

# Cinética de desialización eritrocitaria producida por larvas musculares vivas de *Trichinella spiralis*\*

*Erythrocyte desialylation kinetics produced by living Trichinella spiralis muscle larvae*

*Cinética de dessialização eritrocitária causada por larvas musculares vivas da Trichinella spiralis*

► Patricia Ponce de León<sup>1</sup>, Gabriel López Murúa<sup>2</sup>

---

1 Doctora en Ciencias Biomédicas.  
2 Bioquímico.

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

## Resumen

Las larvas musculares (LM) de *T. spiralis* alteran la agregación eritrocitaria. El objetivo del trabajo fue estudiar la cinética de desialización eritrocitaria producida por LM vivas de *T. spiralis*. Se realizaron 3 experiencias en las que se incubaron 60 larvas con 30  $\mu$ L de eritrocitos en 1 mL de solución salina durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 18, 20, 22 y 24 horas. Se aplicó el Método de Titulación de la Agregación por Polibrene y se calculó Título, Score Total y  $C_{exp}$  CASP en los eritrocitos Control e incubados con LM. Los resultados mostraron que en la primera hora no hubo captación de ácido siálico. A las 2 horas el coeficiente comenzó a decrecer y a las 3 horas el Título disminuyó en una dilución y el coeficiente fue  $0,62 \pm 0,021$ . En los siguientes tiempos el Título se mantuvo y el valor del coeficiente presentó pequeñas disminuciones, hasta alcanzar el valor de  $0,45 \pm 0,010$  a las 22 horas, tiempo en que se produjo la disminución significativa del Título. A las 24 horas hubo una nueva disminución del Título del Control y  $C_{exp}$  CASP fue  $0,13 \pm 0,093$ . Se concluye que las LM vivas durante incubación *in vitro* con eritrocitos comenzarían a captar ácido siálico a partir de las 2 horas de contacto logrando la desialización casi completa del eritrocito a las 24 horas.

**Palabras claves:** cinética \* desialización \* larvas musculares \* *Trichinella spiralis*

## Abstract

*T. spiralis* muscle larvae (ML) alter erythrocyte aggregation. The objective of this work was to study erythrocyte desialylation kinetics produced by living *T. spiralis* ML. Three experiments were conducted in which 60 larvae were incubated with 30  $\mu$ L of erythrocytes in 1 mL of saline solution for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 18, 20, 22 and 24 hours. Titration of Aggregation by Polybrene Method was used and Title, Total Score and  $C_{exp}$  CASP were calculated in Control erythrocytes and erythrocytes incubated with ML. The results showed that in the first hour there was no capture of sialic acid. The coefficient began to decrease at 2 hours, and at 3 hours the Title decreased

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)

in one dilution and the coefficient was  $0.62 \pm 0.021$ . The title was maintained at the following times and the coefficient value presented small decreases, until reaching  $0.45 \pm 0.010$  value at 22 hours. It was then that, a significant decrease in Title occurred. Within 24 hours, there was a further decrease of Control Title, and  $C_{exp} CASP$  was  $0.13 \pm 0.093$ . It can be concluded that living ML during in vitro incubation with erythrocytes began to capture sialic acid after 2 hours of contact, getting almost complete desialylation of erythrocytes at 24 hours.

