

## Artículo original

### Acción biorreológica de extractos de *Ascaris lumbricoides* en eritrocitos humanos

Patricia Ponce de León<sup>a,\*</sup>, Juana Valverde<sup>b</sup>, Bibiana Riquelme<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Parasitología. <sup>b</sup>Laboratorio de Inmunoematología, Hemorreología e Inmunogenética. Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas. <sup>c</sup>Grupo de Óptica Aplicada a la Biología del Instituto de Física de Rosario. CONICET. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Recibido 15 de julio de 2011; aceptado 6 de marzo de 2012

**Resumen:** Experiencias previas han reportado que los extractos de *A. lumbricoides* captan ácido siálico del eritrocito humano modificando su carga. El objetivo fue evaluar *in vitro* las posibles alteraciones biorreológicas debidas al efecto de extractos del parásito adulto. Se analizó la acción de 8 extractos sobre eritrocitos Grupo O, incubando el sedimento globular con igual volumen de extracto y con PBS. Se determinó la distribución y morfología de los agregados (Análisis Digital de Imágenes), carga porcentual (método Azul de Alcian), cinética de agregación (eritroagregámetro) y viscoelasticidad (eritrodefómetro). Los resultados mostraron que todos los extractos causaron una disminución del porcentaje de células aisladas y un aumento en el tamaño de los agregados, sin alterar su morfología. Los glóbulos tratados con 6 extractos mediaron una significativa alteración de la carga superficial y con 5 de ellos la velocidad de agregación fue menor que en el control. Se observó una correlación lineal entre los parámetros de cinética y la concentración proteica de los extractos. Uno de los tratamientos modificó la fluidez de membrana y dos disminuyeron la deformabilidad eritrocitaria, pero ninguno afectó la elasticidad. Estas experiencias *in vitro* permiten concluir que el contacto de los extractos con los eritrocitos produce alteraciones hemorreológicas.

**Palabras clave:** *Ascaris lumbricoides*, acción biorreológica, eritrocitos humanos, ácido siálico.

### Biorheological activity of *Ascaris lumbricoides* extracts in human erythrocytes

**Abstract:** Previous studies have reported that *A. lumbricoides* extracts capture sialic acid from human erythrocytes, modifying their charge. The purpose was to evaluate *in vitro* the possible biorheological alterations due to the effect of extracts from adult parasites. The activity of 8 extracts over Group O erythrocytes was analyzed incubating the globular sediment with an equal volume of extract and with PBS. The distribution and morphology of the aggregates was determined (Digital Image Analysis), percent of charge (Alcian Blue method), aggregation kinetics (erythroaggregometer), and visco-elasticity (erythroderformeter). The results showed that all the extracts produce a decrease of the percentage of isolated cells and an increase of the size of aggregates, without altering their morphology. Red cells treated with 6 extracts mediated a significant alteration of their superficial charge and with 5 of them the aggregation velocity was less than that of the control. A lineal correlation between the kinetic parameters and the protein concentration of the extracts occurred. One of the treatments modified the fluidity of the membrane and two decreased erythrocyte deformability, but none of them affected elasticity. These *in vitro* experiences allowed concluding that contact of the extracts with the erythrocytes produces hemorreological alterations.

**Keywords:** *Ascaris lumbricoides*, biorheological activity, human erythrocytes, sialic acid.

\* Correspondencia:  
E-mail: tefu1958@hotmail.com

#### Introducción

*Ascaris lumbricoides* produce una de las parasitosis más difundidas en el mundo. En su ciclo de vida hay estadios larvarios que circulan por el torrente sanguíneo y ejemplares adultos localizados en intestino que frecuentemente migran y causan obstrucciones, perforación de la pared intestinal y abscesos hepáticos o en pulmón [1,2]. El parásito, por lo tanto, tiene contacto directo con los eritrocitos del hospedador

durante la migración de las larvas y eventualmente también lo puede tener el nematodo adulto. La biorreología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de materia aplicado a los sistemas biológicos. Actualmente ha cobrado un creciente interés en los campos de la medicina y la cirugía [3].

La sangre tiene múltiples funciones que se reflejan en su compleja composición. Los eritrocitos son las células más abundantes, y su función primordial es el transporte

de oxígeno y dióxido de carbono, pero también, por sus propiedades mecánicas y su abundancia, son los principales determinantes del comportamiento reológico de la sangre. La tendencia de los eritrocitos a formar las denominadas “pilas de monedas”, se denomina agregación, y depende del balance de los factores celulares y plasmáticos que favorecen y los que dificultan el fenómeno. Entre los inhibidores debe mencionarse primeramente, la repulsión electrostática entre los glóbulos, que es causada por la carga negativa distribuida sobre la membrana del eritrocito [3-5]. Los residuos de ácido siálico en las glicoproteínas de superficie de los glóbulos rojos son los principales responsables de la carga eritrocitaria, convirtiéndolos en elementos fundamentales del comportamiento hemorreológico y hemodinámico. La disminución de ácido siálico promueve la agregación, y en consecuencia aumenta la viscosidad de la sangre y perturba el flujo sanguíneo, favoreciendo la interacción de los eritrocitos con el endotelio vascular [6,7]. Los mecanismos celulares de muchos procesos infecciosos no se conocen con exactitud, pero la glicobiología reveló un nuevo espectro de funciones biológicas de los hidratos de carbono. La amplísima diversidad de estructuras que conforman los glicoconjugados ha permitido relacionarlos con la mayoría de los procesos biológicos, y actualmente se acepta que los glicoconjugados de la superficie del parásito y los del hospedador, están íntimamente involucrados en las interacciones que se establecen entre ambos [8,9].

