

Acción de *Ascaris lumbricoides* sobre la carga aniónica de eritrocitos y eritrocitos desializados*

Ascaris lumbricoides action on the erythrocyte and desialated erythrocyte anionic charge

Ação de *Ascaris lumbricoides* sobre a carga aniônica de eritrócitos e eritrócitos desializados

► Patricia Ponce de León^{1a}, Liliana Racca^{2b}, Manuel Menéndez^{3a},
Claudia Biondi^{4c}, Juana Valverde^{4c}

¹ Bioquímica.

² Estadística

³ Becario, alumno de Medicina

⁴ Doctora en Ciencias Bioquímicas

^a Área de Parasitología.

^b Área Estadística y Procesamiento de Datos.

^c Laboratorio de Inmunohematología, Hemorreología e Inmunogenética

* Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de *A. lumbricoides* sobre la carga aniónica de eritrocitos y eritrocitos desializados. Se trabajó con 30 extractos ([EA]) y 2 concentrados larvales parasitarios ([CLAL] 1: 500- 600/ [CLAL]2: 200- 300 larvas/ mL) y eritrocitos Grupo "O" en medio salino (GR) y enzimático (GRb). Se incubó el sedimento globular con igual volumen de parásito y el Control (GRc) con solución fisiológica, a 37 °C. Se aplicaron los Métodos de Polibrene y Azul Alcian y se implementó una Titulación de la Agregación a partir del Polibrene. Se definieron coeficientes para cada método que fueron analizados estadísticamente. Los resultados mostraron que a mayor tiempo de tratamiento y a mayor concentración larvaria, aumentó la captación de ácido siálico (AS) disminuyendo la agregación de GR y GRb. El efecto fue mayor en la incubación del parásito con GRb en relación de GR. El tratamiento enzimático redujo la carga porcentual en los glóbulos incubados con ambos [CLAL] de forma similar (16%-17% de la inicial) y la Diferencia de Carga de GR y GRb debida a ambos fue aproximadamente del 10% indicando que la pérdida de carga producida por [CLAL]1 fue significativa con respecto a [CLAL]2. Se concluye que *A. lumbricoides* puede captar AS eritrocitario. Este fenómeno contribuiría a explicar la anemia y trombos producidos en ascariosis, destacando que en pacientes con patologías que cursen con déficit de AS estas complicaciones serían más relevantes.

Palabras clave: *Ascaris lumbricoides* * carga eritrocitaria

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)

Summary

The aim of this work was to study the *A. lumbricoides*' effect on the anionic charge of erythrocytes and desialated erythrocytes. Work was carried out on 30 extracts ([AE]) and 2 larval concentrates ([ALLC] 1: 500-600; ([ALLC] 2: 200-300 larvae/ mL) of the parasite and Group O erythrocytes in saline (RC) and enzymatic medium (RC_b). The red cell sediment was incubated with an equal volume of parasite and the Control (RC_c) with saline solution, at 37 °C. Polybrene and Alcian Blue Methods were applied and Aggregation Titulation from Polybrene was implemented. The coefficients for each method were defined, which were analyzed statistically. The results showed that a longer treatment and also at higher larval concentration, increased the capture of sialic acid (AS), while decreasing the RC and RC_b aggregation. The effect was greater on the incubation of the parasite with RC_b in relation to RC. The enzymatic treatment reduced similarly the percentage charge in the globules incubated with both [ALLC] (16% -17% of initial) and the variation of RC and RC_b charge due to both was about 10%, indicating that the charge loss caused by [ALLC]1 was significant with regard to [ALLC]2. We concluded that *A. lumbricoides* can capture erythrocyte SA. This phenomenon would contribute to explain the anaemia and thrombi produced in ascariosis, noting that in patients with AS deficit pathologies, these complications would be more relevant.

Keywords: *Ascaris lumbricoides* * erythrocyte charge

Resumo

O objetivo foi estudar o efeito de *A. lumbricoides* sobre a carga aniônica de eritrócitos e eritrócitos desializados. Trabalhou-se com 30 extratos ([EA]) e 2 concentrados larvais parasitários ([CLAL]1: 500- 600/ [CLAL]2: 200- 300 larvas/ mL) e eritrócitos Grupo "O" em meio salino (GV) e enzimático (GVb). Foi incubado o sedimento globular com igual volume de parasita e o Testemunha (Gvc) com solução fisiológica, a 37 °C. Foram aplicados os Métodos de Polybrene e Azul Alciano e se implementou uma Titulação da Agregação a partir do Polybrene. Definiram-se coeficientes para cada método que foram analisados estatisticamente. Os resultados mostraram que a maior tempo de tratamento e a maior concentração larvária, aumentou a captação de ácido siálico (AS) diminuindo a agregação de GV e GVb. O efeito foi maior na incubação da parasita com GVb em relação de GV. O tratamento enzimático reduziu a carga percentual nos glóbulos incubados com ambos [CLAL] de forma similar (16%-17% da inicial) e a Diferença de Carga de GV e GVb devida a ambos foi aproximadamente de 10% indicando que a perda de carga produzida por [CLAL]1 foi significativa com relação a [CLAL]2. A conclusão é que *A. lumbricoides* pode captar AS eritrocitário. Este fenômeno contribuiria a explicar a anemia e trombos produzidos em ascariíase, destacando que em pacientes com patologias que cursem com déficit de AS estas complicações seriam mais relevantes.

Palavras chave: *Ascaris lumbricoides* * carga eritrocitária

Introducción

La ascariosis constituye un problema de salud pública en países no desarrollados. *Ascaris lumbricoides* es el mayor nematodo patógeno responsable de aproximadamente 12-15% de las infecciones parasitarias de Rosario. Si bien estos datos son coincidentes con informes realizados en comunidades latinoamericanas (1-3), en otras comunicaciones la frecuencia es variable y superior al 20% (4-6).

