

# Estudio Morfocuantitativo de Protoescólices y otras Estructuras Fundamentales de *Echinococcus granulosus* en Hospederos Humanos

## Morphoquantitative Study of Protoscolices and other Fundamental Structures of *Echinococcus granulosus* in Human Hosts

Bélgica Vásquez<sup>1</sup>; Claudio Rojas<sup>2,3</sup> & Carlos Manterola<sup>2,3</sup>

VÁSQUEZ, B.; ROJAS, C. & MANTEROLA, C. Estudio morfocuantitativo de protoescólices y otras estructuras fundamentales de *Echinococcus granulosus* de hospederos humanos. *Int. J. Morphol.*, 40(6):1630-1640, 2022.

**RESUMEN:** La equinococosis quística (EQ) a pesar de ser una enfermedad endémica en diversos lugares del planeta, presenta pocos estudios morfológicos y cuantitativos de las estructuras fundamentales del *Echinococcus granulosus* en humanos, en especial de los protoescólices. El objetivo de este estudio fue analizar morfocuantitativamente protoescólices y otras estructuras fundamentales de *E. granulosus* obtenidos de hospederos humanos. Estudio de corte transversal. Se estudiaron 8 especímenes de EQ hepática humana, aplicando un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se evaluó las capas quísticas, el líquido y la arenilla hidatídica. Las capas fueron fijadas en formaldehído tamponado a 10 % y procesadas para su inclusión en paraplast. Se realizaron cortes de 5 µm de grosor y fueron teñidas con H-E para su análisis con microscopía óptica. El líquido y arenilla fueron centrifugados y al sedimento obtenido se le realizó análisis directo para determinar las medidas morfométricas de los protoescólices y de los ganchos grandes y pequeños. Se utilizó estadística descriptiva. De los 8 quistes estudiados, 6 eran quistes univesicular, uno multivesicular y un quiste abscedado, cuyas capas laminada y germinativa se encontraban bien definidas. Las vesículas prolíferas presentaban forma redondeada con protoescólices en su interior. Los protoescólices invaginados presentaron un largo y ancho promedio de  $140,8 \pm 34,3$  µm y  $106,2 \pm 29,5$  µm, respectivamente; y los desarrollados un largo de  $237,2 \pm 53,0$  µm y ancho de  $128,7 \pm 32,0$  µm. Los ganchos rostelares presentaron contornos suaves distribuidos en dos filas regulares. El promedio del largo total de los ganchos grandes y pequeños fue  $20,1 \pm 2,7$  µm; el promedio del ancho total fue  $7,4 \pm 1,2$  µm. En conclusión, las características morfocuantitativas de los ganchos de *E. granulosus* en humanos, son distintos a otras especies hospederas intermediarias y de otros *Echinococcus* spp. Es posible que el abandono del estado de resistencia de los protoescólices invaginado hasta su desarrollo genere implicancias epidemiológicas de interés.

**PALABRAS CLAVE:** *Echinococcus granulosus*; Protoescólices; Echinococosis; Hidatidosis; Quiste hidatídico.

## INTRODUCCIÓN

La equinococosis quística (EQ), es causada por el estado larvario del *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*), cestodo parásito del phylum *Platyhelminthes*; cuya plasticidad del citoesqueleto le permite entrar y desarrollarse en el interior de sus huéspedes, completando así su ciclo de vida (La-Rocca *et al.*, 2019). A partir de la capa germinativa interna de los quistes, se generan los protoescólices, que son las formas infectantes para el perro y otros cánidos que constituyen los huéspedes definitivos de la enfermedad.

La EQ es una zoonosis parasitaria crónica, generalmente asintomática, que se diagnostica de manera fortuita, a través de diversas pruebas diagnósticas; y cuyo tratamiento es predominantemente quirúrgico (Manterola *et al.*,

2017). Diversas estrategias han sido utilizadas para el control epidemiológico de la enfermedad, desde campañas de educación escolar; tamizaje ultrasonográfico, inmunológico y molecular; a inmunoprofilaxis y tratamientos antiparasitarios masivos en animales (Larrieu *et al.*, 2019).

Los protoescólices se han estudiado mediante microscopía óptica y algunas tinciones como azul tripán, faloidina, etc, permitiendo visibilizar sus estructuras internas, tales como las ventosas, que exhiben una importante musculatura compuesta por un conjunto de fibras radiales, los corpúsculos calcáreos, la corona de ganchos y el rostelo con los filamentos de actina F que se encuentran dispuestos en forma bulbar con perforaciones que parecen ser lugares de unión de los ganchos (La-Rocca *et al.*, 2019).

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

<sup>2</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>3</sup> Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Lamentablemente existen pocos estudios relacionados con la morfología y morfometría de los protoescólices del *E. granulosus* de hospederos humanos (Wen *et al.*, 2019).

El objetivo de este estudio fue realizar un análisis morfofocuantitativo de protoescólices y otras estructuras fundamentales de *E. granulosus* de hospederos humanos.

El reporte de resultados de este estudio se realizó siguiendo la propuesta MInCir-EOD (Manterola & Otzen, 2017).

## MATERIAL Y MÉTODO

**Diseño:** Estudio de corte transversal.

**Escenario:** El uso del estudio se realizó en el Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), de la Universidad de La Frontera, Chile, entre abril y julio de 2022.

**Participantes:** Se incluyeron muestras de EQ humana de localización hepática, obtenidas de pacientes operados en Clínica RedSalud Mayor y Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco entre abril de 2021 y agosto de 2022. No se contemplaron criterios de exclusión.

**Variables resultado:** Dimensión de estructuras fundamentales de *E. granulosus*: protoescólices, ganchos grandes (GG) y pequeños (GP).

**Otras variables de interés:** Volumen del líquido del quiste estudiado, presencia de comunicaciones biliares y tipo de quiste (univesicular, multivesicular o abscedado).

**Sesgos:** Se minimizaron sesgos de selección y medición utilizando enmascaramiento en la recopilación de datos (Manterola & Otzen, 2015).

**Muestreo y tamaño de la muestra:** Se utilizó una estrategia de muestreo no probabilístico por conveniencia (Otzen & Manterola, 2017).

**Métodos estadísticos:** La recopilación de datos fue realizada por investigadores independientes, y fueron almacenadas en una base de datos utilizando el programa SPSS 21 para MAC (Yosemite)®. Se aplicó un análisis exploratorio de datos, luego se utilizó estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y dispersión (promedios, desviación estándar, valores mínimos y máximos).

**Protocolo de trabajo:** Durante el transcurso de cada inter-

vención quirúrgica, la viabilidad de los quistes fue definida por los cirujanos en base a sus características macroscópicas, clasificándolos en tres tipos: quiste univesicular (QUV) compuesto por una capa germinativa única y una cantidad variable de líquido tipo "agua de roca" en su interior; quiste multivesicular (QMV) formado por una cantidad de germinativa variable y vesículas hijas; y quistes abscedados (QA) compuestos habitualmente de material germinativo semi-digerido y abundante material purulento de mal olor (Manterola & Urrutia, 2005). Luego los quistes y sus contenidos fueron extraídos y almacenados por separado en recipientes estériles a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron procesadas con el mismo protocolo dentro de las dos horas posteriores a su extracción en el CEMyQ de la Universidad de La Frontera, Chile.