Debido a que en experiencias previas se ha reportado que los ejemplares adultos y los estadios larvarios de *A. lumbricoides* pueden disminuir la carga eritrocitaria [10-12] y aumentar la agregación globular, y que estos fenómenos podrían colaborar en la interpretación de algunos aspectos de la patología, como son la formación de trombos y la anemia, el objetivo del trabajo fue estudiar *in vitro* las posibles alteraciones biorreológicas debidas al contacto de los glóbulos rojos con extractos de *A. lumbricoides*.

## Materiales y métodos

*Extractos parasitarios (EA)*: Se trabajó con 8 EA de ejemplares adultos de *A. lumbricoides* obtenidos por remoción quirúrgica de la cutícula y ruptura mecánica refrigerada [13,14].

*Glóbulos rojos (GR)*: Se utilizaron GR frescos provenientes del mismo donante sano correspondiente al grupo O, previa separación del plasma autólogo, los cuales fueron lavados en buffer fosfato salino de pH 7,4 y osmolaridad de 295 mOsm/kg (PBS). En experiencias previas se demostró que los EA pueden presentar epítopes de grupo sanguíneo A y/o B [15-17], por lo que se trabajó con GR del grupo O para evitar posibles interacciones antígeno-anticuerpo ABO que podrían interferir con los resultados.

*Tratamiento de los GR*: Se incubó el sedimento globular con igual volumen de EA durante 1 hora, a 37 °C (GR tratados). Los GR utilizados como control, fueron incubados con

PBS. Finalizada la incubación, los GR tratados y control fueron lavados en PBS.

*Distribución de agregados eritrocitarios por análisis digital de imágenes*: Los GR tratados y control fueron suspendidos en plasma autólogo al 0,13% y mantenidos en reposo durante 5 minutos para permitir la agregación. Cada suspensión fue examinada en un portaobjeto cóncavo con microscopio óptico invertido (Union Optical, Japón). Las imágenes de las diferentes poblaciones de agregados para cada muestra, fueron obtenidas por triplicado (objetivo: 40X; cámara digital Canon Powershot A640). Se realizó el conteo de agregados, y se clasificó de acuerdo a las siguientes categorías: células individuales; agregados de 2, 3 o 4 células; agregados de 5 o más células y *AMAS* (redes de agregados de gran tamaño). Se calculó en las imágenes de cada muestra, el porcentaje de eritrocitos correspondiente a cada categoría y finalmente se promediaron los valores obtenidos. Se definió el coeficiente de células aisladas ( $C_{CA}$ ) como la diferencia entre el número de células individuales iniciales (control) y finales (GR tratados) en relación al número de células aisladas observado antes del tratamiento [18-20].

$$C_{CA} = \frac{CA_{inicial} - CA_{final}}{CA_{inicial}}$$

Cuando el valor de  $C_{CA}$  es igual a 0 indica que no hubo variación en el número de células aisladas por acción del EA, y cuando es igual a 1 señala la ausencia de células aisladas (agregación total).

*Morfología de los agregados por análisis digital de imágenes*: Las imágenes de los agregados eritrocitarios se analizaron con un programa de Análisis Digital de Imágenes (Imagen J), para caracterizar su morfología. En cada una de ellas se hicieron medidas de área (A) y perímetro (p) obteniéndose el “factor de forma” de cada agregado (*ASP*) mediante la ecuación:

$$ASP = 4 \cdot \pi \cdot A / p^2$$

Se promediaron para cada muestra todos los valores de *ASP* de los agregados de las tres imágenes. Los agregados globulares presentan un valor de *ASP* cercano a 1, los que se presentan como “monedas apiladas” (aproximadamente rectangular) tienen un  $ASP \cong 0,3$  y los glóbulos agrupados en forma desordenada un  $ASP \cong 0,7$  [18-21].

*Determinación de la carga aniónica eritrocitaria porcentual*.

*Método de azul alcian*: Es una técnica espectrofotométrica que permite estudiar de manera indirecta la carga y el contenido de ácido siálico (AS) superficial del GR. Se fundamenta en la unión del colorante catiónico azul alcian (AA) con el AS. Se prepararon los siguientes tubos, que fueron incubados durante 30 minutos a 37 °C [22-25].

- Blanco: 2 mL de solución de AA.
- Blanco de hemólisis: 2 mL de alcohol etílico + 10  $\mu$ L de sedimento de GR.

- Muestra GR control: 2 mL de solución de AA + 10  $\mu$ L de sedimento de GR control.
- Muestra GR tratados: 2 mL de solución de AA + 10  $\mu$ L de sedimento de GR tratados.

Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 1.500 rpm durante 10 minutos y se efectuó la medición de absorbancia del sobrenadante, por duplicado, a 650nm en espectrofotómetro (Marca Wayers 4001, UV-VIS, Industria Argentina).

La absorbancia del blanco de AA corresponde al 100% de colorante y la absorbancia medida en el sobrenadante del tubo en el que se coloca la muestra, corresponde al colorante libre que no se ha unido a los GR. Esta última es referida a la absorbancia del blanco de AA y se calcula por diferencia con el 100%; el porcentaje de colorante unido al AS de la muestra, que se denomina *CAE%* (*Carga Aniónica Eritrocitaria porcentual*). Debido a que AA se disuelve en alcohol y produce hemólisis globular, se prepara un tubo con el blanco de hemólisis, cuyo valor de absorbancia se resta al de las muestras con eritrocitos. Se calcularon los valores de *CAE%* para los GR (tratados y control) y se definió el Coeficiente de la Carga Aniónica Eritrocitaria ( $C_{CAE}$ ) como la diferencia entre el *CAE%* inicial (control) y final (GR tratados), en relación al *CAE%* inicial.

$$C_{CAE} = \frac{CAE\%_{inicial} - CAE\%_{final}}{CAE\%_{inicial}}$$

Cuando el EA no produce variación de carga eritrocitaria, el valor de  $C_{CAE}$  es igual a 0, mientras que es igual a 1 si el tratamiento produce la eliminación total de la carga.

