

Efecto de *Trichinella spiralis* y de *Trichinella patagoniensis* n.sp. sobre la desialización

► Patricia Ponce de León^{1a*}, Ernesto Lamagni^{2a}, Juan José Ivancovich^{3b}, Hebe Bottai^{4b}

¹ Doctora en Ciencias Biomédicas.

² Pasante Área Parasitología.

³ Bioquímico.

⁴ Bioquímica.

^a Área Parasitología.

^b Área Estadística y Procesamiento de Datos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

* Autor para correspondencia.

Resumen

El ácido siálico tiene importantes funciones biológicas, muchas de las cuales determinan su participación en la respuesta inmune. El objetivo del trabajo fue comparar el efecto de *Trichinella spiralis* y *Trichinella patagoniensis* n.sp. sobre la desialización eritrocitaria. Se trabajó con 10 concentrados de larvas musculares de *T. spiralis* y 10 de *T. patagoniensis* de la misma concentración larval. Se realizó el tratamiento incubando el sedimento de eritrocitos frescos con igual volumen de concentrado larval (37 °C), tomando muestra a los 30, 60 y 90 minutos. Los controles fueron incubados de la misma forma con solución salina. Se aplicó el método de Titulación de la Agregación por Polibrene y se determinó el *CexpST*. Los resultados mostraron que el valor medio del *CexpST* en los eritrocitos tratados con *T. spiralis* fue significativamente menor que en los glóbulos tratados con *T. patagoniensis*, para todos los tiempos estudiados. El aumento del tiempo de tratamiento también disminuyó significativamente el valor medio del *CexpST* para las dos especies. Éste fue significativamente menor a los 90 minutos de incubación que a los 60 minutos y éstos a su vez menores que a los 30 minutos. Se concluye que *T. spiralis* provocó mayor desialización eritrocitaria que *T. patagoniensis* en las condiciones experimentales estudiadas.

Palabras clave: *Trichinella spiralis* * *Trichinella patagoniensis* n.sp. * desialización

Effect of Trichinella spiralis and Trichinella patagoniensis n.sp. on desialization

Abstract

Sialic acid has important biological functions, many of which determine its participation in the immune response. The objective of this paper was to compare the effect of *Trichinella spiralis* and *Trichinella patagoniensis* n.sp. on erythrocyte desialization. Work was performed on 10 larval concentrates of muscle larvae of *T. spiralis* and 10 of *T. patagoniensis* of the same larval concentration. The treatment was carried out incubating the sediment of fresh erythrocytes with an equal volume of larval concentrate (37 °C), taking samples at 30, 60 and 90 minutes. The controls were incubated in the same way treated with saline solution. Titration of aggregation by Polybrene Method was applied and the *CexpST* was determined. The results showed that the mean value of *CexpST* in erythrocytes with *T. spiralis* was significantly lower than in the globules treated with *T. patagoniensis*, for all the studied times. The increase in treatment time also significantly

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

decreased the mean value of CexpST for the two species, being significantly lower at 90 minutes of incubation than at 60 minutes and these in turn lower than at 30 minutes. It is concluded that *T. spiralis* caused greater erythrocyte desialization than *T. patagoniensis* in the experimental conditions studied.

Keywords: *Trichinella spiralis* * *Trichinella patagoniensis n.sp.* * desialization

Efeito de *Trichinella spiralis* e *Trichinella patagoniensis n.sp.* sobre dessialização

Resumo

O ácido siálico tem importantes funções biológicas, muitas das quais determinam sua participação na resposta imune. O objetivo foi comparar o efeito de *Trichinella spiralis* e *Trichinella patagoniensis n.sp.* sobre a dessialização eritrocitária. Trabalhou-se com 10 concentrados de larvas musculares de *T. spiralis* e 10 de *T. patagoniensis* da mesma concentração larval. Realizou-se o tratamento incubando o sedimento de eritrócitos frescos com igual volume de concentrado larval (37 °C), tomando amostra aos 30, 60 e 90 minutos. Os controles foram incubados da mesma forma com solução salina. Foi aplicado o método de Titulação da Agregação por Polibrene e se determinou CexpST. Os resultados mostraram que o valor médio do CexpST nos eritrócitos tratados com *T. spiralis* foi significativamente menor que nos glóbulos tratados com *T. patagoniensis*, para todos os tempos estudados. O aumento do tempo de tratamento também diminuiu significativamente o valor médio do CexpST para as duas espécies, sendo significativamente menor aos 90 minutos de incubação que aos 60 minutos e eles por sua vez menores que aos 30 minutos. Conclui-se que *T. spiralis* provocou maior dessialização eritrocitária que *T. patagoniensis* nas condições experimentais estudadas.