En el ciclo evolutivo de este parásito, los estadios larvales circulan por sangre hasta llegar a los capilares pulmonares, donde quedan atrapados. Las larvas rompen el endotelio capilar y penetran en los alvéolos, ascendiendo por bronquiolos y bronquios a la faringe. En ese lugar son deglutidas, y llegan al aparato digestivo, donde terminan su proceso madurativo en duodeno, convirtiéndose en machos y hembras adultos (7).

Si bien la localización de estos ejemplares es intestinal, pueden migrar hacia otros órganos y provocar obstrucción biliar, pancreatitis, apendicitis obstructiva, perforación de la pared intestinal, abscesos hepáticos, o penetrar en los canales venosos hepáticos o cavales para ser transportados al cerebro, corazón o pulmones (8). Por lo tanto, el parásito tiene contacto directo con los eritrocitos del hospedador durante la migración por sangre de las fases larvales y eventualmente también lo podría tener el ejemplar adulto.

Si se considera que los glóbulos rojos son los elementos formes más abundantes en la sangre, así como que los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas de superficie eritrocitaria son los principales responsables de la carga negativa eritrocitaria, se evidencia claramente que el ácido siálico es un elemento fundamental del comportamiento hemorreológico y hemodinámico (9).

Los resultados obtenidos en experiencias previas indicaron que los extractos de ejemplares adultos y los concentrados de larvas de *A. lumbricoides* pueden captar ácido siálico de eritrocitos en medio salino y enzimático (10-12).

Este efecto podría colaborar en explicar algunos aspectos de la patología en ascariosis como son la formación de trombos y la anemia (7) (8) (13-15).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto producido por el parásito sobre la carga aniónica superficial de eritrocitos y eritrocitos desializados.

Materiales y Métodos

MUESTRAS

Extractos de *A. lumbricoides* ([EA]): Se trabajó con 30 extractos parasitarios obtenidos a partir de la remoción de la cutícula de ejemplares adultos y ruptura mecánica refrigerada (16).

Concentrados de Larvas ([CLAL]): Se utilizaron Concentrados de Larvas (L1/L2) obtenidos de la embrionación *in vitro* y posterior eclosión de huevos de *A. lumbricoides* (17) (18). Las larvas se recolectaron por el método de Baermann-Moraes (19), se concentraron por centrifugación y se procedió al recuento de las mismas por duplicado en microscopio óptico: 500-600 larvas/mL ([CLAL]1); 200-300 larvas/mL ([CLAL]2).

TRATAMIENTO DE LOS ERITROCITOS

Se utilizaron suspensiones de eritrocitos humanos frescos Grupo "O" en medio salino (GR) y en medio enzimático de bromelina (GRb). El tratamiento consistió en incubar el sedimento globular con igual volumen de parásito durante diferentes tiempos en baño termostático a 37 ° C. Los eritrocitos Control (GRc), fueron incubados de la misma manera con igual volumen de solución fisiológica. Los eritrocitos tratados y Control se lavaron 3 veces en solución salina y se prepararon suspensiones globulares a partir de los sedimentos según correspondió.

MÉTODO DE POLIBRENE MODIFICADO EN PLACA DE VIDRIO (20)

El método se aplicó simultáneamente en eritrocitos no tratados (Control) y en los mismos eritrocitos tratados con el parásito (extractos y concentrados larvales).

Para estudiar la cinética de captación, los GR y GRb fueron incubados durante 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Al finalizar cada uno de estos tiempos, los eritrocitos se lavaron y se prepararon, a partir del sedimento globular, suspensiones al 20% en solución salina.

Se colocaron en una placa de vidrio, 2 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 Polibrene, volviendo a mezclar con la varilla. Se homogeneizó por movimientos circulares de la placa de vidrio durante 1 minuto. En esta etapa se produjo la agregación entre los eritrocitos con carga negativa y el policatión Polibrene.

A los fines de comparar la agregación de los glóbulos tratados con la del respectivo Control, se la semicuantificó con cruces (4+, 3+, 2+: 1+; +/-; -) y se asignó un *score* a cada una según Goudemand y Marsalet (21), de acuerdo a la siguiente escala:

4+	10	1+	2
3+	8	+/-	1 (agregación apenas visible)
2+	5	-	0 (sin agregación)

Se determinó para cada tiempo de Tratamiento el Coeficiente experimental de captación de ácido siálico por el parásito usando el método de Polibrene ($C_{exp-CASP}$) como el cociente entre el *score* de la agregación de los eritrocitos tratados con el parásito y el *score* de la agregación de los eritrocitos Control.

$$C_{exp-CASP} = \frac{\text{score de los eritrocitos Tratados con [EA]/ [CLAL]}}{\text{score de los eritrocitos Control}}$$

TÉCNICA DE TITULACIÓN DE LA AGREGACIÓN

A partir del Método de Polibrene descrito, se implementó una técnica de titulación de la agregación, para lo cual se diluyó el Polibrene (diluciones seriadas progresivas en solución salina: Puro, 1/2; 1/4;.....1/128). A continuación, se mezclaron 10 µL de la suspensión globular al 20% y 20 µL de LIM (solución de baja fuerza iónica) con 10 µL de cada una de las diluciones del Polibrene.

Se evaluó la carga aniónica de los eritrocitos Control y los tratados (GR y GRb), por Titulación de la Agregación, considerando el Título, a la última dilución del policatión que presentó agregación.

Se cuantificó con cruces la agregación obtenida con cada dilución del Polibrene y se le asignó el *Score* de Goudemand y Marsalet (21).

