

## COMUNICACIONES BREVES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO, ARGENTINA

### Alteración de la carga aniónica superficial de glóbulos rojos y glóbulos rojos desializados por *Ascaris lumbricoides*

Patricia Ponce de León,<sup>I</sup> Keydi Juárez Matamoros,<sup>II</sup> Claudia Biondi,<sup>III</sup> Juana Valverde<sup>IV</sup>

#### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** el ácido siálico del eritrocito tiene importancia hemorreológica y hemodinámica. Su disminución promueve la agregación eritrocitaria y la reducción del flujo sanguíneo. **OBJETIVO:** estudiar el efecto producido por *A. lumbricoides* sobre la carga aniónica de eritrocitos y eritrocitos desializados, en función del tiempo de contacto de los glóbulos rojos con extractos del parásito. **MÉTODOS:** se trabajó con 20 extractos parasitarios ([EA]) y con suspensiones de eritrocitos Grupo O en medio salino (GR) y en medio enzimático de bromelina (GR<sub>B</sub>). Se realizó el tratamiento de los glóbulos incubando el sedimento globular con igual volumen de extractos parasitarios a 37 °C durante 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Para cada tiempo de tratamiento hubo un control (eritrocitos sin contacto con extractos parasitarios). Se aplicó simultáneamente el método de Polibrene en el control, GR y GR<sub>B</sub>. Se asignó una puntuación a cada agregación obtenida. Se calculó  $C_{exp} CAS_{[EA]}$  como el cociente entre la puntuación de los eritrocitos tratados y del control. **RESULTADOS:** los análisis estadísticos permitieron concluir que el tiempo de tratamiento de GR y GR<sub>B</sub> tuvo un efecto altamente significativo sobre el valor del  $C_{exp} CAS_{[EA]}$ ; la mediana de  $C_{exp} CAS_{[EA]}$  fue significativamente mayor para GR respecto de GR<sub>B</sub>; la captación de ácido siálico en GR fue mayor a partir de los 90 min, mientras que en GR<sub>B</sub> fue menor a los 15 min, sin diferencias significativas entre los demás tiempos de tratamiento. Los resultados mostraron que la captación de ácido siálico por el parásito dependió del tiempo de tratamiento y que el extracto parasitario provocó mayor alteración en la carga superficial de GR<sub>B</sub>. **CONCLUSIONES:** la disminución de ácido siálico podría relacionarse con la trombosis y la anemia comunicadas en ascariosis. La experiencia permite suponer que el efecto del parásito puede tener mayor relevancia en individuos con diabetes e hipertensión.

**Palabras clave:** *Ascaris lumbricoides*, alteración de la carga eritrocitaria.

La glicobiología estudia los aspectos estructurales y funcionales de los glicoconjugados presentes en las células. Actualmente se considera que tendrían un papel importante en la interacción parásito-hospedador.<sup>I</sup>

El ácido siálico tiene importancia hemorreológica y hemodinámica debido a que es responsable de la carga negativa de la membrana eritrocitaria. Su disminución promueve la agregación de los glóbulos rojos, la formación de agregados

<sup>I</sup> Bioquímica. Docente Área Parasitología. Departamento Microbiología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

<sup>II</sup> Becaria Curso Anual Internacional de Inmunohematología y Transfusión sanguínea. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

<sup>III</sup> Doctora. Docente Área de Inmunohematología, Inmunogenética y Hemorreología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

<sup>IV</sup> Doctora. Coordinadora Curso Anual Internacional de Inmunohematología y Transfusión sanguínea, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

de hematíes en forma de pilas de monedas, la disminución del flujo sanguíneo y el aumento de la viscosidad de la sangre, lo cual favorece la interacción de los eritrocitos con el endotelio vascular.<sup>2</sup>

En experiencias preliminares se demostró, por aplicación del Método de Partición en Sistemas Bifásicos Acuáticos, que *Ascaris lumbricoides* altera la carga superficial eritrocitaria.<sup>3</sup> El objetivo fue estudiar el efecto producido por *A. lumbricoides* sobre la carga aniónica de eritrocitos y eritrocitos desializados, en función del tiempo de contacto de los glóbulos rojos con extractos del parásito.

