoescólex (Smyth, 1962)(6). Los cambios morfológicos que sufre el protoescólex en su proceso de vesiculización han sido descriptos por Smyth(1967) (7), Smyth, Miller y Howkins (1967)(9) y Morseth (1967)(12).

En contraste con estos conocimientos no existe información hasta el momento respecto de las modificaciones que sufren los mecanismos de regulación del agua y los electrolitos cuando se desencadena el proceso de vesiculización. La importancia de estos fenómenos se pone de manifiesto si se tiene presente que los cambios que afectan al protoescólex para originar un quiste hidatídico son notables. Los mismos se pueden describir como una reorganización de los tejidos que permite que un complejo sistema compuesto en su mayor parte por músculo liso cubierto por un delgado sincicio, el tegumento que en su tamaño inicial no supera los 150 μ m de diámetro, se convierta en un saco lleno de fluido hidatídico que llega a tener tamaños de entre 15 a 20 cm de diámetro. Este proceso de vesiculización requiere entonces cambios muy profundos en la distribución electrolítica del parásito que, por otra parte, refleja muy probablemente modificaciones de los mecanismos de transporte de los

iones comprometidos.

Los objetivos del presente trabajo han sido establecer los cambios precoces que ocurren en el balance de agua y electrolitos responsables del proceso de vesiculización y analizar los posibles mecanismos que pueden originarlos.

Los resultados muestran claramente que es posible detectar cambios muy tempranos en el balance del agua, Na y Cl en protoescólices incubados "in vitro" en condiciones que inducen su vesiculización.

Incrementos del contenido de Na y Cl⁻ en el protoescolelex

Los estudios que se presentan en este trabajo establecen que en las primeras 24 horas de incubación "in vitro", bajo condiciones que inducen la vesiculización de los protoescólices de Echinococcus granulosus Smyth y col, 1966; (8), Smyth, 1967; (7), Smyth y col, 1967 (9); Smyth y Davies, 1974 (40) ocurren notables cambios en el contenido de agua, Na y Cl⁻ del parásito. Es así que en 24 horas el contenido de agua del protoescolelex se incrementa en un 65% mientras que el Na y Cl⁻ lo hacen en un 132 y un 235% respectivamente (FIGURA 5). Dado que las determinaciones de Na y Cl⁻ se realizan en tacos compuestos por un gran número de protoescólices (del orden de 30.000 a 50.000 por muestra), se descartó que el posible aumento del Na y Cl⁻ reflejara un progresivo deterioro de una fracción de ellos dado que si ésta fuera la causa de los incrementos en Sodio y Cloruro se debería observar además una caída equivalente del contenido de potasio que se mantiene relativamente constante ya que el máximo cambio que se observó fue de un 16% del contenido inicial (TABLA I). Esta comprobación corrobora la estabilidad del contenido de potasio que pudo ser tomado como un adecuado indicador de la integridad de los protoescólices.

Incremento del contenido de agua en el protoescolelex

Las modificaciones observadas en el contenido de agua se deban al real ingreso de la misma a los protoescólices, y no a un artefacto ocasionado por el aumento del espacio atrapado en los tacos de protoescólices centrifugados. Los resultados obtenidos a partir de dos métodos independientes aportan claras evidencias en favor

de este hecho. Por una parte la medición de los espacios atrapados demostró que el mismo no se incrementa significativamente luego de 24 horas de incubación cuando este es comparado con el valor inicial (TABLA 2). El uso de la inulina-³H como marcador adecuado para el espacio atrapado en los tacos de protoescólices centrifugados fue establecido por Reisin y col (Reisin, Cantiello y Rotunno, 1977 (48) y Reisin y Rotunno, 1980 (49)).

Uno de los requerimientos fundamentales para que un marcador del espacio atrapado sea de utilidad, es que el mismo no penetre en los organismos que están en suspensión. Los resultados que se muestran en la TABLA 2 también ofrecen evidencias de que la inulina-³H no penetraría en los protoescólices, ya que la captación de la inulina-³H, y por lo tanto los espacios calculados a partir de ella no aumentan significativamente aún cuando se llegue a duplicar o triplicar el tiempo de carga (de 5 a 15 o de 18 a 35 minutos, TABLA 2).

Por otra parte, mediante una técnica diferente, se pudo establecer que el volumen del protoescolex se incrementa de manera muy significativa con el tiempo de incubación "in vitro". FIGURA 7.

Incremento en el volumen individual del protoescolex

Los cálculos del volumen individual de los protoescólices se basaron en la medición de los diámetros de los mismos y el empleo de la fórmula para el cálculo del volumen de un elipsoide de revolución prolato (FIGURA 4). Es indudable que la aplicabilidad de esta relación se asienta sobre la validez que tiene el asimilar la forma geométrica del protoescolex invaginado a la elipse de revolución antes citada como se observa en la FIGURA 4. La simple observación microscópica de los protoescólices invaginados justificaría esta suposición (Greenway, 1952; Noble y Noble, 1965; Smyth 1962 y Read, 1977). Sin embargo, la validez de las relaciones establecidas entre el cambio de volumen individual de los protoescólices y los incrementos del contenido de agua en los tacos de protoescólices centrifugados (FIGURA 8) depende de la uniformidad de geometría que presentan los protoescólices. En este sentido el factor que más influiría sería la presencia de protoescólices evaginados, ya que sus formas y dimensiones se alejan notablemente de la adoptada para describir al protoescolex in

vaginado. El recuento de protoescólices invaginados y evaginados permitió establecer que sólo el 1.8% de los protoescólices se hallaron evaginados. De 1236 protoescólices contados sólo 22 se encontraban parcial o totalmente evaginados, por lo que su presencia se hace despreciable.

Se obtuvo una muy alta significación para la correlación de los cambios del volumen individual de los protoescólices con el contenido de agua de los tacos de centrifugación sugiriendo entonces que dicho cambio es el producto de la entrada de Cl, Na y agua en concentraciones similares a las del medio de incubación. FIGURA 8.

Flujo neto de agua en el protoescolex

A partir de los cambios en el contenido de agua que se muestran en la FIGURA 5 se pudo calcular que el valor medio del flujo neto de agua hacia los protoescólices es de 0.065 ± 0.017 ml/g de peso seco h. El flujo neto de agua se pudo calcular también a partir de los cambios de volumen individual de los protoescólices. En este caso, el valor de la pendiente de la recta que se muestra en la FIGURA 8 sería el flujo de volumen pero expresado para un protoescólex. Este flujo sería de 0.032×10^{-6} ml por protoescólex y por hora. A fin de comparar este último valor con el calculado en primer lugar basta tener en cuenta que dividiendo el contenido de agua del protoescolex (ml/g de peso seco) por el volumen individual del protoescolex (ml/protoescolex) se obtiene el factor de conversión cuyas unidades son número de protoescólices por ml de protoescólices. A partir de los datos de las TABLAS 3 y 4 se puede establecer que por ml de protoescólices hay 1.2×10^6 de ellos. Con este dato se pudo finalmente calcular que a partir del cambio de volumen individual del protoescolex el flujo neto de agua es de 0.038 ml/g de peso seco hora, valor que es próximo al obtenido para el flujo de agua por una técnica completamente diferente.