Palavras-chave: *Trichinella spiralis* * *Trichinella patagoniensis n.sp.* * dessialização

Introducción

En la actualidad se reconoce la existencia de más de 50 estructuras de ácidos siálicos y no sólo se están identificando nuevos, sino que, además, se está profundizando en el estudio de sus funciones (1). Los ácidos siálicos se sitúan en el extremo de las moléculas de las que forman parte y fueron hallados en vertebrados, algunos tipos de bacterias, virus e invertebrados, pero no han sido identificados en vegetales (1). Presentan importantes funciones biológicas, por lo que puede deducirse que algunas de ellas en los glucoconjugados están determinadas, al menos parcialmente, por la participación de los ácidos siálicos en su composición. Los ácidos siálicos presentes en glucoproteínas y glucolípidos están involucrados en funciones biológicas tales como procesos de reconocimiento celular, vida media de células y proteínas plasmáticas, modulación del sistema inmune y apoptosis. También son ligandos de moléculas de adhesión, mediando adhesión celular o transducción de señales (2). Su estudio ha permitido relacionarlos con enfermedades, y ya existen ejemplos concretos en infecciones bacterianas y virales. Lo mismo sucede con enfermedades parasitarias como malaria (3)(4) y tripanosomiasis (5-10). Actualmente se considera que tendrían un papel importante en la interacción pará-

sito-hospedador, pues a pesar de que los mecanismos celulares de muchos procesos infecciosos no se conocen con exactitud, se ha comunicado que involucrarían a los glucoconjugados de superficie del parásito y del hospedador (11).

La trichinellosis es una zoonosis transmitida por consumo de carne que contiene larvas musculares del parásito *Trichinella* spp. En la Argentina la enfermedad es endémica y principalmente transmitida por cerdos. Durante años, la única especie involucrada en brotes humanos y focos porcinos en nuestro país fue *Trichinella spiralis*. Sin embargo, Krivokapich *et al.* (12) comunicaron la presencia de un nuevo genotipo en un puma de montaña, en la provincia de Río Negro. Este genotipo hoy es una nueva especie encapsulada: *Trichinella patagoniensis* (12). Estudios experimentales con esta nueva especie demostraron que los felinos y los ratones son los animales más susceptibles de adquirir la infección, mientras que los cerdos y las ratas presentan una carga parasitaria muy baja (12)(13) y en las aves domésticas, la infección no se desarrolla más allá del intestino (14).

Debido a su reciente hallazgo, los conocimientos respecto de la biología de esta nueva especie aún son escasos.

En experiencias previas, utilizando eritrocitos para el estudio de la desialización, se ha comunicado que las

larvas musculares (LM) de *T. spiralis* alteran la agregación globular (15-19).

El objetivo del trabajo fue comparar el efecto de *T. spiralis* y *T. patagoniensis* n.sp. sobre la desialización eritrocitaria.

Materiales y Métodos

Muestras

Se trabajó con 10 concentrados de larvas musculares de *T. spiralis* y 10 concentrados de larvas musculares de *T. patagoniensis* de la misma concentración larval (1.000 ± 200 larvas/ mL)

Larvas musculares (LM) de T. spiralis y de T. patagoniensis

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) y *T. patagoniensis* por el Departamento de Parasitología, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos Malbrán" (Buenos Aires, Argentina), lugar, este último, donde ambas especies fueron tipificadas por análisis moleculares.

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.

Las larvas se recogieron en formol al 10%, se lavaron 3 veces en solución fisiológica y se contaron microscópicamente por duplicado a los fines de preparar concentrados larvales con un volumen de 100 mL y una cantidad aproximada de 1.000±200 larvas/mL (20).

Glóbulos rojos en medio salino (GR). Se trabajó con suspensiones de eritrocitos humanos frescos, provenientes de donadores sanos voluntarios, obtenidos de muestras con anticoagulante y lavados tres veces en solución salina.

Métodos

Tratamiento de los eritrocitos

Se trabajó con tres tubos incubados a 37 °C en baño termostático.

Tubo 1: 100 µL GR + 100 µL concentrado de LM de *T. spiralis* (GR tratados 1)

Tubo 2: 100 µL GR + 100 µL concentrado de LM de *T. patagoniensis* (GR tratados 2)

Tubo 3: 100 µL GR + 100 µL solución fisiológica (GR control)

Volumen final de cada tubo: 200 µL

A los 30, 60 y 90 minutos de incubación se sustrajo de cada uno de los tubos una alícuota de 65 µL, previa homogeneización, que fue recolectada en solución salina.