**Keywords:** kinetics \* desialylation \* muscle larvae \* *Trichinella spiralis*

## Resumo

As larvas musculares (LM) de *T. spiralis* alteram a agregação eritrocitária. O objetivo do trabalho foi estudar a cinética de dessialização eritrocitária produzida por LM vivas de *T. spiralis*. Realizaram-se 3 experiências nas quais foram incubadas 60 larvas com 30  $\mu$ L de eritrócitos em 1  $\mu$ L de solução salina durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 18, 20, 22 y 24 horas. Foi aplicado o Método de Titulação da Agregação por Polibreno e se calculou Título, Pontuação Total (ST) e  $C_{exp} CASP$ . Os resultados mostraram que na primeira hora não houve captura de ácido siálico. Às 2 horas o coeficiente começou a decrescer e às 3 horas o Título diminuiu numa diluição e o coeficiente foi  $0,62 \pm 0,021$ . Nos tempos seguintes o Título se manteve e o valor do coeficiente apresentou pequenas diminuições, até atingir o valor de  $0,45 \pm 0,010$  às 22 horas, tempo em que se produziu a diminuição significativa do Título. Às 24 horas houve uma nova diminuição do Título do Controle e o  $C_{exp} CASP$  foi  $0,13 \pm 0,093$ . Conclui-se que as LM vivas durante incubação in vitro com eritrócitos, começariam a captar ácido siálico a partir das 2 horas de contato conseguindo a dessialização quase completa do eritrócito às 24 horas.

**Palavras-chave:** cinética \* dessialização \* larvas musculares \* *Trichinella spiralis*

## Introducción

De todas las relaciones que existen entre los seres vivos, el parasitismo es una de las más complejas y la clave para entenderlo es el estudio de las interacciones que se establecen entre los dos organismos involucrados: el hospedador y el parásito (1). En este contexto la Glicobiología ha aportado muchísimas evidencias de que los glucoconjugados presentes en ambos intervienen en los mecanismos de infección y daño (2).

Los glúcidos fueron considerados principalmente, hasta la década de 1970, materiales ricos en energía y con funciones de protección o sostén, pero este concepto original ha evolucionado de forma espectacular debido al descubrimiento de su importancia metabólica, biológica y patológica (2).

Los ácidos siálicos pertenecen a una familia de azúcares que se localizan en las posiciones terminales de una gran variedad de glucoconjugados (3). Estos azúcares juegan un papel destacado regulando los procesos de reconocimiento celular y molecular, dado que en diversas situaciones son componentes esenciales de receptores implicados en la transducción de señales. Pueden funcionar también como enmascaradores biológicos, que por efectos estéricos y/o de repulsión electrostática, pueden impedir o reducir la accesibilidad de los ligandos a sus receptores sobre la superficie celular. Es reconocida también su influencia sobre la estructura

de macromoléculas y sobre la especificidad de antígenos, así como su papel de protección frente a ataques enzimáticos, por lo que la participación de los ácidos siálicos en la composición de los glucoconjugados determina, al menos de modo parcial, sus funciones (4).

*Trichinella* spp. es un parásito helminto que afecta a una gran variedad de hospedadores, convirtiéndolo en uno de los nematodos infecciosos más ampliamente distribuido en el mundo. La fuente más importante de infección humana es el cerdo doméstico; sin embargo, durante las últimas décadas, la carne proveniente de caballos, jabalíes y otros animales silvestres ha sido responsable de la aparición de brotes de esta enfermedad. La mayoría de los casos en humanos son debidos a *T. spiralis* y *T. murrelli* (5).

La trichinellosis producida por *T. spiralis* es un problema de salud a nivel mundial y constituye una de las principales zoonosis de América latina. En Argentina se la considera una enfermedad endémica con picos epidémicos (6).

Se ha comunicado que concentrados de larvas musculares (LM) no viables de *T. spiralis*, alteran la agregación eritrocitaria (7), por lo que en experiencias previas se estudió la captación de ácido siálico por distintas concentraciones de LM vivas durante incubación in vitro (8). El objetivo de este trabajo fue estudiar la cinética de desialización eritrocitaria producida por LM vivas de *T. spiralis*.

## Materiales y Métodos

### MUESTRAS

#### *Larvas Musculares (LM)*

*T. spiralis* fue donada por el Laboratorio de Zoonosis, Laboratorio Central de la Red Provincial de Laboratorios, Dirección de Bioquímica y Farmacia (Santa Fe, Argentina) la cual se mantiene por pasaje en ratones CBI desde 2006. Esta cepa fue tipificada utilizando PCR múltiple (Departamento de Parasitología, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos Malbrán", Buenos Aires, Argentina).