Se definió el Coeficiente experimental de *Score* Total (C_{exp-ST}) como:

$$C_{exp-ST} = \frac{\text{Score Total de agregación de los eritrocitos tratados con el parásito}}{\text{Score Total de agregación de los eritrocitos Control}}$$

Donde $Score\ Total = \sum Si$ Si: *score* individual

Este coeficiente es igual a 1 cuando no hay diferencia entre el *Score* Total del Control y de los glóbulos tratados (no hay modificación de ácido siálico por acción del parásito) y es igual a 0 cuando los eritrocitos tratados no agregan con el Polibrene puro ni con ninguna de sus diluciones (el tratamiento con el parásito ocasiona la pérdida total o casi completa del ácido siálico del eritrocito, o sea que la captación del mismo es máxima).

En esta experiencia los GR y los GRb fueron tratados con 20 [EA] y con los 2 [CLAL] durante 15 y 90 min.

TÉCNICA DE AZUL ALCIAN (22)

Es una técnica espectrofotométrica que 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 Azul Alcian, con el ácido siálico.

La absorbancia del blanco de Azul Alcian corresponde al 100%. 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 Azul Alcian que permanece libre, es referida a la del Blanco para calcular el porcentaje que representa. Por diferencia con el 100% se determina el porcentaje de colorante unido al ácido siálico de la muestra, que se denomina CAE% (Carga Aniónica Eritrocitaria porcentual).

Se utilizaron glóbulos rojos humanos frescos Grupo "O" obtenidos de muestras con anticoagulante, lavados 3 veces en tampón fosfato pH 7,4 (PBS) y tratados simultáneamente con ambos [CLAL]. Al término de la incubación, los glóbulos Tratados y Control fueron lavados 3 veces en PBS y se prepararon los tubos de medición:

Tubo Blanco (B): 2 mL de Azul Alcian

Tubo Blanco de Hemólisis (BH): 2 mL de alcohol etílico + 10 µL de sedimento globular

Tubo de Muestra Eritrocitos Control/ eritrocitos Tratados (GR_C/ GR_T): 2 mL de Azul Alcian + 10 µL de sedimento globular.

Todos los Tubos fueron incubados en baño a 37 °C durante 30 min, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y se efectuó la medición de absorbancia del sobrenadante, por duplicado, en espectrofotómetro a 650 nm.

Se calcularon los valores de CAE %

Se definió el Coeficiente de carga aniónica porcentual por Método de Azul Alcian (CC_{AB}), como el cociente entre el CAE% de los eritrocitos Tratados y el CAE% de los eritrocitos Control

$$CC_{AB} = \frac{\text{CAE\% de los Glóbulos Tratados}}{\text{CAE\% de los Glóbulos Control}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las comparaciones de los valores de las variables estudiadas se utilizaron el test de Wilcoxon o el de Friedman y las comparaciones múltiples de Dunn según que el factor en estudio se presentara a 2 o más niveles (22).

Resultados

PRIMERA EXPERIENCIA

Estudio de la Cinética de captación de ácido siálico por extractos y larvas de A. lumbricoides utilizando el Método de Polibrene.

El estudio de la Cinética de captación de ácido siálico por los [EA] mostró que la agregación globular disminuía con el tiempo de tratamiento para GR y GRb, lo que indicó que a mayor tiempo de contacto aumentaba la captación de ácido siálico por el [EA]. Si bien la carga aniónica de GR disminuyó con el tiempo de incubación, los eritrocitos no perdieron totalmente la capacidad de agregación ni aún a los 120 min de tratamiento. Sin embargo, el 97% de los mismos glóbulos desializados (GRb) no agregaron a los 120 min, e inclusive 11 de las 30 suspensiones presentaron ausencia de agregación a los 15 min de incubación.

El análisis estadístico determinó que:

1) El tiempo de tratamiento de GR y GRb, tuvo un efecto altamente significativo sobre el valor del C_{exp}CASP ($p < 0,0001$).

2) Para cada uno de los 6 tiempos de tratamiento, los valores de la mediana de C_{exp}CASP fueron significativamente mayores cuando el extracto estaba en contacto con GR con respecto de GRb ($p < 0,0001$), lo que indicó que tratamiento con el [EA] provocaba mayor alteración de la carga superficial en los glóbulos desializados.

3) La captación de ácido siálico por el [EA] en GR fue aumentando al extenderse el tiempo de contacto, aunque los valores de C_{exp}CASP de dos tiempos próximos no difirieron entre sí significativamente ($p < 0,05$), siendo la captación mayor a los 90 y 120 min, mientras que en GRb la captación fue significativamente menor a los 15 y 30 min de tratamiento con respecto a la de los 90 y 120 min.

A continuación se muestran las estadísticas resumen para los valores del C_{exp}CASP en GR y GRb tratados con los 30 [EA] (Tabla I).

Se estudió la cinética de captación de ácido siálico por larvas, realizando el tratamiento de 5 suspensiones globulares en medio salino (GR) y de las mismas suspensiones en medio enzimático (GRb) con ambos [CLAL]. Se muestran las estadísticas resumen y las figuras de los valores del C_{exp}CASP según el tiempo de tratamiento de los eritrocitos con los concentrados larvales.

Tabla I. Estadísticas resumen para C_{exp} CASP en GR y GRb tratados con [EA]

Tiempo (min)	N° de extractos	GR tratados con [EA]		GRb tratados con [EA]	
		mediana	Rango intercuartil (RI)	mediana	Rango intercuartil (RI)
15	30	1,0	0,0	0,1	0,2
30	30	1,0	0,2	0,1	0,1
45	30	0,8	0,0	0,0	0,1
60	30	0,5	0,3	0,0	0,0
90	30	0,2	0,3	0,0	0,0
120	30	0,2	0,3	0,0	0,0

Tabla II. Estadísticas resumen de C_{exp} CASP en GR y GRb tratados con [CLAL]1 y con [CLAL]2