La existencia de un flujo neto de agua hacia el protoescolex, que se refleja en el aumento del contenido de agua del mismo, plantea por lo menos dos interrogantes. En primer lugar a qué compartimiento o compartimientos del protoescolex ingresa el agua y en segundo lugar qué mecanismos pueden estar involucrados en este proceso. Estos dos aspectos serán analizados a continuación de manera conjunta.

Distribución del agua, Na y Cl⁻ en el protoescolex

La estructura del protoescolex es compleja y estudios de su morfología han sido realizados por Coutelén (1952) (55), Carta y Deiana (1960)(15), Smyth (1962) (6) y Morseth (1967) (12). Desde un punto de vista morfológico compartamental puede considerarse que en el protoescolex existen por lo menos dos compartimientos generales; el celular y el extracelular. Ambos distarían mucho de ser homogéneos y en realidad, basados en los datos morfológicos, se puede suponer que tanto el compartimiento celular como el extracelular son heterogéneos. Es así que el protoescolex posee un tegumento sincicial, una masa importante de músculo liso, células ciliadas de los túbulos excretores, etc. (Morseth, 1967 (12) Smyth, 1962 (6) como también los espacios extracelulares comprenderían el espacio extracelular de los tubos excretores (Carta y Deiana, 1960 (15)).

Aunque no es posible identificar con certeza el compartimiento en el que se acumula el agua y el Cl Na que ingresa al protoescolex durante el proceso de vesiculización precoz, los resultados obtenidos sugieren que esto tiene lugar en el compartimiento extracelular. Esta conclusión se apoyaría en las siguientes observaciones: a) los cambios del contenido de agua y Cl Na no afectan al contenido de K (FIGURA 5 y TABLA I); b) la ouabaina, que sí afecta una fracción del contenido de K (y Na) del protoescolex (FIGURAS 9 y 14, TABLA 5) no modifica el proceso de incorporación de agua y Cl Na (FIGURA 14); c) cuando se calcula la concentración del absorbato se comprueba que este tendría concentraciones de Na y Cl⁻ próximas a las del medio de incubación (FIGURA 6). Este último punto es de mucho interés ya que, por otra parte, los valores de Na y Cl del absorbato (175 y 143 mM respectivamente) son también muy similares a las concentraciones de estos iones en el fluido hidatídico (Mazzoco, 1923 (50)). De manera que los resultados aquí presentados aportarían evidencias indicando que la composición del fluido que se acumula en el protoescolex durante el estadio más precoz del proceso de vesiculización ya tiene una composición en Cl Na similar a la del fluido de los quistes hidatídicos adultos.

El posible papel que puede jugar el sistema de túbulos excretores (sistema protonefrítico) en el mecanismo de vesiculización merece un comentario. A este sistema se le atribuye funciones relacionadas con el balance osmótico del parásito si bien no

existen evidencias directas en favor de que así sea. Si el sistema protonefrítico estuviese involucrado en la regulación del balance del agua y Cl Na a través del control de la excreción de estas sustancias entonces una hipótesis atractiva sería atribuir el proceso de vesiculización a una incapacidad del sistema de túbulos excretores de eliminar el agua y Cl Na que absorbió el protoescolex. Aunque esto último entre en el terreno especulativo es factible en el futuro de un estudio experimental, ya que este tipo de fenómeno debería asociarse a cambios morfológicos en el sistema excretor pasibles de ser detectados por microscopía electrónica (Morse, 1967 (12), Wilson, 1969 (57)).

Estado estacionario de potasio. Análisis compartamental. Acción de la ouabaina

En general todas las células concentran potasio y eliminan sodio contra sus gradientes electroquímicos, manteniendo el estado estacionario de los mismos. Esto es una condición fundamental para el mantenimiento de la vida.

Dado que el potasio es un ión fundamentalmente intracelular se lo utilizó como parámetro para evaluar la integridad de los protoescólices durante los períodos en que se realizaron las experiencias. Este se mantiene notablemente estable, en otras palabras, está en estado estacionario, en 235 $\mu\text{moles/gps}$ (FIGURA 9 TABLA 5) observándose que el mayor cambio producido en el contenido del mismo alcanzó al 16% (FIGURA 5 y TABLA I).

Por otra parte, como ya se habría demostrado previamente (Reisin, Cantiello y Rotunno (1977), Reisin y Rotunno (1979) y Reisin, Rabito y Cantiello (1980) FIGURAS 9, 10 y 14), una importante fracción del contenido total del mismo está asociado a la actividad de una bomba NaK ouabaina sensible.* (58).

Por lo tanto, interesó conocer la distribución del contenido del mismo y establecer los mecanismos que regulan la misma para los protoescólices en condiciones control, lo que se vio facilitado por el hecho de que el K se mantiene en estado estacionario.

El análisis compartamental realizado a partir de las curvas de K^{42} intercambiado (FIGURA 10), ver Apéndice I, nos permitió observar una distribución del conteni-

* Esta bomba NaK no participaría de manera significativa en el incremento de sodio asociado al proceso de vesiculización FIGURA 14).

do total de potasio (235 $\mu\text{moles/gps}$) en por lo menos dos compartimientos de muy distinto tamaño y con constantes de velocidad muy diferentes (TABLAS 6 y 7, FIGURA 11). El más pequeño de los mismos equilibraría un 14% (34 $\mu\text{moles/gps}$) del contenido total a las 3 h (con una constante de velocidad $\lambda_1 = 0.7966 \text{ h}^{-1}$). El segundo compartimiento equilibraría totalmente el 86% restante (201 $\mu\text{moles/gps}$) alrededor de las 100 h. con una constante de velocidad $\lambda_2 = 0.0215 \text{ h}^{-1}$.

Si bien las hipótesis contempladas en el análisis compartimental no permiten elucidar si estos se encuentran en serie o en paralelo, en otras palabras, si los compartimientos intercambian independientemente con el medio de incubación o el segundo compartimiento lo hace a través del primero; las correcciones hechas a partir de las ecuaciones de Huxley (65), TABLA 7, no son realmente significativas debido a las diferencias en el tamaño de los compartimientos y sus respectivas constantes de velocidad. Este análisis cinético se puede resumir para protoescólices en condiciones control, en la FIGURA 12, donde podemos observar en línea continua la curva teórica que obedece a la ecuación $Q_t = 34(1 - e^{-0.7966t}) + 201(1 - e^{-0.0215t})$ que caracteriza dicha compartimentalización. Q_t representa el contenido de potasio total.

