

# ULTRAESTRUCTURA DE LA PARED DE *CISTICERCUS CELLULOSAE* (Cestoda:Taeniidae)

## Capítulo 1

### Introducción:

*Cysticercus cellulosae*, la forma larval de *Taenia solium*, consiste en una vesícula de 8 a 10 mm de diámetro llena de un fluido semejante en composición a la del plasma del hospedero; la vesícula presenta una invaginación en cuyo extremo interior se encuentra el escólex, que dará origen al parásito adulto (*Taenia solium*), al ser ingerido por el huesped definitivo (el hombre).

El hospedero normal del cisticerco es el cerdo, pero frecuentemente afecta al ser humano, produciendo la enfermedad conocida como cisticercosis.

La cisticercosis humana, se presenta cuando el hombre ingiere huevecillos de *Taenia solium* presentes en los alimentos contaminados con materia fecal, o en algunos casos por rejurgitación (peristaltismo inverso) de proglótidos en personas infectadas con *Taenia solium*.

Aunque los cisticercos pueden localizarse en cualquier parte del cuerpo humano, la mayoría de las manifestaciones clínicas se relacionan con su presencia en el sistema nervioso central, produciendo la neurocisticercosis, donde pueden invadir el parénquima, los espacios subaracnoideos y el sistema ventricular, causando ataques epilépticos, hidrocefalia, y otras disfunciones neurológicas.

El sitio mas frecuente de localización, es el músculo esquelético, donde pasa asintomático.

La cisticercosis es un grave problema de salud, tanto en México como en América Latina y en otros países subdesarrollados. En estudios hechos en México, se encontró una seropositividad del 1-2% en sueros de personas muestreadas en todo el territorio nacional (Woodhouse,1982). La incidencia de neurocisticercosis, fué de 3.6% de los casos de autopsias estudiados en hospitales de la Ciudad de México(Zenteno Alanis,1966). En América Latina se encontró que existen alrededor de 350,000 personas afectadas de cisticercosis (Schenone,1982)

Esta es una enfermedad importante no solamente por la alta incidencia en humanos, sino por las dificultades para diagnosticarla y también para tratarla. Además, aunque en el cerdo no produce alteraciones orgánicas, si disminuye grandemente la calidad de la carne, produciendo pérdidas económicas considerables; se calcula que en 1980, de 17 millones de cerdos sacrificados en rastros, 264,000 aproximadamente estaban infectados con cisticercos, y si consideramos que estos cerdos deben ser decomisados, nos podemos dar una idea del impacto económico que esto significa (Acevedo-Hernández, 1982).

Se han hecho descripciones parciales de la pared de *Cysticercus cellulosae* basados en reportes de microscopio de luz y electrónico. Algunos detalles estructurales han sido inferidos de estudios de otros metacéstodos, sobre la base de la organización citológica compartida por todos los miembros de este grupo (Lumsden et al,1982).

Dado que una descripción morfológica completa de la pared de la vesícula de *Cysticercus cellulosae* no existe a la fecha, en el presente trabajo damos una descripción general de esta estructura, basado en estudios de microscopía electrónica.

### **Antecedentes:**

*Cysticercus cellulosae*, la forma larvaria de *Taenia solium* ha sido estudiada por diversos autores mediante el microscopio de luz (Biagi,1961; Voge,1963; Slais,1970). Sin embargo, poco se ha estudiado a nivel de microscopía electrónica; aunque existen estudios de ultraestructura en otros metacéstodos y en céstodos adultos:

Sidiqui (1963) reporta la estructura de *Cysticercus bovis*; así como la estructura de las formas larvarias de *Taenia hydatigena* y *T. pisiformis*. Waitz (1961) describe el estadio quístico de *Hydatigena taeniformis*, mencionando la presencia de microvellosidades en la superficie corporal. La conexión que existe entre la cutícula con el parénquima fue reportada por Race et al, (1965) en larvas de *Multiceps serialis*. Morseth (1966,1967), reporta los aspectos finos de los tegumentos de adultos de *Echinococcus granulosus* y *Taenia pisiformis*, así como la estructura del quiste hidatídico. Tay (1972) reporta la ultraestructura de *Cysticercus cellulosae*; y Voge (1979) reporta la estructura fina del tegumento de *Cysticercus racemosus*; aunque en forma muy incompleta.

En general, todos estos estudios son parciales, concentrándose la mayoría de los estudios en la región mas externa de la pared vesicular, el tegumento.

En nuestro estudio, hacemos una descripción mas completa de las diferentes regiones que constituyen la pared vesicular, así como los diferentes tipos celulares encontrados.

**Objetivo general:**

Hacer una descripción detallada de la ultraestructura de la pared vesicular de *Cysticercus cellulosae*.

**Objetivos específicos:**

Describir las probables funciones que desempeña cada sistema celular encontrado.

**Capítulo 2**

**Materiales y métodos:**

Cisticercos de *Taenia solium* fueron obtenidos de músculo de cerdos parasitados, inmediatamente después de su muerte. Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión, se hizo una incisión en la pared de la vesícula y el quiste fue fijado por una hora a temperatura ambiente en glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos 0.1 molar a un pH de 7.4. El tejido fue post fijado por una hora a 4 grados centígrados en tetraóxido de osmio en el mismo buffer de fosfatos. Se deshidrató en alcohol etílico en concentraciones crecientes (60-100%) durante 15 minutos en cada uno, terminando en dos pases de 15 minutos en óxido de propileno. La inclusión se hizo en epon 812 en moldes planos, se polimerizaron a 70 grados centígrados durante 72 horas. Los blocks se rebajaron en un microscopio estereoscópico usando cuchillas de rasurar de un filo, hasta dejar una pirámide truncada de un milímetro de lado. Se obtuvieron cortes finos de 600 a 900 Angstroms de espesor, que fueron montados en rejillas de cobre de 100 mesh, y

teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds,1963). Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico Hitachi HU IIA.

Para los estudios de microscopio electrónico de barrido, las larvas se procesaron siguiendo el método descrito por Echlin (1971). Se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 35.

### **Capítulo 3**

#### **Resultados:**

La pared de la vesícula de *Cysticercus cellulosae*, tiene un grosor que varía entre 70 y 100  $\mu\text{m}$ ; su superficie externa está cubierta de microvellosidades (figs. 1 y 2). La superficie interna, que está en contacto con el fluido vesicular, es irregular, mostrando elementos celulares y extracelulares (fig. 3).

En un corte transversal, la pared vesicular presenta las siguientes regiones (esquema 1): A.- Región tegumental, B.- Región subtegumental y C.- Región interna.

#### **A.- Región tegumental:**

El tegumento, es la región mas externa ,consiste de un epitelio sincicial de 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  de espesor, cuya membrana externa se proyecta formando microvellosidades (figs. 1 y 2) que miden 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 0.5  $\mu\text{m}$  de altura en su porción basal y 0.07  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.5  $\mu\text{m}$  de altura en su porción apical , con una longitud total de 2.0  $\mu\text{m}$ . Las microvellosidades tienen un anillo interior de microfilamentos, que va desde la parte basal hasta el extremo apical ( figs 4 A,B,C,D,E,F,G,H,I,J).La membrana de las microvellosidades, presenta una fina capa de glucocálix, que las interconectan por medio de

delgados filamentos (figs. 5 A y B). Este material incrementa su electrodensidad cuando se tratan con tetraóxido de osmio al que se añade rojo de rutenio al 0.5% durante la fijación. Con este procedimiento, se observa una capa de 10 a 15nm sobre la membrana citoplásmica; y estructuras de 0.03um de diámetro ordenados en forma helicoidal sobre las microvellosidades (figs. 5 C,D y E).

El tegumento está ocupado por gran cantidad de vesículas ovaladas de tamaño variable (0.05x0.08 um, hasta 0.2x0.3 um); algunas mas electrodensas que otras. Ocasionalmente se aprecia que las membranas de las vesículas estan unidas a la membrana externa del tegumento y aparentemente estan vaciando su contenido al exterior (fig.6 A,B,C,D y E).

La membrana interna del tegumento, descansa sobre una lámina basal y una banda de material fibrilar extracelular. Emite proyecciones citoplásmicas que conectan al tegumento, con la región nuclear de las células tegumentales localizados 15 a 20 um por debajo del tegumento. Estas proyecciones presentan vesículas similares a las encontradas en el tegumento, ademas se pueden apreciar mitocondrias y microtúbulos. La región nuclear de las células tegumentales, presenta un núcleo grande con un nucléolo prominente y escasos gránulos de heterocromatina; contienen poco citoplasma perinuclear con abundantes ribosomas y cisternas del aparato de Golgi. (fig. 7 y 8 B).

### **B.- Región subtegumental:**

En esta región , que abarca hasta la zona de núcleos de las células tegumentales, 15 a 20 um por debajo de la membrana interna del tegumento, encontramos además de las células tegumentales, células

de almacenamiento, cuyo citoplasma contiene gran cantidad de partículas de glucógeno tipo alfa, así como gran cantidad de gotas de lípidos. El núcleo de estas células de almacenamiento, es muy similar al de las células tegumentales con un gran nucléolo y escaso citoplasma perinuclear. Las proyecciones citoplásmicas de estas células, se extienden ampliamente por esta zona, y su membrana está en íntimo contacto con la membrana plasmática de los demás tipos celulares encontrados en la pared vesicular (fig. 8A).

En esta región también encontramos gran cantidad de fibras musculares del tipo liso, que son formadas por proyecciones citoplásmicas de las células musculares, las cuales tienen un núcleo grande con escaso citoplasma perinuclear con gran cantidad de ribosomas y material granular fino (figs. 11 A y B). Estas fibras musculares corren a lo largo de toda la pared vesicular, pero son más abundantes en la región subtegumental, sobre todo en la zona cercana a la lámina basal del tegumento.

