

Trichinella spiralis y *Trichinella patagoniensis*: estudio de la carga globular aplicando el método de Azul Alcian

► Patricia Ponce de León^{1a*}, Gabriel López Murúa^{2a}

¹ Doctora en Ciencias Biomédicas - Bioquímica.
² Bioquímico.

^a Docente Área Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Provincia de Santa Fe. Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

Los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas de superficie son los principales responsables de la carga negativa eritrocitaria. El objetivo de este trabajo fue estudiar alteraciones de carga globular producidas por *Trichinella spiralis* y *Trichinella patagoniensis*. Se trabajó con concentrados de larvas musculares de ambas especies y con eritrocitos frescos. Se incubó el sedimento globular con igual volumen de concentrado larval (1 y 2 horas). Los controles fueron incubados con solución salina. Se aplicó el método de Azul Alcian y se determinó el coeficiente experimental de carga aniónica eritrocitaria (CexpCAE). Los resultados mostraron que la carga disminuyó con el aumento del tiempo de tratamiento para ambas especies. Los valores de CexpCAE de las suspensiones incubadas con *T. spiralis* fueron menores que con *T. patagoniensis*, indicando que *T. spiralis* produjo mayor disminución de carga que *T. patagoniensis*. Se concluye que la desialización producida por ambas especies no es la misma, lo que sugiere que la relación hospedador-parásito que se establecería *in vivo* sería distinta.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*; *Trichinella patagoniensis*; Carga globular; Método de Azul Alcian

Trichinella spiralis and *Trichinella patagoniensis*: study of globular charge applying Alcian Blue method

Abstract

The sialic acid residues of the surface glycoproteins are mainly responsible for the erythrocyte negative charge. The objective of this work was to study alterations of globular charge produced by *Trichinella spiralis* and *Trichinella patagoniensis*. Work was carried out on muscle larvae concentrates of both species and fresh erythrocytes. The treatment was performed by incubating the globular pellet with equal volume of larval concentrate (1 and 2 hours). Controls were incubated with saline solution. The Alcian Blue method was applied and the experimental coefficient of erythrocyte anion charge (expCEAC) was determined. The results showed that the globular charge decreased with increasing treatment time for both species. The expCEAC values of the suspensions incubated with *T. spiralis*

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)

were lower than with *T. patagoniensis*, indicating that *T. spiralis* produced a greater decrease in charge than *T. patagoniensis*. It is concluded that the desialization produced by both species is not the same, suggesting that the host-parasite relationship that would be established in vivo would be different.

Keywords: *Trichinella spiralis*; *Trichinella patagoniensis*; Globular charge; Alcian Blue method

Trichinella spiralis e *Trichinella patagoniensis*: estudo da carga globular pelo método de Azul de Alcian

Resumo

Os resíduos de ácido siálico das glicoproteínas de superfície são os principais responsáveis pela carga negativa dos eritrócitos. O objetivo desse trabalho foi estudar as alterações da carga globular produzidas por *Trichinella spiralis* e *Trichinella patagoniensis*. Trabalhamos com concentrados de larvas musculares de ambas as espécies e com eritrócitos frescos. O tratamento foi realizado incubando o sedimento globular com igual volume de concentrado larval (1 e 2 horas). Os controles foram incubados com solução salina. Foi aplicado o método de Azul de Alcian e se determinou o coeficiente experimental de carga aniônica de eritrócitos (CexpCAE). Os resultados mostraram que a carga diminuiu com o aumento do tempo de tratamento para ambas as espécies. Os valores de CexpCAE das suspensões incubadas com *T. spiralis* foram menores que com *T. patagoniensis*, indicando que *T. spiralis* produziu uma diminuição maior na carga que *T. patagoniensis*. Conclui-se que a dessalinização produzida por ambas as espécies não é a mesma, sugerindo que a relação hospedeiro parasita que seria estabelecida in vivo é diferente.

Palavras-chave: *Trichinella spiralis*; *Trichinella patagoniensis*; Carga globular; Método de Azul de Alcian

Introducción

Los parásitos y sus hospedadores muestran un proceso de coevolución en muchos aspectos de su biología; por ejemplo, los hospedadores pueden cambiar su patrón de glicosilación para escapar de los parásitos, y estos últimos lo hacen para poder unirse a las células que intentan invadir (1). A pesar de que los mecanismos celulares de muchos procesos infecciosos no se conocen con exactitud, en la actualidad se considera que los glicoconjugados tendrían un papel importante en la interacción parásito-hospedador.