Todo análisis compartimental requiere en general una comprobación independiente que verifique morfológicamente las barreras cinéticas halladas en él (Cerejido y Rotunno, 1970, Solomon, 1960). (59).

Realmente la estructura del protoescolex se puede considerar de una gran complejidad anatómica, pero, en la que por lo menos existirían dos compartimientos: un espacio extracelular y el compartimiento celular (Morseth, 1967) (12). No se ha podido, hasta el presente, comprobar hasta qué punto, los compartimientos observados en el análisis cinético para el catión potasio representarían anatómicamente estas estructuras morfológicas. Lo que sí sabemos es que el balance de sodio y de potasio en los protoescólices depende, al menos en parte, del metabolismo del mismo (Reisin, Rabito y Cantiello, 1980) y que un estudio sobre la acción de inhibidores de la bomba NaK ouabafina inhibible u otros, como así también la posterior localización de las mismas ayudarían a resolver el problema.

El balance de sodio y de potasio se altera notablemente por acción del IA, conocido

como inhibidor de la vía glucolítica anaeróbica. Esto confirma la importancia de la misma como principal fuente de energía (Agosin, 1957) (24). Este balance se ve alterado por el CNK en altas tensiones ^{de Oxígeno} aunque su acción no es tan marcada como con el IA. Para el caso de los incubados con IA o IA + CNK (Reisin, Rabito y Cantiello 1980) el balance de electrolitos no alcanza un estado estacionario donde el potasio caería 145 $\mu\text{moles/gps}$ y el sodio aumentaría 152 $\mu\text{moles/gps}$. Estas son considerablemente más grandes que las fracciones ouabaina sensibles. La ouabaina como inhibidor específico de la bomba Na-K causa un incremento en el contenido de sodio y una disminución en el de potasio y en cantidades aproximadamente equivalentes (49), FIGURA 14. Ahora, si bien hay un aumento de 35 $\mu\text{moles/gps}$, y una caída de 41 $\mu\text{moles/gps}$ en el Na y el potasio respectivamente a las 3 h de incubación y aún a las 24 h se observa una caída en el contenido del segundo de 91 $\mu\text{moles/gps}$ se observa que las diferencias son considerablemente menores respecto de los incubados con IA. De aquí se plantean dos problemas; uno asociado a la acción de la ouabaina y el otro a la posible existencia de otros mecanismos de transporte activo.

En primer lugar, desde el punto de vista del análisis compartamental hemos observado que el compartimiento pequeño intercambia hasta 34 $\mu\text{moles/gps}$ pero la caída del contenido de potasio no alcanza sino un cuasíestado estacionario en los incubados con ouabaina (FIGURA 9) en alrededor de 91 $\mu\text{moles/gps}$. Esto se podría explicar de dos formas; o por insensibilidad del sistema a la misma o por la inaccesibilidad de esta a una fracción del número total de bombas en los protoescólices. Podestá (1977) (60) ha descrito el efecto de la ouabaina en Hymenolepis diminuta en su estadio adulto, pero este autor únicamente encontró efecto cuando el tegumento del parásito era cortado lo que expondría el espacio extracelular del mismo a la solución del baño. Por otra lado Pappas, Uglem y Read (1973) (61) demostraron que el estadio larval de la Tenia crassiceps era permeable a la ouabaina. Nuestras experiencias se realizaron en protoescólices intactos, invaginados, pero, hasta qué punto el efecto de la ouabaina se deba a que estos son permeables a la mismo o por qué las bombas NaK (ambos compartimientos) estén localizados en la membrana apical del sincicio del protoescolex no se sabe actualmente. De todas formas, el tegumento del protoescolex de Echinococcus granulosus es bastante diferente al del Hymenolepis diminuta. No se

puede descartar que, como se ha observado en otros modelos biológicos exista cierta insensibilidad a la ouabaína. De todas formas, el efecto de la ouabaína no alcanza a explicar las diferencias encontradas para los incubados con IA o IA + CNK. Podrían existir otros mecanismos de transporte de iones, v.g. el sistema de transporte de sodio sensible al ácido etacrínico en células renales descrito por Whittembury y Proberbio (62).

Hemos observado el comportamiento del contenido de iones en los protoescólices incubados con ácido etacrínico y ácido etacrínico + ouabaína como se observa en la TABLA 11

Contenido de electrolitos* en protoescólices incubados durante 3 horas a 37°C en 95% O₂ en presencia de ouabaína 10⁻⁴M; Acido etacrínico 0.5 y 2.0mM y ambas.

	Na	K µmoles /cps	Cl
control	233 ± 12 (4)	239 ± 4 (3)	135 ± 3 (4)
ouabaína (10 ⁻⁴ M)	219 ± 2 (4)	209 ± 5 (4)	118 ± 4 (3)
Etacrínico (0.5x10 ⁻³ M)	211 ± 1 (5)	232 ± 1 (5)	137 ± 7 (5)
ouabaína+Etacrínico (10 ⁻⁴ M) +(0.5x10 ⁻³ M)	228 ± 10 (5)	222 ± 7 (4)	145 ± 8 (5)
Acido Etacrínico (2x10 ⁻³ M)	305 ± 8 (5)	217 ± 5 (5)	174 ± 7 (5)
ouabaína+Etacrínico (10 ⁻⁴ M) y (2x10 ⁻³ M)	262 ± 10 (4)	187 ± 4 (4)	133 ± 13 (9)

* Experiencia en que se lavó el espacio atrapado con sacarosa 0.3M a 4°C.

TABLA 11

Se observa en la misma que hay diferencias significativas en los incubados en presencia de ácido etacrínico 2mM y + ouabaína 10⁻⁴M respecto de los controles, por lo que en primera instancia no se descartaría la posibilidad de existencia de otros mecanis

mos de transporte activo.

