

# Captación de ácido siálico por larvas de *Ascaris lumbricoides* durante incubación *in vivo*

## *Sialic acid capture by Ascaris lumbricoides larvae during in vivo incubation*

## Captação de ácido siálico por vermes de Ascaris lumbricoides durante incubação in vivo

► Patricia Ponce de León<sup>1a</sup>, Santiago Di Vita<sup>2a</sup>, Claudia Biondi<sup>3b</sup>, Juana Valverde<sup>3b</sup>

---

<sup>1</sup> Bioquímica.

<sup>2</sup> Estudiante de Bioquímica.

<sup>3</sup> Doctora en Ciencias Bioquímicas.

<sup>a</sup> Laboratorio de Parasitología.

<sup>b</sup> Laboratorio de Inmunohematología, Hemoreología e Inmunogenética. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

### Resumen

La agregación eritrocitaria afecta la microcirculación y su estudio es importante en las vasculopatías. Se comunicó que *Ascaris lumbricoides* puede capturar ácido siálico (AS) del eritrocito y alterar la carga aniónica del glóbulo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la captación de AS por larvas de *A. lumbricoides* incubadas *in vivo* con eritrocitos. Se trabajó con un concentrado de larvas ([CLAL]) incubado en 4 tubos con *buffer* fosfato y antibióticos. En dos se agregaron eritrocitos Grupo O. Los restantes fueron controles. Se incubaron a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) durante 24 y 48 horas. Las larvas fueron separadas, recolectadas, concentradas y contadas microscópicamente (larvas/mL: [CLAL]1: 1500-1700; [CLAL]3 1600-1800; [CLAL]2 y 4: 200-400). Se utilizaron las técnicas de Inhibición de la Agregación por Polibrene (IAP) y Alcian Blue (AB). La IAP mostró una diferencia significativa entre los Títulos de Polibrene diluido en solución fisiológica y en [CLAL]1 y 2 que fueron incubados con eritrocitos 24 y 48 horas respectivamente. No hubo variación en el Título de los Controles correspondientes ([CLAL]3 y [CLAL]4). AB realizada en [CLAL]1 y [CLAL]3, determinó CASCap%= 6,65% ± 0,36 y CAS<sub>[CLAL]3</sub>% = 0,67% ± 0,36. La experiencia demostró la captación de AS por las larvas incubadas *in vivo* con eritrocitos y sugirió que ellas no presentan AS intrínseco. El secuestro de AS durante la migración larvaria podría ser importante en la interacción parásito-hospedador.

**Palabras clave:** captación \* ácido siálico \* larvas \* *Ascaris lumbricoides*

### Summary

*Erythrocyte aggregation affects microcirculation and its study is important in vascular diseases. It was communicated that Ascaris lumbricoides can capture erythrocyte sialic acid (SA) and alter the anionic charge on the red cell. The aim of this work was to study SA capture by A. lumbricoides larvae*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

incubated *in vivo* with erythrocytes. Work was performed with concentrated larvae ([ALLC]) incubated in 4 tubes with phosphate buffer and antibiotics. Group O erythrocytes were added in two Tubes. The remaining were Controls. They were incubated at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) for 24 and 28 hours. The larvae were separated, collected, concentrated and counted microscopically (larvae/mL: [ALLC]1: 1500- 1700; [ALLC]3: 1600- 1800; [ALLC]2 and 4: 200- 400). Aggregation Inhibition by Polybrene (AIP) and Blue Alcian (BA) techniques were used. AIP showed a significant difference between Polybrene Titters diluted with physiological solution and with [ALLC]1 and 2, which were incubated with erythrocytes 24 and 48 hours respectively. There was no change in the Title of the corresponding Controls. BA performed in [ALLC]1 and [ALLC]3 determined CapSAC = 6.65% ± 0.36 and SAC<sub>[CLAL]3</sub> % = 0.67% ± 0.36. The experience showed SA capture by larvae incubated *in vivo* with erythrocytes and it suggested that they have no intrinsic SA. SA kidnapping during the larval migration could be important in parasite-host interaction.