Tiempo (min)	N° de extractos	GR tratados con [EA]		GRb tratados con [EA]	
		[CLAL]1	[CLAL]2	[CLAL]1	[CLAL]2
		Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)
15	5	0,8 (0,0)	1,0 (0,0)	0,2 (0,4)	1,0 (0,2)
30	5	0,5 (0,3)	1,0 (0,2)	0,1 (0,1)	0,5 (0,3)
45	5	0,2 (0,0)	0,8 (0,0)	0,0 (0,0)	0,5 (0,4)
60	5	0,1 (0,0)	0,8 (0,0)	0,0 (0,0)	0,2 (0,1)
90	5	0,1 (0,0)	0,8 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)
120	5	0,1 (0,1)	0,8 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,0)

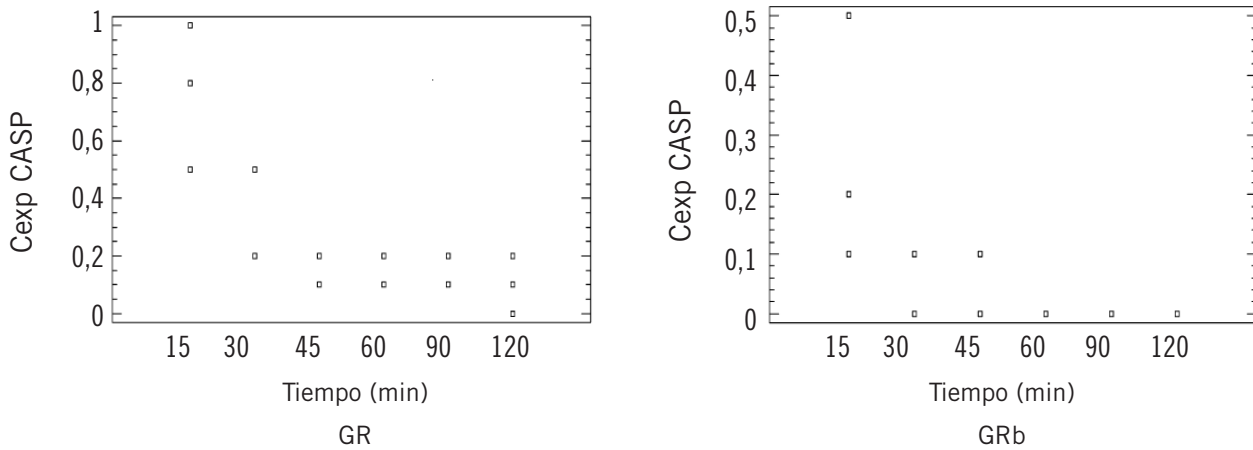


Figura 1. Valores de C_{exp} CASP según el tiempo de contacto de GR y GRb con [CLAL]1

El análisis estadístico concluyó que:

Las medianas de C_{exp} CASP en GR y GRb tratados con ambos [CLAL] no fueron las mismas para los tiempos de contacto estudiados ($p < 0,005$), siendo 1) en GR significativamente mayores a los 15 min con respecto a los 60, 90 y 120 min, y no existiendo diferencias significativas en los otros tiempos. 2) en GRb tratados con [CLAL]1 a los 15 min difirieron de los valores obtenidos a los 45 o más min, mientras que para los GRb tratados con [CLAL]2 los valores correspondientes a 15 min sólo fueron significativamente mayores que los de 90 y 120 min, no existiendo diferencias en los otros tiempos.

La comparación de los valores del C_{exp} CASP en GR

para ambos concentrados larvales mostró que la mediana del coeficiente de los GR tratados con 200-300 larvas/mL fue significativamente mayor que cuando fueron incubados con 500-600 larvas/mL ($p < 0,0000$). Se observó que dicha diferencia fue más evidente cuando el tiempo de contacto fue igual o mayor a 30 min (Figura 3).

La mediana de C_{exp} CASP de GRb tratados con [CLAL]2 fue significativamente mayor que para los incubados con [CLAL]1 ($p < 0,0001$). Se observó que dicha diferencia disminuyó con el aumento del tiempo de contacto de los eritrocitos con las larvas (Figura 4).

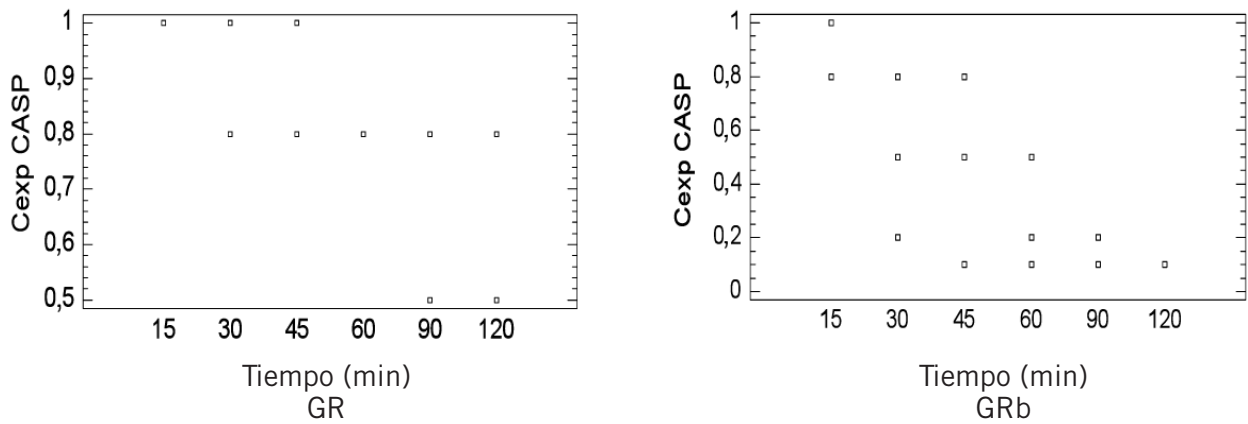


Figura 2. Valores de C_{exp} CASP según el tiempo de contacto de GR y GRb con [CLAL]2