Comportamiento del potasio. Transporte activo

La medición de los influjos en condiciones control (frescos) o incubados con ouabaína 10^{-4} M 30 minutos, permitió comprobar que un 54% de la entrada total de potasio a los protoescólices estaría asociada a un transporte activo ouabaína-sensible (FIGURA 13, TABLA 8). La estimulación obtenida en los protoescólices enriquecidas con sodio es notable tanto para los controles $263 \pm 25\%$, como para los incubados con ouabaína, $251 \pm 37.8\%$ (TABLA 10). Dado que ambos valores son similares, el efecto podría deberse a un cambio en la permeabilidad al potasio producida por el efecto de su depleción

Por otra parte, se observó la dependencia del J_{in}^K respecto del contenido interno de sodio, o sea la activación del sistema de transporte asociado a la presencia del Na contralateral. En la FIGURA 23 se encuentra lo que en una primera aproximación es una correlación lineal y positiva para dicho influjo respecto del contenido de sodio. Se puede observar que el valor a ordenada 0, o sea el valor del contenido de sodio para $J_{in}^K = 0$, que es significativamente distinto de cero, correspondería a una fracción del contenido interno de sodio que no es accesible a la bomba. La diferencia entre las pendientes de ambas rectas de regresión es altamente significativa. $0.01 > p$ y la recta asociada al J_{in}^K en presencia de ouabaína tiene una pendiente distinta de cero. Esto se podría explicar a partir de razones antes mencionadas, una de ellas sería la relativa insensibilidad de una fracción del J_{in}^K a la ouabaína o podría ser que existiese una fracción del total de bombas funcionantes a las que ésta no llega.

Cinética de transporte activo de potasio

Se observó la dependencia de la entrada de K^{42} a los protoescólices previamente deplecionados, respecto de la concentración de potasio externa $[K]_o$. Esto es de sumo interés para comprender los mecanismos de entrada del mismo.

La cinética de saturación que se observa en línea continua en la FIGURA 21 y que ajusta los puntos experimentales de dos experiencias distintas en su forma más simple obede-

ce a una ecuación del tipo:

$$J_a^K = J_{max}^K \frac{1}{\left[\frac{a}{[K]_o} + 1 \right]^3}$$

Esta curva de tipo sigmoideo y de orden cúbico respecto de la $[K]_o$ tiene un J_{max}^K de 38 $\mu\text{moles/gphs}$; $a = 30.3$.

La $[K]_o$ a la cual se alcanza $\frac{1}{2} J_{max}^K$ es de 3.12 mM. Esta ecuación con la que se pudo ajustar los puntos experimentales indicaría que hacen falta 3 potasio simultáneamente para la activación del sistema de transporte, a diferencia de otros modelos que obedecen a cinéticas de orden cuadrático (03).

A partir de la utilización de los valores de potenciales eléctricos (ΔV) obtenidos con una técnica de empalamiento con microelectrodos de vidrio, de la barrera tegumentaria de los protoescólices, (Cantiello, Ibarra, Reisin, 1980)(04) obtenidos en nuestro laboratorio, se pudo calcular la permeabilidad aparente para el potasio en protoescólices previamente deplecionados, CONDICION III e incubados con ouabaina, CONDICION IV, FIGURA(21) cuyos valores son -53mV y -29mV respectivamente.

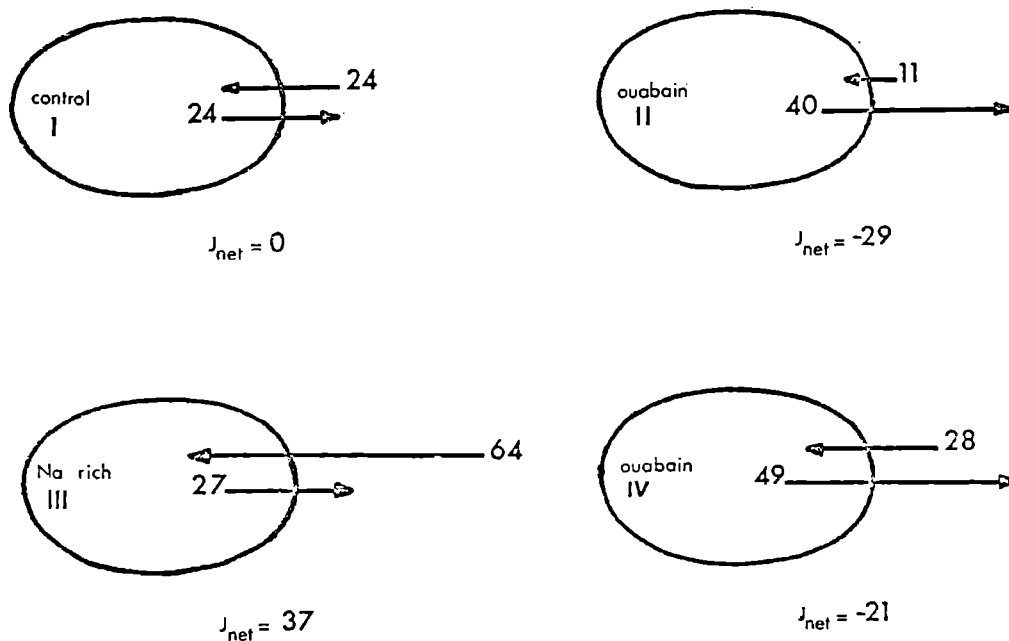


FIGURA 21. Influjos, eflujos y flujos netos en protoescólices frescos y enriquecidos con Na. (I y III) y en presencia de ouabaina 10^{-4}M (II y IV) respectivamente.

Aplicando una corrección de las ecuaciones de Goldman para la utilización de influjos:

$$P_K = \frac{J_{in}^K}{[K]_o} \theta$$

y, donde

P_K es la permeabilidad aparente al potasio, calculada en estas condiciones.

J_{in}^K es el influjo de potasio a los protoescólices previamente enriquecidos con sodio incubados con ouabaina CONDICION IV y que se asume es pasivo,

$$\theta \text{ es igual a } \frac{F\Delta V}{R.T} (1 - e^{-\frac{F\Delta V}{RT}})$$

donde $R =$ cte. de los gases; $F =$ cte. de Faraday, $e =$ base de los logaritmos neperianos y ΔV es el valor de la diferencia de potencial obtenida en esas condiciones $-29mV$ con su signo respectivo (Se considera positivo si el ΔV ayuda al y negativo si se le opone (Se toma como referencia el baño externo). El valor de P_K en estas condiciones es de $17 \times 10^{-7} cm/sg$. Con dicho valor y el ΔV correspondiente se calculó a partir de la $[K]_o$ que es $5mM$, el J_{in}^K "pasivo" para la condición III, o sea los enriquecidos con sodio cuyo valor es $38 \mu moles/gpsh$. Para los tratados con ouabaina, CONDICION IV el J_{in}^K "pasivo" es de $28 \mu moles/gps h$. La diferencia, considerando que no hubo cambios en la P_K , o sea $10 \mu moles/gpsh$ se moverían por el ΔV electrogénico de la bomba.

