



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Ponce de León, Patricia; Lamagni, Ernesto; Bottai, Hebe
***Trichinella spiralis* y *Trichinella patagoniensis*: cinética de desialización eritrocitaria**
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 54, núm. 2, 2020, -Junio, pp. 183-188
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53563407009>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org



Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Trichinella spiralis y *Trichinella patagoniensis*: cinética de desialización eritrocitaria

► Patricia Ponce de León^{1*}, Ernesto Lamagni², Hebe Bottai³

Resumen

El objetivo del trabajo fue estudiar la cinética de desialización eritrocitaria producida por larvas infectantes de *Trichinella spiralis* y *Trichinella patagoniensis*. Se trabajó con 7 suspensiones eritrocitarias incubadas con 1.000 ± 200 larvas musculares/mL, durante 2 horas, tomando muestra al tiempo inicial y cada 15 minutos. Los respectivos eritrocitos controles se incubaron de la misma manera con solución salina. Se aplicaron el método de titulación por Polibrene calculando el CexpST y un análisis de varianza (ANOVA) con las comparaciones múltiples según Tukey. Los resultados mostraron que el valor promedio de CexpST disminuyó con el aumento del tiempo de incubación, para ambas especies. En el tratamiento con *T. spiralis* no hubo diferencias significativas entre el valor medio del coeficiente a tiempo 60 y 75 minutos, mientras que con *T. patagoniensis*, a 45 y 60 minutos. Todas las restantes diferencias fueron significativas. La comparación entre los tratamientos, para cada uno de los tiempos, mostró que al tiempo inicial el coeficiente promedio no difirió entre las especies, pero que a todos los otros tiempos fue significativamente menor en la incubación de los eritrocitos con *T. spiralis*. Se concluye que la relación hospedador-parásito que se establece en ambos casos es distinta y probablemente también la capacidad de adaptación y de daño al hombre.

Palabras clave: Larvas musculares; *Trichinella spiralis*; *Trichinella patagoniensis*; Desialización; Cinética

Trichinella spiralis and *Trichinella patagoniensis*: kinetics of erythrocyte desialization

Abstract

The objective of this work was to study the kinetics of erythrocyte desialization produced by infective larvae of *Trichinella spiralis* and *Trichinella patagoniensis*. It was performed on 7 erythrocyte suspensions incubated with $1,000 \pm 200$ muscle larvae/mL for 120 minutes, taking samples at the initial time and every 15 minutes. The respective control erythrocytes were incubated in the same way with saline solution. The Polybrene Titration method calculating the CexpST and variance analysis (ANOVA) with the multiple comparisons according to Tukey were applied. The results showed that the average value of CexpST decreased with the increase in incubation time, for both species. There were no significant differences between the mean value of the coefficient at 60 and 75 minutes in the treatment with *T. spiralis*, while neither were there any differences between 45 and 60

¹ Bioquímica. Dra. en Ciencias Biomédicas. Docente Área Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

² Pasante alumno de Bioquímica. Área Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina

³ Licenciada en Estadística. Docente Área Estadística y Procesamiento de Datos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

* Autor para correspondencia.

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)

minutes in the incubation with *T. patagoniensis*. All other differences were significant. The comparison between the two treatments, for each of the times, showed that at the initial time the average coefficient did not differ between the species, but at all other times it was significantly lower in the incubation of the erythrocytes with *T. spiralis*. It is concluded that the parasite host relationship that is established in both cases is different and probably also is the ability to adapt and cause harm to man.

Keywords: Muscle larvae; *Trichinella spiralis*; *Trichinella patagoniensis*; Desialization; Kinetics

Trichinella spiralis e *Trichinella patagoniensis*: cinética de dessialização eritrocitária

