

Estados larvales de *Ascaris lumbricoides*: capacidad de unión a ácido hialurónico.

Patricia Ponce-León¹, Patricia Foresto² y Juana Valverde²

¹Cátedra de Parasitología y ²Cátedra de Inmunología, Hemorreología e Inmunogenética. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.

Palabras clave: *Ascaris lumbricoides*, estados larvales, ácido hialurónico.

Resumen. El ácido hialurónico tiene importantes funciones en los procesos inflamatorios y de reparación tisular. Debido a la variedad de estrategias utilizadas por los parásitos para evadir la respuesta inmune del hospedador y las múltiples funciones e importancia fisiológica del ácido hialurónico, el objetivo fue estudiar la capacidad de unión a ácido hialurónico de estados larvales de *A. lumbricoides*. Se trabajó con 4 Concentrados de Larvas obtenidas de la eclosión de huevos de *A. lumbricoides* y recolectadas por el método de Baermann. Se modificó la técnica de detección de CD44 soluble en suero por Inhibición de la Agregación por Adhesión. Se observó que los 4 Concentrados Larvales unían ácido hialurónico. Los resultados obtenidos permiten suponer la existencia de un receptor con especificidad para ácido hialurónico en *A. lumbricoides*. Este receptor eventualmente podría competir con los receptores habituales del hospedador. El parásito podría utilizar este mecanismo para evadir la respuesta inmune.

Larval stages of *Ascaris lumbricoides*: Hyaluronan binding capacity.

Invest Clin 2009; 50(1): 5 - 12

Key words: *Ascaris lumbricoides*, larval stages, hyaluronan.

Abstract. Hyaluronic acid has important functions in inflammatory and tissue reparation processes. Owing to the varied strategies of the parasites to evade the host's immune response, as well as the multiple functions and physiological importance of hyaluronic acid, the aim was to study the hyaluronan binding capacity by *Ascaris lumbricoides* larval stages. Larval concentrates were prepared by hatching *A. lumbricoides* eggs. The larvae were collected by

the Baermann method. The test of serum soluble CD44 detection by Aggregation Inhibition was modified. All the larval concentrates presented hyaluronan binding capacity. The obtained results allow to suppose the existence of an hyaluronic acid specific receptor in *A. lumbricoides*. This receptor eventually might compete with the usual receptors of the host. The parasite might use this mechanism to evade the immune response.

Recibido: 02-10-2007, Aceptado: 12-06-2008.

INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico, representa el componente fundamental de la matriz extracelular de la piel, tejido mucoso, articulaciones, ojo y de muchos órganos y tejidos. Interviene en los procesos de reparación tisular, siendo un componente esencial en la repitelización de la epidermis y evitando la formación de cicatrices (1). Su característica osmótica restituye la hidratación tisular durante el proceso inflamatorio y su viscosidad ayuda a prevenir el pasaje de virus y bacterias por la zona pericelular (2, 3). Es un reconocido estimulador del proceso inflamatorio porque tiene propiedades antioxidantes, capacidad para eliminar radicales libres y actúa como barrera de degradación tisular (4-6).

Durante la evolución los parásitos han sufrido una fuerte presión selectiva y han podido sobrevivir hasta nuestros días debido a su aptitud para manipular la respuesta inmune del hospedador en diferentes niveles o bien interferir en los mecanismos efectores. Dentro de las numerosas estrategias de evasión de la respuesta inmune que pueden utilizar los parásitos se ha descrito la expresión sobre sus superficies de proteínas reguladoras, inhibidores, receptores y proteínas homólogas a las del hospedador (7).