Se lavó por centrifugación 5 minutos, y se preparó con el sedimento globular una suspensión eritrocitaria al 20%.

Método de titulación de la agregación por Polibrene (21) El método se aplicó simultáneamente en los GR control y en los mismos eritrocitos incubados con LM de las dos especies de *Trichinella*. Se hicieron diluciones seriadas progresivas de Polibrene en solución salina (Puro, 1/2; 1/4; 1/8.....1/128) y a continuación se colocaron en una placa de vidrio, una gota de la suspensión eritrocitaria al 20% y una gota de cada una de las diluciones de Polibrene. Se mezcló con varilla de vidrio 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 policatión Polibrene.

Se evaluó la carga aniónica del control y de los GR incubados con las LM, determinando el título como la última dilución del policatión que presentó agregación. Se consideró significativa una diferencia de título ≥2 diluciones (22).

A los fines de comparar la agregación de los glóbulos incubados con LM, en relación a 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 (23), de acuerdo con la siguiente escala:

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

Se determinó el coeficiente experimental de *score* total usando el método de Polibrene (*CexpST*) 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 (22).

$$CexpST = \frac{ST \text{ de los eritrocitos incubados con LM}}{ST \text{ de los eritrocitos control}}$$

Donde *score* total= Σ Si Si: *score* individual

Este coeficiente es igual a 1 cuando no hay modificación de ácido siálico por acción del parásito y es igual a 0 cuando el tratamiento ocasiona la pérdida total del ácido siálico del eritrocito, o sea que la captación del mismo es máxima.

Análisis estadístico

Se compararon los valores del *CexpST* para las dos especies de *Trichinella* y los diferentes tiempos de incubación, aplicando la técnica de análisis de la variancia y el *test* de comparaciones múltiples según Tukey, considerando los factores "especie" de *Trichinella* a dos niveles, tiempo de incubación a tres niveles y GR como factor aleatorio (24).

Resultados

El valor medio del *CexpST* en los GR tratados 1 fue significativamente menor que en los GR tratados 2 ($p < 0,001$) para todos los tiempos estudiados, indicando que *T. spiralis* provocó una mayor desialización eritrocitaria que *T. patagoniensis*.

La disminución del título en 2 o más diluciones en relación al control se observó en 9/10 suspensiones de GR tratados con *T. spiralis*, (2 a los 30 minutos, 2 a los

60 y 5 a los 90 minutos), mientras que solamente se visualizó en 2/10 suspensiones de GR Tratados con *T. patagoniensis* (1 a los 30 y 1 a los 90 minutos de incubación).

El aumento del tiempo de tratamiento también disminuyó el valor medio del *CexpST* ($p < 0,000$), el cual fue significativamente menor a los 90 minutos de incubación que a los 60 minutos y estos a su vez menores que a los 30 minutos, para las dos especies estudiadas.

Los resultados se muestran en la Tabla I y Figuras 1 y 2.

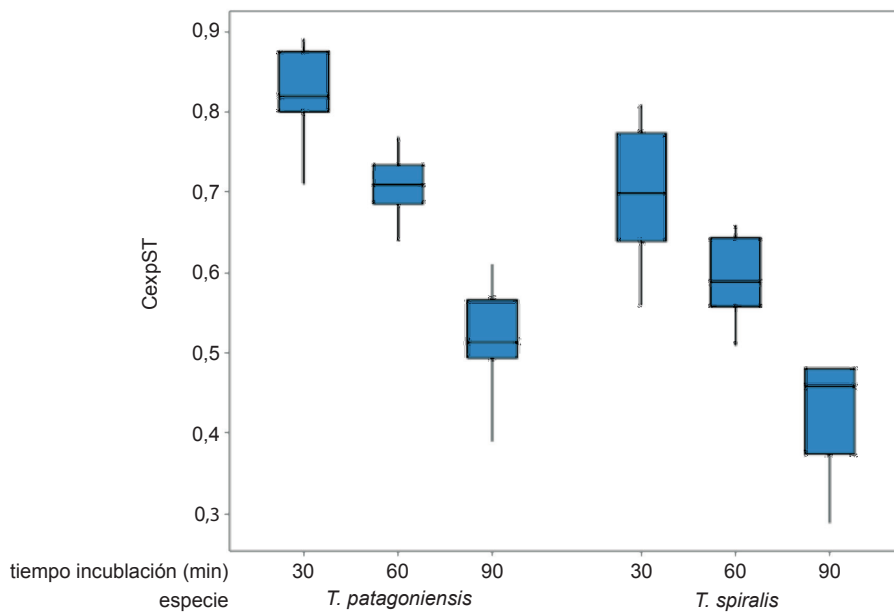


Figura 1. Valores del *CexpST* para las combinaciones especie y tiempo de incubación.