**Keywords:** capture \* sialic acid \* larvae \* *Ascaris lumbricoides*

## Resumo

A agregação eritrocitária afeta a microcirculação e seu estudo é importante nas vasculopatias. Foi comunicado que o *Ascaris lumbricoides* pode capturar ácido siálico (AS) do eritrócito e alterar a carga aniônica do glóbulo. O objetivo deste trabalho foi estudar a captação de AS por vermes de *A. lumbricoides* incubados *in vivo* com eritrócitos. Trabalhou-se com uma concentração de larvas ([CLAL]) incubada em 4 tubos com buffer fosfato e antibióticos. Em dois foram agregados eritrócitos Grupo O. Os restantes foram controles. Foram incubados a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) durante 24 e 48 horas. As larvas foram separadas, coletadas, concentradas e contadas microscopicamente (larvas/mL: [CLAL]1: 1500-1700; [CLAL]3 1600-1800; [CLAL]2 e 4: 200-400). As técnicas utilizadas foram de Inibição da Agregação por Polybrene (IAP) e Alcian Blue (AB). A IAP mostrou uma diferença significativa entre os Títulos de Polybrene diluído em solução fisiológica e em [CLAL]1 e 2 que foram incubados com eritrócitos 24 e 48 horas respectivamente. Não houve variação no Título dos Controles correspondentes ([CLAL]3 e [CLAL]4). AB realizada em [CLAL]1 e [CLAL]3, determinou CASCap% = 6,65% ± 0,36 e CAS<sub>[CLAL]3</sub>% = 0,67% ± 0,36. A experiência demonstrou a captação de AS pelos vermes incubados *in vivo* com eritrócitos e sugeriu que eles não apresentam AS intrínseco. O sequestro de AS durante a migração de larvas poderia ser importante na interação parasita-hospedeiro.

**Palavras chaves:** captação \* ácido siálico \* vermes \* *Ascaris lumbricoides*

## Introducción

El ácido siálico es responsable de la carga negativa distribuida sobre la membrana celular del eritrocito. Esta carga negativa tiene significado hemorreológico y hemodinámico. Cualquier disminución del contenido de ácido siálico en la membrana del glóbulo rojo implica una disminución de la repulsión electrostática intercelular normal, favoreciendo la agregación eritrocitaria, la formación de *rouleaux* y el aumento de la viscosidad de la sangre, por lo que el flujo sanguíneo se torna más lento (1).

La agregación de los eritrocitos juega un rol importante en la microcirculación y su estudio es particularmente relevante en diabetes, aterosclerosis, hipertensión arterial y otras vasculopatías (1-4).

La comprensión a nivel molecular del enlace hidrato de carbono/proteína ha posibilitado el conocimiento de las funciones biológicas de los hidrato de carbono. Actualmente se considera que tendrían un papel impor-

tante en la interacción parásito-hospedador (5). Se ha demostrado la participación del ácido siálico en las infecciones parasitarias producidas por *Trypanosoma cruzi*, *T. congolense*, *T. brucei*, *T. evansi* (6-14), *Plasmodium falciparum* (15)(16) y *Entamoeba histolytica* (17). En investigaciones previas se comunicó que *Ascaris lumbricoides* puede captar ácido siálico del eritrocito y alterar la carga aniónica superficial del glóbulo (18)(19).

El objetivo fue estudiar la captación de ácido siálico por larvas de *A. lumbricoides* incubadas *in vivo* con glóbulos rojos.

## Materiales y Métodos

### MUESTRAS

#### Concentrado de Larvas ([CLAL])

Se utilizó un concentrado de larvas (L1/L2) obtenido de la embrionación *in vitro* (20) y posterior eclosión de

huevo de *A. lumbricoides* (21). Las larvas fueron recolectadas a 37 °C por el método de Baermann-Moraes (22) en *buffer* fosfato (PBS) con antibióticos (vancomicina 300 µg/mL; colistina 750 µg/mL; nistatina 1250 U/mL; trimetoprima 500 µg/mL), pH 7. Completada la recolección fueron concentradas por centrifugación y se procedió al recuento de las larvas por duplicado en microscopio óptico, el que determinó una cantidad de 2000 larvas/mL.