Las larvas infectivas L1 utilizadas se obtuvieron por digestión artificial con pepsina y ácido clorhídrico de la masa muscular de ratones infectados de la colonia CBI-IGE del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas UNR (9). Este trabajo se realizó bajo las normas de bioseguridad adecuadas en el bioterio y laboratorio, con la aprobación del Comité de Bioética de las Facultades de Ciencias Médicas y de Bioquímica (UNR) para el procesamiento de muestras y manejo de los animales de experimentación.

Las larvas fueron contadas microscópicamente por duplicado y se preparó un concentrado larval en solución fisiológica, con una cantidad aproximada de 2000±100 larvas/mL.

#### *Glóbulos rojos en medio salino (GR)*

Se trabajó con suspensiones de eritrocitos frescos Grupo O, lavados 3 veces en solución salina.

### MÉTODOS

#### *Incubación de los GR*

Se realizaron 3 experiencias, preparando en cada una de ellas 14 Tubos de tapa a rosca con 1 mL de solución fisiológica y 30 µL del sedimento globular. En 13 de ellos se adicionaron 30 µL del concentrado de LM vivas (cantidad aproximada de LM: 60) y el restante fue utilizado como Control.

Los Tubos sembrados con LM fueron incubados a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 18, 20, 22 y 24 horas. Finalizado cada uno de los tiempos de incubación, un Tubo fue retirado de la estufa y lavado en solución salina 3 veces.

#### *Método de Titulación de la Agregación por Polibrene% (10)*

El método se aplicó simultáneamente en el Control y en los mismos eritrocitos incubados con LM a los distintos tiempos de incubación. Se hicieron diluciones seriadas progresivas del Polibrene en solución salina (Puro, 1/2; 1/4; 1/8.....1/128) y se prepararon las suspensiones globulares al 20%, a partir de cada uno de los

sedimentos. A continuación, se mezclaron 15 µL de la suspensión globular al 20% con 15 µL de cada una de las diluciones del Polibrene en una placa de vidrio. Se mezcló con varilla y se homogeneizó por movimientos circulares de la placa durante 1 minuto, hasta que se produjo la agregación entre los eritrocitos con carga negativa y el polication Polibrene.

Se evaluó la carga aniónica del Control y de los GR incubados con las LM, considerando el Título a la última dilución de Polibrene que presentó agregación. Se consideró significativa una diferencia de Título ≥2 diluciones entre ambos (11).

A los fines de comparar la agregación de los glóbulos incubados con LM, en relación a la del Control, se las semicuantificó con cruces (4+, 3+, 2+, 1+, +/-; -) y se asignó un *Score* a cada una según Goudemand y Marsalet (12), de acuerdo con la siguiente escala:

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

Se determinó el Coeficiente experimental de captación de ácido siálico por el parásito usando el método de Polibrene (C<sub>exp</sub> CASP) como el cociente entre el *Score* Total de la agregación (ST) de los eritrocitos incubados con las LM y el *Score* de la agregación de los eritrocitos Control (11).

$$C_{\text{exp}} \text{ CASP} = \frac{\text{ST de los eritrocitos incubados con LM}}{\text{ST de los eritrocitos Control}}$$

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

Cuando este coeficiente es igual a 1 significa que la agregación del Control y de los eritrocitos incubados con LM es la misma, por lo que no habría diferencia en el contenido de ácido siálico. Mientras que si su valor es 0 representa que los glóbulos incubados con LM no agregan con el Polibrene puro ni con ninguna de sus diluciones, por lo que la remoción de ácido siálico sería completa.

#### *Análisis estadísticos*

Se calculó el valor de la media y de la desviación estándar para cada tiempo de incubación con los 3 valores de C<sub>exp</sub> CASP obtenidos, a los fines de establecer si los valores incluidos en el rango de dispersión del coeficiente para cada tiempo también estaban en el rango de dispersión de C<sub>exp</sub> CASP de los dos tiempos inmediatos (13).