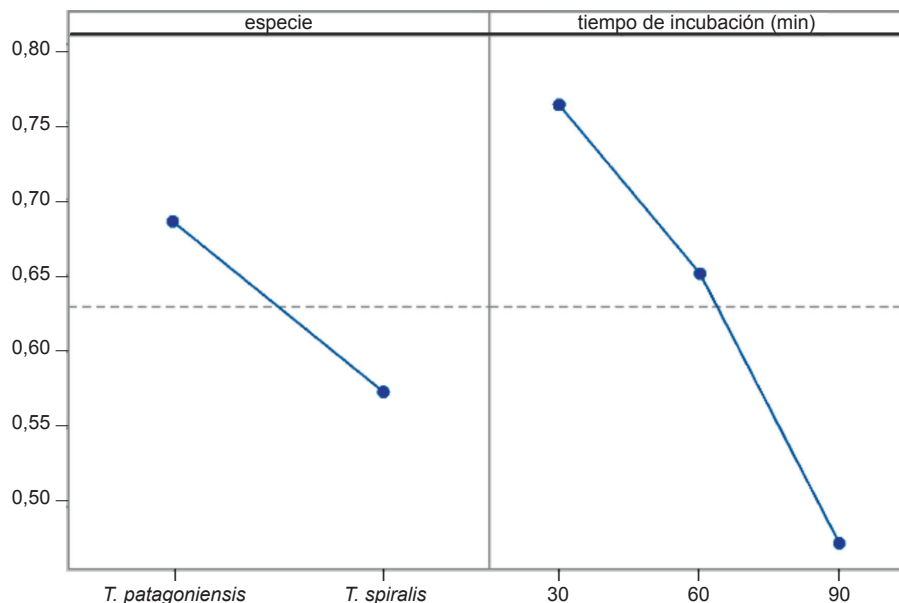


Figura 2. Valores de la media de la variable *CexpST* para cada combinación de niveles de los factores especie y tiempo de incubación.

Tabla I. Valores de la media y desviación estándar del *CexpST* para eritrocitos tratados con *T. spiralis* y *T. patagoniensis* en los diferentes tiempos de incubación

Combinación	n	Media	Desviación estándar
<i>T. spiralis</i> -30 minutos	10	0,697	0,083
<i>T. spiralis</i> -60 minutos	10	0,593	0,052
<i>T. spiralis</i> -90 minutos	10	0,433	0,066
<i>T. patagoniensis</i> -30 minutos	10	0,823	0,054
<i>T. patagoniensis</i> -60 minutos	10	0,710	0,038
<i>T. patagoniensis</i> -90 minutos	10	0,519	0,061

Discusión y Conclusiones

Los ácidos siálicos participan en la respuesta inmune, ya que inhiben la vía alternativa del complemento y tienen importantes funciones de estabilización de moléculas y membranas, así como también influencia en las interacciones de modulación con el medio ambiente. Muchas de sus funciones provienen de la fuerte carga electronegativa que poseen, como por ejemplo la unión y transporte de iones, la estabilización de la conformación de las proteínas, incluso enzimas y el mejoramiento de la viscosidad de las mucinas. Sin embargo, también pueden proteger a células y moléculas del ataque de proteasas o glucosidasas, extendiendo su tiempo de vida y sus funciones. Los ácidos siálicos además pueden regular la afinidad de receptores y modular los procesos involucrados en la señalización transmembrana, fertilización, crecimiento y diferenciación. Se ha comunicado que su efecto antioxidante es eliminador de radicales libres, lo que sería significativo en los endotelios de los vasos sanguíneos. Otro papel prominente que poseen es su dualismo, actuando como enmascaradores o como sitios de reconocimiento (25).

Debido a las variadas funciones del ácido siálico, posiblemente *T. spiralis* lo utilice como una manera de evadir la respuesta inmune, como se ha sido descrito en especies de *Trypanosoma* (5-11) o bien en alguna etapa de su metabolismo, tal como se ha comunicado en *Entamoeba histolytica* (26).