*Estudio de la cinética de agregación por "Retrodifusión láser"*: Se estudió el proceso de agregación y desagregación eritrocitaria utilizando un eritroagregómetro. La agregación se produce por la adhesión intercelular del GR mediada por proteínas plasmáticas que hacen de puente entre las células, siendo esta unión débil y reversible. La retrodifusión láser es inversamente proporcional al tamaño de los agregados y aumenta con las velocidades de corte empleadas. Cuando finalmente se alcanza la disociación total, la retrodifusión es máxima e independiente de la velocidad de corte. El  $t_{50\%}$  representa el tiempo requerido por la muestra para alcanzar el 50% de su capacidad total de agregación y  $p_{4s}$  la velocidad del proceso de agregación durante los primeros 4s. Si la carga superficial disminuye, los GR se agregan más rápidamente por lo que  $t_{50\%}$  disminuye y  $p_{4s}$  aumenta. Las mediciones de los GR tratados y control, se hicieron por duplicado, utilizando 1,5 mL de suspensión de eritrocitos en plasma autólogo al 40% [26].

*Medición de las características viscoelásticas*: Se determinaron los parámetros viscoelásticos dinámicos y estacionarios de los GR por difractometría láser utilizando un eritrodefómetro. El índice de deformabilidad (ID) se calcula en función de las dimensiones que adquiere el patrón de difracción de una población de GR cuando son deformados por una tensión de corte constante, y se define

por la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{D - d}{D + d}$$

Donde:  $D$ : diámetro mayor del patrón de difracción;  $d$ : diámetro menor del patrón de difracción.

La curva de deformación y recuperación de la forma de los GR permite determinar los parámetros reológicos: viscosidad superficial de membrana ( $\eta_m$ ) y módulo elástico ( $\mu_m$ ). Las mediciones de cada muestra se hicieron por duplicado utilizando 100  $\mu$ L de eritrocitos resuspendidos en plasma autólogo al 40% [26-31].

*Análisis estadístico de los resultados*: En cada muestra, para todos los parámetros y coeficientes, se calculó *a posteriori* el nivel de significación empírico de contraste entre la hipótesis nula y la alternativa con respecto al control mediante el análisis de *t-Student* [32].

## Resultados

*Distribución de los agregados eritrocitarios*: El tratamiento con los EA modificó la distribución de los tamaños de los agregados celulares en relación a lo observado en el control. En las ocho suspensiones de GR tratados se comprobó la disminución del número de células aisladas y el aumento del tamaño de los agregados formados, inclusive en cuatro de ellas se visualizaron *AMAS* que no fueron observadas antes del tratamiento. Los valores de  $C_{CA}$  comprendidos entre 0,4 y  $1 \pm 0,05$ , indicaron que el efecto de los extractos sobre los GR variaba marcadamente dependiendo del EA utilizado en la incubación. El análisis estadístico concluyó que todos los tratamientos provocaron diferencias significativas en el porcentaje de células aisladas en relación a las del control ( $p < 0,0003$ ).

La figura 1 muestra la imagen de los agregados eritrocitarios formados en la muestra control. Las figuras 2 y 3 corresponden a muestras de GR tratados con EA, donde se visualizan *AMAS* en la primera imagen ( $C_{CA} = 1 \pm 0,05$ ) y

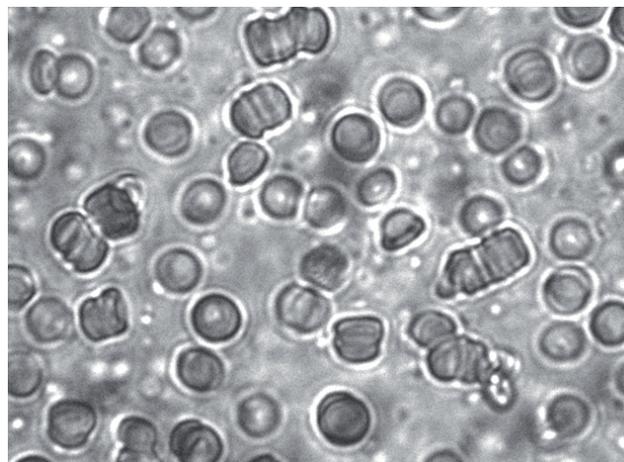


Figura 1. Distribución de los agregados eritrocitarios en la muestra control. Imagen obtenida en microscopio invertido (400 X).

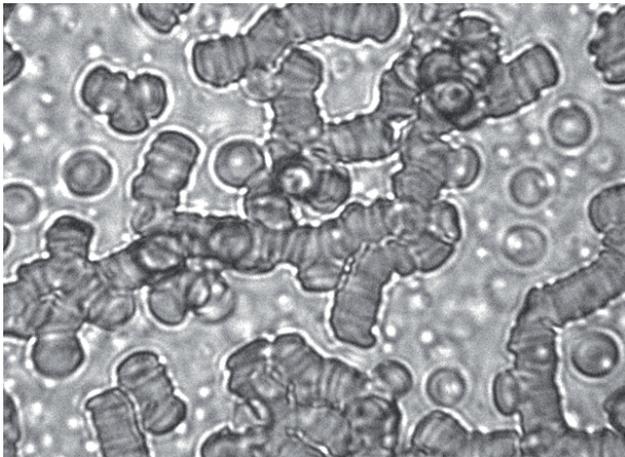


Figura 2. Distribución de los agregados eritrocitarios en muestra tratada ( $C_{CA} = 1 \pm 0,05$ ). Imagen obtenida en microscopio invertido (400 X).