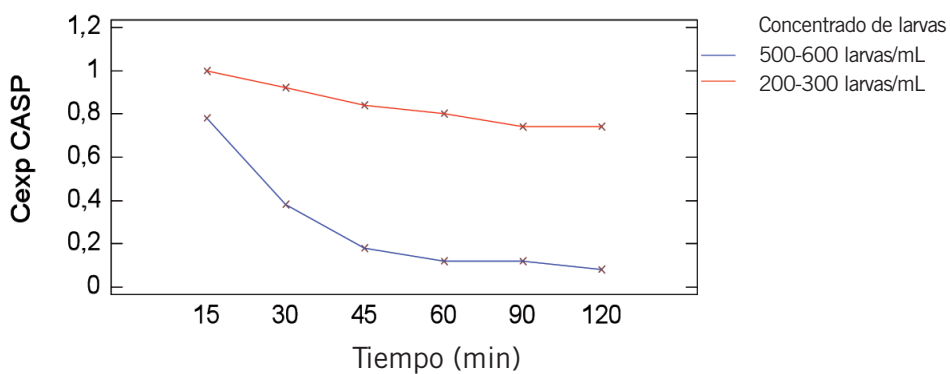


Figura 3. Valores de las medianas de C_{exp} CASP de GR en función del tiempo de contacto de los eritrocitos con los dos concentrados de larvas

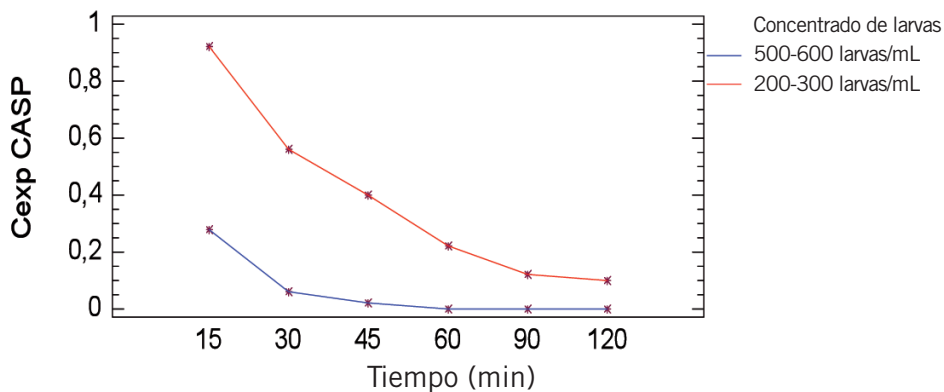


Figura 4. Valores de las medianas de C_{exp} CASP de GRb en función del tiempo de contacto de los eritrocitos con los dos concentrados de larvas

SEGUNDA EXPERIENCIA

Técnica de Titulación de la Agregación para estudiar la disminución de carga globular producida por extractos y larvas de A. lumbricoides.

El tratamiento con los 20 [EA] evidenció que la mediana (RI) de C_{exp} ST para GR (15': 0,93 (0,245); 90': 0,30

(0,285)) fue significativamente mayor que para GRb (15': 0,125 (0,145); 90': 0,00 (0,08)) para los dos tiempos de incubación utilizados en la experiencia ($p < 0,0005$). Se observó asimismo que la mediana del coeficiente, para GR fue significativamente mayor a los 15 min de tratamiento que a los 90' ($p < 0,0001$), y también lo fue para GRb ($p < 0,0005$). Los resultados se muestran en la Figura 5.

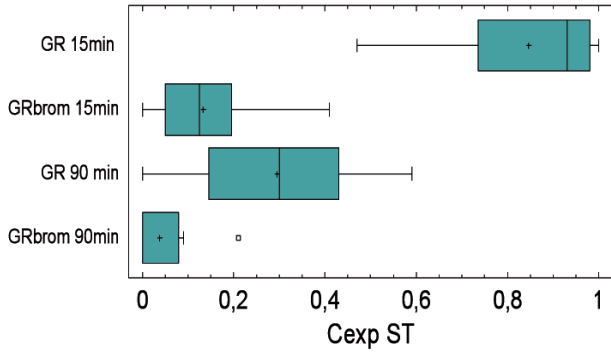


Figura 5. Valores de C_{exp} ST para GR y GRb con tiempos de tratamiento de 15 y 90 min

Posteriormente se compararon los valores de C_{exp} ST en GR y GRb tratados con [CLAL]1 y [CLAL]2 para cada uno de los dos tiempos de tratamiento. Los resultados indicaron que la mediana (RI) del coeficiente en GR tratados con [CLAL]1 durante 15 min, fue significativamente mayor que para GRb ($p < 0,05$), mientras que a los 90 min dicho valor para GR fue marginalmente mayor que para GRb ($p < 0,10$). El tratamiento de los eritrocitos con [CLAL]2 durante 15 min, mostró que los valores de C_{exp} ST para GR y GRb no mostraron diferencias significativas ($p > 0,20$), pero a los 90 min la mediana para GR fue marginalmente superior que para GRb ($p < 0,10$).

Cuando se analizó el efecto producido por la cantidad de larvas usada en el tratamiento, se observó que la mediana del C_{exp} ST fue significativamente mayor en la incubación con [CLAL]2 con respecto a [CLAL]1 ($p < 0,05$) para GR a los 15 min y a los 90 min de contacto y para GRb a los 15 min, mientras que la mediana sólo fue marginalmente superior para GRb a los 90 min de tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla III.

TERCERA EXPERIENCIA

Estudio de la alteración de carga aniónica debida al tratamiento de los glóbulos con los estadios larvales de *A. lumbricoides*, utilizando el método de Azul Alcian.

Se realizaron 5 repeticiones, incubando simultáneamente en cada una los eritrocitos (GR y GRb) con [CLAL]1 y [CLAL]2. Se determinaron, por duplicado, los valores de CAE% en los eritrocitos Control y Tratados y los correspondientes CC_{AB}.