**Protocolo de laboratorio:** Se evaluaron las capas quísticas y sus elementos internos, el líquido y la arenilla hidatídica. Para el análisis de las capas quísticas y sus elementos internos se tomaron de manera aleatoria distintas muestras de cada quiste, los que fueron fijados en formalina tamponada al 10% durante 48 horas y procesados según protocolo histológico convencional para inclusión en Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor los que fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) para observación en un microscopio óptico (Leica® DM 750) y fotografiados con cámara digital (Leica® ICC50 HD). Se evaluaron las características de las capas quísticas (laminada acelular y germinativa); así como sus elementos internos: vesículas prolíferas y protoescólices, considerando corpúsculos calcáreos, ganchos rostelares (GR), etc. Además, se determinó el grosor de la capa laminada. Respecto al líquido y la arenilla hidatídica, se les midió el volumen en un recipiente graduado, y posteriormente fueron centrifugados tres veces a 3000 rpm durante 5 minutos. El sedimento obtenido fue analizado por observación directa (entre lámina y cubreobjeto) en un microscopio óptico (Leica DM 750) para determinar la presencia de vesículas prolíferas y protoescólices. Se clasificaron los estados de desarrollo de los protoescólices libres considerando lo siguientes: 1. Protoescólice invaginado; 2. Protrusión del polo apical o rostelar; 3. Protrusión de ventosas; 4. Escólex levemente distinguible evaginado; 5. Rostelo y ventosas visible evaginados; 6. Escólex diferenciado y cuello ovalado; 7. Escólex diferenciado y cuello se alarga; 8. Protoescólice desarrollado libre (Fig. 1). De cada estado de desarrollo, se obtuvieron sus principales medidas morfométricas. En los protoescólices invaginados su largo (medida de polo rostelar a basal) y ancho total (medida más amplia transversal al eje anterior). En los protoescólices en desarrollo, el largo total corresponde a la medida del eje desde el polo apical a la basal; el ancho total a la medida transversal entre

los márgenes externo de la zona de las ventosas, y coincide con el ancho del escólex; el largo de rostelo es la medida desde el polo apical al inicio del promontorio de las ventosas, y su ancho se determinó entre los límites internos de la corona de ganchos; el largo del escólex del polo rostelar a la depresión que marca la transición entre las ventosas e inicio del cuello; finalmente el largo del cuello a la medida desde la depresión que marca la transición ventosas-cuello al polo basal del cuello, y su ancho la medida transversal

entre los límites externos del cuello (Fig. 2). También se determinó la longitud y ancho total de GG y GP que se encontraban libres (Fig. 3). Para el análisis morfométrico, se utilizó el Software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

**Ética:** Este estudio contempla el uso de muestras de material biológico de deshecho. De todos modos, se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

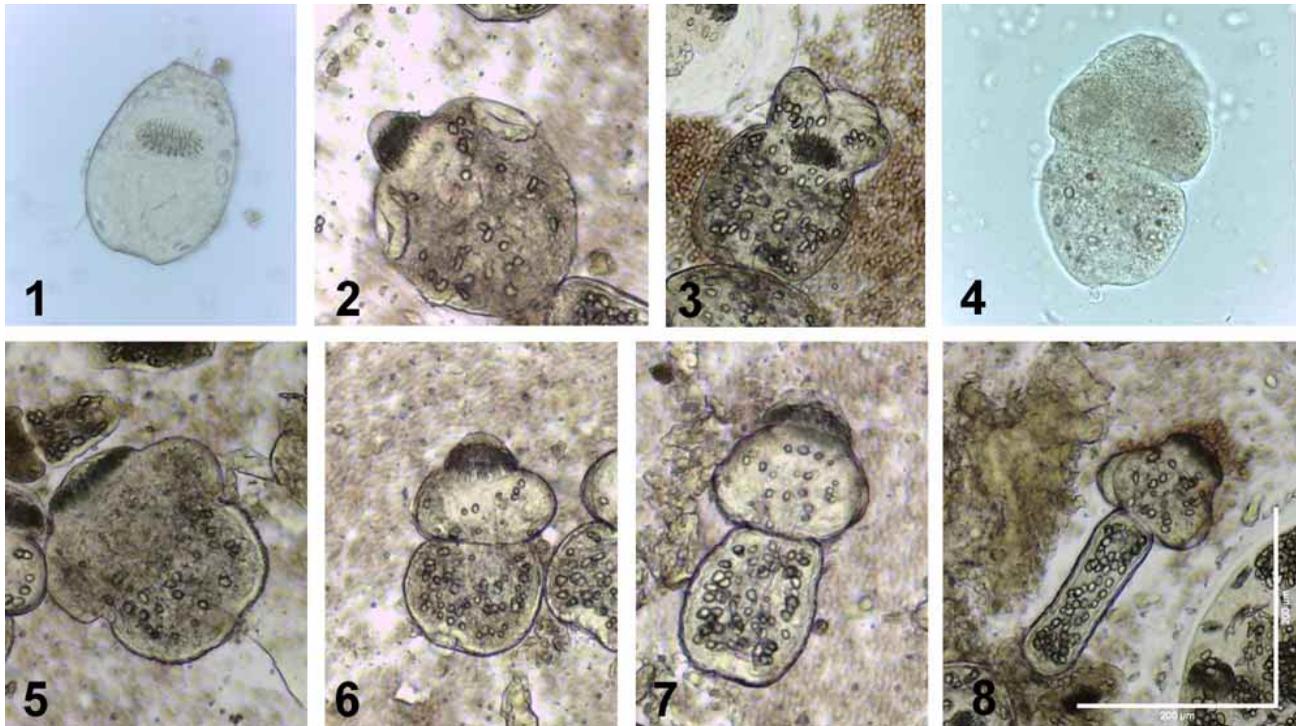


Fig. 1. Protoescólices de *Echinococcus granulosus* procedentes de hígado humano. 1. Protoescólice invaginado; 2. Protrusión del polo apical o rostelar; 3. Protrusión de ventosas; 4. Escólex levemente distinguible evaginado; 5. Rostelo y ventosas visible evaginados; 6. Escólex diferenciado y cuello ovalado; 7. Escólex diferenciado y cuello se alarga; 8. Protoescólice desarrollado libre.