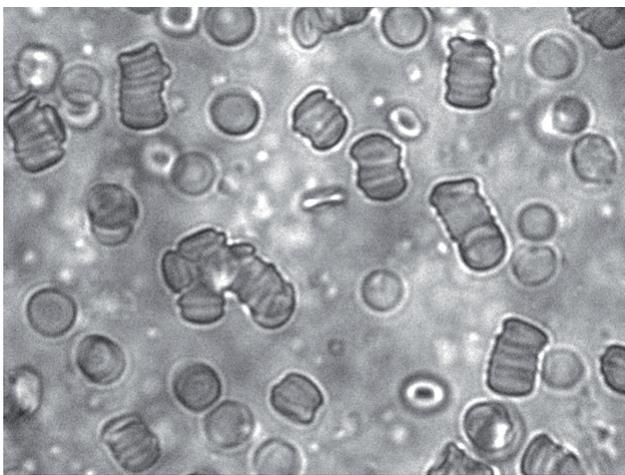


Figura 3. Distribución de los agregados eritrocitarios en GR tratados ( $C_{CA} = 0,7 \pm 0,05$ ). Imagen obtenida en microscopio invertido (400 X).

en la segunda, agregados globulares constituidos por mayor número de células que las que se observaron en el control ( $C_{CA} = 0,7 \pm 0,05$ ). Estas figuras reflejan que el efecto de los

extractos sobre los eritrocitos se traduce en un aumento del tamaño de los agregados globulares formados.

La tabla 1 muestra la distribución de los tamaños de los agregados y los valores de  $C_{CA}$ .

*Morfología de los agregados eritrocitarios:* No se observó alteración en la morfología de los agregados por efecto del tratamiento. Ninguno de los valores de  $ASP$  presentó diferencias significativas con el valor del control ( $p > 0,05$ ), aunque la media del parámetro para los GR tratados con los  $EA_4$  y  $EA_7$  disminuyó en relación al valor inicial. No se pudo determinar el valor de  $ASP$  en la suspensión tratada con el  $EA_5$ . Los resultados se muestran en la tabla 1.

*Determinación del coeficiente de carga aniónica eritrocitaria ( $C_{CAE}$ ):* El tratamiento de los GR con seis de los EA determinó valores de  $C_{CAE}$  entre 0,3 y  $0,4 \pm 0,02$  indicando una alteración significativa de la carga porcentual inicial ( $p < 0,00001$ ). Los eritrocitos tratados con los dos extractos restantes  $EA_6$  y  $EA_8$ , no mostraron diferencia entre la carga inicial y final ( $C_{CAE}$ : 0,03 y  $0,06 \pm 0,02$ , respectivamente), siendo estos GR los que presentaron también los menores valores de  $C_{CA}$ . Los resultados se muestran en la tabla 1.

*Estudio de la cinética de agregación:* La cinética de agregación determinó un aumento en los valores de  $t_{50\%}$  y una disminución en los de  $p_{4s}$  en relación al control ( $p < 0,05$ ) en los GR tratados con cinco de los EA, indicando que la velocidad inicial de formación de agregados era más lenta y mayor el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la capacidad de agregación total. El tratamiento con los  $EA_4$  y  $EA_6$  no produjo diferencia significativa con respecto a la cinética del control, a pesar de que ambos disminuyeron el porcentaje de células aisladas iniciales y el  $EA_4$  alteró significativamente la carga porcentual de los GR, tal como mostraron los valores de  $C_{CA}$  y  $C_{CAE}$ . No se obtuvieron los datos correspondientes al  $EA_1$  porque la cantidad de muestra fue insuficiente para realizar estas determinaciones.

Tabla 1. Estudio de la distribución y morfología de los agregados eritrocitarios y de la carga aniónica en los eritrocitos control y tratados con los extractos parasitarios.

Muestra de glóbulos rojos (GR)	Células aisladas	Grupos de 2, 3 o 4 células	Grupos de 5, 6 o 7 células	Grupos 7 o más células	AMAS	$C_{CA}$	$C_{CAE}$	ASP
GR control	56,0%	28,0%	16,0%	-	-	$0,0 \pm 0,05$	$0,0 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,10$
GR tratados con $EA_1$	18,0%	21,0%	27,0%	34,0%	-	$0,7 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,10$
GR tratados con $EA_2$	2,0%	1,0%	1,0%	3,0%	93,0%	$1,0 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,10$
GR tratados con $EA_3$	1,0%	-	-	-	99,0%	$1,0 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,10$
GR tratados con $EA_4$	11,0%	45,0%	24,0%	20,0%	-	$0,8 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,10$
GR tratados con $EA_5$	1,0%	-	-	-	99,0%	$1,0 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,02$	AMAS
GR tratados con $EA_6$	34,0%	39,8%	20,7%	5,5%	-	$0,4 \pm 0,05$	$0,0 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,10$
GR tratados con $EA_7$	6,0%	3,4%	5,6%	16,5%	68,5%	$0,9 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,10$
GR tratados con $EA_8$	30,7%	27,2%	4,8%	37,3%	-	$0,5 \pm 0,05$	$0,1 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,10$

AMAS: redes de agregados eritrocitarios.