### **C.- Región interna:**

En la región interna de la pared vesicular, encontramos principalmente los componentes del sistema excretor, constituido por los conductos excretores distribuidos a todo lo largo de la pared vesicular, y por las células en flama.

Las células en flama se caracterizan por la presencia en la región adyacente al núcleo, de un mechón de cilios (60 a 130) de simetría hexagonal, y con el arreglo típico de 9 pares de microtúbulos externos y un par central. (fig. 9b y 9c).

Los cilios se extienden 6.5  $\mu\text{m}$  a través del tubo colector de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, formado por la célula de conducto. En la zona de unión entre la célula en flama y el tubo colector, está la región de filtración, formada por proyecciones citoplásmicas digitiformes tanto de la célula en flama, como de la célula de conducto ( figs. 9A y 9a). Entre estas proyecciones, quedan aberturas que comunican el espacio interno del conducto, con el espacio extracelular.

Los tubos colectores, son formados por las células de conducto, cuyo núcleo grande, también presenta un prominente nucléolo, y muy escaso citoplasma perinuclear. Emite proyecciones citoplásmicas que dan lugar a los túbulos excretores (fig. 10 A,B,C,y D), cuyo diámetro aumenta conforme se alejan de la célula en flama, y pueden alcanzar hasta 15  $\mu\text{m}$  ó mas (fig. 10 C), dando lugar a las prominentes estructuras tubulares observadas con microscopía electrónica de barrido (figs. 10 E y F).

Todos estos elementos celulares descritos, están embebidos en una abundante matriz extracelular fibrilar de colágena.

Un tipo celular al que hemos llamado fibroblasto, parece ser el responsable de producir este material, el cual tiene en su citoplasma, vacuolas con un material granular fino y presenta estructuras tubulares de 250 Angstroms de grosor, por las que parece estar saliendo este material al exterior (fig. 13). En algunas regiones, se observa una estrecha relación entre estas fibras conectivas y las fibras musculares, dando la impresión de que sirven de punto de apoyo a fibras musculares específicas (fig. 12).



El borde interno de la pared vesicular, que está en contacto con el fluido vesicular, es muy irregular y está formado por este mismo material fibrilar extracelular y elementos celulares, sobretodo células de conducto, con grandes conductos excretores (fig 3). En ningún caso, se pudo ver que estos conductos desembocaran hacia el espacio interior de la vesícula.

### **Discusión.**

La pared de la vesícula del cisticerco de *Taenia solium* es un órgano complejo, diseñado para proteger y mantener a la larva invaginada. Esta estructura interactúa directamente con el huésped ;y muchas de las funciones de la larva que están relacionadas con el medio ambiente, tales como alimentación, eliminación de desechos y defensa contra el aparato inmunológico del huésped, presumiblemente son realizadas a través de este órgano.

La superficie de la pared vesicular de un cisticerco promedio (1.4x0.7 cm) tiene un área aproximada de 2.5 cm<sup>2</sup>. Esta superficie se incrementa aproximadamente 136 veces por las microvellosidades. La membranas citoplásmica externa de la pared, está protegida por una capa de glucocálix, posiblemente secretada por las vesículas localizadas en el tegumento. Aunque algunos aspectos de este fenómeno no están claros, el papel secretor de las vesículas en el cisticerco están apoyadas por la siguientes observaciones: 1) el mebendazol, una droga sintética que interfiere con la función microtubular del parásito, causa que las vesículas se acumulen en la región nuclear de las células del tegumento (Lachlette et al,1980); 2) algunas vesículas se unen a la membrana citoplasmática y se abren al

exterior, vaciando su contenido (fig. 6); y 3) quistes vivos incubados por varios días en la presencia de diferentes marcadores incluyendo cloruro de cobalto, rojo de rutenio, ferritina, azul de metileno y partículas de carbón, muestran una acumulación únicamente en la superficie del glucocálix, pero no se encuentran trazas dentro de las vesículas, aunque ellas estén abiertas hacia el exterior. Las funciones que tenga el material secretado en la respuesta inmunológica, todavía no están bien definidas.

El glucógeno y los lípidos contenidos en las células de almacenamiento, se derivan de los nutrientes contenidos en el medio ambiente. Los mecanismos que regulan el metabolismo de estos compuestos necesitan ser estudiados en detalle. El contacto íntimo entre la membrana de estos depósitos y las otras estructuras celulares como conductos excretores, células musculares o células en flama, sugieren que de alguna manera, la reserva energética que representa el glucógeno y los lípidos, están siendo transferidos a ellas.

El sistema excretor de la larva corresponde al tipo nefridial, similar al existente en el parásito adulto, que consiste en una extensa red de túbulos anastomosados, de gran calibre algunos y que van disminuyendo de diámetro, hasta terminar en pequeños conductos de un micrómetro de diámetro donde se encuentran las células en flama en grupos de dos o más. La función de este sistema, es la de regular el contenido de líquidos en los tejidos, y eliminar productos de desecho;] a la manera de un primitivo sistema renal. La incorporación de marcadores en el interior de la pared o en el líquido vesicular utilizando micro agujas y micro manipuladores, seguido del estudio de su

eliminación a través del sistema tubular, podrían ayudar a dilucidar mejor su funcionamiento.

El mecanismo específico por el cual se producen las fibras colágenas, (que así fueron identificadas por Torreblanco,1982) de la matriz extracelular, es sugerido por la evidencia estructural de la figura 13 A y B.

### **Conclusiones:**

Las características ultraestructurales de la pared vesicular de *Cysticercus cellulosae*, son muy similares a la de otros metacéstodos estudiados. Su función es, la de mantener viable a la larva, mientras alcanza al huésped definitivo.

La pared vesicular, es un órgano muy complejo, donde encontramos diferentes tipos celulares constituyentes de los sistemas de absorción, muscular, de almacenamiento de nutrientes, y de excreción. Todos ellos embebidos en una matriz extracelular de tipo colágena.

### **Perspectivas:**

Queda aún mucho por estudiar, principalmente sobre la fisiología de los diferentes tipos celulares, y sobre todo, de los mecanismos que intervienen en su diferenciación.

## RESUMEN

*Cysticercus cellulosae*, es la forma larvaria de *Taenia solium*. Consiste de una vesícula de 8 a 10 mm de diámetro, cuyo hospedero natural es el cerdo, pero frecuentemente, puede encontrarse en el hombre al ingerir alimentos contaminados con huevecillos de *Taenia solium*.

La importancia de esta parasitosis radica en los efectos causados, principalmente la neurocisticercosis; así como las pérdidas económicas ocasionadas a la industria porcícola.

La pared del cisticerco es un órgano complejo, encargado de la protección y mantenimiento de la larva, que se encuentra invaginada en el fluido vesicular.

Está constituida por seis diferentes tipos celulares:

Células tegumentales, que originan el tegumento sincicial, cuya superficie externa está cubierta de microvellosidades que le permiten absorber los nutrientes del medio exterior; y es la región que está en contacto con el huésped.

Células de almacenamiento, que contienen grandes cantidades de glucógeno y lípidos, los cuales son la fuente de energía para las diferentes actividades celulares.

Células musculares, que forman una extensa red muscular que cubre toda la pared vesicular, ocasionando un continuo movimiento.

Células en flama y células de conducto, que juntas forman el sistema excretor del parásito, y que controla el contenido de líquidos y la eliminación de productos de desecho.

Todos estos componentes celulares, están embebidos en una matriz extracelular formada por fibras de colágena, producidas por un tipo celular semejante a fibroblastos.

Todos estos sistemas celulares, en función coordinada, permiten la supervivencia de la larva, hasta llegar al huésped definitivo que es el hombre.

## LITERATURA CITADA

- Acevedo Hernandez Antonio (1982). Economic impact of porcine cysticercosis. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Edited by Flisser, Willms, Laclette, Larralde, Ridaura, Beltran. Academic Press. p 63-67
- Biagi F., Briceño C.E., y Martínez B. (1961). Diferencia entre *Cysticercus cellulosae* y *Cysticercus racemosus*. *Rev. Biol. Tropical* 9(1): 141-151
- Echlin, P. (1971). The application of Scanning electron microscopy to biological research. In: "New developments in Electron microscopy" (H.F. Huxley and A. Klug Eds.) pp 135-172. The Royal Society, London.
- Laclette, J.P., Guerra, G., and Zetma, C. (1980). Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:417
- Lumsden, R.D. (1966). Fine structure of the medullary parenchymae cell of a Trypanorhynch cestode, *Lacistorhynchus tenuis*, with emphasis on specialization for glycogen metabolism. *J. Parasit.* 52:417-427

Lumsden, R.D. and T.Byrom (1967). The ultrastructure of the cestode muscle.

J. Parasit. 53:326-342

Lumsden, R.D.,Voge,M, and Sogandares, F. (1982). The metacestode tegument: Fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. In: Cysticercosis: Present state of knowlwdge and perspectives.

Edited by Flisser ,Willms,Laclette,Larralde,Ridaura and Beltrán.

Academic Press p. 307-361

Morseth, J.D. (1966). The fine structure of adult *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. pisiformis*.

J. Parasit. 52 (6): 1074-1085

Morseth, J.D. (1967). Fine structure of the Hydatid cyst and protoscolex of the *Echinococcus granulosus*.

J. Parasit. 53(2): 312-325

Race, G.J.,Larsh,J.E.,Esch, G.W.,and Martin,J.H. (1965). A study of the larval stage of *Multiceps serialis* by electron microscopy.