Resumo

O objetivo do trabalho foi estudar a cinética de dessialização eritrocitária, produzida por larvas infectantes de *Trichinella spiralis* e *Trichinella patagoniensis*. O trabalho foi feito com 7 suspensões eritrocitárias incubadas com 1.000 ± 200 larvas musculares/mL por 2 horas, colhendo amostras no tempo inicial e a cada 15 minutos. Os respectivos eritrócitos-controle foram incubados da mesma forma com solução salina. Foi aplicado o método de titulação por Polibreno calculando o CexpST e também uma análise da variância (ANOVA) com as comparações múltiplas de acordo com Tukey. Os resultados mostraram que o valor médio de CexpST diminuiu com o aumento do tempo de incubação para ambas as espécies. No tratamento com *T. spiralis* não houve diferenças significativas entre o valor médio do coeficiente no tempo 60 e 75 minutos, ao passo que com *T. patagoniensis*, aos 45 e 60 minutos. Todas as diferenças restantes foram significativas. A comparação entre os tratamentos, para cada um dos tempos, mostrou que no tempo inicial o coeficiente médio não diferiu entre as espécies, mas que em todos os outros tempos foi significativamente menor na incubação dos eritrócitos com *T. spiralis*. A conclusão é que a relação hospedeiro-parasita, estabelecida em ambos os casos, é diferente e provavelmente também a capacidade de adaptação e dano ao homem.

Palavras-chave: Larvas musculares; *Trichinella spiralis*; *Trichinella patagoniensis*; Dessialização; Cinética

Introducción

La diversidad biológica del género *Trichinella* tiene una marcada importancia evolutiva, ya que refleja una diversidad genética sustancial, así como una ecología y relaciones hospedador-parásito divergentes (1).

Trichinella spiralis, hasta hace unos pocos años, era el único taxón del género detectado en animales domésticos y salvajes de Sudamérica (2-4).

Krivokapich *et al.*, comunicaron la presencia de un nuevo genotipo: T12, en un puma de montaña de la provincia de Río Negro, Argentina (5). Los datos reproductivos y moleculares indicaron que T12 se separaba de todas las demás *Trichinella* spp. encapsuladas, sugiriendo que era biológicamente similar a *T. britovi* y *T. murrelli*, más que a otras especies o genotipos encapsulados (5).

Actualmente este genotipo es una nueva especie: *T. patagoniensis* n.sp. Debido a su reciente hallazgo, los conocimientos respecto de su biología aún son escasos (5).

Los glúcidos fueron considerados, hasta la década de 1970, 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 (6). La diversidad de estructuras que los conforman, determinadas por su fracción glucánica, ayuda a comprender la capacidad de éstos para efectuar funciones biológicas muy variadas, cuya interpretación aún es incompleta o impredecible.

Los ácidos siálicos presentes en las glucoproteínas y los glucolípidos están involucrados en procesos de reconocimiento celular, vida media de células y proteínas plasmáticas, modulación del sistema inmune, apoptosis, adhesión celular y transducción de señales (7) (8).

Debido a la amplia variedad de funciones que presentan los ácidos siálicos, se han estudiado y relacionado con procesos metabólicos y vías de infección e invasión de diferentes parásitos (9) (14).

A causa de la importancia biológica que podría tener la captación de ácido siálico en la interacción parásito-hospedador, en experiencias previas se ha comparado el efecto producido por larvas musculares de *T. spiralis*

y *T. patagoniensis* n.sp. sobre la desialización (15). Los resultados mostraron que *T. spiralis* provocó mayor desialización eritrocitaria que *T. patagoniensis* n.sp (15). Debido a esos hallazgos, el objetivo propuesto en este trabajo fue estudiar la cinética de desialización eritrocitaria producida por larvas infectantes de ambas especies.

Materiales y Métodos

Muestras

Larvas Musculares (LM) de *T. spiralis* y de *T. patagoniensis* n.sp.

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* n.sp. 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 de la Universidad Nacional de Rosario.

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 200 μ L y una cantidad aproximada de 1.000 ± 200 larvas/mL (16).

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), y 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 dadores sanos voluntarios, obtenidos de muestras con anticoagulante y lavados 3 veces en solución salina.

Métodos

Tratamiento de los eritrocitos

Se realizaron 7 experiencias en las cuales se incubaron 200 μ L de eritrocitos con igual volumen de cada uno de los dos concentrados de LM (GR Tratados) durante 120 minutos, a 37 °C con agitación controlada, tomando 20 μ L de muestra al tiempo inicial (tiempo 0)

y cada 15 minutos (tiempo 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120). Los respectivos controles (GR Control) se incubaron de la misma manera con solución salina.

Al finalizar cada tiempo, los GR Control y GR Tratados se lavaron en solución salina y se prepararon suspensiones al 20% a partir de cada uno de los sedimentos, para aplicación del método de titulación de la agregación.