Tabla III. Estadísticas resumen para C_{exp} ST en GR y GRb tratados con [CLAL]1 y [CLAL]2

Tiempo (min)	n	GR tratados con [CLAL]		GRb tratados con [CLAL]	
		[CLAL]1	[CLAL]2	[CLAL]1	[CLAL]2
		Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)
15	5	0,45 (0,36)	0,82 (0,30)	0,06 (0,40)	0,12 (0,15)
90	5	0,16 (0,07)	0,37 (0,31)	0,00 (0,11)	0,00 (0,30)

La diferencia entre los CC_{AB} obtenidos para GR y GRb incubados con cada uno de los [CLAL] representaría la disminución de carga porcentual del Control por efecto del tratamiento enzimático (CC_{AB} GR - CC_{AB} GRb), mientras que la diferencia entre la unidad y cada uno de estos coeficientes indicaría la disminución de carga aniónica total. La disminución en la carga de GR (1 - CC_{AB} GR), se debe únicamente al tratamiento con las larvas, y la de GRb (1 - CC_{AB} GRb) es consecuencia de los tratamientos con bromelina y larvas.

Los resultados mostraron que la disminución de carga aniónica porcentual debida al efecto de la concentración larvária fue mayor en los eritrocitos incubados con [CLAL]1 (mediana: 0,30%; RI: 0,01%) que con [CLAL]2 (mediana: 0,20%; RI: 0,02%). El tratamiento enzimático produjo una disminución de carga porcentual similar en los glóbulos incubados con ambos concentrados larvales ([CLAL]1: 0,16%, RI: 0,03%; [CLAL]2: 0,17%, RI: 0,02%).

La mediana del cálculo de la Diferencia de Carga aniónica debida al tratamiento con [CLAL]1 o [CLAL]2 de los GR (DCA_{GR}T) fue 0,10% (RI: 0,01%) y de GRb (DCA_{GRb}T) 0,09% (RI: 0,01%), indicando que [CLAL]1 ocasionó una pérdida significativa y similar de carga porcentual en ambas suspensiones globulares con respecto a [CLAL]2 ($p < 0,05$). Los resultados se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Alteración de carga aniónica porcentual en glóbulos tratados con [CLAL] Resultados del Método de Azul Alcian

Valores de mediana y rango intercuartil de:	[CLAL]1 (%)	[CLAL]2 (%)
CC _{AB} (GR)	0,70 (0,01)	0,80 (0,02)
CC _{AB} (GRb)	0,54 (0,01)	0,63 (0,01)
CC _{AB} GR - CC _{AB} GRb	0,16 (0,03)	0,17 (0,02)
1 - CC _{AB} GR	0,30 (0,01)	0,20 (0,02)
1 - CC _{AB} GRb	0,46 (0,01)	0,37 (0,01)

Discusión y Conclusiones

La diversidad de estructuras que conforman los glicoconjugados, determinada por su fracción glicánica, ayuda a comprender la capacidad de éstos para poder

efectuar funciones biológicas muy variadas, cuya interpretación aún es incompleta o imprevisible.

Es sabido que desde que se publicó en 1953 el importantísimo trabajo de Watson y Crick sobre la estructura del ADN, se ha concedido justificadamente un papel decisivo a los ácidos nucleicos en la codificación de las estructuras de las proteínas. Siendo éstas parte esencial de la composición de los seres vivos, y generalmente de naturaleza proteica las enzimas que catalizan todos los procesos que ocurren en los organismos, resulta evidente el significado biológico de ácidos nucleicos y proteínas. Por el contrario, a los glúcidos se les había considerado hasta la década de 1970 principalmente materiales ricos en energía y con funciones de protección o sostén. Este concepto original ha evolucionado de forma espectacular debido al descubrimiento de la importancia metabólica, biológica y patológica de los glicoconjugados (23).

El ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico es un monosacárido ácido derivado del ácido neuramínico mediante acetilación y es un componente importante de las glucoproteínas. (24). Su presencia 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 (25).

La captación de ácido siálico por *A. lumbricoides* a partir de eritrocitos, podría colaborar en la explicación de algunos aspectos de la patología en individuos parasitados con este helminto (7) (8) (13-15).

En la *primera experiencia* se estudió la cinética de captación de ácido siálico por *A. lumbricoides* y se evidenció que los extractos y las larvas del helminto pueden secuestrarlo de eritrocitos en medio salino y enzimático, en concordancia con observaciones previamente realizadas (11) (12).

Los resultados mostraron que al extenderse el tiempo de contacto del [EA] con los GR y los GRb, la captación aumentaba, siendo en ambos casos mayor a partir de los 90 min. Estas observaciones evidencian que el secuestro de ácido siálico por los extractos parasitarios depende del tiempo de contacto con los glóbulos, tal como fuera comunicado anteriormente (12). Para todos los tiempos estudiados, el efecto del tratamiento con el extracto produjo menor agregación en GRb que en GR, lo que indicó que el extracto produce mayor alteración de carga globular en eritrocitos desializados, y sugiere que *in vivo* este efecto sería mayor en individuos con déficit de ácido siálico como son las personas diabéticas o hipertensas (26-29).

Los resultados mostraron que los valores de las medianas de C_{exp} CASP en GR y GRb incubados con [CLAL]1 y de GR tratados con [CLAL]2 fueron significativamente mayores a los 15 min de contacto que a los 60, 90 y 120 min, no existiendo diferencias significativas en los otros tiempos; mientras que la mediana

de C_{exp} CASP en GRb a los 15 min de contacto con [CLAL]2, fue también significativamente mayor que a los 60, 90 y 120 min, pero además el valor correspondiente a los 30 min fue mayor que a los 90 y 120 min, no existiendo otras diferencias. La cinética de captación por las larvas mostró que el contenido de ácido siálico de GR y GRb es mayor a los 15 min y disminuye significativamente a partir de los 60' para el tratamiento con los dos [CLAL], por lo que al igual que los [EA], las larvas aumentaron la captación de ácido siálico al extenderse el tiempo de contacto con los glóbulos. La incubación de GRb con 200-300 larvas/mL evidenció también que a los 30 min disminuye marcadamente la carga eritrocitaria como fue observado a los 15' y difiere de la presentada a partir de los 90', donde adquiere el menor valor.