## REACTIVOS

### *Técnica de Inhibición de la Agregación por Polibrene (Método en placa de vidrio)*

1. LIM
 

dextrosa	25 g
disodio EDTA	1 g
agua destilada	500 mL
2. Polibrene 0,1%
 

Solución de Almacenamiento 10% (1 g de Polibrene + 10 mL de solución salina)

Solución de trabajo (5 mL solución de almacenamiento + 495 mL de solución salina).

### *Técnica de Alcian Blue Modificada:*

- Solución de Alcian Blue: En el momento de uso disolver 6,25 mg de colorante en 25 mL de alcohol etílico (99,5%). Colocar en baño a 37 °C durante 30 min y luego centrifugar (5 min a 1500-2000 rpm).
- Glóbulos rojos frescos Grupo O de muestras obtenidas con anticoagulante (EDTA). Los eritrocitos fueron lavados 3 veces en *buffer* fosfato (pH 7).
- Alcohol etílico 99,5%

## MÉTODOS

### *Incubación*

Se prepararon 4 tubos con 3 mL de *buffer* fosfato (pH 7) con antibióticos (vancomicina 300 µg/mL; colistina 750 µg/mL; nistatina 1250 U/mL; trimetoprima 500 µg/mL).

En los tubos 1 y 2 se adicionaron 100 µL del sedimento de glóbulos rojos frescos Grupo O y se homogeneizó. Los restantes (tubos 3 y 4) se utilizaron como controles. Se agregaron en todos 500 µL de [CLAL] y se colocaron en estufa a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los tubos 1 y 3 fueron incubados 24 h y los tubos 2 y 4 durante 48 h.

Finalizado el tiempo de incubación correspondiente, las larvas fueron nuevamente separadas por el método de Baermann Moraes, recolectadas y lavadas 3 veces en *buffer* fosfato (pH 7) con antibióticos. Se concentraron por centrifugación y se realizó el conteo de las mismas por duplicado en microscopio óptico ([CLAL]1: 1500- 1700

larvas/mL; [CLAL]2: 200-300 larvas/mL; [CLAL]3: 1600- 1800 larvas/mL; [CLAL]4: 200- 400 larvas/mL)

### *1-Técnica de Inhibición de la Agregación por Polibrene (Método en placa de vidrio)*

A los fines de evaluar la captación de ácido siálico por las larvas, se implementó una Técnica de Inhibición de la Agregación basada en el Método de Polibrene en placa de vidrio (23). La técnica se fundamenta en que el bromuro de hexadimetrina (Polibrene) es un polímero sintético, cargado positivamente, que tiene la propiedad de unirse al ácido siálico y producir la agregación de los eritrocitos normales, pero no agrega los glóbulos con carga negativa reducida (24).

El primer paso fue poner en contacto durante 30 min a temperatura ambiente, 50 µL de Polibrene 0,1% con igual volumen del [CLAL] recuperado de la incubación (mezcla [CLAL]- Polibrene). De esta manera el Polibrene quedó diluido ½. Para ello se utilizaron los [CLAL] incubados con eritrocitos (tubos 1 y 2) y los [CLAL] controles correspondientes (tubos 3 y 4).

A continuación se prepararon 3 series de diluciones seriadas progresivas al medio de Polibrene a partir de ½. La primera serie se realizó diluyendo el Polibrene en solución fisiológica (SF). Las otras dos series se hicieron a partir de las mezclas [CLAL]-Polibrene.

Finalmente se aplicó el Método de Polibrene (23), utilizando una suspensión al 20% de eritrocitos humanos frescos Grupo O, lavados 3 veces en SF. Para ello se colocaron en una placa de vidrio 3 gotas de LIM (solución de baja fuerza iónica) y 1 gota de la suspensión eritrocitaria. Se mezcló con varilla de vidrio y se agregó 1 gota de la dilución de Polibrene, volviendo a mezclar con la varilla. Se homogenizó por movimientos circulares de la placa de vidrio durante 1 min. El método se realizó con cada una de las diluciones de Polibrene de las 3 series.

Se determinó el Título de Polibrene en cada serie, como la última dilución del mismo que producía la agregación de los eritrocitos. Se consideró significativa una diferencia del Título de Polibrene igual o mayor a dos diluciones entre las series.

### *Interpretación*

Si las larvas, durante la incubación con eritrocitos, captaron ácido siálico, éste se une al Polibrene en el primer paso de la técnica (mezcla [CLAL]- Polibrene). La cantidad de polímero libre será menor, y por lo tanto la última agregación de los eritrocitos se visualizará a una mayor concentración del Polibrene (menor Título de Agregación).