Los ácidos siálicos son monosacáridos excepcionales, que se sitúan en el extremo de las moléculas de las que forman parte (2). Presentan importantes funciones biológicas, entre las cuales se encuentran las debidas a su carga negativa, a su influencia sobre la estructura de macromoléculas y sobre la especificidad de antígenos, a su papel protector frente a ataques enzimáticos y a la característica de tener sitios de reconocimiento y a la vez efecto de enmascaramiento (2). Muchos parásitos utilizan el ácido siálico en su mecanismo de invasión, en sus rutas metabólicas o para evadir la respuesta inmune del hospedador.

La triquinelosis es una parasitosis cosmopolita. Las larvas migratorias que han llegado al músculo esquelético, pueden sobrevivir por años antes de ser ingeridas por un nuevo hospedador, y la célula nodriza donde se

alojan está altamente vascularizada y es rica en residuos sializados (3).

Durante años, la única especie involucrada en brotes humanos y focos porcinos en la Argentina fue *Trichinella spiralis*. Sin embargo, Krivokapich *et al.* (4) comunicaron la presencia de un nuevo genotipo: *Trichinella patagoniensis* (4). Debido a su reciente hallazgo, los conocimientos respecto de la biología de esta nueva especie aún son escasos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la alteración de carga eritrocitaria producida por larvas musculares de *T. spiralis* y *T. patagoniensis*, aplicando el método de Azul Alcian.

Materiales y Métodos

Muestras

Se trabajó con 28 concentrados de larvas musculares, 14 de *T. spiralis* y 14 de *T. patagoniensis*, de la misma concentración larval.

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” (Ciudad Autónoma de 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, Universidad Nacional de Rosario (UNR) (5).

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 µL y una cantidad aproximada de 1000±200 larvas/mL.

Los protocolos para la obtención de LM son utilizados en líneas de investigación de las Facultades de Ciencias Médicas y de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), los cuales han sido aprobados por los Comités de Bioética de ambas instituciones.

Glóbulos rojos en medio salino (GR)

Se trabajó con suspensiones de eritrocitos humanos frescos, provenientes de donadores voluntarios sanos, obtenidos de muestras con anticoagulante y lavados tres veces en solución salina.

Métodos

Tratamiento de los eritrocitos

El tratamiento consistió en incubar cada concentrado larval (100 µL) con igual volumen del sedimento globular en baño termostático a 37 °C. Los eritrocitos “control” fueron incubados de la misma manera con igual volumen de solución fisiológica.

Se realizaron 7 experiencias, en cada una de las cuales se incubaron dos concentrados larvales de *T. spiralis* y dos de *T. patagoniensis*, uno de cada especie durante una hora y, los otros, durante 2 horas.

Al término de la incubación, los glóbulos “tratados” y “control” se lavaron 3 veces en solución fisiológica y se prepararon los tubos de medición para el método de Azul Alcian.

Método espectrofotométrico de Azul Alcian

Es una técnica espectrofotométrica que se fundamenta en la unión del colorante catiónico Azul Alcian con el ácido siálico (6).

La absorbancia del blanco de Azul Alcian corresponde a 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). 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.

El método se aplicó simultáneamente en eritrocitos “control” (GRC) y en los mismos eritrocitos “tratados” con los concentrados larvales (GRT).

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” (GRC/GRT): 2 mL de Azul Alcian + 10 µL de sedimento globular.

Todos los tubos se incubaron en baño termostático a 37 °C durante 30 min, se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 10 min y se efectuó la medición de la absorbancia del sobrenadante, por duplicado, en espectrofotómetro (Unico, modelo SQ2800 (Dayton, EE.UU.) a 650 nm. Se calcularon los valores de CAE%.

Cálculo CAE%

$$\% \text{ de Azul Alcian en el sobrenadante} = \frac{(\text{Absorbancia GRC/GRT} - \text{Absorbancia BH}) \times 100}{\text{Absorbancia de B}}$$

$$\text{CAE}\% = 100 - \frac{\% \text{ de Azul Alcian en el sobrenadante} \times 100}{\text{Absorbancia de B}}$$

Se determinó el coeficiente experimental de carga aniónica eritrocitaria (CexpCAE), definido como el cociente entre CAE% final y CAE% inicial (7).

$$\text{CexpCAE} = \frac{\text{CAE}\% \text{ GRT (final)}}{\text{CAE}\% \text{ GRC (inicial)}}$$

Reactivos

- Solución de Azul Alcian: en el momento de uso se disuelven 6,25 mg de colorante en 25 mL de alcohol etílico (99,5%). Se coloca en baño a 37 °C durante 30 min y luego se centrifuga (5 min a 1500-2000 r.p.m.). Se separa el sobrenadante que es utilizado para preparar los tubos de medición.
- Alcohol etílico 99,5%.