## Resultados

La experiencia mostró que en la primera hora de incubación no se modificaron ni el Título ni el ST de los eritrocitos Control (media ± desviación estándar

de  $C_{exp}CASP=0,97\pm 0,052$ ), sugiriendo que las LM no captaron ácido siálico. A las 2 horas comenzó el descenso del coeficiente y a las 3 horas presentó una moderada disminución (media  $\pm$  desviación estándar de  $C_{exp}CASP=0,62\pm 0,021$ ) acompañada de la reducción del Título del Control en una dilución (disminución no significativa). En los siguientes tiempos de incubación se observó que el Título se mantuvo en todas las experiencias y el valor del coeficiente presentaba pequeñas disminuciones. Recién a las 22 horas de contacto de los eritrocitos con las LM, se produjo la disminución significativa del Título del Control en 2 diluciones en las 3 repeticiones realizadas y el coeficiente alcanzó un valor promedio de  $0,45\pm 0,01$ . A las 24 horas se obtuvo la máxima captación de ácido siálico observándose un valor del coeficiente cercano al mínimo (media  $\pm$  desviación estándar de  $C_{exp}CASP = 0,13\pm 0,093$ ),

así como también una nueva disminución en el Título del Control. Los resultados se muestran en la Tabla I y en la Figura 1 se representan los valores promedios de  $C_{exp}CASP$  para los distintos tiempos de incubación.

## Discusión y Conclusiones

La trichinellosis constituye en la época actual uno de los problemas graves que afectan la salud humana y de las 32 especies que parasitan al hombre se ha señalado a *T. spiralis* como la más peligrosa y con mayor complejidad antigénica (14) (15).

Todos los parásitos, incluyendo *T. spiralis*, escapan a la inmunidad protectora mediante la reducción de su inmunogenicidad o la inhibición de las respuestas inmunitarias de los huéspedes (15).

Tabla I. Valores de título, score total y  $c_{exp}CASP$  en los eritrocitos control e incubados con larvas musculares

	TÍTULO 1 experiencia	TÍTULO 2 experiencia	TÍTULO 3 experiencia	$C_{exp}CASP$ (media $\pm$ desviación estándar)
GR Control	16	64	32	-
Tiempo de incubación de GR con LM (horas)				
1	16	64	32	0,97 $\pm$ 0,052
2	16	64	32	0,81 $\pm$ 0,012
3	8	32	16	0,62 $\pm$ 0,021
4	8	32	16	0,62 $\pm$ 0,021
5	8	32	16	0,58 $\pm$ 0,010
6	8	32	16	0,58 $\pm$ 0,010
7	8	32	16	0,58 $\pm$ 0,010
10	8	32	16	0,58 $\pm$ 0,010
15	8	32	16	0,55 $\pm$ 0,015
18	8	32	16	0,52 $\pm$ 0,010
20	8	32	16	0,52 $\pm$ 0,010
22	4	16	8	0,45 $\pm$ 0,010
24	2	8	4	0,13 $\pm$ 0,093

GR: glóbulos rojos.