### *2-Técnica de Alcian Blue Modificada (25)*

Esta técnica espectrofotométrica permite estudiar de manera indirecta la carga y el contenido de ácido siálico superficial del glóbulo rojo. Se fundamenta en la unión del colorante catiónico Alcian Blue con el ácido siálico.

La absorbancia del blanco corresponde al 100% de Alcian Blue. La absorbancia medida en el sobrenadante del tubo en el que se coloca la muestra de eritrocitos, corresponde al colorante que no se ha unido a los glóbulos. La medición de absorbancia del Alcian Blue que permanece libre, es referida a la del Blanco para calcular el porcentaje que representa. Por diferencia con el 100% se calcula el porcentaje de colorante unido al ácido siálico de la muestra, que se denominará CAS% (carga de ácido siálico porcentual). Debido a que el colorante se disuelve en alcohol, y produce hemólisis globular, se debe preparar un blanco de hemólisis cuyo valor de absorbancia se resta al de la muestra con eritrocitos.

Esta técnica se aplicó en los [CLAL] incubados 24 horas, debido a que las cantidades de larvas en ellos fueron notablemente mayores a las cantidades recuperadas a las 48 horas.

Se siguió el mismo protocolo de la técnica original, pero incorporando además 2 tubos con la misma muestra de eritrocitos más el agregado de [CLAL]1 y del

Control ([CLAL]3), respectivamente.

Para que el método permitiera observar la mayor diferencia entre las lecturas de absorbancia de los eritrocitos con y sin el agregado de larvas se utilizaron los remanentes totales de los [CLAL] después de la realización de la Técnica de Inhibición de la Agregación (150 µL de [CLAL] 1 y de [CLAL] 3).

A los fines de comprobar que el volumen agregado de [CLAL] no interfería en el método, se prepararon también un blanco (B2), blanco de hemólisis (BH2) y tubo de medición de la muestra de eritrocitos (TM GR 2) donde se adicionaron 150 µL de alcohol. El protocolo se muestra en la Tabla I.

Los 8 tubos fueron incubados en baño termostático durante 30 min a 37 °C.

A continuación se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y se efectuó la medición espectrofotométrica de absorbancia en el sobrenadante, por duplicado, a 650 nm

Se calcularon los valores de CAS% (Carga de Ácido Siálico porcentual).

#### *CÁLCULO DE LA CARGA DE ÁCIDO SIÁLICO PORCENTUAL DE LOS GLÓBULOS ROJOS (CAS<sub>GR</sub>%)*

$$\% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = \frac{(\text{Absorbancia TM} - \text{Absorbancia BH}) \cdot 100}{\text{Absorbancia de B}}$$

$$\text{CAS}_{\text{GR}} \% = 100 - \% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = 100 - \frac{[(\text{Absorbancia TM} - \text{Absorbancia BH}) \cdot 100]}{\text{Absorbancia de B}}$$

#### *CÁLCULO DE LA CARGA DE ÁCIDO SIÁLICO PORCENTUAL DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y [CLAL]1*

$$\% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = \frac{(\text{CAS}_{\text{GR} + [\text{CLAL}]1} - \text{Absorbancia TML} - \text{Absorbancia BH}) \cdot 100}{\text{Absorbancia de B}}$$

$$\text{CAS}_{\text{GR} + [\text{CLAL}]1} \% = 100 - \% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = 100 - \frac{[(\text{Absorbancia TML} - \text{Absorbancia BH}) \cdot 100]}{\text{Absorbancia de B}}$$

#### *CÁLCULO DE LA CARGA DE ÁCIDO SIÁLICO PORCENTUAL DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y [CLAL]3 (CONTROL) (CAS<sub>GR + [CLAL]3</sub>%)*

$$\% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = \frac{(\text{Absorbancia TMLC} - \text{Absorbancia BH}) \cdot 100}{\text{Absorbancia de B}}$$

$$\text{CAS}_{\text{GR} + [\text{CLAL}]3} \% = 100 - \% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = 100 - \frac{[(\text{Absorbancia TMLC} - \text{Absorbancia BH}) \cdot 100]}{\text{Absorbancia de B}}$$