Análisis estadístico

Se calculó el valor de la media y el de la desviación estándar con las 2 mediciones de CAE% de cada uno de los eritrocitos “tratados” y de los correspondientes “controles”. Luego se relacionaron para establecer si los valores incluidos en el rango de dispersión de CAE% de los glóbulos “tratados” también estaban en el rango de dispersión de CAE% de los “controles respectivos”. Con estos datos se determinó cuál era el valor mínimo de CexpCAE que indicaba que se había producido alteración de carga globular con el tratamiento (8).

Resultados

Para las mediciones de CAE% de cada una de las suspensiones de eritrocitos “tratados”, se tuvo en cuenta el valor de la media y la desviación estándar en relación con el valor obtenido para el correspondiente “control”. De esta manera, se consideró que cuando CexpCAE era menor o igual que 0,87, los eritrocitos disminuían su carga aniónica durante el tratamiento con el concentrado larval, lo que representó una variación entre el CAE% inicial y el final $\geq 1,67\%$ ($\Delta\text{CAE}\%$), don-

de el CAE% inicial es el correspondiente a los GRC y el final al de los GRT.

El valor de CAE% de las suspensiones globulares tratadas con ambas especies, en las siete experiencias realizadas, fue menor a las 2 horas de incubación en relación a la primera hora, indicando mayor disminución de la carga aniónica con el aumento del tiempo de tratamiento.

Todos los tratamientos con *T. spiralis* modificaron la carga globular en los dos tiempos de incubación. La media y la desviación estándar de los CexpCAE de las siete suspensiones incubadas durante una hora fueron $0,65\pm 0,123$ y las de las siete incubadas durante 2 horas, $0,47\pm 0,19$. En los tratamientos con *T. patagoniensis* se observó una disminución de la carga eritrocitaria en 6/7 de las suspensiones incubadas una hora (media y desviación estándar de los CexpCAE: $0,77\pm 0,089$) y en las siete que estuvieron en contacto con las larvas musculares durante 2 horas (media y desviación estándar de los CexpCAE: $0,59\pm 0,149$).

En todas las experiencias, los valores de CexpCAE indicaron que *T. spiralis* producía mayor alteración de la carga que *T. patagoniensis*, tanto a la primera como a la segunda hora de incubación.

Los resultados se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Valores del CexpCAE^a y de $\Delta\text{CAE}\%$ ^b

Tratamiento	GRT con <i>T. spiralis</i> 1 hora	GRT con <i>T. spiralis</i> 2 horas	GRT con <i>T. patagoniensis</i> 1 hora	GRT con <i>T. patagoniensis</i> 2 horas
Experiencia 1 CexpCAE $\Delta\text{CAE}\%$	0,54 2,60	0,37 3,60	0,66 1,92	0,54 2,60
Experiencia 2 CexpCAE $\Delta\text{CAE}\%$	0,58 8,17	0,29 13,81	0,82 3,50	0,43 11,16
Experiencia 3 CexpCAE $\Delta\text{CAE}\%$	0,73 7,37	0,58 11,49	0,81 5,15	0,66 9,27
Experiencia 4 CexpCAE $\Delta\text{CAE}\%$	0,86 1,88	0,81 2,40	0,87 1,67	0,85 1,98
Experiencia 5 CexpCAE $\Delta\text{CAE}\%$	0,58 8,17	0,29 13,81	0,92 ^c 1,50	0,43 11,16
Experiencia 6 CexpCAE $\Delta\text{CAE}\%$	0,54 2,60	0,37 3,60	0,66 1,92	0,54 2,60
Experiencia 7 CexpCAE $\Delta\text{CAE}\%$	0,73 7,37	0,58 11,49	0,81 5,15	0,66 9,27

^a CexpCAE: Coeficiente experimental de carga aniónica eritrocitaria; ^b $\Delta\text{CAE}\%$: variación entre el CAE% inicial y el final; GRT: glóbulos rojos “tratados”;

^c sin variación de carga globular con el tratamiento.