J. Parasit. 51(3): 489

Reynolds, E.D. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.

J.Cell Biol. 17: 208

Voge, M. and Brown, w.J. (1979). Fine structure of a racemose *Cysticercus*.

J. Parasit. 65(2):262-266

Waitz,J.A. (1961) Studies of the ultrastructure of larval *Hydatigera taeniformis*.

J. Parasit. 47:27

Woodhouse, E.,Flisser,A., and Larralde,C. (1982). Seroepidemiology of human cysticercosis in México. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Edited by Flisser,Willms,Laclette,Larralde,Ridaura,and Beltrán.

Academic Press. p. 11-23

Zenteno Alanis H.G. (1966). Frecuencia de la cisticercosis en México.

Prensa Médica Mex. 31:156-162

## DESCRIPCIÓN DE FIGURAS

**Fig. 1.-** Micrografías de luz (A) y de barrido (B) de la superficie de la pared vesicular de *Cysticercus cellulosae*. C.- Vista estereoscópica de una proyección sobre la superficie de la pared.

**Fig. 2.-** Estereomágenes a dos diferentes magnificaciones de las microvellosidades en la superficie externa de la pared vesicular.

**Fig. 3.-** Micrografías electrónicas de barrido de diferentes regiones sobre la superficie interna de la pared vesicular. Las estructuras elongadas y las esféricas, presumiblemente corresponden a conductos excretores (CE), y a cuerpos celulares (CC) respectivamente.

**Fig. 4.-** A.- Corte longitudinal de una microvellosidad, mostrando la capa interna de microfilamentos. B.- Vista longitudinal aumentada de la parte basal de la microvellosidad, donde se nota con más detalle la capa de microfilamentos. El glucocálix aparece difuso sobre la superficie de la membrana plasmática.. E,F,G,H,I,J. – Cortes transversales de microvellosidades, a diferentes niveles, mostrando la capa de microfilamentos, tanto en la región basal como apical. K.-Microfotografía electrónica de barrido de un grupo de microvellosidades.

**Fig. 5.-** A.- Micrografía electrónica de barrido, mostrando los delgados filamentos del glucocálix, interconectando las microvellosidades. B.- Corte transversal de microvellosidades, en la región apical, mostrando el glucocálix y los filamentos delgados. C,D,E.- Microvellosidades tratadas con tetraóxido de osmio adicionado de rojo de rutenio. En E se observan las partículas electrodensas arregladas helicoidalmente sobre la membrana (flechas).



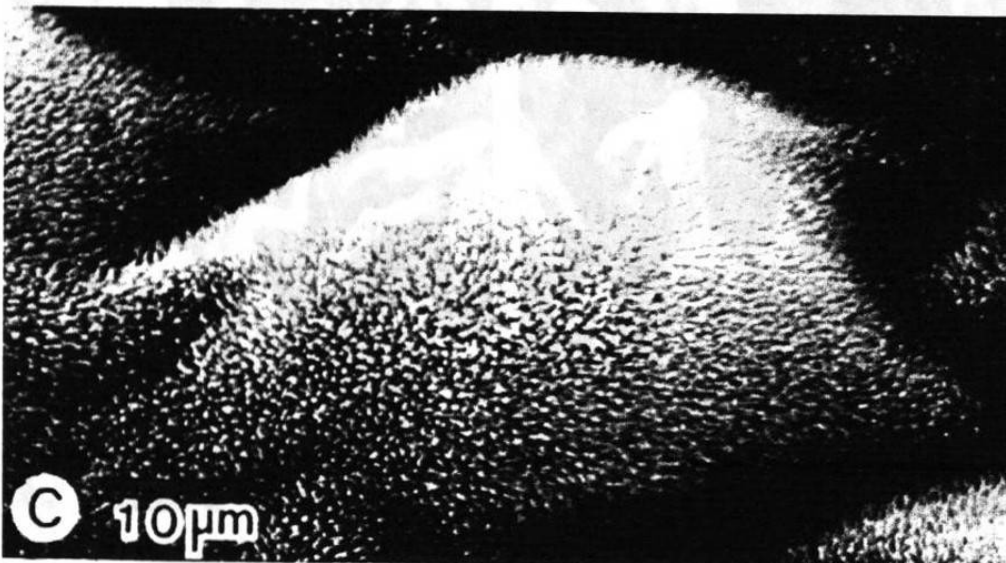
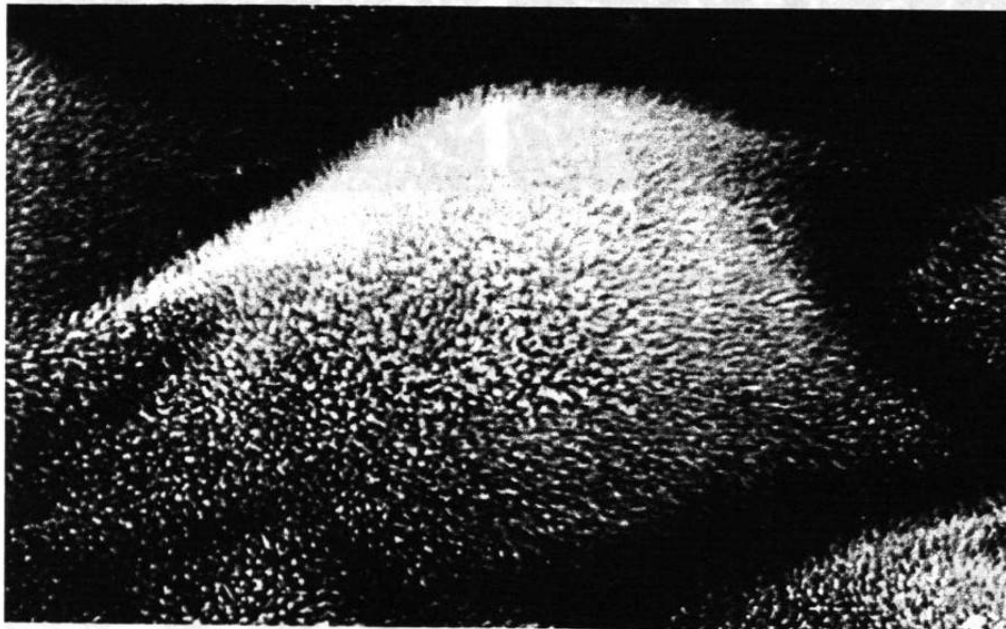
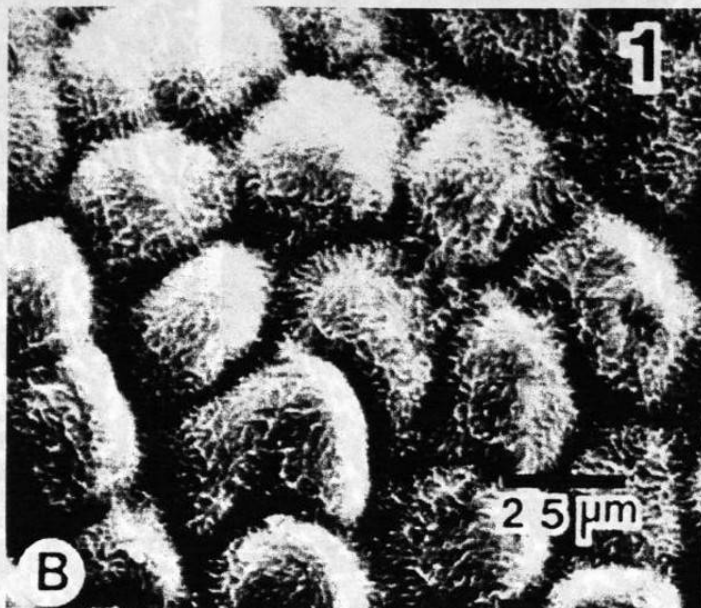
**Fig. 6.-** A.- sección del tegumento, mostrando la distribución y morfología de las vesículas (V) y las mitocondrias (M).  
B,C,D,E.- Pueden ser vistas vesículas que se abren a la superficie, aparentemente vaciando su contenido al exterior (flechas).