La alteración de la carga aniónica demostrada por los coeficientes  $C_{CAE}$  y  $C_{CA}$ , se tradujo en agregados de mayor tamaño y los parámetros  $p_{4s}$  y  $t_{50\%}$  indicaron que la velocidad de formación de los mismos fue menor que en el control. Si se considera que el único efecto producido por el extracto es la disminución de la carga, se esperaría un aumento de la velocidad de agregación (mayor valor de  $p_{4s}$ ) y una disminución del tiempo requerido para alcanzar el 50% de la capacidad de agregación total (menor valor de  $t_{50\%}$ ). Al analizar los resultados se observó que los GR tratados que modificaron la cinética del control, mostraron disminución de  $p_{4s}$  y aumento de  $t_{50\%}$ , inclusive una de estas cinco suspensiones globulares (GR tratados con EA<sub>8</sub>) no mostró variación de carga, a pesar de que el valor de  $C_{CA}$  había indicado el aumento en la capacidad de agregación (tabla 2). Debido a que existen otros factores que influyen en la agregación, como es la presencia de macromoléculas proteicas, los resultados permitieron sugerir que los

extractos además de alterar la carga, producían otro efecto adicional sobre los GR. Se estudió, por lo tanto, la relación de los parámetros de cinética con la concentración proteica total de los extractos. Los resultados mostraron que  $p_{4s}$  y  $t_{50\%}$  correlacionaban linealmente con la cantidad de proteínas totales de los EA siendo los coeficientes de regresión ( $R^2$ ) 0,9 para  $p_{4s}$  y 0,9 para  $t_{50\%}$ .

*Estudio de la viscoelasticidad eritrocitaria:* Los valores de ID no mostraron variaciones significativas con respecto al control ( $p > 0,05$ ) excepto en los GR tratados con los dos extractos de mayor concentración proteica (EA<sub>5</sub> y EA<sub>7</sub>), en los que fueron menores a los valores obtenidos antes del tratamiento, indicando que la capacidad de deformación eritrocitaria disminuyó después del contacto de los GR con los extractos.

El módulo elástico de membrana ( $\mu$ ), parámetro asociado a las características retráctiles del citoesqueleto, no presentó

Tabla 2. Estudio de la cinética de agregación y de la viscoelasticidad eritrocitaria en los eritrocitos control y tratados con los extractos parasitarios.

Muestra de glóbulos rojos (GR)	CP de EA	$t_{50\%}$	$p_{4s}$	ID	$\mu$	$\eta$
GR Control	0,0	4,1 ± 0,4	14,1 ± 0,2	0,54 ± 0,02	3,4 ± 0,3	2,2 ± 0,5
GR Tratados con EA <sub>1</sub>	0,3	-	-	0,57 ± 0,02	4,5 ± 0,4	2,8 ± 0,2
GR Tratados con EA <sub>2</sub>	0,4	5,1 ± 0,3	12,8 ± 0,3	0,52 ± 0,02	4,2 ± 0,4	2,3 ± 0,8
GR Tratados con EA <sub>3</sub>	0,5	5,0 ± 0,3	12,9 ± 0,2	0,57 ± 0,02	4,6 ± 0,4	2,0 ± 0,2
GR Tratados con EA <sub>4</sub>	0,3	4,2 ± 0,3	13,9 ± 0,2	0,58 ± 0,02	4,5 ± 0,4	1,3 ± 0,1
GR Tratados con EA <sub>5</sub>	1,1	8,8 ± 0,4	8,3 ± 0,1	0,48 ± 0,02	-	-
GR Tratados con EA <sub>6</sub>	0,1	4,5 ± 0,3	14,3 ± 0,4	0,50 ± 0,02	3,5 ± 0,4	2,8 ± 0,4
GR Tratados con EA <sub>7</sub>	1,7	7,3 ± 0,9	8,8 ± 0,1	0,46 ± 0,02	4,8 ± 0,4	2,9 ± 0,9
GR Tratados con EA <sub>8</sub>	0,2	6,1 ± 0,5	11,6 ± 0,3	0,50 ± 0,02	5,3 ± 0,4	2,1 ± 0,8

GR: Glóbulos rojos. CP de EA: concentración proteica del extracto de *Ascaris lumbricoides* (gr/dL).  $t_{50\%}$ : tiempo para el 50% de agregación (segundos).  $p_{4s}$ : pendiente inicial (primeros 4 segundos). ID: índice de deformación eritrocitaria.  $\mu$ : módulo elástico de membrana eritrocitaria ( $10^{-3}$  dyne/cm).  $\eta$ : viscosidad superficial de la membrana eritrocitaria ( $10^{-4}$  dyne.s/cm).

diferencia significativa con respecto al control ( $p > 0,1$ ) en ninguno de los tratamientos. La viscosidad superficial de la membrana ( $\eta$ ), que se relaciona con la fluidez de la bicapa lipídica, sólo disminuyó en los GR tratados con el EA<sub>4</sub> ( $p < 0,0001$ ), mientras que la incubación con los extractos restantes no produjo en los eritrocitos alteraciones significativas de  $\eta$  ( $p > 0,05$ ). Los resultados se muestran en la tabla 2.

## Discusión

En experiencias previas fue reportado que *A. lumbricoides* capta ácido siálico del eritrocito y altera su carga superficial [10-12,33]. Muchas investigaciones han relacionado al AS con los procesos metabólicos y con las vías de infección e invasión de diferentes parásitos [34-40]. El AS es un monosacárido excepcional, de marcada polaridad, resultante de la condensación de una molécula de ácido pirúvico con

otra de manosamina. Klenk y Faillard (1954) determinaron su estructura correcta [41-43] y Schauer, prosiguiendo con las investigaciones de estos autores, identificó nuevos ácidos siálicos y profundizó en el conocimiento de sus funciones, manifestando que presentan importantes y variados roles biológicos, incluso algunos diametralmente opuestos [41]. Entre sus funciones se hallan las debidas a su carga negativa, la influencia sobre la estructura de macromoléculas y sobre la especificidad de antígenos, el rol protector frente a ataques enzimáticos, la capacidad de tener sitios de reconocimiento, y a la vez poseer efecto de enmascaramiento por carga o estérico. Por lo tanto, algunas funciones de los glucoconjugados están determinadas, al menos parcialmente, por la participación en su composición de los ácidos siálicos [44].