Método de titulación de la agregación por Polibrene

El método se aplicó simultáneamente en los GR Control y en los mismos eritrocitos incubados con los dos concentrados de LM. Se hicieron diluciones serias progresivas de Polibrene en solución salina (puro, 1/2; 1/4; 1/8.....1/128). Luego 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 un minuto, hasta que se produjo la agregación entre los eritrocitos con carga negativa y el polication Polibrene (17).

Se evaluó la carga aniónica del control y de los GR incubados con las LM, determinando el título como la última dilución del polication que presentó agregación. Se consideró significativa una diferencia de título ≥ 2 diluciones entre ambos (18).

A los fines de comparar la agregación de los glóbulos incubados con las LM de ambas especies, 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 (19), 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 (CexpST) como el cociente entre el *score* total de la agregación de los eritrocitos incubados con las LM y el *score* total de la agregación de los eritrocitos control (18).

Este coeficiente es igual a 1 cuando no hay modificación en la agregación globular por acción del parásito y es igual a 0 cuando no se observa agregación por efecto del tratamiento, o sea que habría una remoción total de la carga aniónica eritrocitaria.

Análisis estadísticos

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para un modelo longitudinal mixto considerando como factores fijos, la especie del parásito a dos niveles (*T. spiralis* y de

T. patagoniensis n.sp) y tiempo de incubación a 9 niveles (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos) y como factor aleatorio dador (7 dadores voluntarios sanos). Luego fueron aplicadas comparaciones múltiples según Tukey, y la variable respuesta fue CexpST. Se consideró significativa cuando $p < 0,05$ (20).

Resultados

Los resultados del análisis estadístico mostraron que existe un efecto significativo en la interacción tratamiento-tiempo ($p=0,001$), por lo que se efectuaron las comparaciones entre tiempos para cada tratamiento (a) y entre tratamientos para cada tiempo (b).

- (a) Al comparar los tiempos para cada uno de los tratamientos con las LM de *T. spiralis* y de *T. patagoniensis* n.sp., se observó, en las incubaciones de los eritrocitos con las dos especies, que el coeficiente promedio disminuyó significativamente con el aumento del tiempo de incubación. En el tratamiento con *T. spiralis* no hubo diferencias significativas entre el valor medio de CexpST a tiempo 60 y 75 minutos, mientras que con *T. patagoniensis* n.sp, entre el valor promedio a tiempo 45 y 60 minutos. Todas las restantes diferencias fueron significativas para ambas especies.
- (b) La comparación entre los dos tratamientos para cada uno de los tiempos, mostró que al tiempo inicial (tiempo 0), el coeficiente promedio

no difirió significativamente entre las especies, pero que a todos los otros tiempos estudiados el valor promedio de CexpST fue significativamente menor en la incubación de los eritrocitos con *T. spiralis* en relación a la incubación con *T. patagoniensis* n.sp, indicando que la desialización producida por *T. spiralis* fue mayor a partir de los 15 minutos de incubación y hasta el tiempo final.

Los resultados se muestran en la Figura 1.

En el tratamiento con *T. spiralis*, el título de los GR Control disminuyó significativamente en el total de las experiencias realizadas; en una de ellas a los 60 minutos de incubación y en las restantes a los 75 minutos. Mientras tanto, en el tratamiento con *T. patagoniensis* n.sp. la disminución del título del control, en 2 diluciones, se observó en 6 de las 7 suspensiones eritrocitarias, en 4 de ellas a los 105 minutos y en las otras 2 a los 120 minutos de incubación.

Discusión y Conclusiones

La Glicobiología estudia los glicoconjugados, las enzimas que catalizan su síntesis y las lectinas que los reconocen. Los monosacáridos que intervienen en su composición presentan una amplia diversidad, debido a que pueden combinarse y formar estructuras lineales o ramificadas. Actualmente resulta evidente que los hidratos de carbono poseen una enorme capacidad para