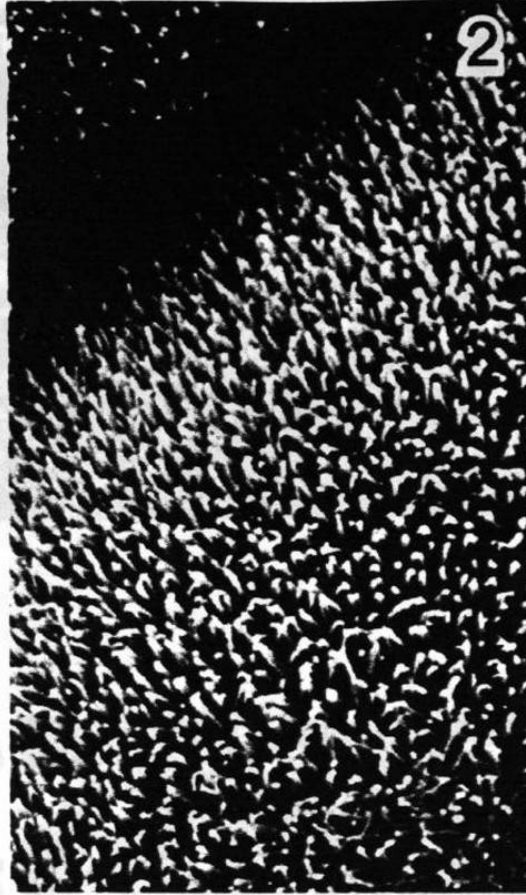
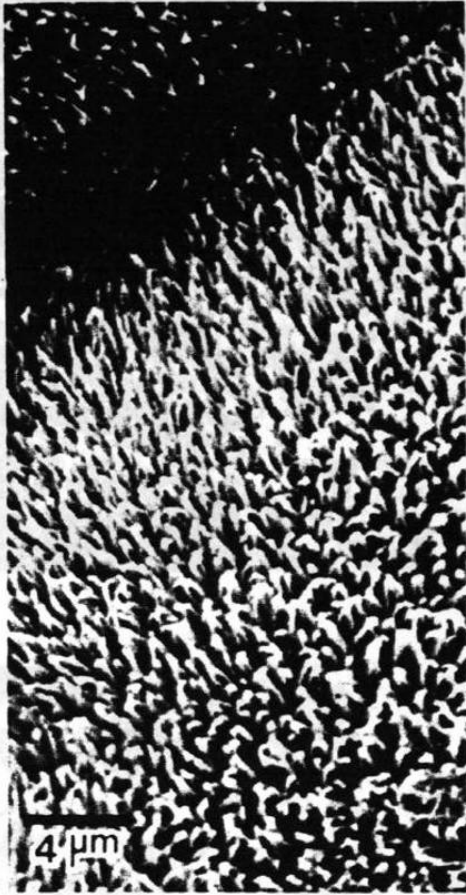
**Fig. 7.-** A.- Sección de la porción externa de la pared vesicular. La membrana basal bajo el tegumento es interrumpida por proyecciones citoplasmáticas (PC) que unen al tegumento con los cuerpos nucleares localizados mas internamente. B.- Estructura que parece una proyección citoplásmica (PC) de una célula tegumental emergiendo de un tubo colector hacia el tegumento..

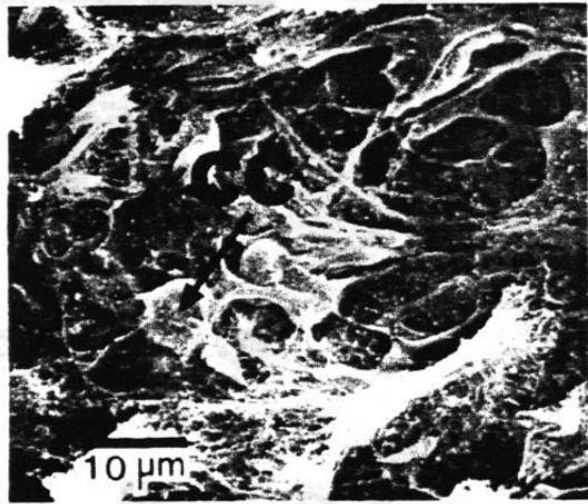
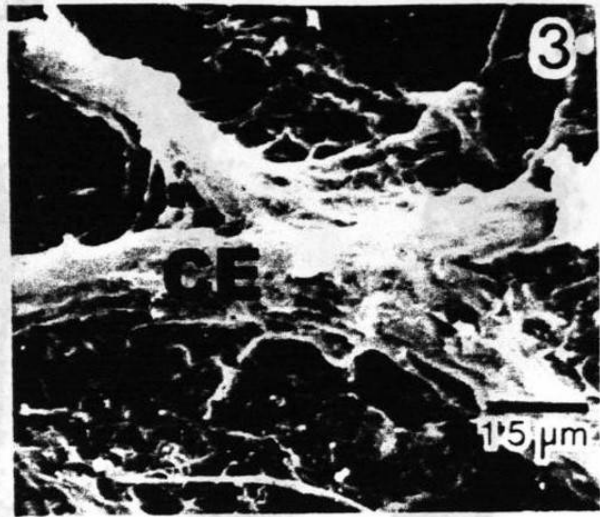
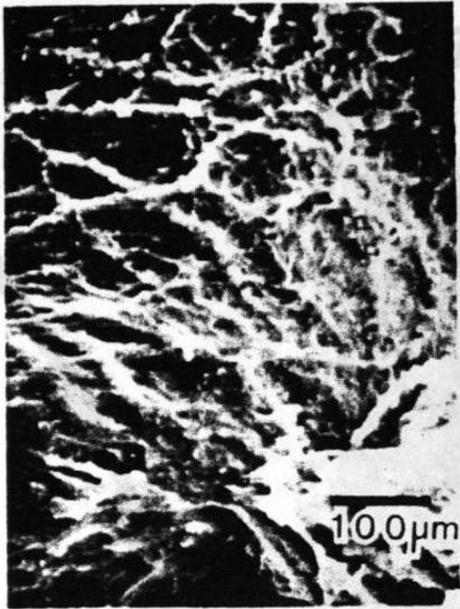
**Fig. 8.-** secciones mostrando regiones perinucleares en la pared vesicular. A.- Célula de almacenamiento con grandes depósitos de glucógeno (Gl) y gotas de lípidos (L); y abundantes ribosomas en el citoplasma perinuclear. B.- Célula tegumental, conteniendo vesículas (V) semejantes a las del tegumento.

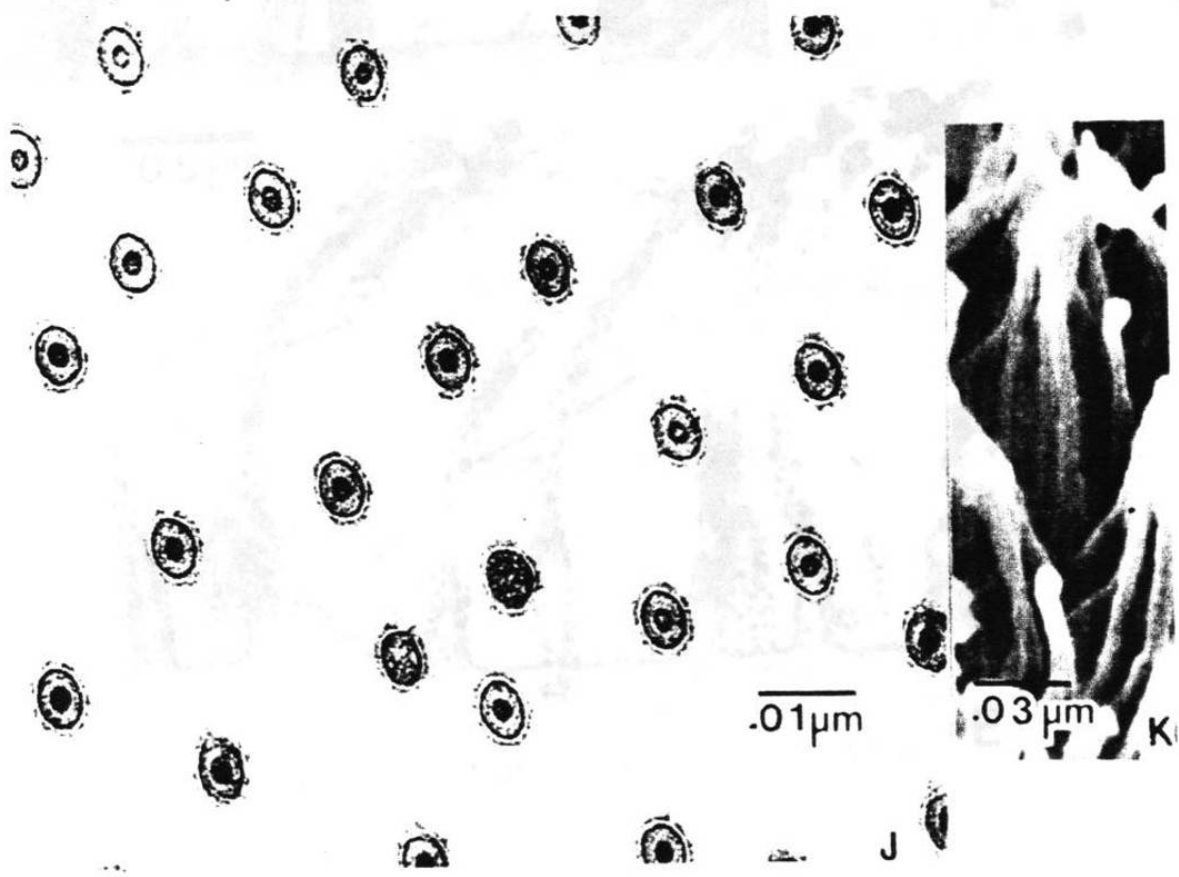
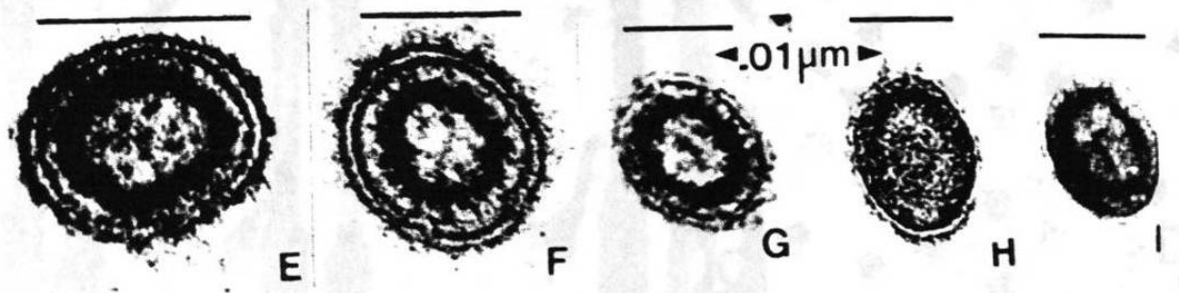
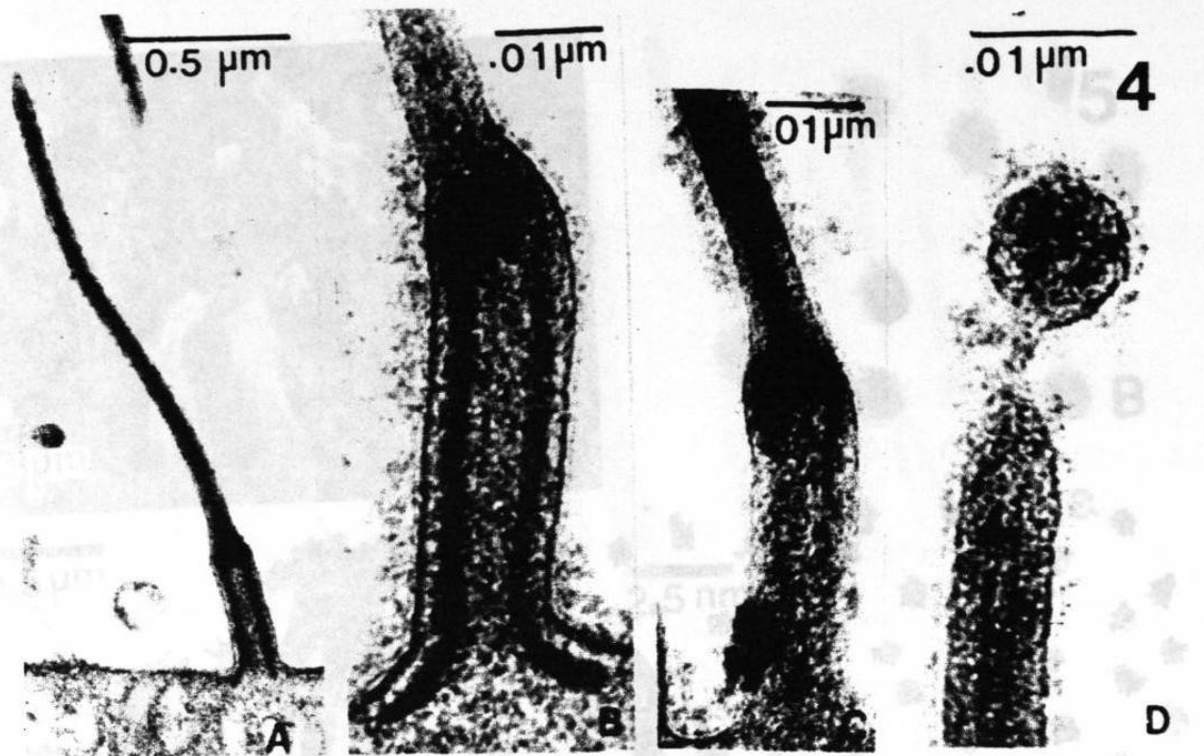
**Fig. 9.-** Micrografía de los cilios de una célula en flama, localizados dentro del tubo colector. Cortes transversales de las regiones a) b) y c) se muestran también.  
a).- Región interdigital entre la célula en flama y la célula de conducto.  
b).- Región del tubo colector ocupado por los cilios y c).- Región del tubo colector, mostrando la punta de los cilios. B.- Cuerpo de una célula en flama. C-cilios; TC-tubos colectores; RF-región de filtración