Se trabajó con 20 extractos parasitarios ([EA]) obtenidos a partir de la remoción de la cutícula de ejemplares adultos y ruptura mecánica refrigerada<sup>4</sup> y con suspensiones de eritrocitos Grupo O en medio salino (GR) y en medio enzimático de bromelina (GR<sub>B</sub>). Se realizó el tratamiento de los glóbulos, que consistió en incubar el sedimento globular con igual volumen de [EA] en baño a 37 °C durante 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Para cada tiempo de tratamiento hubo un control (eritrocitos en medio salino, sin contacto con [EA]) que fue incubado de la misma manera con igual volumen de solución fisiológica. Al finalizar cada tiempo de incubación, los GR y GR<sub>B</sub>, ambos tratados con [EA], así como también el control correspondiente, fueron lavados 3 veces en solución salina. El método de Polibrene<sup>5</sup> (bromuro de hexadimetrina) fue aplicado simultáneamente en los eritrocitos control y en los tratados con el parásito. Este método permite estudiar de manera indirecta la carga y el contenido de ácido siálico superficial del glóbulo rojo. El Polibrene es un polímero sintético, cargado positivamente, que tiene la propiedad de agregar los eritrocitos normales, pero no los glóbulos con carga negativa reducida<sup>6</sup>.

La agregación de los eritrocitos tratados se comparó con la agregación del control respectivo, se cuantificó con cruces y se le asignó una puntuación, determinada por *Goudemand y Marsalet*,<sup>7</sup> de acuerdo con la escala siguiente:

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

Se calculó para cada tiempo de tratamiento el coeficiente experimental de captación de ácido siálico por el [EA] utilizando el método de Polibrene ( $C_{exp} CAS_{[EA]} P$ ).

$$C_{exp} CAS_{[EA]} P = \frac{\text{Puntuación de la agregación de los eritrocitos control}}{\text{Puntuación de la agregación de los eritrocitos tratados con [EA]}}$$

Para comparar los valores de la variable en estudio ( $C_{exp} CAS_{[EA]} P$ ) en función del tiempo de tratamiento de los GR y GR<sub>B</sub>, se utilizó la prueba de Wilcoxon.<sup>8</sup> Para analizar los valores de la variable en GR y GR<sub>B</sub>, para cada uno de los tiempos de tratamiento, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y las correspondientes comparaciones múltiples, aproximación para muestras grandes propuesta por Miller.<sup>8</sup>

La experiencia mostró que la agregación globular disminuía con el tiempo de tratamiento para ambas suspensiones eritrocitarias, lo cual indicó que a mayor tiempo de contacto aumentaba la captación de ácido siálico por el extracto. Si bien la carga aniónica de GR disminuyó con el tiempo de incubación, los eritrocitos no perdieron totalmente la capacidad de agregación ni aun a los 120 min de tratamiento. Sin embargo, 95 % de los mismos glóbulos desializados (GR<sub>B</sub>) no agregaron a los 120 min, e inclusive 8 de las 20 suspensiones mostraron ausencia de agregación a los 15 min de incubación con el extracto.

El análisis estadístico concluyó que el tiempo de tratamiento de GR y GR<sub>B</sub>, tuvo un efecto altamente significativo sobre el valor del  $C_{exp} CAS_{[EA]} P$  ( $p < 0,0001$ ). Los resultados determinaron que para todos los tiempos de incubación, el valor de la mediana de  $C_{exp} CAS_{[EA]} P$  fue significativamente mayor para GR respecto de GR<sub>B</sub> ( $p < 0,0001$ ), esto demostró que el contacto con el parásito provocaba mayor alteración de la carga superficial de membrana en los glóbulos desializados.