Si calculamos ahora el J_{in}^K pasivo en la CONDICION III a partir del ΔV obtenido en los incubados con ouabaina (IV), es decir, suponiendo el resto del movimiento de potasio pasivo se efectuaría por el ΔV electrogénico obtenemos un J_{in}^K 27
 $\mu moles/gpsh$ cuya diferencia con el J_{in}^K pasivo calculado con el potencial obtenido en III son $11 \mu moles/gpsh$. Si se observa que la diferencia de los J_{in}^K totales para condiciones III y IV son $36 \mu moles/gpsh$ esto es que el J_{in}^K asociado al transporte activo son $36 \mu moles/gpsh$ y que el componente electrogénico mueve $11 \mu moles/gpsh$ representaría $11/36 = 0.31$ una tercera parte. Por lo que se podría asumir que para el transporte activo de potasio 2 potasios entrarían por la bomba y uno se incorporaría pasivamente debido al incremento del ΔV electrogénico pro-

ducido por la actividad de la bomba. La imposibilidad de obtener datos que concuerden para las condiciones I y II estaría ligado al hecho de que se producirían cambios de permeabilidad entre ambas condiciones. Esto nos lleva a evaluar en el futuro estos datos de otra forma.

En el caso particular de las Condiciones III y IV la estimulación misma producida por la deflección modificaría en ambas, la permeabilidad de la misma.

APENDICE I

Análisis compartamental

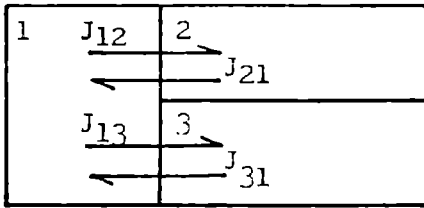
El análisis compartamental tiene la validez y el alcance de generar modelos abstractos que reproduzcan la cinética de distribución de trazadores, en general radioactivos en sistemas biológicos. Esta validez surge de considerar una serie de hipótesis como son; a) la composición de cada compartimiento es uniforme; b) la inyección del trazador no afecta el comportamiento del sistema; c) éste no puede discriminarlo, d) tanto el movimiento de entrada como de salida son al azar y lo más importante, e) la velocidad del mismo está limitada por barreras cinéticas que es lo único que se puede observar (Solomon, 1960, (59), Atkins, (1969)(66)).

Estado estacionario. La condición más simple bajo la que se puede realizar el análisis compartamental de un sistema lo constituye la condición de estado estacionario, en este caso la única fuerza impulsora para el trazador será sus gradientes de actividad específica (p^*) (Solomon, 1960 (59), Atkins, 1966 (66), Cereijido y Rotunno, 1970 (33)). De esta manera un sistema cerrado que inicialmente tiene una distribución no homogénea tras un tiempo suficientemente largo (t_{∞}) tenderá a tener al trazador uniformemente distribuido en todos los compartimientos que lo componen. En estado estacionario el trazador sigue una cinética de primer orden independiente del orden de la reacción que se quiere investigar.

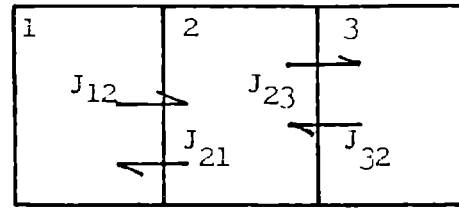
En general se pueden utilizar dos procedimientos diferentes (Cereijido y Rotunno, 1970); incorporación y lavado de trazadores. En las experiencias informadas en esta tesis se utilizó una cinética de incorporación en un sistema de tres compartimientos, uno de los cuales es de capacidad infinita respecto de los otros dos.

Incorporación de trazador

El sistema en estudio se considera como un sistema de tres compartimientos: baño de incubación (Compartimiento 1) y dos compartimientos intraprotoscolex (Compartimientos 2 y 3) estos últimos pueden estar en paralelo o en serie. Para el primer caso se considera que cada compartimiento intercambia independientemente con el medio de incubación (FIGURA I, a) o como en el segundo caso, se puede considerar que el compartimiento 3 intercambia con el medio a través del compartimiento 2 (FIGURA I, b).



a)



b)

FIGURA AI

Análisis en paralelo

$$\frac{dP_1}{dt} = \frac{dP_2}{dt} + \frac{dP_3}{dt} \quad (A_1) \text{ donde,}$$

$$\frac{dP_2}{dt} = J_{12}P_1^* - J_{21}P_2^* \quad (A_2) \text{ y}$$

$$\frac{dP_3}{dt} = J_{13}P_1^* - J_{31}P_3^* \quad (A_3)$$

integrando entre $t=0$ y $t=t$ teniendo en cuenta que las ecuaciones A_2 y A_3 y considerando que $P_{10}^* = P_{1\infty}^*$ (reservorio infinito) se obtiene que

$$P_t = \alpha (1 - e^{-\lambda_1 t}) + \beta (1 - e^{-\lambda_2 t}) \quad (A_4), \text{ donde } \alpha = Q_2/Q_t \text{ y}$$

$$\beta = Q_3/Q_t$$

cada compartimiento será entonces Q_2 y Q_3 ; y para las ecuaciones de equilibrio del trazador ($t = t_\infty$) tenemos que

$$P_2 = Q_2 (1 - e^{-\lambda_1 t}) \quad A_5$$

$$P_3 = Q_3 (1 - e^{-\lambda_2 t}) \quad A_6 \text{ y}$$

$Q_T = Q_2 + Q_3$ (A_7). Esta ecuación es válida en tanto se cumpla realmente que ambos compartimientos, 2 y 3 intercambian independientemente con el compartimiento 1.

Compartimentalización en serie

Huxley desarrolló un tratamiento para analizar el intercambio de un ión marcado entre la solución que baña a una masa muscular. Este autor consideró la existencia de 3 compartimientos distribuidos en serie; 1) la solución externa, 2) el líquido extracelular del tejido y 3) las células musculares (FIGURA AI b). La hipótesis de que el intercambio se puede explicar por la suma de dos términos de primer orden que corresponderán a los dos compartimientos no es adecuada, ya que en el sistema en serie a $t=0$ sólo se carga el compartimiento 2 y el 3 lo hace a partir de la actividad específica del 2. La magnitud y naturaleza de dichos errores se puede ilustrar más claramente en una experiencia del lavado. La radioactividad total del tejido ($P_2 + P_3$) A 8 consistiría cinéticamente en aproximadamente dos términos exponenciales como vimos antes a partir de que

$$P_2 + P_3 = Q_2 e^{-\lambda_1 t} + Q_3 e^{-\lambda_2 t} \quad A9$$

la hipótesis más común es equivalente a escribir:

$$P_2 = Q_2 e^{-\lambda_1 t} \quad A10$$

$$P_3 = Q_3 e^{-\lambda_2 t} \quad A11$$

mientras que de hecho ambos compartimientos tendrían términos con cada una de las constantes de velocidad.

$$P_2 = Q_2 e^{-\lambda_1 t} + Q_2 e^{-\lambda_2 t} \quad A12$$

$$P_3 = Q_3 e^{-\lambda_1 t} + Q_3 e^{-\lambda_2 t} \quad A13$$

Lo que se trata de obtener es el valor inicial P_{30} o sea el compartimiento intracelular de radiactividad P_3 que puede obtenerse de las cantidades medidas Q_2 y Q_3 , λ_1 y λ_2 , a partir de la relación derivada por Huxley: quien obtuvo, a partir de A9, A12 y A13 la ecuación,

$$P_{30} = \frac{Q_2 Q_3 (\lambda_1 - \lambda_2)^2}{Q_2 \lambda_1^2 + Q_3 \lambda_2^2} \quad A14$$

La hipótesis común de que $P_{30} = P_3 = Q_3$ sería una sobreestimación dado que el error puede ser grande especialmente en los casos en que $Q_2 \simeq Q_3$ o $\lambda_1 \simeq \lambda_2$.