Discusión y Conclusiones

El ácido siálico, responsable de la carga del glóbulo rojo, además de tener importancia hemorreológica y hemodinámica (9), se encuentra presente en glucoproteínas y glucolípidos involucrados en funciones biológicas como son los procesos de reconocimiento celular, vida media de células y proteínas plasmáticas, modulación del sistema inmune y apoptosis. También es un ligando de moléculas de adhesión, como selectinas o sialoadhesinas, mediante adhesión celular o transducción de señales (10).

Actualmente se conoce la existencia de más de 50 estructuras de ácidos siálicos, hecho que no sucede con ningún otro monosacárido, los cuales muestran naturalmente una inmensa diversidad de estructuras que reflejan su participación en importantes procesos biológicos de crecimiento y desarrollo, tanto normal como patológico (10).

Todos los parásitos escapan a la inmunidad protectora mediante la reducción de su inmunogenicidad o la inhibición de las respuestas inmunitarias de los hospedadores (11).

Despommier le dio el nombre de célula nodriza al nicho donde se implantan las larvas infectantes (L1) de *Trichinella* en el músculo estriado (12). 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 (13).

Si se considera que este complejo larva-célula nodriza modula de alguna manera la respuesta inmune del hospedador y puede permanecer viable durante años o eventualmente sufrir calcificación, se podría especular que las larvas musculares podrían captar el ácido siálico del miocito.

El análisis estadístico concluyó que cuando el CexpCAE era menor o igual que 0,87, había disminución de carga en los glóbulos "tratados" en relación al respectivo "control", lo que representó una variación entre el CAE% inicial y final $\geq 1,67\%$; estos resultados se correlacionaron a los comunicados aplicando el mismo método, en los cuales se consideró que, cuando el CexpCAE era menor o igual que 0,88, los eritrocitos alteraban su carga aniónica durante el tratamiento, lo que representaba un $\Delta\text{CAE}\% \geq 1,5\%$ (14).

Los valores de la media y la desviación estándar de los CexpCAE mostraron, para ambas especies, que el aumento del tiempo de tratamiento producía mayor disminución de carga globular, así como también que, a los dos tiempos de incubación estudiados, *T. spiralis* provocaba mayor alteración que *T. patagoniensis*. Estos resultados fueron similares a los comunicados previamente aplicando el método de Polibrene (15).

El método espectrofotométrico de Azul Alcian es simple y de utilidad para el estudio de las variaciones en la carga aniónica eritrocitaria. La experiencia realizada

muestra que la disminución de carga globular producida por ambas especies es distinta y sugeriría que la relación hospedador-parásito que se establece *in vivo* entre *T. spiralis* y *T. patagoniensis* con los eritrocitos humanos no es la misma. Estos resultados podrían contribuir a comprender la diferencia de adaptación de ambas especies al hombre.

Agradecimientos

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

Fuentes de financiación

Subsidios de Investigación del Programa de Incentivos a los Docentes Investigadores. Ministerio de Cultura y Educación. Secretaría de Políticas Universitarias.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no presentar conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

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

Referencias bibliográficas

1. Gimeno EJ, Barbeito CG. Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la Biología y de la Patología. *Anales de la ANAV* 2014; 58: 6-34.
2. Cabezas JA. Acides sialiques: leur signification biochimique. *Le Pharm Biol* 1961; 2: 9-19.
3. Riva E, Steffan PE, Fiel CA. Trichinellosis: aspectos múltiples de una zoonosis global. En: Mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América Latina y el Caribe, Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2007. p. 94-109.
4. 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.
5. Luebke RW. Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. *Methods* 2007; 41: 38-47.

6. 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.
7. Ponce de León P, 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 Cuba Med Trop* 2011; 63 (3): 263-7.
8. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. Estadística matemática con aplicaciones. 7ª ed. México: Thomson Learning; 2010.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Despommier DD, Gwadz RD, Hotez P. Parasites and disease. 5ª ed. New York: Apple Trees Production L.L.C.; 2005.
13. Vignau ML. Triquinosis. *Rev Ciencia Hoy* 2004; 14 (82): 58-65.
14. Ponce de León P, López Murúa G. Alteración del ácido siálico eritrocitario por efecto de *Trichinella spiralis* aplicando el método de Azul Alcian. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2018; 52 (4): 411-6.
15. Ponce de León P, Lamagni E, Ivancovich JJ, Bottai H. Efecto de *Trichinella spiralis* y de *Trichinella patagoniensis* n.sp. sobre la desialización. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2019; 53 (1): 37-42.

Recibido: 19 de febrero de 2020

Aceptado: 29 de mayo de 2020