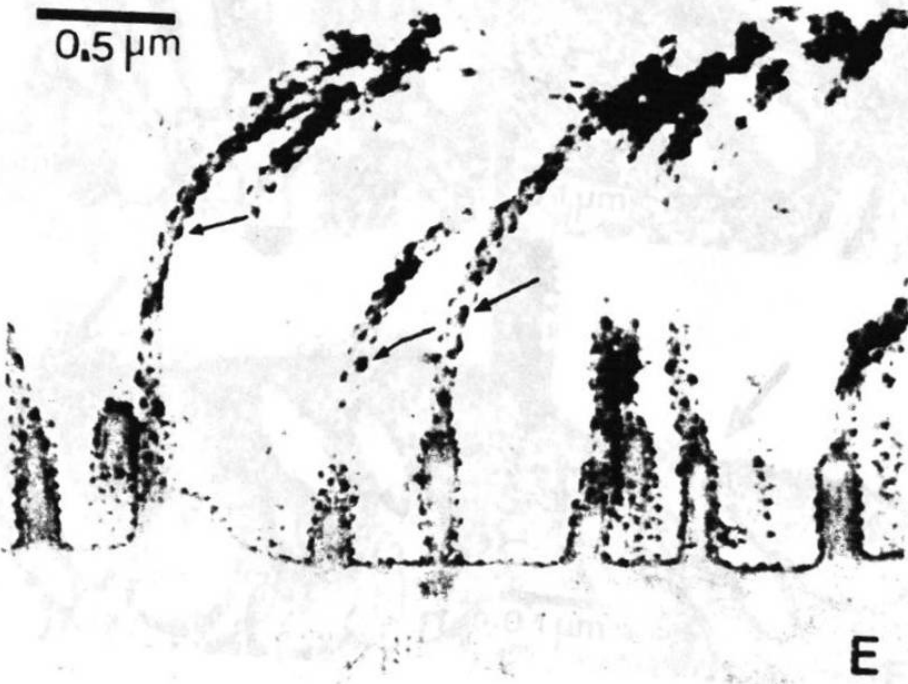
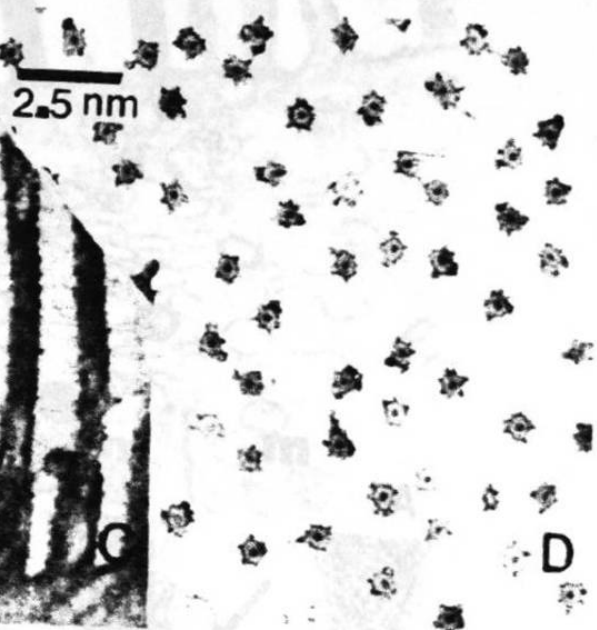
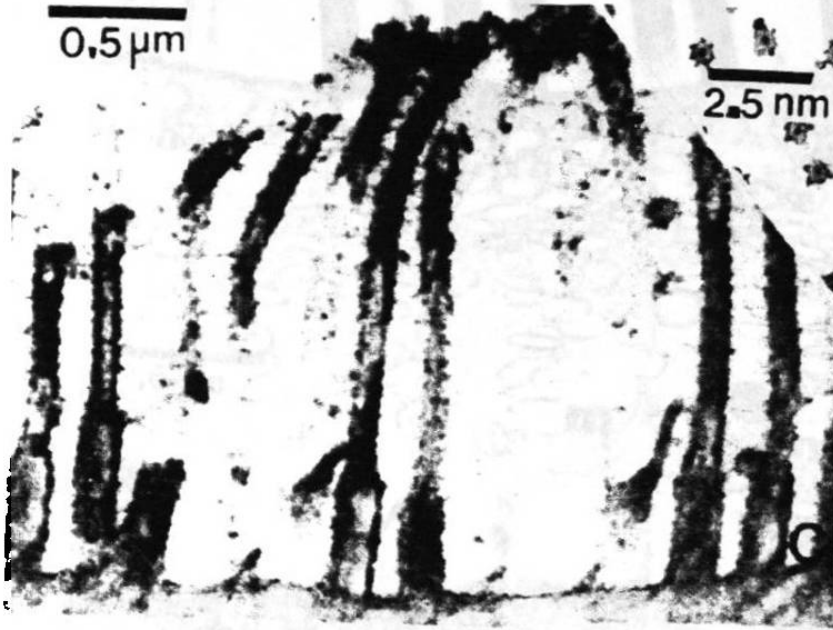
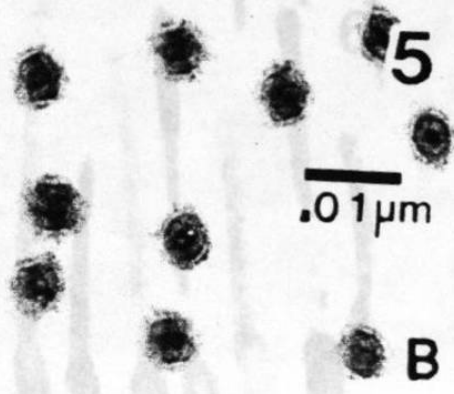
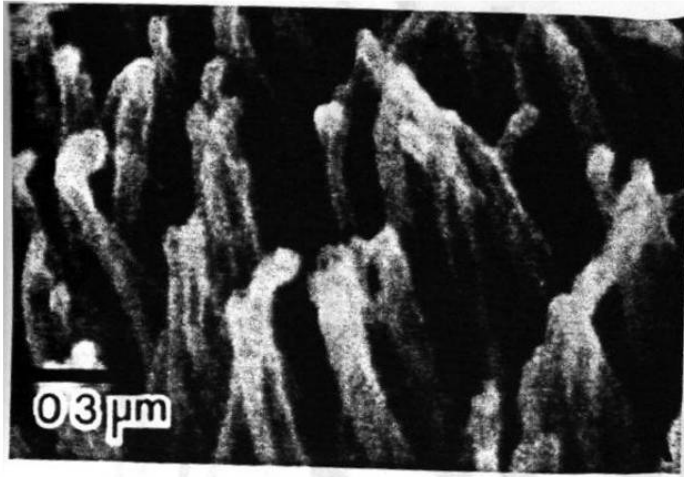
**Fig. 10.-**A,B,C,D.- Secciones de células de conducto (CC). Dos cuerpos nucleares están unidos entre si y con dos diferentes tubos colectores (TC), formando un sincicio. E,F.- Vista externa e interna de los perfiles de tubos colectores (TC) de la pared vesicular.