La aplicación de la ecuación A14 en los experimentos que se informan en esta tesis muestra que la corrección para los valores obtenidos en Q_3 es del 5%.

TABLA 7.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El protoescolex de *Echinococcus granulosus* es un componente muy peculiar del ciclo del parásito que bajo condiciones adecuadas puede evolucionar tanto hacia su etapa adulta de tenia o bien originar un quiste hidatídico.

Los estadios iniciales de este último proceso ocurren a partir de un término que se denominó vesiculización del protoescolex.

En contraste con los conocimientos morfológicos de dicho proceso, no existe información respecto de las modificaciones sufridas por los mismos en sus mecanismos de regulación del agua y electrolitos ni su compromiso con la actividad metabólica cuando comienza la vesiculización.

Los protoescólices de *Echinococcus granulosus* (variedad ovina) incubados in vitro en RK o en MEM a 37°C por períodos de 24 h sufrieron un gran incremento en sus contenidos de agua, sodio y cloruro. Dichos aumentos no eran debidos a un incremento del volumen del espacio atrapado en los tacos de centrifugación. Esto se verificó a partir de la medición de dicho espacio de dos maneras diferentes: lavado del mismo con solución de sacarosa 0.3 M a 4°C o medición del mismo con metoxiinulina H³. Observándose valores similares a lo largo de las 24 h de incubación. Se verificó que las concentraciones de agua y ClNa de los absorbatos eran similares a la de los medios de incubación. Se cuantificó el aumento del volumen de los protoescólices invaginados, a partir de la medición de sus diámetros mayor y menor asimilando su forma a la de un elipsoide de revolución prolato. Se encontró una alta correlación lineal y positiva entre el aumento de volumen de los mismos y la entrada del absorbato a los protoescólices. Los valores de los flujos netos de agua medidos a partir de ambos métodos fueron muy similares. Se estableció que la ouabaína (10⁻⁴M) no afecta el proceso de absorción de agua y ClNa asociado a la vesiculización.

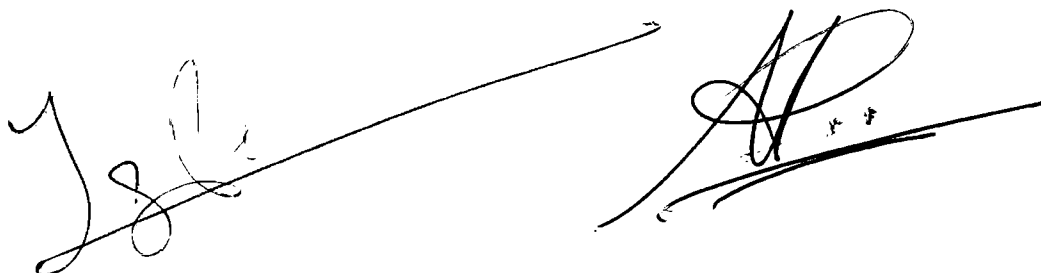
En contraste con estos incrementos el contenido de potasio, catión fundamentalmente intracelular, se mantuvo sensiblemente constante (estado estacionario) durante las 24 hs por lo que se lo usó como un parámetro para evaluar la integridad de los protoescólices. En esas condiciones se realizó un análisis compartamental del mismo con el objeto de estudiar su distribución a partir de la incorporación de K⁴². Se

observó que éste se distribuiría en por lo menos dos compartimientos, uno pequeño y de rápido intercambio y uno grande y lento. La distribución de los mismos en paralelo o en serie afecta relativamente poco el tamaño de los mismos.

De los primeros tiempos de incubación con K^{42} se calcularon los influjos de K tanto en condiciones control como en los tratados con ouabaina. Se observó que una importante fracción de la entrada total de potasio a los protoescólices estaría asociada a la actividad de una bomba Na K ouabaino-sensible previamente descrita por Reisin, Cantiello y Rotunno, 1977 (48). En protoescólices enriquecidos con sodio los influjos de K sufren un notable incremento respecto de los controles.

Lo mismo ocurrió en los incubados con ouabaina. Se comprobó que la misma no sólo disminuye los influjos sino que aumenta el eflujo de K. Se comprobó además la dependencia del contenido de Na interno (catión contraletal) en el influjo de potasio. Se evaluó las diferencias entre la regulación en el contenido de Na y K producida por la ouabaina y por el Ia o IA + CNK en términos de inaccesibilidad de la misma a los sitios de transporte o la posible existencia de otros sistemas de transporte, v.g. el escrito por Whittensburg y Proberbio (62). Se estudió además la relación existente entre el influjo de K y la concentración externa del mismo para caracterizar su sistema de transporte.

El influjo ouabaino inhibible es saturable y tiene una relación sigmoidea de orden exponencial cúbica con la concentración de potasio externa. El componente electrogénico debido a la actividad de la bomba daría cuenta de un tercio del influjo que es sensible a la ouabaina.