El análisis digital de imágenes mostró que los GR tratados con EA presentaban un aumento de la capacidad de agregación con una marcada disminución del número de

células aisladas, inclusive en cuatro de las ocho poblaciones celulares se observó la formación de *AMAS*.

La morfología de los agregados no presentó variaciones significativas con el tratamiento. En la incubación con EA<sub>4</sub> y EA<sub>7</sub>, los valores de la media de *ASP* disminuyeron, pero estuvieron incluidos en el rango del control, lo que podría explicarse por el aumento observado en el porcentaje de GR apilados constituidos por cinco o más células y por el marcado descenso en el porcentaje de células aisladas iniciales.

Los valores de  $C_{Ca}$  variaron entre 0,4 y  $1\pm 0,05$ , indicando que el incremento en la capacidad de agregación fue dependiente del EA usado en el tratamiento. Estos resultados corroboran los obtenidos previamente, en los que se observó variabilidad en el grado de agregación al incubar los GR con diferentes EA, posiblemente debido a características intrínsecas de los mismos [10-12,33].

Las experiencias *in vitro* mostraron que la acción del EA produce agregados eritrocitarios de mayor tamaño, lo que podría explicar la trombosis observada *in vivo* en pacientes con ascariasis [1,2].

Los valores de  $C_{CAE}$  comprendidos entre 0,3 y  $0,4\pm 0,02$ , indicaron que seis de los EA alteraron en forma significativa la carga de los GR durante la incubación, mientras que los dos restantes, no modificaron el contenido de AS ( $0,03$  y  $0,06\pm 0,02$ ). Los GR incubados con estos últimos extractos (EA<sub>6</sub> y EA<sub>8</sub>) fueron los que presentaron también la menor disminución del porcentaje de células aisladas iniciales ( $C_{Ca}$ :  $0,4\pm 0,05$  y  $0,5\pm 0,05$ , respectivamente). El método de AA no detectó variación de carga, cuando el porcentaje de células aisladas disminuyó al 50% y 60% de las iniciales, mientras que cuando fueron iguales o menores al 30% de las del control, el método mostró una diferencia significativa entre la carga aniónica antes y después del tratamiento. Estos resultados indicarían que el método de análisis digital de imágenes permite detectar una menor alteración de carga aniónica, en los eritrocitos tratados con extractos parasitarios, que el método de AA.

Se ha reportado en infecciones por *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* que los cambios en la morfología y en la agregación de los eritrocitos, aumentan la interacción con el endotelio vascular y pueden producir alteraciones en la microcirculación. Muchos estudios indicaron que los GR de pacientes con malaria presentan cambios bioquímicos y morfológicos, que conducen al aumento de la agregación y de la interacción celular, relacionándose estrechamente con la severidad de la infección [45]. Las alteraciones en la forma globular se deben a que los parásitos se multiplican en su interior, llevando al aumento de ATP acumulado en el GR, al incremento del influjo de sodio y eflujo de potasio a través de la membrana y a la mayor respuesta al calcio [41,46]. Sin embargo, también se han informado alteraciones importantes en la morfología eritrocitaria en infecciones producidas por *Schistosoma mansoni* relacionadas al daño producido por el trematodo en los diferentes estadios de la infección [47].

La disminución en la carga eritrocitaria es uno de los

principales determinantes de la agregación, pero también influyen en este fenómeno la velocidad de cizallamiento de las diferentes capas sanguíneas en el interior del vaso [48], así como también numerosos factores plasmáticos y celulares, entre los que se incluyen las proteínas, especialmente fibrinógeno y globulinas, los lípidos y posiblemente otras macromoléculas [49].

La agregabilidad es fuertemente dependiente de la concentración y naturaleza de las macromoléculas presentes en el medio, aunque no todas las proteínas plasmáticas favorecen la agregación de GR humanos, sino aquéllas cuyas moléculas son alargadas como en el fibrinógeno. Existen dos hipótesis que intentan explicar la acción de las macromoléculas en el fenómeno de agregación. La más simple e intuitiva sostiene que las macromoléculas filamentosas promueven la agregación al interponerse entre los GR formando puentes entre sus membranas que reducen la repulsión electrostática. Este modelo predice que la agregación se verá facilitada por una mayor concentración de macromoléculas próximas a la superficie de los eritrocitos. Una segunda hipótesis es el llamado modelo de depleción, según el cual la exclusión de macromoléculas suspendidas entre dos GR adyacentes crea un gradiente osmótico que reduce el grado de hidratación de la superficie globular y facilita la aposición de las membranas adyacentes, por lo que este modelo predice exactamente lo contrario. Aún no hay suficientes datos que permitan decidirse por una u otra hipótesis [4].

El estudio de la cinética de agregación reveló que cinco EA produjeron una disminución de la velocidad de la agregación de los GR tratados y los valores de  $t_{50\%}$ , mientras que en el tratamiento con los dos EA de menor concentración proteica, ambos parámetros fueron similares al control. Los resultados sugieren que por acción de los extractos se forman agregados de mayor tamaño, pero que sus velocidades de formación son menores a la del control. Si bien es cierto que para obtener agregados más grandes se requiere un tiempo mayor, también se podría pensar que si el único efecto producido por los EA sobre los GR fuera la alteración de carga, se observaría, al disminuir la repulsión electrostática, un descenso en el tiempo de agregación. Una posible explicación podría estar dada por la relación lineal ( $R^2 > 0,87$ ) que se observó entre los parámetros de cinética y la concentración de proteínas de los EA, sugiriendo que las macromoléculas cuticulares interfieren en el proceso y causan la disminución en la velocidad de agregación. Este fenómeno fue comunicado previamente utilizando la técnica de Polibrene, donde se observó que la velocidad de agregación de los GR tratados con el 37,25% de los EA fue notablemente más lenta que la de los controles, así como también fue menor la cantidad de agregado final formado [12]. El análisis estadístico determinó que la cantidad de agregado formado era independiente de la concentración proteica del EA [12]. Los resultados obtenidos en esta experiencia, indican que el EA produce la disminución en la carga del eritrocito, pero que sus proteínas afectan la velocidad de agregación sin influir en el tamaño final de los

agregados formados.