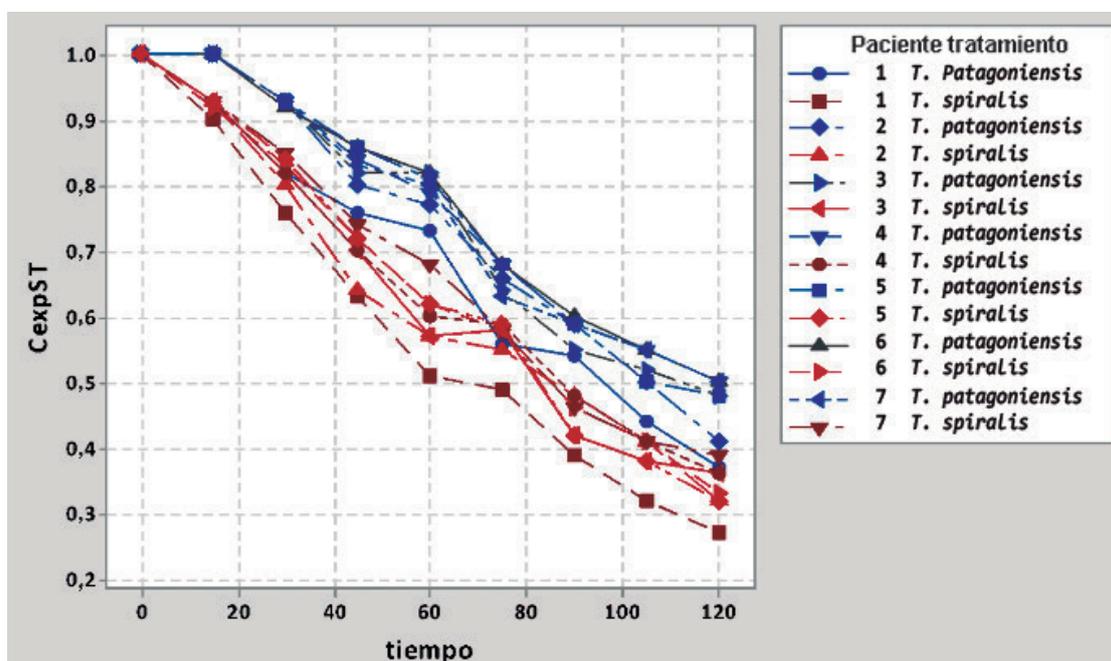


Figura 1. Gráfica de dispersión de CexpST vs. tiempo.

transmitir información, mucho mayor que los ácidos nucleicos y las proteínas. Estos compuestos cumplen roles específicos cruciales en la infección, inflamación, inmunidad, fertilización, diseminación de células tumorales y plegamiento de proteínas. La comprensión a nivel molecular del enlace hidratos de carbono /proteína ha posibilitado el conocimiento de sus funciones biológicas (6).

En la actualidad se reconoce la existencia de más de 50 estructuras de ácidos siálicos, los cuales presentan muchas funciones biológicas importantes, e incluso diametralmente opuestas (7) (21). Su estudio ha permitido relacionarlos con enfermedades, y ya existen ejemplos concretos en infecciones bacterianas, virales y parasitarias, tales como malaria, leishmaniosis, amibiosis, tripanosomiosis y ascariosis (9-14) (18) (22) (23).

El desarrollo de las infecciones parasitarias y la gravedad que pueden adquirir en cada individuo, es el resultado de la relación que se establece entre el sistema inmunitario del hospedador y las estrategias de evasión que utiliza el parásito. El estudio de las interacciones entre ambos, se ha convertido en un nuevo desafío para comprender no solo aspectos del metabolismo parasitario, sino también los mecanismos de invasión, escape y daño.

Las larvas infectantes de *T. spiralis* y de *T. patagoniensis* n.sp. provocaron la desialización eritrocitaria, por lo que se podría especular que podrían obtener ácido siálico a partir de otros glucoconjugados. El miocito se desarrolla como "célula nodriza", una estructura funcional rica en residuos sializados, y diferente de cualquier otra célula de mamíferos, la cual evidencia un alto grado de angiogénesis. El complejo larva-célula nodriza coopera en la obtención de nutrientes, en la exportación de desechos y en aislar a la larva de la respuesta inmune del hospedador, dando como resultado la viabilidad del parásito durante años, salvo que sufra calcificación (26).

T. spiralis, a diferencia de *T. patagoniensis*, posee una patogenicidad superior debido a su alto índice de capacidad reproductiva y a la reacción inmunológica que desencadena en el hospedador (27).