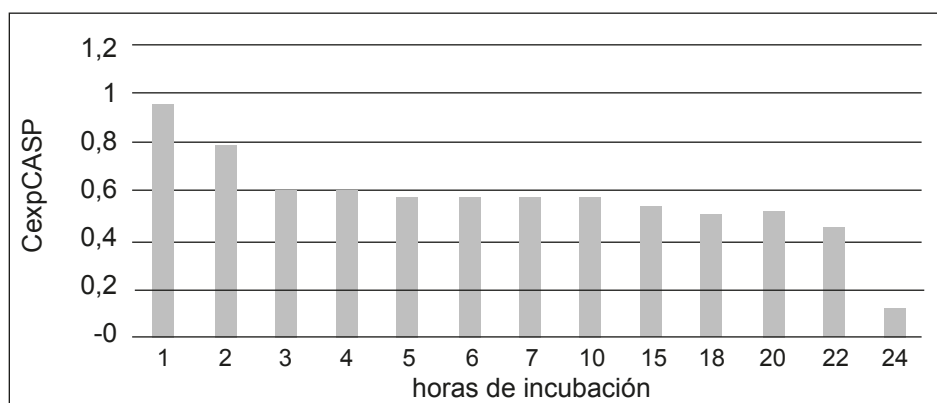


Figura 1. Valores de  $C_{exp}CASP$  para los distintos tiempos de incubación.

Despommier le dio el nombre de célula nodriza al nicho donde se implantan las larvas infectantes (LI) de *T. spiralis* en el músculo estriado (16). Las células musculares infectadas proveen de nutrientes a la larva en su etapa de crecimiento, desarrollo y homeostasis durante la fase muscular del ciclo vital (17).

La transformación de la célula muscular en una célula nodriza implica el reemplazo de todos los componentes musculares específicos (filamentos de actina y miosina) por espirales de membrana lisa, el agregado de mitocondrias parcialmente disfuncionales, el alargamiento del núcleo y desarrollo del nucléolo, la hipertrofia del glicocálix y la formación de una nueva red vascular en torno de dicha cubierta (17). Tres días después de entrar el parásito en las fibras musculares comienza un crecimiento exponencial en el volumen de la larva, el alargamiento del núcleo y el incremento de las organelas (18).

Los ácidos siálicos muestran una inmensa diversidad de estructuras que reflejan su participación en importantes procesos biológicos de crecimiento y desarrollo, tanto normal como patológico (19). La captación de ácido siálico a partir del eritrocito por las larvas musculares de *T. spiralis* permitiría especular que el parásito podría también secuestrarlo a partir de otros glucoconjugados que posean residuos sialisados, tal como fue comunicado para *T. cruzi* (20). En este contexto, considerando las múltiples funciones del ácido siálico, su captación podría ser utilizada por las LM para inhibir la vía alternativa del complemento, alterar los procesos de reconocimiento celular, la vida media de células y proteínas plasmáticas, modular el sistema inmune y la apoptosis celular, y/o modificar la adhesión de moléculas cuyo ligando fuera el ácido siálico (21), a los fines de evadir la respuesta inmunológica del hospedador. Aunque también podría ser utilizado por el helminto en alguna etapa de su metabolismo, tal como se ha descrito en *E. histolytica* y *E. invadens* (22).

A los fines de comparar los resultados con los obtenidos en experiencias previas, se trabajó con 60 larvas/mL que fue la menor cantidad de larvas que produjo durante la incubación *in vitro* una diferencia significativa del Título de los glóbulos rojos Control (8). En concordancia con las observaciones anteriores, a la primera hora de incubación se mantuvo el Título y el valor del ST de los eritrocitos Control, indicando que no había captación de ácido siálico por las LM. A las 2 horas el Título tampoco se modificó, aunque el ST presentó una leve disminución (media  $\pm$  desviación estándar de  $C_{exp} CASP=0,81\pm 0,012$ ), y a las 3 horas el Título descendió en una dilución (disminución no significativa), mientras que el ST fue moderadamente menor al del Control (media  $\pm$  desviación estándar de  $C_{exp} CASP=0,62\pm 0,021$ ) (8).

La experiencia realizada mostró que recién a las 22 horas de incubación, la captación de ácido siálico por

las LM ocasionó la disminución significativa del Título del Control y el coeficiente alcanzó un valor promedio de  $0,45\pm 0,010$ . Sin embargo, a las 24 horas hubo un incremento significativo en el secuestro del glucoconjugado que produjo otra disminución en el Título del Control y en el valor del coeficiente (media  $\pm$  desviación estándar de  $C_{exp} CASP=0,13\pm 0,093$ ). Previamente se ha comunicado que la captura de ácido siálico por las LM fue máxima a las 24 horas, sin diferencias con las 48 horas de incubación (8).