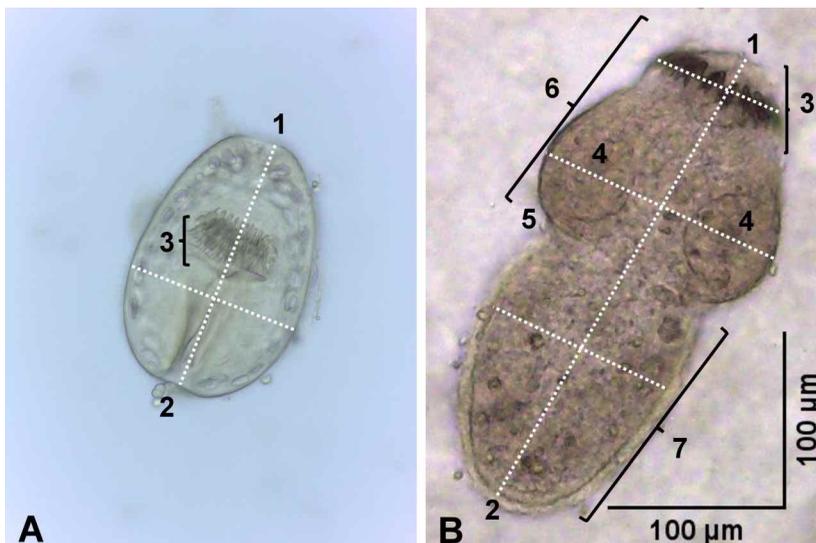


Fig. 2. Protoescólices de *Echinococcus granulosus* procedentes de hígado humano. A. Protoescólex invaginado. B. Protoescólex maduro o desarrollado: 1: polo apical o rostelar; 2: polo basal o peduncular; 3: rostelo; 4: ventosas; 5: depresión transición ventosas-cuello; 6: escólex; 7: cuello. Punteado blanco: ejes de medida morfométrica. Directo de sedimento de arenilla hidatídica.



Fig. 3. Ganchos libres de protoescólices de *Echinococcus granulosus* procedentes de hígado humano. A. Estructura de ganchos: 1: mango; 2: hoja; 3: promontorio. B. Medida morfométrica en ganchos libres. Directo de sedimento de arenilla hidatídica.

## RESULTADOS

Ocho quistes hidatídicos y sus contenidos fueron obtenidos de 8 pacientes operados por EQ hepática. El promedio de edad de los pacientes fue 39,8 años (25 a 67 años). Cuatro de ellos eran mujeres. De los 8 quistes estudiados, 6 eran QUV; uno, QMV; y un QA.

Los quistes estudiados evidenciaron capas quísticas laminada y germinativa bien definidas, con características macroscópicas de bordes irregulares y aspecto rugoso. Los QUV presentaron un diámetro promedio de 14 cm (8 a 20 cm) y un volumen promedio de 1,66 L (1,3 a 2,5 L). El líquido hidatídico presentaba apariencia clara y transparente; y en algunos casos, levemente turbio. El QMV presentó un diámetro de 15 cm, con un volumen de 1,5 L; el líquido hidatídico era amarillento, debido a cristales de

colesterol y a la existencia de una comunicación biliar. El QA presentó un diámetro de 20 cm y un volumen de 0,8 L; con un color blanquecino, opaco. Las medidas morfométricas de las estructuras de los quistes estudiados se resumen en la Tabla I.

El análisis histológico mostró que la capa laminada se encontraba formada por una matriz de fibras dispuestas paralelamente entre sí, que presentó un grosor variable cuyo promedio fue  $177,4 \pm 77,2 \mu\text{m}$  (123 a  $301 \mu\text{m}$ ); siendo, más gruesa en los QA. La capa germinativa, se observó más delgada y muy próxima a la laminada, de fácil desprendimiento. Con H-E fue posible observar corpúsculos calcáreos y ganchos, aunque estos últimos no se colorearon con esta tinción (Fig. 4).

Tabla I. Características morfocuantitativas de quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus* proveniente de hígado humano.

N°	Características macroscópicas de los quistes				Protoescólices invaginado		GG		GP	
	Tipo	Diámetro (cm)	N° de CB	Volumen (L)	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Largo total ( $\mu\text{m}$ )	Ancho total ( $\mu\text{m}$ )	Largo total ( $\mu\text{m}$ )	Ancho total ( $\mu\text{m}$ )
1	QUV	14	1	1,4	$116,9 \pm 21$	$100 \pm 19$	$22 \pm 0,9$	$8,1 \pm 1$	$18,7 \pm 1,9$	$7,3 \pm 1$
2	QUV	8	0	1,3	$113,9 \pm 21$	$116 \pm 30$	$21,5 \pm 0,7$	$8,1 \pm 0,9$	$17,7 \pm 2,3$	$6,5 \pm 0,9$
3	QUV	9	0	1,3	$147,1 \pm 20$	$133 \pm 20$	$23 \pm 1$	$7,9 \pm 1,4$	$16,4 \pm 2$	$6,2 \pm 1,1$
4	QUV	20	1	1,8	$147,9 \pm 42$	$99 \pm 33$	$22,2 \pm 1,4$	$7,6 \pm 1$	$18 \pm 2,1$	$7 \pm 1,4$
5	QUV	18	0	1,7	$155,2 \pm 37$	$104 \pm 35$	$21,7 \pm 1$	$7,8 \pm 1$	$18,5 \pm 2,4$	$6,7 \pm 1,3$
6	QUV	25	1	2,5	$151,8 \pm 45$	$100 \pm 29$	$22,2 \pm 0,9$	$7,8 \pm 0,9$	$18 \pm 2,2$	$7,1 \pm 1,2$
7	QMV	15	1	1,5	$133,3 \pm 51$	$102 \pm 43$	$22,1 \pm 0,8$	$7,2 \pm 1,2$	$17,2 \pm 2,1$	$6,5 \pm 1,4$
8	QA	20	1	0,8	$160,2 \pm 37$	$95,9 \pm 27$	$22,5 \pm 1,5$	$8,0 \pm 1,4$	$19,7 \pm 2,2$	$7,5 \pm 0,9$

CB: comunicación biliar del quiste; QUV: quiste univesicular; QMV: quiste multivesicular; QA: quiste abscedado; GG: ganchos grandes; GP: ganchos pequeños. Los valores están reportados en promedios y desviación estándar.

En el análisis del directo del líquido y la arenilla hidatídica, las vesículas prolíferas presentaban forma redondeada con protoescólices en su interior (Fig. 5A). En algunos casos, fue posible observar el proceso de apertura o ruptura de la pared de las vesículas prolíferas, dejando los protoescólices expuestos en forma de racimos. En las vesículas abiertas fue posible observar protoescólices adheridos por un tallo o pedúnculo a la capa germinativa de la vesícula prolífera (Fig. 5 B-E).

Los protoescólices invaginados, en número de 3 a 15 por campo, presentaban un aspecto ovoide; en su interior las ventosas, el róstelo con ganchos y corpúsculos calcáreos

se visualizaban fácilmente. Los protoescólices desarrollados presentaron características morfocuantitativas diversas, que dependieron de su estado de desarrollo (Fig. 6). Las medidas morfométricas en los diferentes estados de maduración del protoescólices se resumen en la Tabla II.

Los GR de los protoescólices presentaron contornos suaves y se distribuyeron en dos filas regulares. Cada gancho presentó un mango, una hoja y un promontorio o talón en la zona media, con una forma característica de “daga árabe”. El promedio del largo total de los ganchos grandes y pequeños fue  $20,1 \pm 2,7 \mu\text{m}$ ; el promedio del ancho total fue  $7,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$ .