The image shows two handwritten signatures. The signature on the left is written in a cursive, flowing style. The signature on the right is more stylized and blocky. A long, thin arrow originates from the right side of the first signature and points towards the second signature.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Smyth, J.D. and Smyth, M.M. (1964). "Natural and experimental hosts of Echinococcus granulosus and E. multilocularis, with comments on the genetics of speciation in genus Echinococcus. Parasitology, 54, 494-514.
- 2- Mendy, R.M. (1975). "La Zoonosis hidatídica". Noticias Médico Veterinarias $\frac{1}{2}$ 126-191. Bayer Leverkusen.
- 3- Williams J.F., López Adaros, H. and Trejos, A. (1971). Current prevalence and distribution of hydatidosis with special referente to the Américas". The Am. Journal of Trop. Med. and Hygiene 20 N° 2. 224-230.
- 4- Read, C.P. (1978). "Parasitismo animal". pp 111-122. Campaña Editorial Continental S.A. México.
- 5- Greenway, D.F. 1952. "Zooparásitos y Zooparasitosis humanas". Universidad de Córdoba. 8° Ed. Córdoba.
- 6- Smyth, JD 1962. "Studies on tape worm physiology. X. Axenic cultivation of hydatic organism, Echinococcus granulosus; establishment of a basis technique. Parasitology, 57, III.
- 7- Smyth, J.D. 1967. "Studies on tape worm physiology. XI. "In vitro" cultivation of Echinococcus granulosus from protoscolecex to strobilake stage Parasitology 57 , III.
- 8- Smyth, J.D.; Howkins, A.B. y Barton, M. 1966. "Factors controllint the differentiation of the hydatic organism, Echinococcus granulosus into cystic or strobilar stage "in vitro", Nature 211. 1374.
- 9- Smyth, J.D., Miller, H.J. y Howkins, A.B., 1967. "Further analysos of the factors controlling strobilization, differentiation and maturation of Echinococcus granulosus "in vitro". Exp. Parasitol. 21-31.
- 10- Lee, D. 1966. "The structure and composition of the helmith cutiele". Adv. Parasitol. 4: 187-254.
- 11- Morseth, D.J. 1966. "The fine structure of the teguments of adult Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena, and Taenia pisiformis. Journal of Parasit. 52 N° 6. 1024-1035.
- 12- Morseth, D.J. (1967). "Fine structure of the hydatic cyst and protoscolex of Echinococcus granulosus". Journal of Parasitol. 53 N° 2, 312-325.
- 13- Read, C.P. y Simmons, J.E. 1963. The physiology and biochemistry of tapeworms. Physiol. Rev. 43: 203.

- 14- Lascano, E.F.; Coltori, E.A. and Varela Díaz, V.M. 1975. Fine structure of the germinal membrane of Echinococcus granulosus cysts. The Journal of Parasitology. 61: 853-860.
- 15- Carta, A.E.; Deiana, S. (1960). "Sistema escretore canalicolare acquifero in protoscolici di Echinococcus granulosus al microscopio a contrasto di fase". Parassitologia II 1-2. 63-80.
- 16- Krevs, E.G. y Najjar, V.A. 1946. "The inhibition of d-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by specific antiserum. J. Exp. med. 66, 569-577.
- 17- Barret, J. 1976. "Bioenergetics in helminths in Biochemistry of Parasites and Host Parasite relationships. 67-80. Van den Bossche. Ed. Elsevier/North Holland Biom. Press. Amsterdam.
- 18- Bryant C. and Behm C.A. 1970. "Regulation of respiratory metabolism in Momiezia expansa under aerobic and anaerobic conditions".
- 19- Flossner, O. 1924. Neue Untersuchungen über die Echinokokkus flüssigkeit. Z. biol. 80: 255-260.
- 20- Flossner, O. 1925. Neue untersuchungen über die Echinokokkus flüssigkeit. 2. Mitteilung. Z biol. 82: 297.301.
- 21- Codonnis, A. and Polydorés, J. 1936. Sur les constituants du liquide deskystedé hydatiques. Proc. Int. Longi. Comp. Pathol., 3rd Congress. Athens. 2: 195-202.
- 22- Emelik, S. 1952. Zur kenntnis der lipoiden an den Cysten membranen von Taenia Echinococcus. Z. Physiol. Chem. 289: 78-79.
- 23- Agosin, M. von Brand, T. Rivera, G.F. and Mc Mahon, P. (1957). "Studies on the metabolism of Echinococcus granulosus. I. general chemical composition and respiratory reactions". Exp. Parasit. 6: 37-51.
- 24- Agosin, M. 1957. Studies on the metabolism of Echinococcus granulosus II. Some observations on the carbohydrate metabolism of Hydatid. Cyst. Scolices". Exp. Parasit. 6: 586-593.
- 25- Agosin, M. and Repetto Y. 1965. "Studies on the metabolism of Echinococcus granulosus. VIII. The pathway of succinate in E. granulosus scolices". Comp. Bioch. Physiol. 14: 299-300.
- 26- Agosin, Moisés. (1959). "Biocquímica de Echinococcus granulosus". Biológica 28: 3-31.
- 27- Mc Manus, D.P. and Smyth J.D. (1978). "Differences in the chemical composition and carbohydrate metabolism of Echinococcus granulosus (horse and shepp strains) and E. multilocularis". 77: 103-109.

- 28- Solomos, T. 1977. Cyanide resistant respiration in higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 28: 279.
- 29- Reisin I.L. y C.A. Ibarra, 1980. "Existencia de una vía alternativa para el consumo de oxígeno en protoescólicas de Echinococcus granulosus. en prensa.
- 30- Bryandt, C. 1970. Electron transport in parasitic helminths and Protozoa. Advances in Parasit. 8: 139.
- 31- Read, C.P. Simmons, J.E.; Rothman, A.H., 1960. "Permeation and membrane transport in animal parasites; amino acid permeation into tapeworms from elasmobranchs". Journal of Parasit. 46, 33-51.
- 32- Michaelis, L. and Menten, M.L. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Ztchv. 49: 333-309.
- 33- Cereijido, M. y Rotunno, C.A. 1970. "Introduction to the study of Biological membranes (Edited by Gordon and Breach). Ch.3
- 34- Lineweaver, H. and Bunk, D. 1934, J. A.C.S. 56: 658.
- 35- Pappas, P.W. and Read, C.P. 1975. "Parasitological review: membrane transport in helminth parasites: A review". Exp. Parasit. 37: 409-530.
- 36- Kedem, O. (1960). "Criteria of Active Transport". Membrane Transport and metabolism. Proc. of a Symp. Praga, August. 22-27. Ac. Press.
- 37- Lumsden, R.D., Oaks, J.A. and Alworth, W.L. 1970. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. IV. Localization and cytochemical properties of membrane-fixed cation binding sites. Journal of Parasit. 50: 730-747.
- 38- Threadgold, L.T. and Arne, C. (1974). "Hymenolepis diminuta? An electron microscope study of ion absorption". Exp. Parasit. 35: 475-491.
- 40- Lehninger, A.L. 1969. Acid-base changes in mitochondria and medium during energy dependent and energy independent binding of Ca^{++} . Annals of the New York Ac. of Sci. 147: 816-823.
- 41- Colli, C.W. and Schantz, P.M. 1974. "Growth and development of Echinococcus granulosus from embryophores in an abnormal host (mus musculus) .Journal of Parasit. 60: N° 1. 53-58.
- 42- Varela Díaz, V.M.; Williams, J.F., Coltorti, E.A. and Williams C.S.F. 1974. Survival of cysts of Echinococcus granulosus after transplant into homologous and heterologous hosts. Journal of Parasit. 60: 608-612.