Los resultados mostraron, en la incubación de los eritrocitos con ambas especies, que la disminución de la carga aniónica globular es mayor a medida que aumenta el tiempo de contacto, tal como se comunicó previamente (15). El estudio de la cinética realizado indicó que al tiempo inicial no había diferencias en la desialización producida por *T. spiralis* y *T. patagoniensis* n.sp., pero a partir de los 15 minutos y hasta los 120 min, el efecto producido por la primera era significativamente mayor.

Si se considera la importancia que podría tener este glucoconjugado en la supervivencia de la larva muscular en la célula nodriza, y que *T. spiralis* produce mayor desialización de los eritrocitos humanos que *T. patago-*

niensis, sugiriendo que puede capturar más ácido siálico que la otra especie, se podría concluir que la relación hospedador parásito que se establece en ambos casos es distinta y probablemente también su capacidad de adaptación y de daño 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*.

Fuente de financiación

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

Conflicto de intereses

No se presentan.

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. Korhonen PK, Pozio E, La Rosa G, Chang B, Koehler AV, Hoberg E *et al.* Phylogenomic and biogeographic reconstruction of the *Trichinella* complex. *Nature Communications* 2016; 7:10513.
2. Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell KD. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J Parasitol* 1992; 78: 647-53.
3. Krivokapich SJ, Molina V, Bergagna HFJ, Guarnera EA. Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic, synanthropic and sylvatic animals from Argentina. *J Helminthol* 2006; 80: 267-9.
4. Ribicich M, Gamble HR, Bolpe J, Scialfa E, Krivokapich S, Cardillo N, *et al.* *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitol Res* 2010; 107: 377-80.
5. 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.
6. Gimeno E, Barbeito C. Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la Biología y de la Patología. *Anales de ANAV* 2004; 58: 6-34.

7. Cabezas JA. Acides sialiques: leur signification biochimique. *Le Pharm Biol* 1961; 2: 9-19.
8. 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.
9. Hemphill A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. *Parasitol Res* 1995; 81: 412-20.
10. Boada Sucre A, Rossi S, Marcello S, De Stefano H. Alteraciones en el patrón de enlazamiento de lectinas en el riñón de ratones infectados experimentalmente con una cepa venezolana de *Trypanosoma evansi*. *Rev Cient* 2004; 14 (5): 431-9.
11. Ponce de León P, Di Vita S, Biondi C, Valverde J. Captación de ácido siálico por larvas de *Ascaris lumbricoides* durante incubación *in vivo*. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011; 45 (3): 455-61.
12. 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* 2009; 106 (13): 5.348-52.
13. Chayen A, Avron B, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1988; 56 (3): 673-81.
14. Pasvol G, Wainscoat JS, Weatherall DJ. Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1982; 297: 64-6.
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.
16. Luebke RW. Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. *Methods* 2007; 41(1): 38-47.
17. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. *Transfusion Today* 2006; 66: 28.
18. 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 (2): 247-56.
19. Goudemand M, Marsalet ID. *Elements d'immuno-hématologie*. 3ª ed. Paris: Flammarion; 1974.
20. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. *Estadística matemática con aplicaciones*. 7ª ed. México: Thomson Learning; 2010.
21. Cabezas 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.
22. Ghoshal A, Gerwig G, Kamerling J, Mandal C. Sialic acids in different *Leishmania* sp., its correlation with nitric oxide resistance and host responses. *Glycobiology* 2010; 20: 553-66.
23. Souto Padron T. The surface charge of trypanosomatids. *An Acad Bras Ciênc* 2002; 74: 649-75.
24. Rosales-Borjas D, Ortiz-Ortiz L. Infecciones parasitarias: mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa ULA* 2008; 2: 89-98.
25. Gutiérrez Hernández JA, Hernández Bautista VM, Huerta López JG. Respuesta inmune a virus y parásitos. *Alergia, asma e Inmunología Pediátrica* 2006; 15: 94-6.
26. Chávez Guajardo EG, Saldivar Elías S, Muñoz Escobedo JJ, Moreno García. Trichinellosis una zoonosis vigente. *REDVET* 2006; 7 (5): 1-19.
27. Pozio E, Zarlenga DS. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1191-204.

Recibido: 14 de agosto de 2019

Aprobado: 12 de noviembre de 2019