$\text{CAS}_{[\text{CLAL}]1} \% = \text{CAS}_{\text{GR} + [\text{CLAL}]1} \% - \text{CAS}_{\text{GR}} \%$  (este valor corresponde al colorante unido al ácido siálico del concentrado larval incubado con eritrocitos)

$\text{CAS}_{[\text{CLAL}]3} \% = \text{CAS}_{\text{GR} + [\text{CLAL}]3} \% - \text{CAS}_{\text{GR}2} \%$  (este valor corresponde al colorante unido al ácido siálico de las larvas control, por lo que representaría al ácido siálico naturalmente presente en los estadios larvales)

#### *CARGA DE ÁCIDO SIÁLICO PORCENTUAL CAPTADO POR LAS LARVAS DURANTE LA INCUBACIÓN CON ERITROCITOS (CASCap%)*

$$\text{CASCap}\% = \text{CAS}_{[\text{CLAL}]1} \% - \text{CAS}_{[\text{CLAL}]3} \%$$

Tabla I. Protocolo de la técnica de Alcian Blue modificada.

	Blanco (B)	Blanco (B2)	Blanco de Hemólisis (BH)	Blanco de Hemólisis (BH2)	Muestra GR (TM)	Muestra GR (TM2)	Muestra GR + Larvas (TML)	Muestra GR + Larvas Control (TMLC)
Solución de Alcian Blue	2 mL	2 mL	-	-	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Culot de GR	-	-	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Alcohol etílico	-	150 µL	2 mL	2 mL +150 µL	-	150 µL	-	-
[CLAL] <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	150 µL	-
[CLAL] <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	150 µL

GR glóbulos rojos

### Interpretación

La absorbancia de Alcian Blue medida en el sobrenadante de TM es menor a la de B, porque el colorante libre ha disminuido por su unión a los eritrocitos. Si el [CLAL] incubado con glóbulos rojos captó ácido siálico, la absorbancia medida en el sobrenadante de TML será menor a la de TM, pues el colorante también se unirá al ácido siálico de las larvas. La diferencia entre ambos valores de CAS%, indicará el valor que representa al ácido siálico presente en las larvas incubadas con glóbulos rojos.

La diferencia entre el CAS% de TM y TMLC, representaría al ácido siálico intrínseco a las larvas, por lo que al restar este valor al obtenido con el concentrado larval incubado con eritrocitos, se obtiene el valor que corresponde al ácido siálico captado por las larvas.

## Resultados

### 1-TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN POR POLIBRENE (MÉTODO EN PLACA DE VIDRIO)

La titulación de Polibrene en las 3 series mostró diferencias significativas entre el título de la primera y segunda serie para los [CLAL] incubados 24 y 48 horas, por lo que se demostró que las larvas captaron ácido siálico de los eritrocitos. Si bien la cantidad de larvas de [CLAL]2 fue notablemente inferior a la de [CLAL]1, la

diferencia de título fue de dos diluciones para ambos tiempos de incubación, lo que pudo haberse debido a que hubo 24 horas más de contacto entre las larvas de [CLAL]2 y los glóbulos.

No se observó diferencia entre el título de la tercera serie en relación a la primera en ninguno de los dos casos, indicando que los estadios larvales carecían de ácido siálico intrínseco, o bien lo podrían tener en cantidades muy pequeñas como para ser detectadas por el método. Los resultados se muestran en la Tabla II

### 2-TÉCNICA DE ALCIAN BLUE MODIFICADA

El valor calculado de CAS<sub>GR</sub>% fue similar con y sin el agregado de los 150 µL de alcohol (TM y TM2). Se decidió usar las mediciones de absorbancia de B2, BH2 y TM2 para el cálculo porcentual del colorante unido al ácido siálico de las larvas (TML y TMLC) para que las lecturas de absorbancia correspondiesen al mismo volumen de muestra.