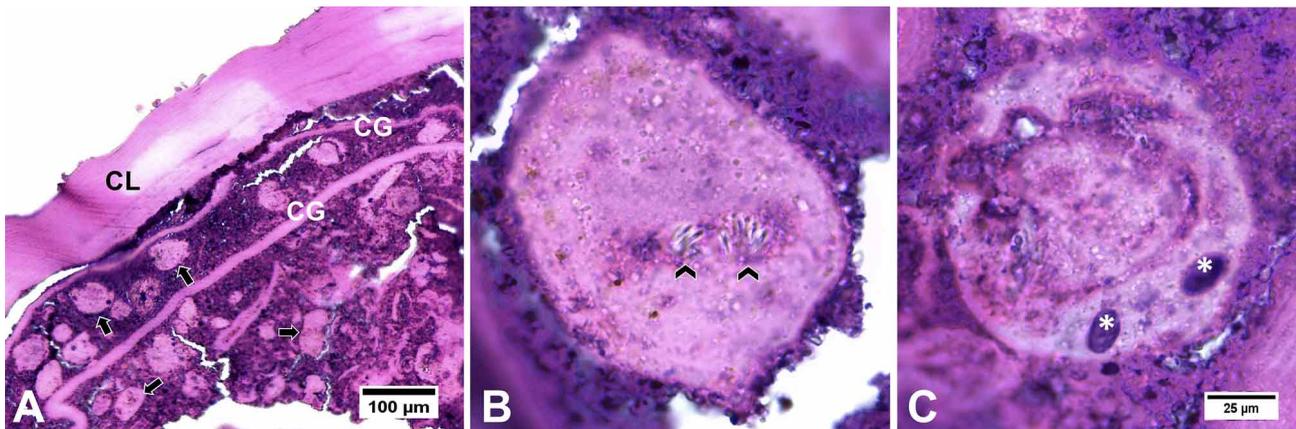


Fig. 4. Quiste de *Echinococcus granulosus* procedente de hígado humano. A. Quiste univesicular; B y C. Protoescólices invaginados; CL: capa laminada; CG: capa germinativa; flechas: protoescólices; punta de flecha: ganchos; asterisco: corpúsculos calcáreos. Tinción H-E.

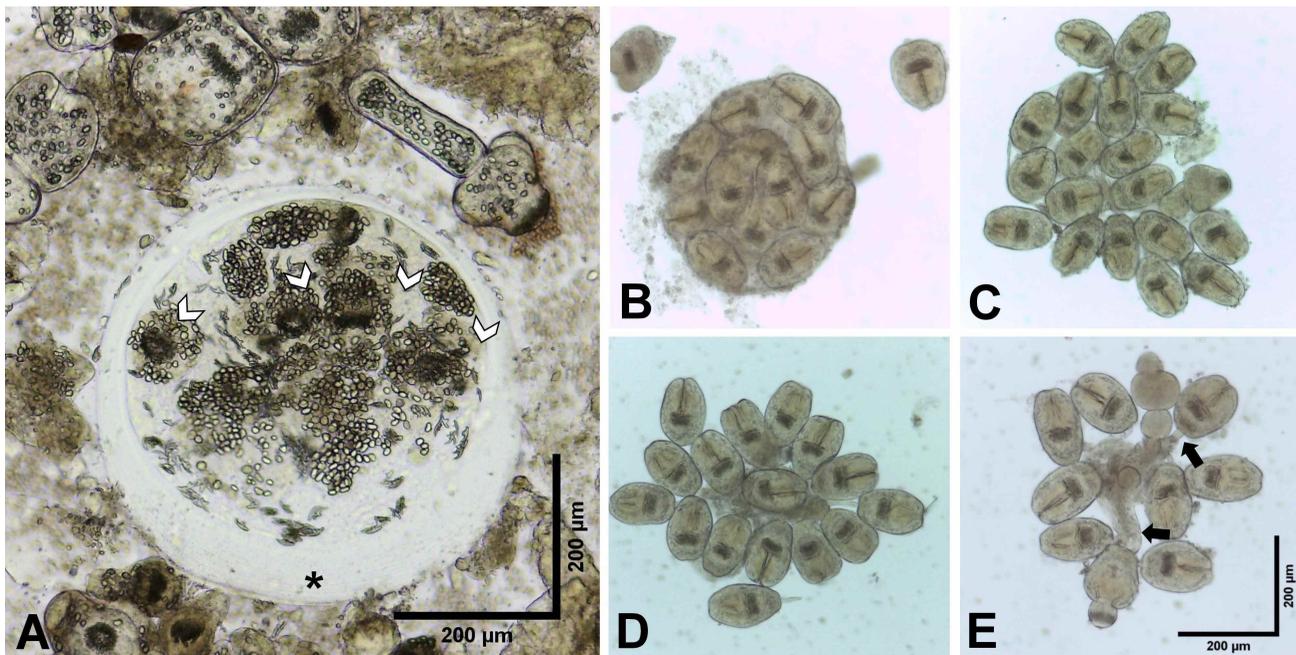


Fig. 5. Vesículas prolíferas de *Echinococcus granulosus* procedente de hígado humano. A. Vesícula prolífera cuya capa laminada se encuentra bien desarrollada (\*). B-E. Proceso de ruptura de la vesícula prolífera y liberación de protoescólices. Flechas blancas: protoescólices. Flechas negras: pedúnculos. Directo de sedimento de arenilla hidatídica.

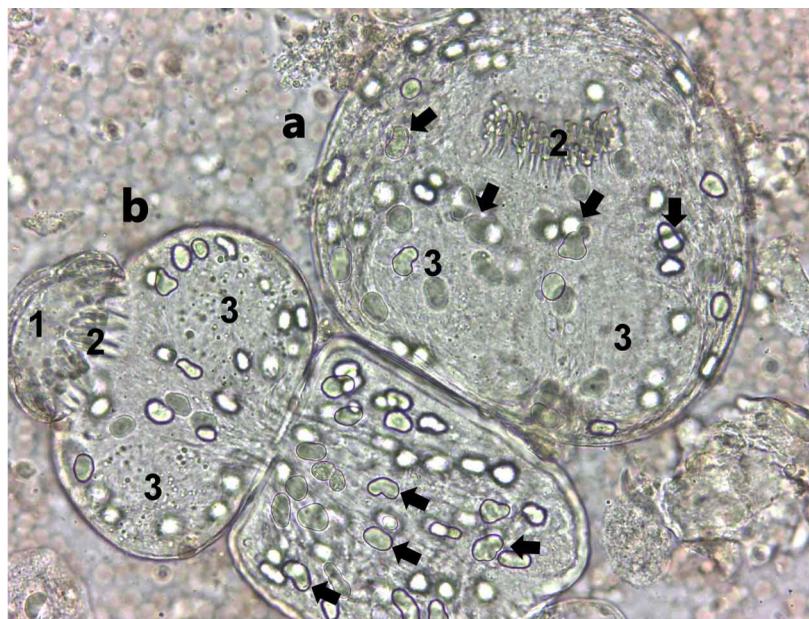


Fig. 6. Protoescólices de *Echinococcus granulosus* procedente de quiste univesicular de hígado humano. Se observa un protoescólice invaginado con rostellum y ventosas, (a) estado I y un protoescólice desarrollado, (b) estado 7. 1: rostellum, 2: ganchos, 3: ventosas, flechas: corpúsculos calcáreos. Directo de sedimento de arenilla hidatídica.