La experiencia realizada mostró que las larvas infectantes de *T. spiralis* y de *T. patagoniensis* n. sp provocan la desialización eritrocitaria, por lo que se podría especular que lo obtendrían a partir de otros glucoconjugados que posean residuos sializados.

Las dos especies provocaron mayor desialización con el aumento del tiempo de contacto con los glóbulos, tal como indicó el valor medio del *CexpST* de ambas, el cual fue disminuyendo a medida que el tiempo de tratamiento aumentaba.

Para cada uno de los 3 tiempos de incubación estudiados el valor medio del coeficiente fue significativa-

mente menor para *T. spiralis* que para *T. patagoniensis*, lo que demostró que la desialización era mayor en los eritrocitos cuando estuvieron en contacto con *T. spiralis*, en relación a cuando los mismos glóbulos se incubaron con *T. patagoniensis*.

Los resultados mostraron que *T. spiralis* capturó más ácido siálico de los eritrocitos humanos que *T. patagoniensis* en las condiciones experimentales estudiadas, lo que sugeriría que la relación hospedador-parásito que se establece es distinta para ambas especies y posiblemente *T. spiralis* tenga mayor adaptación al hombre que *T. patagoniensis*.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. María Delia Vasconi y a la Bioq. Paula Indelman el suministro de larvas musculares de ambas especies de *Trichinella*.

Correspondencia

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

Referencias bibliográficas

1. Cabezas JA. Acides sialiques: leur signification biochimique. Le Pharm Biol 1961; 2: 9-19.
2. Morell AG, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. J Biol Chem 1971; 246: 1461-7.
3. 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.
4. 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. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2009; 106: 5348-52.
5. Hemphil A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. Parasitol Res 1995; 81: 412-20.
6. 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.
7. Esievo KAN, Saror DI, Ilemobade AA, Hallaway MH. Variation in erythrocyte surface and free serum sialic acid concentrations during infection in Cattle. Res Vet Sci 1982; 32: 1-5.

8. 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.
9. Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* 1993; 7: 1257-64.
10. Colli W, Hemphil A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. *Parasitol Res* 1995; 81: 412-20.
11. 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: 24-7.
12. Krivokapich SJ, Pozio E, Gatti GM, Gonzalez Prous CL, Ribicich MM, Marucci G *et al.* *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivore mammals in South America. *Int J Parasitol* 2012; 42: 903-10.
13. Ribicich M, Krivokapich S, Pasqualetti M, Gonzalez Prous CL, Gatti GM, Falzoni E, *et al.* Experimental infection with *Trichinella* T12 in domestic cats. *Vet Parasitol* 2013; 194: 168-70.
14. Pasqualetti M, Fariña F, Falzoni E, Cardillo N, Aronowicz T, Krivokapich S, *et al.* Susceptibility of chickens (*Gallus gallus domesticus*) to *Trichinella patagoniensis*. *Vet Parasitol* 2014; 205: 397-400.
15. Ponce de León P, López Murúa G, Bertorini G, Vasconi MD, Riquelme B. Efecto biorreológico de *Trichinella spiralis* sobre la agregación eritrocitaria mediante el análisis digital de imágenes. *Ciencia y Tecnología. Rosario: UNR Editora*; 2013. p. 452-4.
16. López Murúa G, Racca L, Ponce de León P. Efecto de *Trichinella spiralis* sobre la cinética de agregación eritrocitaria. *Ciencia y Tecnología. Rosario: UNR Editora*; 2014. p. 61-3.
17. López Murúa G, Racca L, Ponce de León P. Estudio de la cinética de captación de ácido siálico por larvas musculares de *Trichinella spiralis*. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2015; 49: 267-72.
18. 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: 347-52.
19. 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: 687-91.
20. Luebke RW. Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. *Methods* 2007; 41: 38-47.
21. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. *Transfusion Today* 2006; 66: 28.
22. Ponce de León P, Racca L, Menendez M, Biondi C, Valverde J. Acción de *Ascaris lumbricoides* sobre la carga aniónica de eritrocitos y eritrocitos desializados. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46: 247-56.
23. Goudemand M, Marsalet ID. *Elements d'immuno-hématologie*. 3ª ed. Paris: Flammarion; 1974.
24. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. *Estadística matemática con aplicaciones*. 7ª ed México: Thomson Learning; 2010.
25. Varki A, Schauer R. Sialic Acids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2ª ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1920/> (Fecha de acceso: 13 de agosto de 2018).
26. Chayen A, Avron B, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immunol* 1988; 56: 673-81.

Recibido: 23 de agosto de 2018

Aceptado: 5 de octubre de 2018