El índice de deformabilidad sólo mostró una disminución en los GR que fueron incubados con los dos EA de mayor concentración proteica, por lo que posiblemente la adhesión de macromoléculas cuticulares a la membrana del glóbulo rojo afectó su capacidad de deformación, aumentando la rigidez.

La viscosidad del eritrocito, determinada por la bicapa lipídica de la membrana, sólo se vio alterada en el tratamiento con el EA<sub>4</sub> mientras que el módulo elástico, en todas las muestras tratadas, no presentó diferencias significativas con el control, sugiriendo que la incubación con el EA no afecta las propiedades del citoesqueleto del glóbulo rojo.

Los estudios hemorreológicos indicaron que las alteraciones morfológicas y los cambios en la capacidad de deformación del GR en infecciones por *Trypanosoma cruzi* causan el aumento de la viscosidad sanguínea [50] y en schistosomosis producen anemia y conducen a hipoxia tisular asociada a decaimiento y fatiga [47]. Los resultados obtenidos podrían contribuir en explicar los trombos, la anemia, el cansancio y/ o debilidad que pueden presentar los pacientes con ascariosis [51-54].

El estudio de los parámetros hemorreológicos antes y después del tratamiento de los GR humanos con los EA permite concluir: i. Los extractos tienen distinta capacidad de alteración de la carga aniónica, que se traduce en distintos grados de agregación. La alteración de la carga aumenta el tamaño de los agregados formados, pero sin producir cambios en su morfología. ii. El contacto de los EA con los GR, disminuye la velocidad inicial de agregación y aumenta el tiempo necesario para obtener el 50% de agregación total, lo que probablemente se deba a que las macromoléculas cuticulares del extracto interfieren en el proceso demorando la velocidad de formación del agregado, pero sin afectar su tamaño final. iii. Las propiedades viscoelásticas de la membrana podrían modificarse por la acción de algunos extractos, los cuales afectarían la fluidez y/o disminuirían la capacidad de deformación del glóbulo rojo, pero no se ha observado alteración de la elasticidad del eritrocito. Las experiencias realizadas *in vitro* permiten concluir que el contacto de los EA con los GR produce alteraciones hemorreológicas que podrían colaborar en la comprensión de algunos aspectos de la patología producida por el parásito *in vivo*.

## Referencias

1. Beaver PCH, Jung RC, Cupp EW. Parasitología Clínica. 2ª ed. Barcelona: Salvat; 1986.
2. Saredi N. Manual Práctico de Parasitología Médica. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/49968146/40/Ascaris-lumbricoides-Ascariidiosis>. Acceso 25 de junio 2011.
3. Silva JM, Saldanha C. Biorreologia e Hemorreologia- Origens e Evolução. SPHM. 2005;20(3):5-11.
4. Saraví F. ETAS-Hemodinámica, Capítulo 11. En: Reología de la Sangre, 2007. <http://www.buenastareas.com/ensayos/Reologia/655748.html>. Acceso 25 de junio 2011.
5. Berga L, Vives-Corrons J, Feliu E, Woessner S, Rozman C. Hemorreología. Bases teóricas y aplicaciones clínicas. Barcelona: Salvat; 1983.
6. 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.
7. Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280:222-36.
8. Buscaglia C. Trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*: un blanco potencial para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev Hos Mat Inf. Ramón Sardá. 2002; 21:24-7.
9. 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). Acceso 25 de junio 2011.
10. Ponce de León P, Juárez Matamoros K, Biondi C, Valverde J. Alteración de la carga aniónica superficial de glóbulos rojos y glóbulos rojos desializados por *Ascaris lumbricoides*. Rev Cub Med Trop. 2011;1: 63:87-90.
11. 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; 51:219-21.
12. Ponce de León P, Biondi C, Valverde J. Efecto producido por *Ascaris lumbricoides* sobre la carga superficial eritrocitaria utilizando el método de polibrene. Acta Bioquím Clin Latinoam. 2010; 44:689-96.
13. Capron J, Biguet A, Vernes A, Afchain D. Structure Antigenique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path Biol. 1968; 16:121-38.
14. Monroy-Ostria A, Gómez-Gutiérrez IJ, Ramírez-Ramírez A, Carrillo-Landin G. Reconocimiento por inmunotransferencia de antígenos de *Taenia solium* y su larva. Rev Lat Amer Microbiol. 1992; 34:33-8.
15. Ponce de León P, Valverde J. ABO System: molecular mimicry of *Ascaris lumbricoides*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003; 45:107-8.
16. Ponce de León P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: heterogeneidad en la expresión de epitopes ABO. Rev Invest Clín. 2006; 47:385-93.
17. Ponce de León P, Valverde J. Método de Difusión luminica aplicado a la capacidad inhibitoria para epitopes ABO en *Ascaris lumbricoides*. Acta Bioquím Clin Latinoam. 2005; 39:463-6.
18. Riquelme B, Dumas D, Relancio F, Fontana A, Alessi A, Foresto P *et al.* Study of polycation effects on erythrocyte agglutination mediated by anti-glycophorins using microscopic image digital analysis. In: Grzymala R, Haerberle O, editors; Advances in Biophotonics and New Therapy Frontiers. 1ª ed. Washington: SPIE; 2006.
19. Foresto P, D'Arrigo M, Carrera L, Etcheparre R, Valverde J, Rasia R. Evaluation of red blood cell aggregation in diabetes by computerized image analysis. Medicina. 2000; 60:570-2.
20. Danieli V, Fontana AB, Alessi AC, Foresto PG, Valverde JR, Grandfils y col. Tratamiento de eritrocitos humanos con copolímeros sintéticos: optimización del tiempo de incubación. Acta Bioquím Clin Latinoam. 2009; 43:43-8.
21. D'Arrigo M, Lebensohn N, Re A, Filippini F, Carrera L, Valverde J y col. Acido siálico sérico y carga aniónica eritrocitaria en pacientes diabéticos e hipertensos. Posible