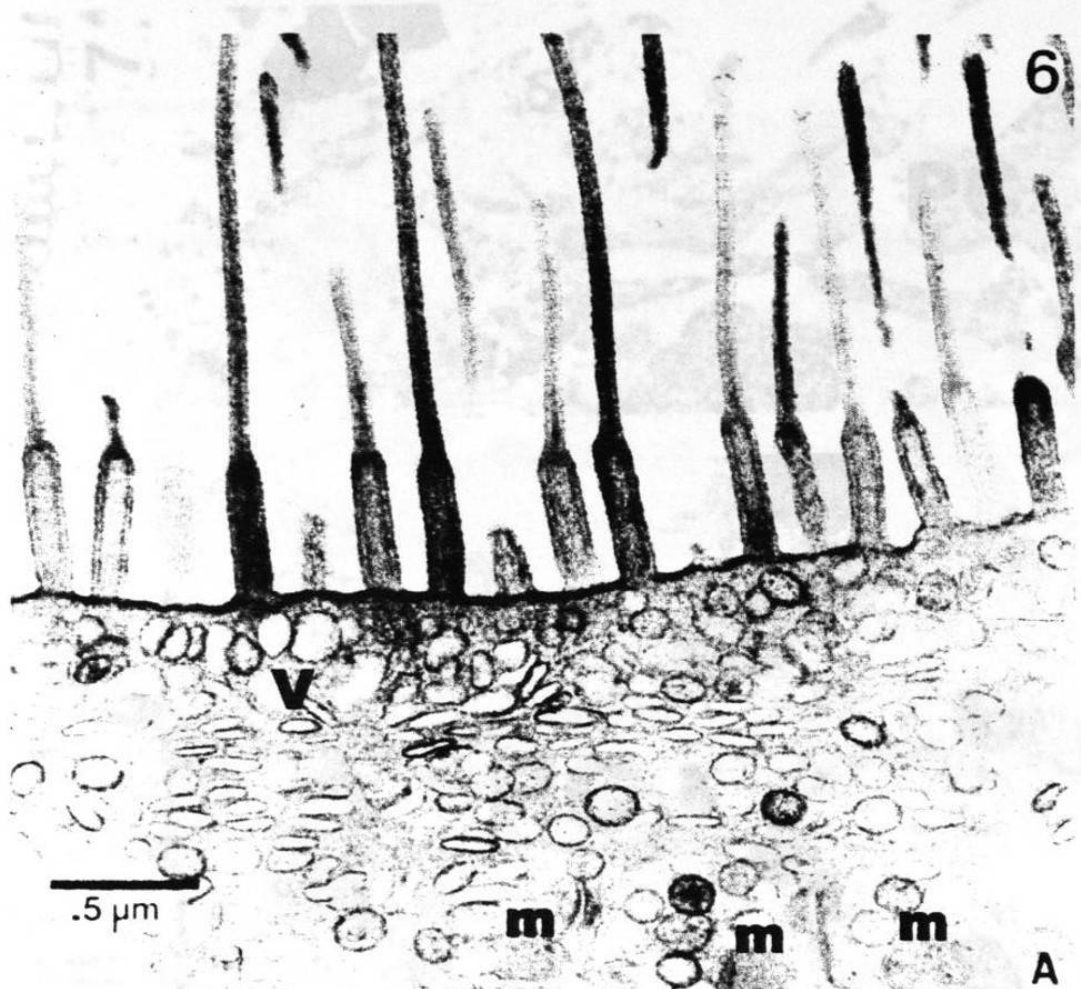




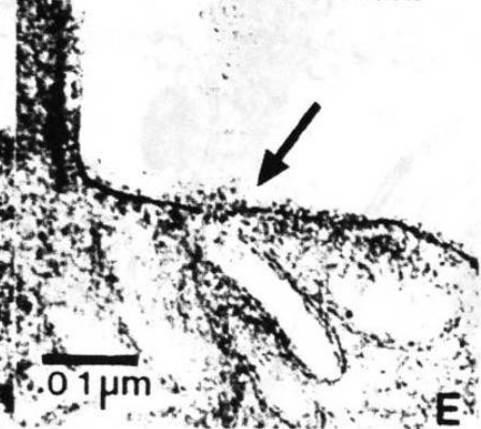
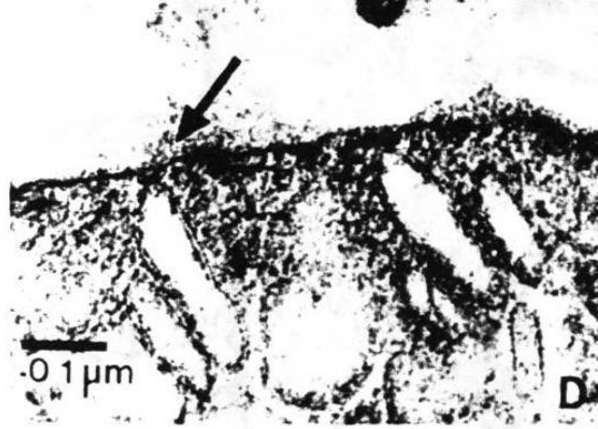
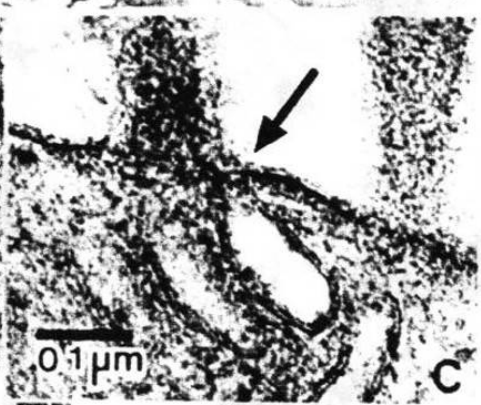
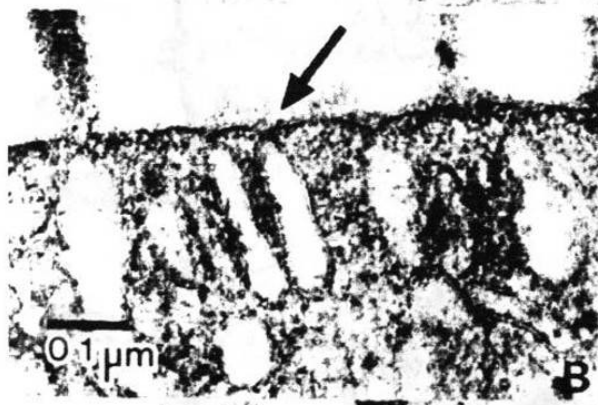