Tabla II. Medidas morfométricas según estado de desarrollo de protoescólices de *Echinococcus granulosus* procedente de hígado humano.

Estado*	Nº	Protoescólices		Rostelo		Escólex	Cuello	
		Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	58	140,8 ± 34,3	106,2 ± 29,5	-	-	-	-	-
2	3	145,0 ± 43,4	107,8 ± 42,9	38,9 ± 35,5	33,2 ± 29,7	-	-	-
3	9	174,0 ± 23,4	111,1 ± 13,0	11,4 ± 22,6	8,2 ± 16,6	34,5 ± 41,7	34,9 ± 41,5	38,3 ± 45,5
4	10	167,3 ± 21,7	101,2 ± 11,4	3,4 ± 10,6	5,0 ± 15,9	76,2 ± 32,5	79,4 ± 19,4	85,0 ± 20,0
5	6	150,4 ± 13,1	84,4 ± 13,6	17,5 ± 14,1	35,7 ± 28,2	71,0 ± 10,4	71,5 ± 3,5	79,4 ± 9,4
6	4	173,0 ± 35,3	97,5 ± 31,9	33,0 ± 4,3	55,4 ± 9,6	78,8 ± 27,8	85,9 ± 14,6	79,0 ± 33,5
7	7	181,9 ± 49,7	103,6 ± 28,0	31,4 ± 6,3	57,2 ± 13,2	83,6 ± 35,4	85,8 ± 28,4	79,4 ± 19,7
8	15	237,2 ± 53,0	128,7 ± 32,0	27,4 ± 7,1	63,2 ± 15,1	114,3 ± 25,3	121,7 ± 28,2	92,4 ± 26,4

\* 1. Protoescólice invaginado; 2. Protrusión del polo rostellar sin pérdida de continuidad; 3. Inicio evaginación con apertura del polo rostellar; 4. Escólex levemente distinguible evaginado; 5. Rostelo visible evaginado; 6. Rostelo y ventosas visibles evaginadas; 7. Protoescólice diferenciado con cuello ovalado; 8. Protoescólice desarrollado libre. Los valores están reportados en promedios y desviación estándar.

## DISCUSIÓN

Las especies del género *Echinococcus* pueden diferenciarse por múltiples características morfológicas presentes en la constitución del cestodo en su estado adulto o larvario. Sin embargo, comparten características morfológicas que los definen como especies (Nakao *et al.*, 2013). De manera general, se puede señalar que un quiste hidatídico está constituido externamente por una capa adventicia celular fibrosa que proviene del huésped y cuya función es proteger al hidátide de la respuesta inmune y de

la fuga de elementos. Hacia el interior se encuentra la capa laminada acelular del parásito que sirve de sustento a células cuboidales altas y claras que forman la capa germinativa interna del quiste (Rojas & Manterola, 2021). Esta capa celular da origen a prolongaciones tenues que constituyen el origen y el revestimiento de las vesículas prolíferas, de las que emergen múltiples estructuras ovoides o redondeadas, denominadas protoescólices (estado infectante que dará origen a un nuevo cestodo en el intestino del hospedero defini-

tivo), unidas por un delgado tallo o pedúnculo a la vesícula prolígera, pudiendo también quedar libres en el líquido hidatídico formando parte de la arenilla hidatídica.

El análisis histopatológico del quiste hidatídico y citológico de la arenilla de *E. granulosus*, mostró que algunas vesículas prolíferas presentaban una capa laminada bien definida y de mayor grosor al reportado en *E. oligarthrus* (Rodríguez *et al.*, 2000).

En el interior de los protoescolices se encontraban los GR dispuestos en dos filas, que con tinción H-E, se observan de color amarillo transparente (Smith & Richards, 1993); su visualización fue más adecuada en el análisis directo entre lámina y cubreobjeto, sin tinción especial.

Tanto los GG como los GP tienen un mango, una hoja y un promontorio o talón en la zona media (Smyth & Smyth, 1964). Las medidas de los GR varían según especie, información que permite ser utilizada para la identificación de las mismas (Rajabloo *et al.*, 2012). Se describe que los protoescolices invaginados de *E. vogeli* presentan pequeños GR de una longitud total de 32,5 a 34,0 mm; para *E. oligarthrus* una longitud de 25,4 a 27,3 mm; para *E. multilocularis* una longitud total de 23,1 a 24,4 mm; y finalmente *E. granulosus* presentan una longitud total de GR de 22,6 a 27,8 mm (WHO & OIE, 2002). Así, desde un punto de vista taxonómico, la morfometría larva-gancho es un método válido para identificar *E. granulosus* (Almeida *et al.*, 2009). No obstante, las diferencias fenotípicas de cada especie suelen reportarse principalmente por las características cuantitativas de las estructuras, priorizando las medidas morfométricas de los GR (Gordo & Bandera, 1997).

En un estudio realizado en Colombia sobre características morfológicas de *Echinococcus* spp., se verificó que la morfología, longitud total, y relación entre la hoja y el mango de los ganchos permiten diferenciar a *E. oligarthrus* (proveniente de *Proechimys* c.f. *guairae*, rata espinosa), de las otras especies de *Echinococcus* (Rodríguez *et al.*, 2000). En un estudio realizado en India, se constató que independiente de la especie hospedadora, aislamientos de genotipos G1, G2 y G3 se agrupan en dos líneas de GG y GP, en contraste con aislamientos de G5 en que los ganchos son morfométricamente más grandes (Pednekar *et al.*, 2009). En un estudio iraní, se compararon las características de los ganchos de 25 aislamientos obtenidos de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y de 3 experimentales de cestodo adulto en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*); observándose protoescolices de características similares, con dos filas de GG y GP alternados, y de contornos suaves; pero los GR de parásitos adultos mostraron un contorno áspero; con diferencias entre ovejas y camellos, en el número de ganchos,

la longitud total, de la hoja de los GG y GP (Hosseini *et al.*, 2012). En el mismo país un estudio con quistes de *E. granulosus* recuperados de hígados de camellos y ovejas domésticas y salvajes; se verificó que los GR de los protoescolices de ovejas salvajes y domésticas eran de contornos ásperos, a diferencia de los ganchos de camellos que presentaban contornos suaves; además, que la longitud total y la longitud de la hoja de los GG y GP era similares entre oveja salvajes y domésticas; pero que existían diferencias significativas, entre ovejas salvajes y camellos domésticos (Eslami *et al.*, 2016).

Por otro lado, en otro estudio iraní, se observó que en muestras de ganado con genotipos G1 y G3, las medidas de los ganchos fueron similares, independientemente del tipo de hospedero (Hosseini & Eslami, 1998).

Finalmente, en un estudio realizado en Neuquén, Argentina, en el que se analizaron 1780 ganchos de 36 aislamientos de ovejas (n=11, G1), cabras (n=10, G6), bovinos (n=5, G6) y cerdos (n=10, G7); se verificó que el punto de corte fue 26,5 mm (Soriano *et al.*, 2015).