Considerando los múltiples mecanismos parasitarios para evadir la respuesta inmune del hospedador y la importancia fisiológica del ácido hialurónico, se iniciaron las investigaciones para determinar si *Ascaris lumbricoides* expresa receptores capaces de

unir ácido hialurónico. Experiencias previas demostraron que extractos parasitarios obtenidos a partir de ejemplares adultos de este nematodo pueden captar ácido hialurónico (8, 9). El propósito de este trabajo fue estudiar la capacidad de unión a ácido hialurónico de estados larvarios de *A. lumbricoides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se prepararon concentrados de larvas de *A. lumbricoides* (CLAL) a partir de heces con huevos de este helminto. Los huevos se concentraron por el método de flotación de salmuera (10), se lavaron 3 veces en agua destilada y se colocaron en SO_4H_2 0,1 N durante 12 a 24 días a 37°C hasta la observación microscópica de huevos larvados (11). Se consideró los estados larvales como una mezcla de larvas de primer y segundo estadio (L1/L2) de acuerdo a trabajos publicados en relación al tiempo requerido para el desarrollo de la larva durante la embrionación in vitro expresado por Geenen y col. (12). Se tomaron alícuotas del sedimento fecal con los huevos larvados y se neutralizaron con igual volumen de buffer fosfato 0,5 M pH 7. Se lavaron 3 veces en agua destilada, y se procedió a la remoción de la cubierta de los huevos con hipoclorito de sodio 1% a 37°C en atmósfera del 5% de CO_2 durante 30 minutos. A continuación se lavaron 3 veces en el mismo buffer suplementado con antibióticos y se colocaron en el medio de eclosión a 37°C agitando constante-

mente durante 1 a 2 horas hasta la liberación completa de las larvas.

Medio de eclosión: por cada 0,5 mL de suspensión de huevos, se adicionó: 1 mL de bisulfito de sodio 0,1M y 1mL de cloruro de sodio 0,25 M (pre-gaseado conteniendo 0,0025% de Tween 80 y 0,1 M de bicarbonato de sodio) (11).

Las larvas (L1/L2) fueron recolectadas a las 2 horas a 37°C por el método de Baermann-Moraes (13) en el buffer fosfato. Completada la recolección fueron concentradas por centrifugación y se procedió al recuento de las mismas.

Se trabajó con 4 Concentrados de Larvas (L1/L2): CLAL₁ y CLAL₂ con 1100 a 1200 larvas/mL; CLAL₃ con 600 a 800 larvas/mL y CLAL₄ con 110 a 120 larvas/mL.

Métodos

Se utilizó la técnica de Inhibición de la Agregación por Adhesión para detección del Receptor CD44 soluble de hialuronato en suero humano. El fundamento de esta técnica se basa en la competencia por la unión de ácido hialurónico (AH) entre el CD44 soluble del suero y la molécula de adhesión CD44 (receptor de los eritrocitos). Se preparó una serie de diluciones al medio del suero donde se desea investigar la presencia de CD44 soluble (Puro; 1/2; 1/4; 1/8.....1/512). Se agrega ácido hialurónico y se revela con eritrocitos Grupo O. Cuando el receptor soluble en suero está presente, se produce la inhibición de la adhesión de ácido hialurónico a CD44 de los eritrocitos. Se determina el título del receptor CD44 soluble en suero, siendo éste igual a la inversa de la mayor dilución que presenta agregación (14).

Esta técnica fue modificada a los fines de la experiencia de la siguiente forma:

En primer lugar se titularon varios pools de sueros con el objeto de seleccionar, el que presentara un título de CD44 soluble igual o mayor a 16, para evitar estar

trabajando en el límite de sensibilidad de la técnica cuando se realizara el estudio de los concentrados larvarios.

La técnica de inhibición de la agregación por adhesión se basa en una inhibición semicuantitativa donde se considera significativa una diferencia de título igual o mayor a dos diluciones entre las dos series de diluciones del suero. Esto determina que para poder observar esta diferencia, el título del suero en la primera serie no debe ser menor a 4, siendo este título el límite de sensibilidad de la técnica.