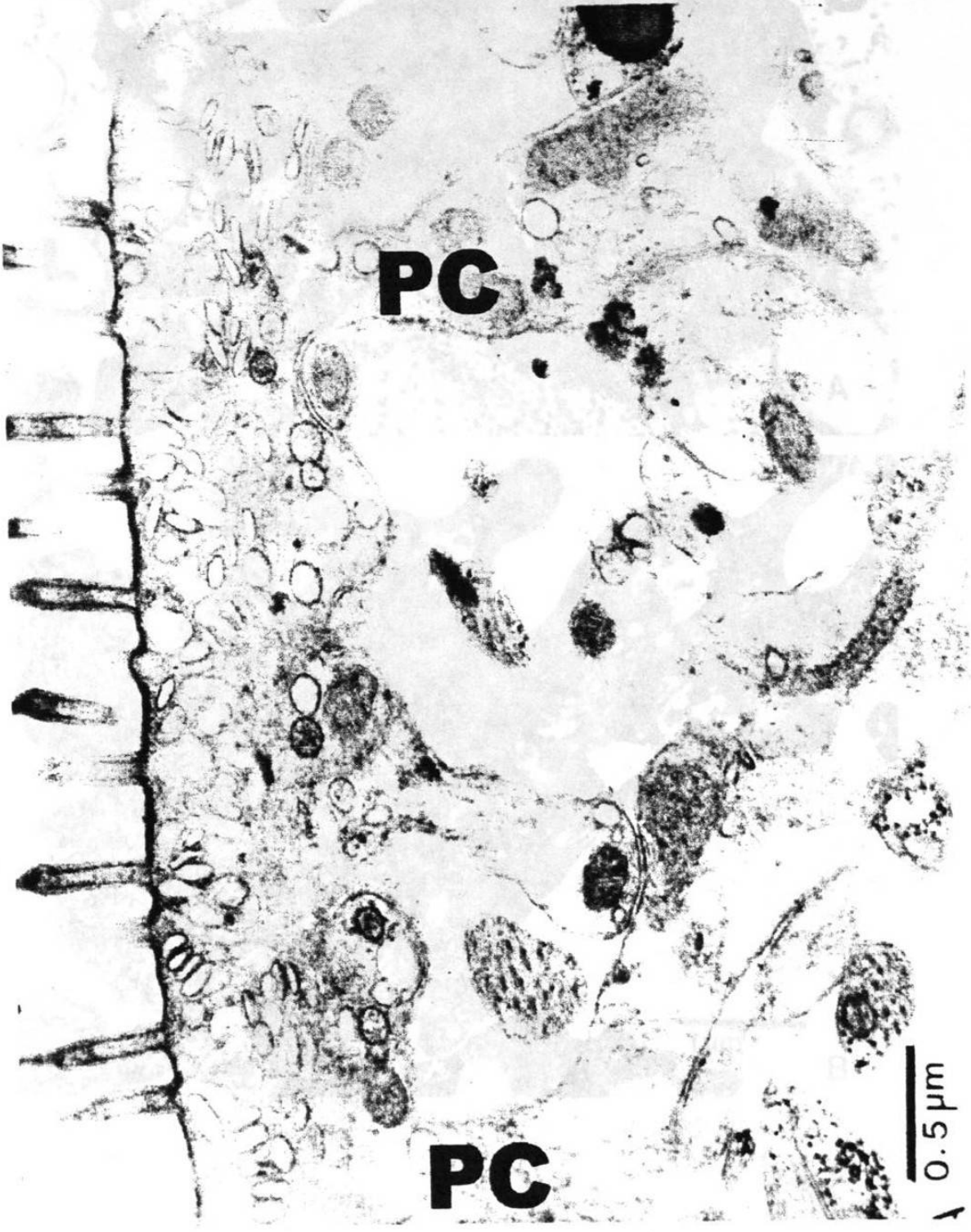
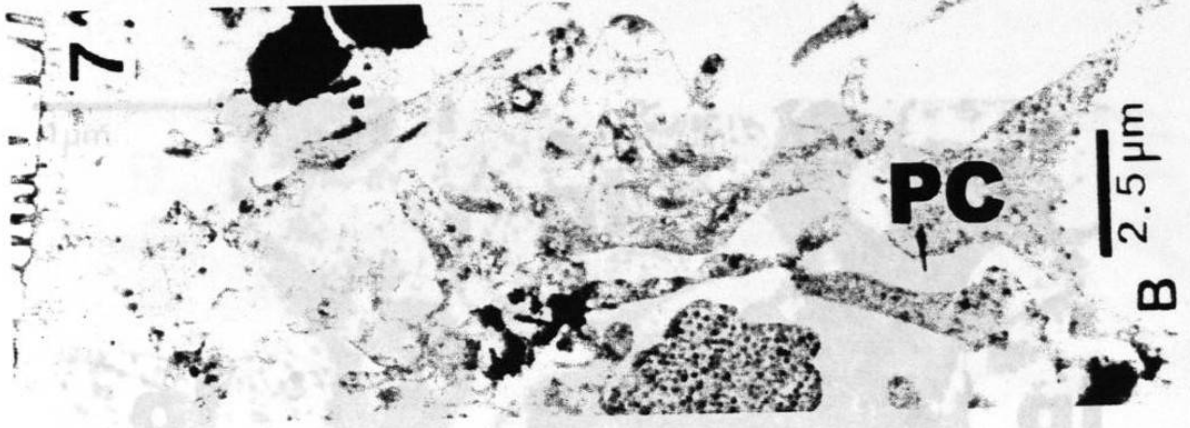




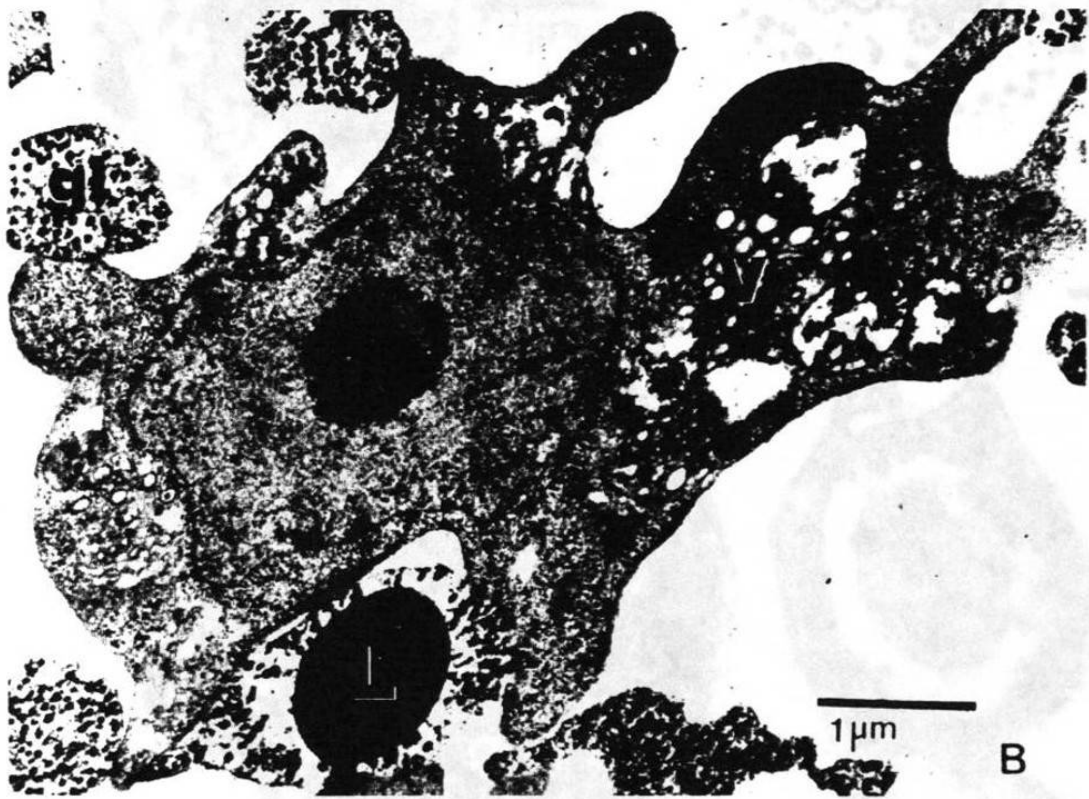
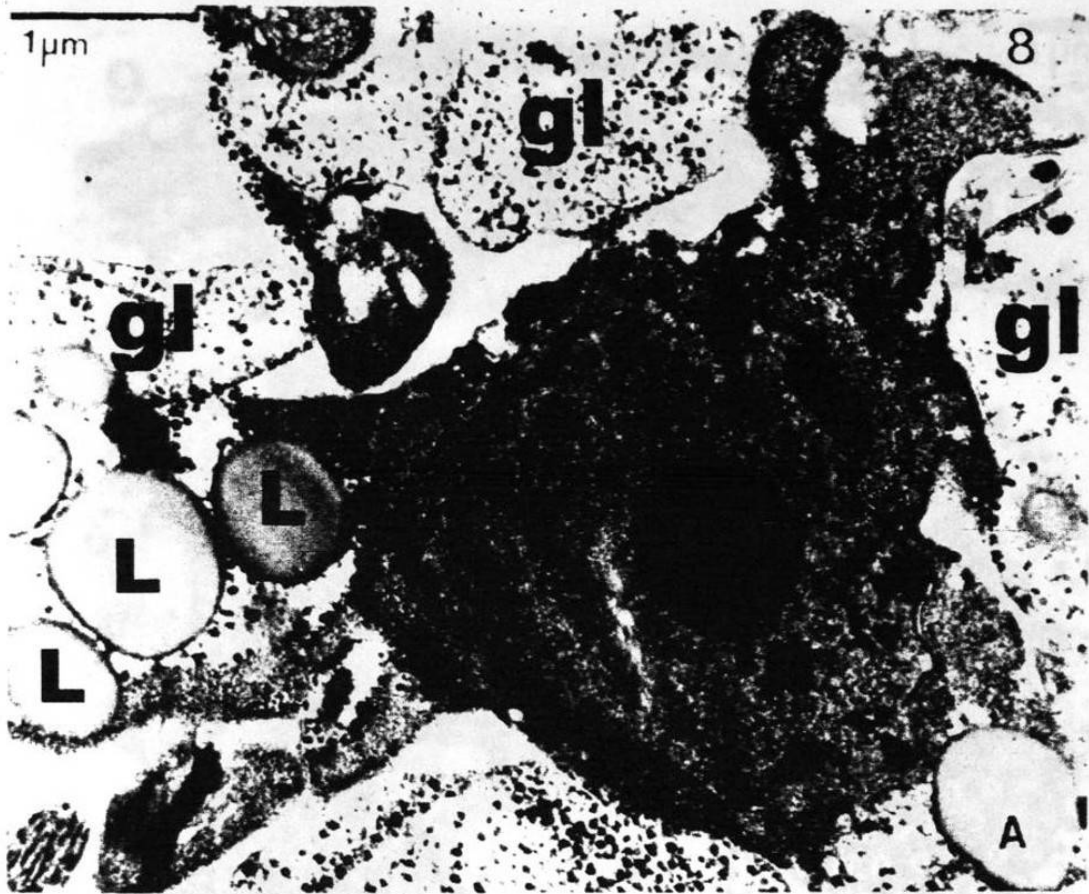