La Tabla III, resume la información relacionada con mediciones morfométricas de los GG y GP en hospederos intermediarios animales (Rodríguez *et al.*, 2000; Latif *et al.*, 2010; Hosseini *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014; Eslami *et al.*, 2016). Las variaciones en las mediciones que se observan en los componentes de los quistes pudieran explicarse por la adaptación que el parásito debe realizar para poder ingresar a una nueva especie hospedadora intermediaria, alcanzar la vía sanguínea o realizar migración tisular a su órgano blanco. Es aquí donde los ganchos cobran relevancia al ser estructuras de fijación que permiten su adhesión final, pero que durante la migración impide el retroceso del parásito y obliga su avance, evitando el establecimiento de granulomas por evasión. A diferencia de otras especies de animales hospedadoras, es posible que los órganos humanos presenten menor resistencia a la invasión, y por ello, los órganos de fijación, en especial los ganchos de los protoescolices, pueden ser más pequeños, como es el caso de nuestro estudio que corresponden solo a quistes hepáticos de origen humanos.

Al respecto, los ganchos analizados en este estudio se clasificarían como GP según la descripción de referencia original (Smyth & Smyth, 1964; Cordero del Campillo & Rojo, 1999); pero con dimensiones similares a las descritas en reportes anteriores con quistes humanos (Sweatman & Williams, 1963; Smyth & Smyth, 1964; Gordo & Bandera, 1997). Lamentablemente, estos últimos estudios no informaron el estándar de clasificación; por lo que posiblemente fue determinado de forma arbitraria por los mismos autores (Tabla IV). Sin embargo, es posible que el estándar de refe-

rencia utilizado no sea válido para muestras de origen humano, con ganchos más pequeños, cuyo punto de corte para diferenciar GP de GG, debiese estar en 20,5 µm.

En cuanto a los protoescólices, existe evidencia que se desarrollan en 7 etapas desde la capa germinativa: 1) formación de brotes celulares a partir de agrupamiento de células que emergen de la capa germinativa de los quistes hidatídicos. 2) alargamiento de los brotes y disminución del número de células en sus bases. 3) aparición de un surco en las yemas alargadas, delimitando las regiones anteriores (escólex) y caudal (cuerpo). 4) diferenciación de ganchos como las primeras estructuras completamente formadas en la región apical del escólex naciente. 5) formación de proyecciones circulares y depresiones en los escólex, que posteriormente se convierten en ventosas. 6) aparición de un cono en el centro de los ganchos, expansión del cuerpo y

cuello entre el escólex y el cuerpo. 7) desacoplamiento del tallo y el protoescólices infeccioso, el que queda libre en el líquido hidatídico (durante su desarrollo el protoescólices permanece adherido a la capa germinativa a través de un tallo) (Galindo *et al.*, 2002).

En nuestro estudio, si bien fue posible identificar el desarrollo de protoescólices unidos por un pedúnculo a la capa germinativa, como ocurre de igual forma en las vesículas proliferativas; se observó una alta cantidad de protoescólices libres en distintas etapas de desarrollo a partir de los protoescólices invaginados, no descritos anteriormente, lo que aporta información al proceso de desarrollo de los protoescólices. En este caso, en los protoescólices invaginados (estado 1), las ventosas empujan el rostelo con ganchos que se abre paso por el polo apical o rostelar, distal al tallo o pedúnculo; emerge el rostelo y corona de GR (es-

Tabla III. Comparación de medidas morfométricas de *Echinococcus granulosus* verificadas en otros estudios de diferentes hospederos.

Especie de <i>Echinococcus</i> , Autor, año	País origen del estudio	Especie animal hospedera	Longitud ganchos (µm)		Diámetro PE (µm)	Diámetro VP (µm)
			GG	GP		
<i>E. granulosus</i> Eslami <i>et al.</i> , 2016	Irán	Oveja salvaje	23,6 ± 1,4	19,6 ± 1,7	NR	NR
		Oveja doméstica	23,3 ± 2,9	18,1 ± 1,0		
		Camello doméstico	28,9 ± 1,5	21,6 ± 1,4		
<i>E. granulosus</i> Latif <i>et al.</i> , 2010	Pakistán	Oveja G3	23,5 ± 1,2	19,2 ± 0,8	NR	NR
		Oveja G1	24,6 ± 1,1	19,4 ± 0,6		
		Cabra G3	25,6 ± 0,9	17,7 ± 0,8		
		Cabra G1	23,8 ± 0,6	19,4 ± 0,6		
		Bovino G1	24,8 ± 0,6	19,9 ± 0,5		
		Búfalo G3	22,7 ± 0,5	18,1 ± 0,6		
		Camello G1	25,1 ± 0,7	18,9 ± 0,3		
<i>E. granulosus</i> Hosseini <i>et al.</i> , 2012	Irán	Búfalo	24,3 ± 1,2	20,1 ± 1,7	NR	NR
<i>E. oligarthus</i> Rodríguez <i>et al.</i> , 2000	Colombia	Rata espinosa	35,2 ± 1,2	29,4 ± 1,1	122,3 ± 8,5	333,1 ± 117,4
<i>E. granulosus</i> Singh <i>et al.</i> , 2014	India	Oveja	24,8 ± 1,5	22,0 ± 2,0	NR	NR
		Cabra	24,8 ± 1,2	21,6 ± 1,6		
		Ganado	24,4 ± 0,6	21,0 ± 0,6		
		Búfalo	24,6 ± 0,8	21,2 ± 1,2		
		Cerdo	25,3 ± 1,2	21,6 ± 0,9		

GG: Ganchos grandes; GP: Ganchos pequeños; PE: Protoescólices; VP: Vesículas prolíferas; NR: No reportado. Los valores están reportados en promedios y desviación estándar.

Tabla IV. Longitud de ganchos de protoescólices de *Echinococcus granulosus* provenientes de quistes hepáticos de origen humano, según distintos autores.

Autor, año	Ganchos grandes		Ganchos pequeños	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)
Sweatman & Williams, 1963	23,3	13,0	20,5	9,8
Smyth & Smyth, 1964	36,5	NR	28,1	NR
Gordo & Bandera, 1997	22,9	12,4	19,8	9,1
Nuestro estudio, 2022	22,2 ± 1	7,8 ± 1,1	18 ± 2,2	6,9 ± 1,2

NR: No reportado. Los valores están reportados en promedios (con o sin desviación estándar).

tado 2). La protrusión del rostelo da paso a la protrusión de las ventosas alcanzando un diámetro mayor y menor (largo y ancho) de  $174 \pm 23,4 \mu\text{m}$  y  $111,1 \pm 13 \mu\text{m}$ , respectivamente (Tabla II). Posteriormente, se exteriorizan las ventosas, convirtiéndose en la porción más ancha del parásito (estado 4). En esta etapa se distinguen dos regiones; apical triangular que dará origen al escólex y basal rectangular que dará origen al cuello, del cual se forma el estróbilo en el hospedero definitivo. El rostelo, con su corona de ganchos, se puede visualizar diferenciados en la porción apical y separado de las ventosas que ocupan la mayor parte del escólex en formación (estado 5). La depresión inferior de las ventosas marca visualmente la transición a un cuello más ovalado (estado 6). El rostelo se distancia de las ventosas ocupando el primer cuarto del escólex, dando un aspecto similar a la tonsura utilizada por los monjes católicos y su cuello transita de ovalado a rectangular alargándose (estado 7). Finalmente, las ventosas se encuentran desarrolladas y el cuello se encuentra alargado (estado 8), alcanzando un largo y ancho total de  $237,2 \pm 53 \mu\text{m}$  y  $128,7 \pm 320 \mu\text{m}$ , respectivamente; el doble de un protoescólices invaginado.