#### Cálculo de CAS<sub>GR</sub>%

Absorbancia B= 0,776 Absorbancia TM= 0,652 Absorbancia BH= 0,07

$$\% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = \frac{0,582 \cdot 100}{0,776} = 75\%$$

$$\text{CAS}_{\text{GR}} \% = 25\% \pm 0,32 (x \pm s_x)$$

Tabla II. Resultados de la técnica de inhibición de la agregación

Incubación	Título Polibrene Primera serie (Polibrene diluido en SF)	Título Polibrene Segunda serie (mezcla [CLAL]-Polibrene)	Título Polibrene Tercera serie (mezcla [CLAL] Control- Polibrene)
24 horas [CLAL]1: 1500- 1700 larvas/mL [CLAL]3: 1600- 1800 larvas/mL (Control)	32	8	32
48 horas [CLAL]2: 200- 400 larvas/mL [CLAL]4: 200- 400 larvas/mL (Control)	16	4	16

*Cálculo de CAS<sub>GR2</sub>% con el agregado de alcohol*

Absorbancia B2= 0,751 Absorbancia TM2= 0,635  
Absorbancia BH2= 0,068

$$\% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = \frac{0,567 \cdot 100}{0,751} = 75,50\%$$

$$\text{CAS}_{\text{GR2}} \% = 24,50\% \pm 0,37 (x \pm s_x)$$

*Cálculo de CAS%<sub>GR2+ [CLAL]1</sub>*

Absorbancia TML= 0,580

$$\% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = \frac{0,512 \cdot 100}{0,751} = 68,18\%$$

$$\text{CAS} \%_{\text{GR2+ [CLAL]1}} = 31,82\% \pm 0,36 (x \pm s_x)$$

*Cálculo de CAS%<sub>GR2+ [CLAL]3 (Control)</sub>*

Absorbancia TMLC= 0,630

$$\% \text{ de Alcian Blue en el sobrenadante} = \frac{0,562 \cdot 100}{0,751} = 74,83\%$$

$$\text{CAS}\%_{\text{GR2+ [CLAL]3}} = 25,17\% \pm 0,35 (x \pm s_x)$$

$$\text{CAS}\%_{[\text{CLAL}]1} = \text{CAS}\%_{\text{GR2+ [CLAL]1}} - \text{CAS}\%_{\text{GR2}} = 31,82\% - 24,50\% = 7,32\% \pm 0,36$$

$$\text{CAS}\%_{[\text{CLAL}]3} = \text{CAS}\%_{\text{GR2+ [CLAL]3}} - \text{CAS}\%_{\text{GR2}} = 25,17\% - 24,50\% = 0,67\% \pm 0,36$$

$$\text{CASCap}\% = 7,32\% - 0,67\% = 6,65\% \pm 0,36$$

## Discusión y Conclusiones

La presencia de ácido siálico en la superficie del eritrocito determina la carga negativa, y su disminución tiene consecuencias hemorreológicas y hemodinámicas que son fundamentales en el desarrollo de distintas patologías humanas (1).

Los distintos grupos de ionización presentes en la superficie externa de la membrana plasmática son responsables de que todas las células vivas tengan globalmente una carga negativa superficial expuesta al medio acuoso que las rodea. Este potencial eléctrico negativo condiciona la estabilidad física de la célula en la circulación sanguínea (26). Cualquier disminución del contenido de ácido siálico en la membrana del eritrocito implica una disminución de la repulsión electrostática intercelular normal, favoreciendo la agregación eritrocitaria y aumentando la interacción del glóbulo rojo con el endotelio vascular (3). La agregación de los eritrocitos juega un importante papel en el flujo sanguíneo, particularmente en la microcirculación, y por lo tanto su estudio es de relevancia en diabetes, aterosclerosis, hipertensión arterial y otras vasculopatías (27).

La ascariosis constituye un problema de salud pública en países no desarrollados. El parásito posee una gran resistencia metabólica y capacidad de reproducción, lo que explica la alta frecuencia de casos humanos (28). El ciclo biológico de *A. lumbricoides* incluye una migración larvaria por el torrente circulatorio, la cual per-

mite un contacto directo de las larvas con los eritrocitos del hospedador.

En experiencias previas se comunicó que extractos de ejemplares adultos del parásito y concentrados de larvas de *A. lumbricoides* alteran la carga superficial eritrocitaria, lo que indicó que el nematodo tendría la capacidad de captar ácido siálico del glóbulo rojo (18) (19).