Los valores de  $C_{exp} CAS_{[EA]} P$  para los 90 y 120 min de tratamiento de GR fueron significativamente menores que los obtenidos para 15, 30 y 45 min; el valor para 60 minutos fue mucho menor que los correspondientes a los 15 y 30 min, pero no difirió de los valores obtenidos en los demás tiempos estudiados ( $p < 0,01$ ). Por lo tanto, la captación

del ácido siálico de GR por el extracto fue significativamente mayor a partir de los 90 min de contacto.

Los valores de  $C_{exp} CAS_{[EA]}$  para  $GR_B$  solo fueron significativamente mayores a los 15 min de tratamiento con respecto a los obtenidos a los 60, 90 y 120 min ( $p < 0,05$ ); no existen diferencias significativas entre los demás tiempos analizados. Estos resultados indicaron que la captación del ácido siálico de  $GR_B$  realizada por el extracto, solo fue menor a los 15 min de contacto, con una alteración de carga aniónica superficial similar entre los demás tiempos de tratamiento.

Los valores de  $C_{exp} CAS_{[EA]}$  para GR y  $GR_B$  se muestran en la tabla.

**TABLA.** Valores del coeficiente experimental de captación de ácido siálico por el extracto parasitario ([EA]) utilizando el método de Polibrene ( $C_{exp} CAS_{[EA]} P$ ) en función del tiempo de incubación para eritrocitos (GR) y eritrocitos desializados ( $GR_B$ ) tratados con 20 extractos del parásito

Tiempo de incubación (minutos)	$C_{exp} CAS_{[EA]} P$	
	Eritrocitos en medio salino	Eritrocitos en medio enzimático
	GR mediana; rango intercuartil	$GR_B$ mediana; rango intercuartil
15	1,0; 0	0,1; 0,15
30	1,0; 0,20	0; 0,10
45	0,8; 0	0; 0,10
60	0,5; 0,30	0; 0
90	0,2; 0,15	0; 0
120	0,2; 0,10	0; 0

La experiencia demostró la disminución del contenido de ácido siálico de la membrana eritrocitaria en función del tiempo de contacto de los glóbulos rojos con [EA], así como también que el efecto del parásito resultó significativamente mayor en glóbulos rojos desializados.

La remoción de los residuos de ácido siálico del glóbulo rojo, no solo tiene importancia hemorreológica y hemodinámica,<sup>2</sup> sino que también altera la superficie del eritrocito, la modifica desde los puntos de vista antigénico y bioquímico, y en consecuencia puede producir un incremento de la fagocitosis hepática de los glóbulos.<sup>9</sup> Al relacionar la disminución del ácido siálico eritrocitario, con algunos aspectos de la enfermedad producida por *A. lumbricoides*, se puede considerar la for-

mación de trombos ocasionados por migraciones erráticas del parásito<sup>10</sup> y las frecuentes comunicaciones de anemia.<sup>11-13</sup>

La desialización no enzimática produce una reducción de la carga electronegativa, la disminución de la repulsión y el incremento de la agregación celular, que contribuye a las alteraciones del flujo microvascular.<sup>14,15</sup> Las anomalías en la agregación eritrocitaria están involucradas en las complicaciones vasculares de hipertensión y diabetes.<sup>14</sup> Los resultados mostraron que la alteración de la carga aniónica fue mayor en glóbulos previamente deficientes en ácido siálico, por lo que la ascariosis podría tener un efecto relevante en individuos con estas enfermedades.