No todos los quistes presentaron protoescólices en proceso de maduración, lo más frecuente fue visualizar los protoescólices invaginados; pero en otros, se observó una alta frecuencia de protoescólices en proceso de maduración, independiente de la condición de QUV, QMV o QA. Es necesario estudiar los roles patológico y epidemiológico que pueda tener la maduración de los protoescólices en los quistes, ya que el desarrollo de los mismos puede traer consigo una mayor excreción sanguínea de metabolitos parasitarios útiles para fines diagnósticos; y, por otro lado, facilitar los tratamientos quimioterapéuticos al no estar en su estado vegetativo de resistencia, como es el caso del protoescólices invaginado.

Dado que las características morfométricas de los protoescólices y GR de *E. granulosus* son útiles para el diagnóstico; se requiere utilizar una solución lítica para digerir los protoescólices y lograr estudiar la morfometría de los GR de los protoescólices de *E. granulosus*. Para ello, se dispone de diversas opciones, como soluciones con lactofenol (lactofenol, azul de lactofenol). Sin embargo, la evidencia indica que la solución lítica de proteinasa-K representa una mejor opción puesto que se puede obtener una visión clara de los ganchos y un uso más seguro respecto de los lactofenoles (Hammad *et al.*, 2020). En este estudio, no fue requerida esta estrategia, ya que la obtención de ganchos fue mediante la centrifugación de la arenilla hidatídica, la que se origina de forma natural por detritus celulares de la hidátide, entre ellos, los protoescólices muertos.

Sobre las ultraestructuras tegumentarias de los

protoescólices la evidencia indica que aquellos que se desarrollan dentro de las cápsulas prolíferas se caracterizan por una escasa cubierta de microtriches truncados y son carentes de espinas tegumentarias; y en las primeras etapas de su formación su superficie es cubierta por microvellosidades. El citoplasma rostelar distal de los protoescólices de *E. granulosus* se caracterizan por un extenso plegamiento de la capa basal, hemidesmosomas prominentes y están sostenidos por una lámina reticular de microfibrillas de 10 nm de diámetro que ocasionalmente muestran una periodicidad de bandas de 55 nm (Smith & Richards, 1991).

A medida que continua la diferenciación, se forman GR mediante el agrandamiento de microtriches individuales, los que se forman mediante la adición de material a los microtriches truncados, y de Novo, seguidos de levantamiento desde la superficie tegumentaria. Las microvellosidades se desprenden para ser reemplazadas por microtriches y pequeñas elevaciones romas (Rogan & Richards, 1987).

Los GR, se pueden observar formando dos filas, cada una tiene una pulpa amorfa central, una médula microfibrilar media con microfibrillas de aproximadamente 4 nm de diámetro y una corteza externa compleja en todo, excepto en la región proximal de la protección y la base del mango. En estas regiones se produce material adicional, de densidad electrónica similar a la de la médula, pero que carece de la subestructura fibrilar, y da a las áreas un aspecto lobulado. El microanálisis de rayos X de energía dispersiva de ganchos enteros permite verificar azufre y pequeñas cantidades de fósforo (Antoniu & Tselentis, 1993; Smith & Richards, 1993).

Por otra parte, existe evidencia de la existencia de estructuras similares a vesículas, posiblemente involucradas en rutas endocíticas/exocíticas, dentro del cuerpo vesicular tegumentario, así como en el glucocálix del parásito, el citoplasma distal y en las estructuras internas cercanas. Además, contienen antígenos del parásito (GST-I y AgB) que se localizan de forma desigual en las estructuras del cuerpo vesicular tegumentario (Miles *et al.*, 2021).

En conclusión, las características morfo cuantitativas de los quistes y su contenido pueden orientar respecto al grado de desarrollo del parásito y su relación de patogenicidad; no obstante, los estudios que detallan características morfo cuantitativas de EQ en humanos son escasos, lo que representa una necesidad de continuar con esta línea de investigación con el fin de establecer asociación entre el fenotipo y genotipo, ultraestructuras, patogenicidad; y las características morfo cuantitativas para generar evidencia suficiente para desarrollar mejores herramientas diagnósticas, terapéuticas y preventivas de esta parasitosis.

La evidencia concuerda con que los GG y GP de EQ humana son más pequeños que los reportados para otras especies huéspedes intermediarios; y se propone como punto de corte de clasificación para los GG de GP sea 20,5  $\mu\text{m}$  de largo total y 7,4  $\mu\text{m}$  de ancho total.

**Declaración de conflictos:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

**Contribución de los autores.** Todos los autores participaron en la preparación de las bases de datos; analizaron e interpretaron los resultados; escritura y revisión del manuscrito final.

---

**VÁSQUEZ, B.; ROJAS, C. & MANTEROLA, C.** Morphoquantitative study of protoscolices and other fundamental structures of *Echinococcus granulosus* from human hosts. *Int. J. Morphol.*, 40(6): 1630-1640, 2022.

**SUMMARY:** Although cystic echinococcosis (CE) is an endemic disease in several parts of the world, few morphological and quantitative studies of the fundamental structures of *Echinococcus granulosus* in humans, especially protoscolices. The aim of this study was to perform a morphoquantitative analysis of protoescolex and other fundamental structures of *E. granulosus* from human hosts. Cross-sectional study. Eight human hepatic EQ specimens were studied, applying non-probabilistic convenience sampling. Cystic layers, fluid and hydatid grit were evaluated. The layers were fixed in 10% buffered formaldehyde and processed for embedding in paraplast. Slices of 5  $\mu\text{m}$  thickness were made and stained with H-E for light microscopic analysis. The liquid and grit were centrifuged and the sediment obtained was analyzed directly to determine the morphometric measurements of the protoscolices and the large and small hooks. Descriptive statistics were used. Of the 8 cysts studied, 6 were univesicular cysts, one multivesicular and one abscessed cyst, whose lamellar and germinative layers were well defined. The proligerous vesicles had a rounded shape with protoscolices inside. The invaginated protoscolices had an average length and width of  $140.8 \pm 34.3 \mu\text{m}$  and  $106.2 \pm 29.5 \mu\text{m}$ , respectively; and the developed ones had a length of  $237.2 \pm 53.0 \mu\text{m}$  and width of  $128.7 \pm 32.0 \mu\text{m}$ . The rostellar hooks presented smooth contours distributed in two regular rows. The average total length of the large and small hooks was  $20.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$ ; the average total width was  $7.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$ . In conclusion, the morphoquantitative characteristics of *E. granulosus* hooks in humans are distinct from other intermediate host species and from other *Echinococcus* spp. It is possible that the abandonment of the resistance state of the invaginated protoscolices until their development generates epidemiological implications of interest.