- 42- Schwabe, C.W. 1959. Host-parasite relationship in echinococcosis. I. Observations on the permeability of the hydatid cyst wall. *Journal of Trop. med. and Hyg.* 3: 20-28.
- 43- Schwabe, C.W.; Koussa, and Acra, A.M. 1961. "Host-parasite relationships in echinococcosis. V. Acetylcholinesterase and permeability regulation in the hydatid cyst wall". *Comp. Bioch, Physio.* 2: 161-172.
- 44- Rotunno, C.A.; Kammerer, W.S. Pérez Esandi, M.V.; Cerejido, M. 1974. "Studies on the permeability to water, sodium, and chloride of the Hydatid cyst of Echinococcus granulosus. *Journal of Parasit.* 60 N° 4. 613-620.
- 45- Reisin I.L., Rabito C.A., Rotunno C.A. and Cerejido, 1977. The permeability of the membranes of experimental secondary cysts of Echinococcus granulosus to (C¹⁴) mebendazole. *Int. Journal for Parasitol.* 7: 189-194.
- 46- Smyth, J.D. & Davies, Z. 1974. Occurrence of physiological strains of Echinococcus granulosus demonstrated by in vitro culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. *International Journal for Parasitology.* 4: 443-445.
- 47- Bray, G.A. 1960. A simple efficient scintillator for counting aqueous solution in a liquid scintillation counter. *Analytical Biochemistry.* 1: 279-285.
- 48- Reisin, I.L.; Cantiello, H.F. y Rotunno, C.A. 1977. "Active transport of sodium and potassium in protoscoleces of Echinococcus granulosus. Ier Simposio Internacional de Parasitología. Santiago de Chile.
- 49- Reisin, I.L. and Rotunno, C.A. (1980). "Water and electrolyte balance in protoscoleces of Echinococcus granulosus incubated in vitro. I- general procedures for the determination of water, sodium, potassium, and chloride in protoscoleces". *International Journal for Parasitol.* In Press.
- 50- Kerman, R.P. 1965. "Cell K Butter Worth Inc. Bittar Ed.
- 51- Dévé, 1901. "Sur la transformation des Scolex en cysts echinococciques". *Comp. Rend. Soc. Biol. Paris,* 53: 298.
- 52- Dévé, 1902. "Sur l'évolution cystique du scolex echinococcique". *Arch. Parasit,* 0: 54.
- 53- Dévé, F. 1946. "L'échinocose secondaire". Masson et cie y Paul Duval, Paris.
- 54- Smyth, J.D.; Howkins, A.B. and Barton, M. 1966. Factors controlling the differentiation of hydatid organism Echinococcus granulosus into cystic or strobilar stages in vitro. *Nature.* 211: 1374-1377.

- 55- Coutelén, F.; Biquet, J. Doby, J.m. y Deblock, St. 1952. "Le système musculaire du scolex". Ann. Parasit. Hum. Comp. 27: 80.
- 56- Mazzocco, P., 1923. "Composition du liquide hydatique". Compt. Rend. Soc. Biol. Paris, 88: 342.
- 57- Wilson, R.A. 1909. "The fine structure of the protonephridial system in the miracidium of Fasciola hepatica". Parasitology, 59: 461.
- 58- Reisin, I.L., Rabito C.A. and Cantiello H.F. (1980). Water and electrolyte balance in protoescoleces of Echinococcus granulosus incubated in vitro. II. Effect of metabolic inhibitor. International Journal for Parasitol. In press.
- 59- Solomon, A.K. (1960). "Compartmental Methods of Kinetic Analysis". Mineral metabolism and advanced treatise. Volume I. Part A. Chapter 5. Ac. Press.
- 60- Podesta, R.B. 1977. a. Hymenolepis Diminuta. Electrolyte transport pools of tissues and metabolic inhibitors. Experimental Parasitology. 43: 295-306.
- 61- Pappas, P.W., Uglem, G.L. & Read, C.P. 1973. Taenia Crassiceps: Absorption of hexoses and partial characterization of Na⁺ dependent glucose absorption by larvae. Experimental Parasitology, 33: 127-137.
- 62- Whittembury, G. & Proverbio, F. 1970. Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. Pflügers Archiv. European Journal of Physiology. 316: 1:25.
- 63- Sachs, J.R. y L. G. Welt. 1967. "The concentration dependence of active potassium transport in the human red blood cells". J. of Clinical Inv. 46 N° 1.
- 64- Cantiello, H.F., Ibarra, C.A., Reisin, I.L. (1980). Flujos de K y potenciales eléctricos a través de las membranas de Echinococcus granulosus incubados "in vitro". Presentado en IX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Bermejo. Mendoza 17-20-10-1980.
- 65- Huxley, A.F. (1960). Compartmental methods of kinetic analysis Ch. 5. Ap. II. in Mineral metabolism and advanced treatise. Vol. I. Ac. Press.
- 66- Atkins. G.L. (1969). "Multicompartment models for biological system". Methuen & Co. Ltd.

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

A_0	Actividad o velocidad de desintegración al $t=0$ (CPM)
A	Actividad o velocidad de desintegración al $t=t$ (CPM)
Ci:	Curie
mCi:	milicurie
μ Ci:	microcurie
F=	96500 coulombs/mol
gp.s.:	gramo de peso seco
I_{in} :	Influjo
J_{out} :	Eflujo
I_n :	Flujo neto
J_a^x	Flujo activo de la sustancia x
J_{max}^x :	Flujo máximo de la sustancia x
J_{ij} :	Flujo de la sustancia x desde el compartimiento i al j en μ moles/g p.s.h o μ moles/cm ² seg.
λ_{ij} :	Constante de velocidad del compartimiento i al j.
P:	Cantidad de trazador μ Ci
P_t :	Cantidad total de trazador μ Ci
P_i :	Cantidad de trazador en el compartimiento i
p:	Concentración del trazador μ Ci/ml
p^* :	Actividad específica del trazador Ci/ μ mol
p_i :	Actividad específica del trazador en el compartimiento i.
Q:	Cantidad de sustancia μ moles.
Q_t :	Cantidad total de sustancia.

Q_i : Cantidad de sustancia en el compartimiento i
 R : $0.082 \text{ } ^\circ\text{K/mol}$
 t : tiempo
 T : temperatura $^\circ\text{K}$
 V : voltio
 mV : milivoltio
 ΔV : diferencia de potencial eléctrico
 x_i : valor de la variable x en el compartimiento i .
 x_{i0} : valor de la variable x en el compartimiento i a tiempo 0 .
 x_i valor de la variable x en el compartimiento i a tiempo infinito.



ARTICULO 11º) La Facultad no se hace solidaria de las opiniones
vertidas en una Tesis.