### Alteration in superficial anionic charge of erythrocytes and desialated erythrocytes caused by *Ascaris lumbricoides*

#### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** sialic acid of the erythrocytes has hemorreologic and hemodynamic importance, so its reduction causes erythrocyte aggregation and low blood flow. **OBJECTIVE:** to study the effect of *A. lumbricoides* on the anionic charge of erythrocytes and of desialated erythrocytes, taking the time of contact of the erythrocytes with parasite extracts into account. **METHODS:** twenty parasite extracts and Group O erythrocyte suspensions in saline medium (GR) and in bromelin enzymatic medium ( $GR_B$ ) were used. The erythrocytes were treated by incubating the globular sediment with the same volume of parasite extracts, at 37 °C for 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min. There was a control for each treatment interval (erythrocytes without contact with parasite extracts). The polybrene's method was simultaneously applied to the controls, the GR and the  $GR_B$ . Each obtained aggregation was given a scoring.  $C_{exp} CAS_{[EA]}$  was calculated as the quotient between the treated erythrocytes scoring and the control. **RESULTS:** the statistical analysis allowed arriving to the conclusion that the time of GR and  $GR_B$  treatment had a highly significant effect on the value of  $C_{exp} CAS_{[EA]}$ ; the median of  $C_{exp} CAS_{[EA]}$  was significantly higher for GR than for  $GR_B$ ; the sialic acid uptake in GR was higher from 90 minutes on, whereas this parameter was lower in  $GR_B$  at 15 min; no significant differences were observed for the rest of the treatment times. The results showed that the sialic acid uptake by the parasite depended on the time of treatment and that the parasite extract caused more alteration in the superficial charge of  $GR_B$ . **CONCLUSIONS:** the reduction of sialic acid could be related to thrombosis and anemia in ascariosis. The experience gained allows us to consider that the effect of the parasite may be more significant in diabetic and hypertensive individuals.

**Key words:** *Ascaris lumbricoides*, alteration of the erythrocyte charge.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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](http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=79).
2. Foresto PG, D'Arrigo M, Filipini F, Gallo R, Rasia R, Valverde JR. Estudio de parámetros hemorreológicos en hipertensión esencial. *Rev Fed Arg Cardiol.* 2002;31:69-73.
3. Ponce de León P, Lebensohn N, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: alteration of the erythrocyte superficial charge using the Partition Method in aqueous two-phase system. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(4):219-21.
4. Ponce de León P, Valverde J, Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42:295-6.
5. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. *Transfusion Today.* 2006;66:28.
6. Mollison PL. Transfusion de sangre en Medicina Clínica. Barcelona: Ed Reverté; 1987.
7. Goudemand M, Marsalet ID. Elements d'immuno-hématologie. Paris: Ed Flammarion; 1967.
8. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. Estadística matemática con aplicaciones. México: Ed Thomson Learning; 2003.
9. 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.
10. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Parasitología Clínica. 2º ed. Barcelona: Ed Salvat; 1986.
11. Bardenwerper HE. *Ascaris lumbricoides* infestation with extreme anemia. *J Am Med Assoc.* 1928;91(14):1037.
12. García-Leiva J, Barreto-Zuñiga R, Estradas J, Torre A. *Ascaris lumbricoides* and Iron Deficiency Anemia. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1051-2.
13. Amuga GA, Onwuliri COE, Oniye SJ. Relative contribution of hookworm and *Ascaris lumbricoides* to iron deficiency anemia among school pupils in Nasarawa area, Nigeria. *IJONAS.* 2006;2(3):205-9.
14. D'Arrigo M, Lebensohn 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. *RBCyP.* 2008;22(1):17-20.
15. Alet A, Chiesa MA, Racca L, D'Arrigo M, Foresto P, Valverde J, et al. Hemorreología comparativa. Estudios en diabéticos e hipertensos. *Acta Bioq Clin Latinoamer.* 2001;1:63-8.

Recibido: 18 de junio de 2010. Aprobado: 5 de agosto de 2010.  
 Patricia Ponce de León. Área Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR. Suipacha 531-2000. Rosario, Argentina. Teléfs.: 0341-4804592/93/98 Interno 219. Correo electrónico: tefu1958@hotmail.com