**KEY WORDS:** *Echinococcus granulosus*; Protoscolex; Echinococcosis; Hydatidosis; Hydatid Cyst.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, F.; Rodrigues-Silva, R.; Neves, R.; Gonçalves, M.; Romani, E. & Machado-Silva, J.R. Morphological and morphometric studies on protoscoleces rostellar hooks of *Echinococcus granulosus* from Peru visualized by several microscopic techniques. *Neotrop. Helminthol.*, 3(2):65-72, 2009.
- Antoniou, M. & Tselentis, Y. Studies on *Echinococcus granulosus* using the scanning electron microscope. II. The hooks. *Parasitol. Res.*, 79(7):543-6, 1993.
- Eslami, A.; Meshgi, B.; Jalousian, F.; Rahmani, S. & Salari, M. Genotype and phenotype of *Echinococcus granulosus* Derived from Wild Sheep (*Ovis orientalis*) in Iran. *Korean. J. Parasitol.*, 54(1):55-60, 2016.
- Galindo, M.; Gonzalez, M. J. & Galanti, N. *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biol. Res.*, 35(3-4):365-71, 2002.
- Gordo, F. & Bandera, C. Differentiation of spanish strains of *Echinococcus granulosus* using larval rostellar hook morphometry. *Int. J. Parasitol.*, 27(1):41-9, 1997.
- Hammad, S. J.; Cavallero, S.; Al-Nasiri, F. S. & Amelio, S. D. Comparative study among lactophenol blue, lactophenol solution and proteinase-K lytic solution for rostellar hooks morphometry of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Helminthol.*, 57(1):63-70, 2020.
- Hosseini, S. H. & Eslami, A. Morphological and developmental characteristics of *Echinococcus granulosus* derived of sheep, cattle and camel in Iran. *J. Helminthol.*, 72(4):337-41, 1998.
- Hosseini, S. H.; Pour, A. & Shayan, P. Morphological characteristics of *Echinococcus granulosus* derived from buffalo in Iran. *Parasitology.*, 139(1):103-9, 2012.
- La-Rocca, S.; Farias, J.; Chalar, C.; Kun, A. E. & Fernandez, V. *Echinococcus granulosus*: Insights into the protoscolex F-actin cytoskeleton. *Acta Trop.*, 199:105122, 2019.
- Latif, A.; Tanveer, A.; Maqbool, A.; Siddiqi, N.; Kyaw-Tanner, M. & Traub, R. Morphological and molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* in livestock and humans in Punjab, Pakistan. *Vet. Parasitol.*, 170(1-2):44-9, 2010.
- Laure, E.; Gavidia, C. M. & Lightowlers, M. W. Control of cystic echinococcosis: Background and prospects. *Zoonoses Public. Health.*, 66(8):889-99, 2019.
- Manterola, C. & Urrutia, S. Infected hepatic Echinococcosis: Results of surgical treatment of a consecutive series of patients. *Surg. Infect. (Larchmt.)*, 16(5):553-7, 2015.
- Manterola, C. & Otzen, T. Los Segos en Investigación Clínica. *Int. J. Morphol.*, 33(3):1156-64, 2015.
- Manterola, C.; Otzen, T.; Muñoz, G.; Alanis, M.; Kruuse, E. & Figueroa, G. Surgery for hepatic hidatidosis. Risk factors and variables associated with postoperative morbidity. Overview of the existing evidence. *Cir. Esp.*, 95(10):566-76, 2017.
- Manterola, C. & Otzen, T. Checklist for reporting results using observational descriptive studies as research designs: The MINCir initiative. *Int. J. Morphol.*, 35(1):72-6, 2017.
- Miles, S.; Magnone, J.; García-Luna, J.; Ancarola, M. E.; Cucher, M.; Dematteis, S.; Frischknecht, F.; Cyrklaff, M. & Mourglia-Etlin, G. Ultrastructural characterization of the tegument in protoscoleces of *Echinococcus ortleppi*. *Int. J. Parasitol.*, 51(12):989-97, 2021.
- Nakao, M.; Lavikainen, A.; Yanagida, T. & Ito, A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.*, 43(12-13):1017-29, 2013.
- Otzen, T. & Manterola, C. Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. *Int. J. Morphol.*, 35(1):227-32, 2017.
- Pednekar, R.; Gatne, M.; Thompson, R. & Traub, R. Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet. Parasitol.*, 165(1-2):58-65, 2009.

- Rajabloo, M.; Hosseini, S. H. & Jalousian, F. Morphological and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from goat isolates in Iran. *Acta Trop.*, 123(2):67-71, 2012.
- Rodríguez, G.; Tamayo, M. & Boshell, J. Estructura del quiste hidatídico producido por *Echinococcus oligarthrus* en el hospedero intermediario *Proechimys c.f. guairae* (rata espinosa) en Casanare, Colombia. *Biomedica.*, 20(3):238-47, 2000.
- Rogan, M.T. & Richards, K.S. *Echinococcus granulosus*: changes in the surface ultrastructure during protoscolex formation. *Parasitology.*, 94(Pt 2):359-67, 1987.
- Rojas, C. & Manterola, C. Equinococosis: Actualización en terminologías utilizadas desde la biología a la terapéutica. *Int. J. Morphol.*, 39(4):1240-52, 2021.
- Singh, B. B.; Sharma, J. K.; Tuli, A.; Sharma, R.; Bal, M. S.; Aulakh, R. S. & Gill, J. P. S. Prevalence and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* from north India. *J. Parasit. Dis.*, 38(1):36-40, 2014.
- Smith, S. A. & Richards, K. S. Ultrastructure and microanalyses of the protoscolex hooks of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology.*, 103 Pt 2:267-74, 1991.
- Smith, S. A. & Richards, K. S. Ultrastructure and microanalyses of the calcareous corpuscles of the protoscoleces of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Res.*, 79(3):245-50, 1993.
- Smyth, J. D. And Smyth, M. M. Natural and experimental hosts of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*, with comments on the genetics of speciation in the genus *Echinococcus*. *Parasitology.*, 54:493-514, 1964.
- Soriano, S. V.; Pierangeli, N. B.; Pianciola, L. A.; Mazzeo, M.; Lazzarini, L. E.; Debiaggi, M. F.; Bergagna, H. F.; Basualdo, J. A. The optimum cut-off value to differentiate *Echinococcus granulosus* sensu stricto from other species of *E. granulosus* sensu lato using larval rostellar hook morphometry. *J. Helminthol.*, 89(1):1-8, 2015.
- Wen, H.; Vuitton, L.; Tuxun, T.; Li, J.; Vuitton, D. A.; Zhang, W. & McManus, D. P. Echinococcosis: advances in the 21st century. *Clin. Microbiol. Rev.*, 32(2):e00075-e00018, 2019.
- World Health Organization and World Organization for Animal Health (WHO & OIE). *Manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern*. Institute of Parasitology, University of Zurich, Suiza, 2002.

Dirección para correspondencia

Dr. Claudio Rojas

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas

Universidad de La Frontera

Temuco

CHILE

E-mail: crojas.vet@gmail.com