La aplicación de las técnicas de inhibición de la agregación por Polibrene y de Alcian Blue mostraron que las larvas incubadas 24 y 48 horas con eritrocitos, captan *in vivo* el ácido siálico de la membrana globular.

En las condiciones experimentales utilizadas, la captación fue moderada, tal como indicó la diferencia de 2 diluciones entre el título del Polibrene de la segunda serie con respecto a la primera, y el valor de CASCap% (6,65% ± 0,36). Los resultados se correlacionaron con los obtenidos previamente, donde se sugirió que en los glóbulos rojos tratados con concentrados larvales de *A. lumbricoides* la pérdida de ácido siálico de los eritrocitos debería ser inferior al 12% (19).

No se demostró la presencia de ácido siálico en [CLAL] 3 y 4 (controles) con la técnica de inhibición de la agregación. La técnica de Alcian Blue determinó un valor muy pequeño de CAS%<sub>[CLAL]3</sub> (0,67% ± 0,36) que pudo deberse al error propio del método. Por lo tanto, las experiencias indicarían que las larvas no poseen *per se* ácido siálico. Si bien no se puede descartar en forma absoluta que los estadios larvales carezcan naturalmente de ácido siálico, es posible que si éste está presente en escasa cantidad sobre las superficies larvales, no fuera detectado con las metodologías utilizadas.

La disminución del ácido siálico eritrocitario puede relacionarse con algunos aspectos de la patología producida por *A. lumbricoides* como son la anemia y la formación de trombos ocasionados por migraciones erráticas del parásito (29-32).

Desde otro punto de vista, el secuestro de ácido siálico por las larvas durante su migración por la corriente sanguínea podría deberse a una estrategia de evasión parasitaria. Se ha comunicado que el ácido siálico inhibe la vía alternativa del complemento (33) (34) y que está involucrado en funciones biológicas celulares, en procesos de reconocimiento celular, en la vida media de células y proteínas plasmáticas, en la modulación del sistema inmune y en la apoptosis, así como también se ha reconocido que es ligando de moléculas de adhesión que median la adhesión celular o la transducción de señales (5).

Se concluye que la captación de ácido siálico por las larvas de *A. lumbricoides* podría tener un papel importante en la interacción parásito-hospedador.