- impacto hemorreológico. Bioquímica y Patología Clínica. 2008; 72:17-20.
22. 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.
  23. Levin M, Smith C, Walters MDS, Gascoine P, Barrett TM. Steroid responsive nephrotic syndrome: a generalized disorder of membrane negative charge. *Lancet* 1985; 2:239-42.
  24. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leucocytes and platelets from whole blood. *J Lab Clin Med.* 1976; 88:328-33.
  25. Gambaro G, Baggio B, Cicerello E, Mastrosimone S, Marzaro G, Borsatti A *et al.* Abnormal erythrocyte charge in diabetes mellitus: link with microalbuminuria. *Diabetes.* 1988; 37:745-8.
  26. Altube LA, Marenzana A, Valverde J, Calviño G, Foresto P, Riquelme B. Equipo automatizado para el estudio de la disociación de aglutinados celulares. *Anales AFA.* 2005;17: 318-20.
  27. Riquelme B, Rasia R. Un material viscoelástico de interés especial: el glóbulo rojo humano. *Anales AFA.* 1997; 9:255-9.
  28. Rasia RJ, Porta PE, García Rosasco M. Estudio comparativo entre filtrabilidad y difractometría en medición de deformabilidad eritrocitaria. *Rev Argent Transfus.* 1985;11(4):217-20.
  29. Rasia RJ, Porta P, García Rosasco M. Shear deformation measurement of suspended particles. Applications to erythrocytes. *Rev Sc Instrum.* 1986; 57: 33-5.
  30. Rasia R.J. Quantitative evaluation of erythrocyte viscoelastic properties from diffractometric data: Applications to hereditary spherocytosis, thalassaemia and hemoglobinopathy. *Clin. Hemorheol.* 1995;15(2):177-89.
  31. Riquelme B, Valverde J, Rasia R. Optical method to Determine the Complex Viscoelasticity Parameters of Human Red Blood Cells. Singh M, Radhakrishnan S, editors. In: *Advances in Medical Diagnostic Techniques and Procedures.* 1ª ed. India: Narosa Publishing House; 1999.
  32. Devore J. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 5ª ed. México: Editorial Thomson Learning; 2001.
  33. 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 Cub Med Trop.* 2011; 63:263-7.
  34. Souto Padron T. The surface charge of trypanosomatids. *An Acad Bras Ciênc.* 2002; 74:649-75.
  35. Hemphil A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. *Parasitol Res.* 1995; 81:412-20.
  36. 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*. *RC.* 2004; 14:431-9.
  37. 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.
  38. Chayen A, Avron B, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1988; 56(3):673-81.
  39. Pasvol G, Wainscoat JS, Weatherall DJ. Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 1982; 297:64-6.
  40. Mayer DC, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, Mendoza LH, Miller LH. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106:5348-52.
  41. 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; 74:409-32.
  42. Cabezas JA. Acides sialiques: Leur Signification Biochimique. *Le Pharm. Biol.* 1961; 2:9-19.
  43. Cabezas JA. Estudio de los ácidos siálicos en diversos materiales biológicos. (Discurso de incorporación como Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia). *An R Acad Nac Farm.* 1968; 24:154-72.
  44. Jayavanth S, Jagadeesan K, Singh M. Influence of *P.vivax* malaria on erythrocyte aggregation and deformability. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004; 31: 257-66.
  45. Oelshlegel FJ, Sander BJ, Brewer GJ. Role of *in vivo* pyruvate kinase activity. A. Inheritance of elevated red cells ATP levels. B Red cell malarial parasite interactions. *Erythrocyte Structure and Functions.* New York: Alan R. Liss, 1975.
  46. Yuthawong Y. Alterations of the erythrocytes induced by malaria parasites. *J Sci Soc Thailand.* 1985; 11:53-65.
  47. Valderrama J, Amará F, Simpson L, Ghanem Y, Abdel-Aati T, Youssef E, El-Sheikh S. Study of erythrocyte shape changes in schistosomiasis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003; 28:21-8.
  48. Ruiz Jimenez M. Nuevos factores de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes. Madrid: Ed. Díaz de Santos S.A, 2005.
  49. Rasia M, Hernandez G. Propiedades de flujo de la sangre en la obesidad. *Rev Med Rosario.* 2004; 70:150-4.
  50. Berra HH, Piaggio E, Revelli SS, Luquita A. Blood viscosity changes in experimentally *Trypanosoma cruzi*- infected rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005; 32:175-82.
  51. Arias V, Parra E. Haga usted el diagnóstico. *Biomed.* 2005;25(1):148-51.
  52. Bardenwerper HE. *Ascaris lumbricoides* infestation with extreme anemia. *J Am Med Assoc.* 1928;91(14):1037.
  53. García-Leiva J, Barreto-Zuñiga R, Estradas J, Torre A. *Ascaris lumbricoides* and iron deficiency anemia. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1051-2.
  54. 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; 2:205-9.