Se concluye que las LM vivas durante incubación *in vitro* con eritrocitos, comenzarían a captar ácido siálico a las 2 horas de contacto, logrando la desialización casi completa del glóbulo rojo a las 24 horas.

#### CORRESPONDENCIA

Dra. PATRICIA PONCE DE LEÓN  
Área Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas  
y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario.  
Suipacha 531  
2000 ROSARIO, Argentina  
E-mail: tefu1958@hotmail.com

#### Referencias bibliográficas

- Martínez Fernández A. El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos y hospedadores. En Parasitología Veterinaria, 1ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 1999. p. 22-38.
- Navarro BF. Glicobiología: una ciencia dulce. Disponible en: <http://dieumsnh.qfb.umich.mx/glicobiologia.htm>. (Fecha de acceso: 23 de julio de 2016).
- Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. Cell Mol Life Sci 2006; 63 (12): 1331-54.
- Cabezas Fernández del Campo JA. Influencia de la sialilación y de la "pegilación" de la molécula de ciertos medicamentos en su actividad. An R Acad Nac Farm 2008; 74 (3): 409-32.
- Pasqualetti M, Acerbo M, Miguez M, Rosa A, Fariña F, Cardillo N *et al*. Nuevos aportes al conocimiento de *Trichinella* y trichinellosis. Rev Med Vet 2014; 95 (2): 12-21.
- Pozio E, Zarlenga DS. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. Int J Parasitol 2005; 35: 1191-204.
- Ponce de León P, López Murúa G, Racca L. Estudio del efecto de *Trichinella spiralis* sobre la desialización aplicando el Método de Polibrene. Acta Bioquím Clín Latinoam 2015; 49 (3): 347-52.
- Ponce de León P, López Murúa G. Captación de ácido siálico por larvas musculares de *Trichinella spiralis* durante incubación *in vitro*. Acta Bioquím Clín Latinoam 2016; 50 (4): 687-91.



9. Luebke RW. Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. *Methods* 2007; 41: 38-47.
10. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. *Transfusion Today* 2006; 66: 28.
11. Ponce de León P, Racca L, Menendez M, Biondi C, Vaverde J. Acción de *Ascaris lumbricoides* sobre la carga aniónica de eritrocitos y eritrocitos desializados. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 (2): 247-56.
12. Goudemand M, Marsalet ID. *Elements d'immunohématologie*. 3° ed. Paris: Flammarion; 1974.
13. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. *Estadística matemática con aplicaciones*. México: Thomson Learning; 2003.
14. Cabral J, Villicaña H, Fragozo R, Contreras A. Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. *Salud Pública Méx* 1990; 32: 575-82.
15. Laredo S, Martínez M, Reveles R, Muñoz J, Moreno MA. Modificación de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con antígeno soluble total de *Trichinella spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 2012; 71 (2): 160-6.
16. Despommier DD, Gwadz RD, Hotez P. *Parasites and Disease*. 5ª ed. New York: Apple Trees Production L.L.C.; 2005.
17. Vignau ML. Triquinosis. *Rev Ciencia Hoy* 2004; 14 (82): 58-65.
18. Reveles RG, Villalobos R, Saldivar S, Moreno MA. Implante histológico de *Trichinella spiralis* experimental. *Parasitol. Día* 1997; 21 (3-4): 114-8.
19. Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(12): 1331-54.
20. 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.
21. Cabezas JA. Acides sialiques: Leur Signification Biochimique. *Le Pharm Biol* 1961; 2: 9-19.
22. Chayen A, Avron B, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immunol* 1988; 56 (3): 673-81.

**Recibido: 24 de agosto de 2016**

**Aceptado: 4 de noviembre de 2016**