En el tratamiento de los eritrocitos con [CLAL]1, se observó una diferencia significativa en el valor del coeficiente de GRb con respecto a GR para todos los tiempos estudiados hasta los 90 min, lo que indicó el menor contenido de ácido siálico presente en los GRb. Sin embargo a los 120 min, no hubo diferencias significativas de cargas entre GR y GRb, lo que sugeriría que la captación de ácido siálico por las larvas resultaría en una carga aniónica similar en el último tiempo estudiado.

Cuando los eritrocitos fueron tratados con una concentración menor de larvas ([CLAL]2) no se observaron diferencias significativas en las cargas aniónicas de GR y GRb para los 2 primeros tiempos de incubación, mientras que a partir de los 45 min el contenido de ácido siálico de GRb fue manifiestamente inferior que el de GR, lo que indicó la disminución del ácido siálico eritrocitario por efecto de las larvas.

El contenido de ácido siálico de GR y GRb disminuyó cuando mayor fue la concentración de larvas usada en el tratamiento, para todos los tiempos de incubación.

La diferencia de carga de GR tratados con [CLAL]1 y [CLAL]2 fue más evidente cuando el contacto de las larvas con los glóbulos fue igual o mayor a 30 min, mientras que en GRb la diferencia de carga provocada por el tratamiento con ambos [CLAL] disminuyó con el aumento del tiempo de contacto.

En la *segunda experiencia* se implementó la técnica de Titulación de la Agregación, la cual mostró, en coincidencia a los resultados anteriores, que el aumento del tiempo de tratamiento tanto para GR como para GRb, provocó la disminución de la agregación por pérdida de ácido siálico en los glóbulos, lo que se tradujo en la disminución del C_{exp} ST.

En el tratamiento con los [EA] se observó que a los 90 min, los GRb fueron incapaces de agregar con el Polibrene, indicando la remoción total o casi completa de su carga aniónica. Para ambos tiempos estudiados (15 y 90 min) los GRb presentaron menor carga que los GR y por lo tanto menor agregación con el Polibrene, por lo que los valores del C_{exp} ST disminuyeron.

El tratamiento con los [CLAL] indicó que a los 15 min de contacto con el concentrado de mayor cantidad de larvas, el valor del C_{exp} ST en GR fue significativamente mayor que en GRb, sugiriendo que para los GR la agregación y por lo tanto, el contenido de ácido siálico globular eran mayores que en GRb, mientras que a los 90 min la diferencia en el valor del C_{exp} ST fue marginalmente significativa.

Cuando los eritrocitos fueron tratados con el concentrado de menor cantidad de larvas no se observaron diferencias del coeficiente para GR y GRb a los 15 min, por lo tanto, la agregación fue similar para ambas suspensiones, pero a los 90 min el coeficiente en GR fue marginalmente superior al de GRb.

La experiencia corroboró que el efecto de las larvas sobre la agregación eritrocitaria es más significativo cuando los glóbulos están previamente desializados y cuando la concentración de larvas usada en el tratamiento es mayor. Estos resultados coinciden con los comunicados anteriormente (11)(12).

El único método directo de cuantificación de ácido siálico en el glóbulo rojo es su dosaje en la membrana eritrocitaria. Debido a que la implementación de esta técnica no es accesible a todos los laboratorios, surgieron varios métodos que permiten estudiar de manera indirecta la carga y el contenido de ácido siálico superficial del eritrocito. Uno de ellos es el que utiliza bromuro de hexadimetrina (Polibrene) y fue empleado en las dos primeras experiencias de este trabajo. El Polibrene es un polímero sintético, cargado positivamente que tiene la propiedad de aglutinar los eritrocitos normales, pero no a los glóbulos con carga negativa reducida (30).

Otro método es el que utiliza el colorante catiónico Azul Alcian (28)(29)(31). Esta prueba fue empleada previamente y comparada con la de Polibrene. Los resultados estadísticos concluyeron que ambos métodos tienen sensibilidades similares para detectar alteración en la carga eritrocitaria (32).

El método de Alcian Blue fue utilizado en la *tercera experiencia* para estudiar la modificación de carga aniónica globular debida al tratamiento con los concentrados larvales de *A. lumbricoides*. Los resultados mostraron que las larvas en contacto con glóbulos rojos en medio salino y enzimático, captan una cantidad similar de ácido siálico del eritrocito. La disminución de carga producida por el tratamiento con [CLAL]1 fue aproximadamente el 10% superior a la provocada en los glóbulos tratados con [CLAL]2, indicando, en concordancia con resultados previos (11), que la alteración de carga en el eritrocito se relaciona con la concentración larvaria usada en el tratamiento. Nuevamente se mostró que el efecto *in vitro* producido por las larvas sobre la carga del eritrocito es mayor en glóbulos desializados.

Los estudios realizados concluyen que las larvas y los ejemplares adultos de *A. lumbricoides* pueden captar ácido siálico del eritrocito. Este fenómeno colaboraría en

la explicación de la anemia y los trombos producidos en pacientes con ascariosis (7)(8)(13-15), destacando que si existe simultáneamente a la parasitosis, una patología que curse con déficit de ácido siálico (12), estas complicaciones podrían adquirir mayor gravedad.