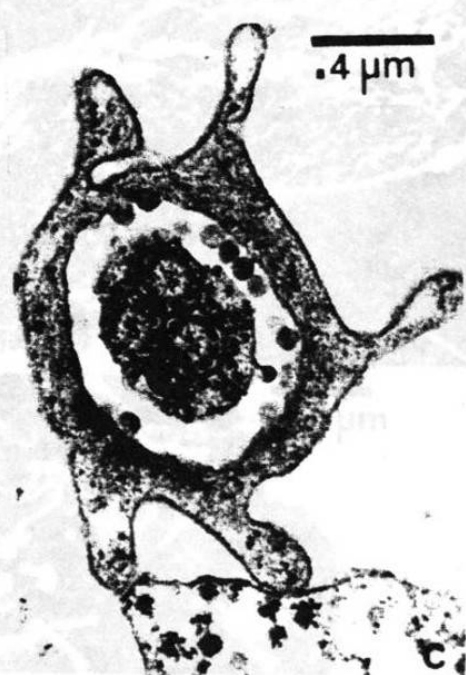
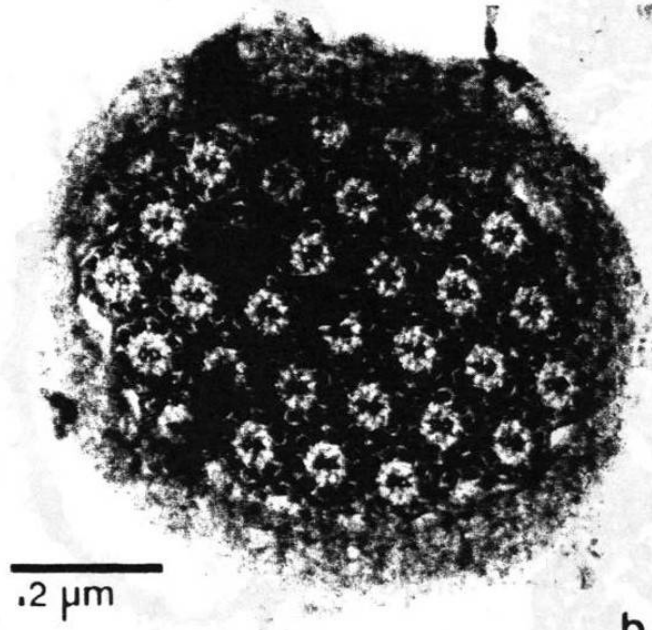
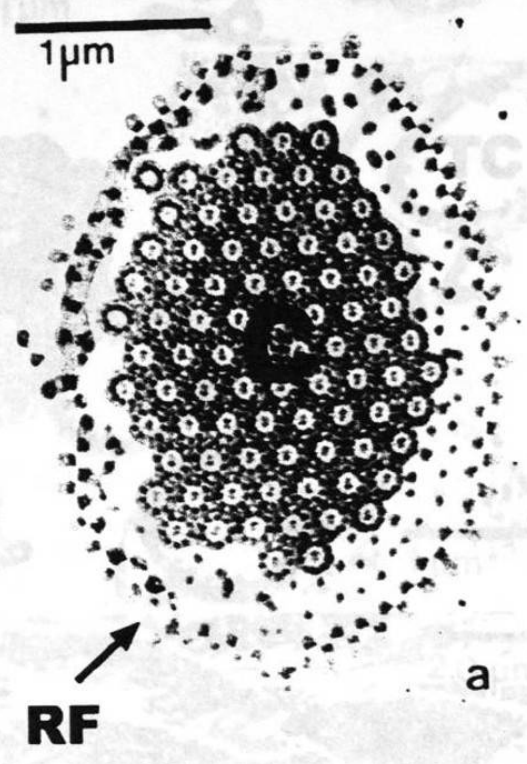
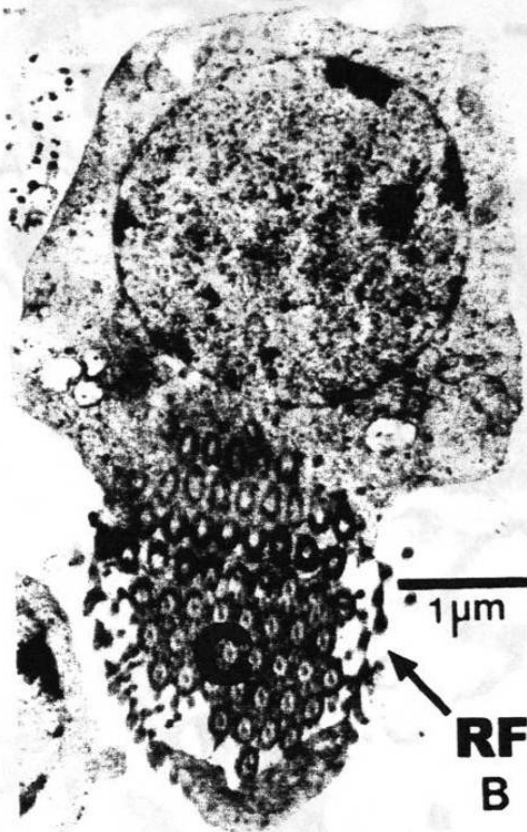
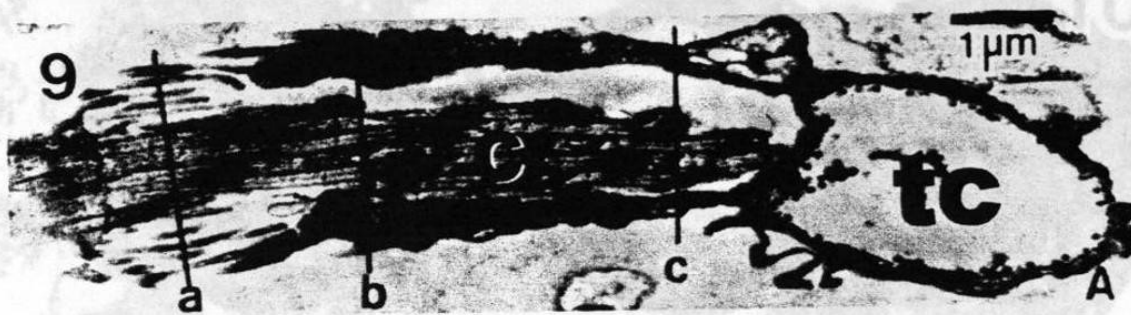
2.5 μm

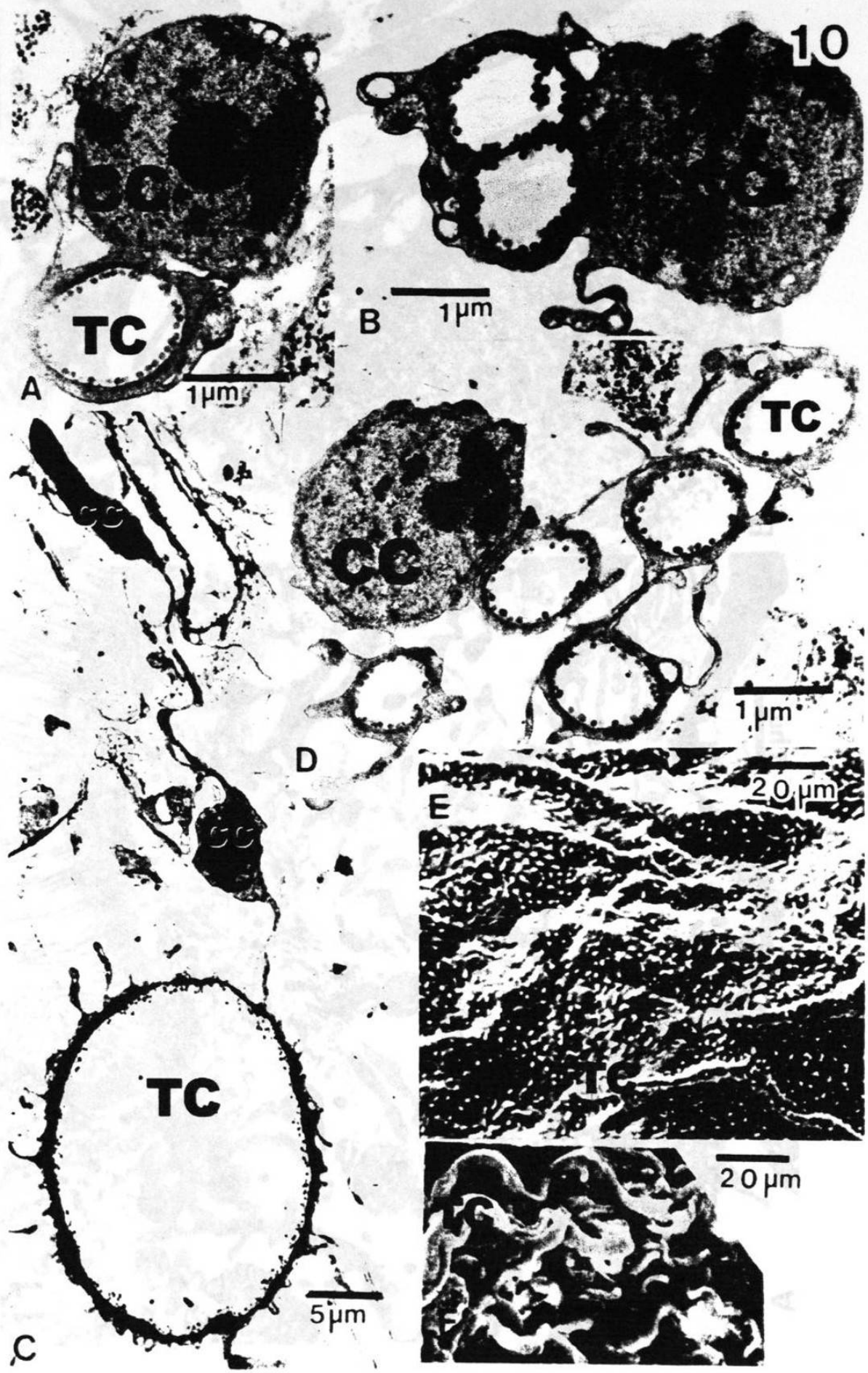














B



A