### CORRESPONDENCIA

DRA. PATRICIA PONCE DE LEÓN

Laboratorio de Parasitología. Dpto. de Microbiología

Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas

Suipacha 531

2000 Rosario – SANTA FE - Argentina

E-mail: tefu1958@hotmail.com

## Referencias bibliográficas

1. Foresto PG, D'Arrigo M, Filipini F, Gallo R, Rasia R, Valverde JR. Estudio de parámetros hemorreológicos en hipertensión esencial. *Rev Fed Argent Cardiol* 2002; 31: 69-73.
2. Filipini F, Foresto PG, Gallo R, D'Arrigo M, Barberena S, Valverde J. Consideraciones hemorreológicas de la hipertensión arterial. *Boletín CAHTA* 2006; 7: 30-7.
3. Carrera Fernández LI, Etchepare R, Foresto PG, D' Ottavio Cattani AE, D'Arrigo M, Valverde J. La agregación eritrocitaria en la fisiopatogenia de las lesiones cutáneas microangiopáticas diabéticas. *Endocrinol Nutr* 2006; 53(4): 242-5.
4. Licea Puig M. Alteraciones hemorreológicas en la diabetes mellitus: revisión bibliográfica. *Rev Cubana Med* 1987; 26(12): 1321-8.
5. Previato L, Todeschini AR, Previato JO. Enfermedad de Chagas. Macromoléculas: Carbohidratos, lípidos y glucoproteínas. Disponible en: [http://www.fiocruz.br/chagas\\_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=79](http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=79). (Fecha de acceso: 8 de setiembre de 2010.)
6. Buscaglia C. Trans- sialidasa de *Trypanosoma cruzi*: un blanco potencial para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá* 2002; 21 (1): 24-7.
7. Souto Padron T. The surface charge of trypanosomatids. *An Acad Bras Ciênc* 2002; 74 (4): 649-75.
8. Hemphil A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endotelial cells. *Parasitol Res* 1995; 81: 412-20.
9. Boada Sucre A, Rossi S, Marcello S, De Stefano H. Alteraciones en el patrón de enlazamiento de lectinas en el riñón de ratones infectados experimentalmente con una cepa venezolana de *Trypanosoma evansi*. *Rev Cient* 2004; 14 (5): 431-9.
10. Anosa VO, Kaneko JJ. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis. *Am J Vet Res* 1983; 44: 645-51.
11. Esievo KAN, Saror DI, Ilemobade AA, Hallaway MH. Variation in erythrocyte surface and free serum sialic acid concentrations during experimental *Trypanosoma vivax* infection in Cattle. *Res Vet Sci* 1982; 2: 1-5.
12. Nok AJ, Humprey C, Zelibe N, Yako SK. Sialidase: surface localization, properties and hydrolysis of ghost red blood cells and brain cells-identification in tripanosomiasis. *Zentrabl Natur* 2003; 58: 504-601.
13. Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi* FASEB J 1993; 7: 1257-64.
14. Colli W, Hemphil A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endotelial cells. *Parasitol Res* 1995; 81: 412-20.
15. Colli W, Pasvol G, Wainscoat JS, Weatherall DJ. Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1982; 297: 64-6.
16. Mayer DC, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, et al. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *PNAS* 2009; 106(13): 5348-52.
17. Chayen A, Avron B, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immunol* 1988; 56(3): 673-81.
18. Ponce de León P, Lebensohn N, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: alteration of the erythrocyte superficial charge using the Partition Method in aqueous two-phase system. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2009; 51 (4): 219-21.
19. Ponce de León P, Biondi C, Valverde J. Efecto producido por *Ascaris lumbricoides* sobre la carga superficial eritrocitaria utilizando el Método de Polibrene. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2010; 44 (4): 689-96.
20. Fairbairn D. The *in vitro* hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Canad J Zool* 1961; 39: 153-62.
21. Geenen PL, Bresciani JB, Pedersen A, Eirksen H, Fagerholm PN. The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg. *J Parasitol* 1999; 85 (4): 616-22.
22. Shore García L, Ash L. Diagnóstico parasitológico. 2º ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1983.
23. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. *Transfusion Today* 2006; 66:28.
24. Mollison PL. Transfusión de sangre en Medicina Clínica. Barcelona: Editorial Reverté; 1987.
25. Oguzhan D, Dilek Y, Ayliz V, Hasan C, Nihal A, Goncagül H, et al. Effects of ACE inhibition and angiotensin II receptor blockade on glomerular basement membrane protein excretion and charge selectivity in type 2 diabetic patients. *JRAAS* 2006; 7: 98.
26. Riquelme B, Foresto P, Relancio F, Lebensohn N, Di Tullio L, Grandfils C, et al. Evaluación de la acción de nuevos policationes sintéticos sobre las propiedades viscoelásticas de la membrana eritrocitaria. *Anales AFA* 2005; 17: 325-7.
27. D'Arrigo M, Foresto P, Carrera L, Etchepare Cuzzo R, Racca L, Valverde J, et al. Agregación eritrocitaria y diabetes. *Med* 1999; 59 (5): 2.
28. Scot M. *Ascaris lumbricoides*: Una revisión de su epidemiología y su relación con otras infecciones. *An Nestlé* 2008; 66 (1): 7-22.
29. Beaver PCH, Jung RC, Cupp EW. Parasitología Clínica. 2ªed. Barcelona: Salvat; 1986.
30. Bardenwerper HE. *Ascaris lumbricoides* infestation with extreme anemia. *JAMA* 1928; 91 (14): 1037.
31. García- Leiva J, Barreto- Zuñiga R, Estradas J, Torre A. *Ascaris lumbricoides* and iron deficiency anemia. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1051-2.
32. Amuga GA, Onwuliri COE, Oniye SJ. Relative contribution of hookworm and *Ascaris lumbricoides* to iron deficiency anemia among school pupils in Nasarawa area, Nigeria. *IJONAS* 2006; 2 (3): 205-9.
33. Norris KA, Cooper NR, So M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J Immunol* 1991; 147 (7): 2240-7.
34. Murray PR, Rosenthal K, Pfaller MA. Microbiología Médica. Madrid: Gea Consultoría Editorial; 2006.

**Aceptado para su publicación el 1º de julio de 2011**