CORRESPONDENCIA

BIOQ. PATRICIA PONCE DE LEÓN
Área 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

- Méndez C, Orlando J. Prevalencia de enteroparasitosis frente al consumo cotidiano y dirigido de *Mentha spicata* L. "hierba buena" en el Centro Educativo No. 86282 Francisco Alegre Serrano de la ciudad de Carhuaz-Ancash, 2001. Disponible en: http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2004/cadillo_mj/html/index-frames.html. (Fecha de acceso: 6 de septiembre de 2011)
- Torres P, Franjola TR, Pérez J, Auad S, Hermosilla C, Flores L, *et al.* Geohelmintosis intestinales en el hombre y animales domésticos de sectores ribereños de la cuenca del río Valdivia Chile. *Bol Chil Parasitol* 1995; 50(3/4): 57-66.
- Devera R, Cermeño JR, Blanco Y, Bello Morales MC, Guerra X, De Sousa M, *et al.* Prevalencia de blastocistosis y otras parasitosis intestinales en una comunidad rural del Estado Anzoátegui, Venezuela. *Parasitol Latinoam* 2003; 58: 95-100.
- Agudelo-Lopez S, Gómez-Rodríguez L, Coronado X, Orozco A, Valencia-Gutierrez CA, Restrepo-Betancur LF, *et al.* Prevalencia de Parasitosis Intestinales y Factores Asociados en un Corregimiento de la Costa Atlántica Colombiana. *Rev Salud Pública* 2008; 10 (4): 633-42.
- Simoes M, Rivero Z, Díaz I, Carreño G, Lugo M, Maldonado A, *et al.* Prevalencia de enteroparasitosis en una escuela urbana en el Municipio San Francisco, Estado Zulia, Venezuela. *Km* 2000; 28 (1): 27-43.
- Ramos L, Salazar-Lugo R. Infestación Parasitaria en Niños de Cariaco-Estado Sucre, Venezuela y su Relación con las Condiciones Socioeconómicas. *Km* 1997; 25(3): 175-89.
- Atías A. *Parasitología Médica*: Santiago: Mediterráneo; 1998.
- Beaver PCH, Jung RC, Cupp EW. *Parasitología Clínica*. 2° ed. Barcelona: Salvat, 1986.
- Saraví F. ETAS- Hemodinámica, Capítulo 11. En: *Reología de la Sangre*, 2007. Disponible en: fcm.uncu.edu.ar/medicina/area/fisica/.../11Reologia2007.pdf (Fecha de acceso: 28 de junio de 2011)
- Ponce de León P; Lebensohn N; Foresto P; Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: alteration of the erythrocyte super-

- ficial charge using the Partition Method in aqueous two-phase system. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2009; 51 (4): 219-21.
11. 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.
 12. Ponce de León P, Juárez Matamoros K, Biondi C, Valverde J. Alteración de la carga aniónica superficial de glóbulos rojos y glóbulos rojos desializados por *Ascaris lumbricoides*. *Rev Cub Med Trop* 2011; 63(1): 87-90.
 13. Bardenwerper HE. *Ascaris lumbricoides* infestation with extreme anemia. *J Am Med Assoc* 1928; 91(14):1037.
 14. García-Leiva J, Barreto-Zuñiga R, Estradas J, Torre A. *Ascaris lumbricoides* and Iron Deficiency Anemia. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1051-2.
 15. Amuga GA, Onwuliri COE, Oniye SJ. Relative contribution of hookworm and *Ascaris lumbricoides* to iron deficiency anemia among school pupils in Nasarawa area, Nigeria. *JONAS* 2006; 2(3): 205-9.
 16. Ponce de León P, Valverde J, Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42 (5): 295-6.
 17. Fairbairn D. The in vitro hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Canad J Zool* 1961; 39: 153-62.
 18. 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.
 19. Shore García L, Ash L. *Diagnóstico parasitológico*. 2º ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1983.
 20. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. *Transfusion Today* 2006; 66: 28.
 21. Goudemand M, Marsalet ID. *Elements d'immuno-hématologie*. Paris: Flammarion, 1967.
 22. 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. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006; 7: 98-103.
 23. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. *Estadística matemática con aplicaciones*. México: Thomson Learning; 2003.
 24. 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 (Fecha de acceso: 26 de junio de 2011)
 25. Nelson DL, Cox MM. *Principios de Bioquímica*. 4ª ed., Barcelona: Editorial Omega, 2005.
 26. Foresto PG, D'Arrigo M, Filipini F, Gallo R, Rasia R, Valverde JR. Estudio de parámetros hemorreológicos en hipertensión esencial. 2002, *Rev Fed Argent Cardiol* 2002; 31: 69-73.
 27. D'Arrigo M, Lebenhson N, Re A, Filippini F, Carrera L, Valverde J, *et al.* Ácido siálico sérico y carga aniónica eritrocitaria en pacientes diabéticos e hipertensos. Posible impacto hemorreológico. *Bioquím y Patol Clín* 2008; 22 (1): 7217-20, Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65112135002>. (Fecha de acceso: 6 de septiembre de 2011).
 28. Lebensohn N, Re A, Filippini F, Carrera L, D'Ottavio A, Valverde J, *et al.* Impacto hemorreológico de la carga aniónica eritrocitaria en vasculopatías. *Medicina* 2007; 67 (Supl. 3): 94.
 29. Lebensohn N, Re A, Carrera L, Barberena L, D'Arrigo M, Foresto P. Acido siálico sérico, carga aniónica y agregación eritrocitaria en pacientes diabéticos e hipertensos. *Medicina* 2009; 69: 331-4.
 30. Mollison PL. *Transfusión de sangre en Medicina Clínica*. Barcelona: Reverté; 1987.
 31. 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. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006; 7: 98-103.
 32. Patricia Ponce de León P, Santiago Di Vita S, Racca L, Biondi C, Valverde J. Extractos de *Ascaris lumbricoides*: alteración de la carga eritrocitaria utilizando el Método de Azul Alcian. *Rev Cubana Med Trop* 2011 (En prensa).

Aceptado para su publicación el 7 de octubre de 2011