Se prepararon series de diluciones al medio de pools de sueros (puro a 1/512). El volumen final de cada dilución fue de 50 μ L. A todos los tubos se les agregó igual volumen de ácido hialurónico, concentración 1/128 en PBS pH 7,4 (AH) y se dejó reaccionar 15 minutos a 4°C. Pasado este tiempo se adicionó 50 μ L del sistema revelador (suspensión al 2% de eritrocitos Grupo O, lavados 3 veces en PBS pH: 7,4 y en medio enzimático de bromelina).

Medio enzimático de bromelina: Pre-tratamiento de los hematíes durante 15 minutos a 37°C con bromelina, la cual es una enzima proteasa que se utiliza en las pruebas serológicas para aumentar la agregación de los hematíes ya que reduce su carga superficial al hidrolizar las sialoglicoproteínas de la superficie celular). Después de 24 horas a 4°C se determinó el título de CD44 soluble en los pools de sueros, siendo éste la inversa de la última dilución que presentó agregación.

Se incluyó un testigo positivo de agregación por adhesión (Testigo +: 50 μ L de AH + 50 μ L del plasma autólogo de los eritrocitos Grupo O + 50 μ L de eritrocitos Grupo O).

Una vez seleccionado el pool de sueros a utilizar en la experiencia de Inhibición de la Agregación por adhesión (Título 16), se preparó una suspensión en partes iguales de ácido hialurónico (1/64 en PBS pH 7,4)

y CLAL, de tal manera que la concentración final fuera 1/128, y se dejó en contacto 60 minutos a 4°C (mezcla AH-CLAL) a los fines de hacer posible la unión entre las larvas y el ácido hialurónico.

Se prepararon dos series de diluciones del pool de sueros seleccionado (puro a 1/64). El volumen final de cada dilución fue de 50 μ L. A cada tubo de la primera serie se le agregó 50 μ L de AH (1/128), y a los tubos de la segunda serie igual cantidad de la mezcla AH-CLAL. Ambas series fueron colocadas durante 15 minutos a 4°C. En esta etapa ocurre la unión entre el ácido hialurónico y el receptor soluble del pool de sueros. Si las larvas presentan capacidad de unión a hialuronato, la cantidad de ácido hialurónico libre en la mezcla AH-CLAL disminuye y por lo tanto es menor la unión a CD44 soluble.

A todos los tubos de ambas series se les adiciona 50 μ L del sistema revelador (suspensión al 2% de eritrocitos frescos Grupo O en medio enzimático de bromelina).

La lectura de inhibición de la agregación por adhesión se realizó después de 24

horas a 4°C determinando el título de CD44 soluble en el pool de sueros de las dos series.

RESULTADOS

Los 4 CLAL presentaron capacidad de unión a ácido hialurónico. La lectura de inhibición de la agregación por adhesión mostró diferencias significativas en el título de CD44 soluble del pool de sueros entre las dos series. El título disminuyó 4 diluciones cuando se agregó al ácido hialurónico CLAL₁, CLAL₂ y CLAL₃. La incorporación de CLAL₄ provocó una disminución de título de 3 diluciones. Estos resultados se observan en la Tabla I.

DISCUSIÓN

La matriz extracelular está formada por macromoléculas que constituyen el ecosistema donde las células cumplen sus funciones vitales. El ácido hialurónico tiene un papel importante en la migración celular, contribuye a la adhesividad de las células y

TABLA I
TITULACIÓN DE CD44 SOLUBLE EN UN POOL DE SUEROS CON Y SIN EL AGREGADO DE CONCENTRADOS DE LARVAS (L1/L2) DE *Ascaris lumbricoides*

Diluciones del pool de sueros	Puro	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Título de CD44 soluble
AH Primera serie	++	++	+	+	+/-	-	-	16
AH- CLAL ₁ Segunda serie	+/-	-	-	-	-	-	-	1
AH- CLAL ₂ Segunda serie	+/-	-	-	-	-	-	-	1
AH- CLAL ₃ Segunda serie	+	-	-	-	-	-	-	1
AH- CLAL ₄ Segunda serie	+	+/-	-	-	-	-	-	2

AH: Titulación con ácido hialurónico. AH-CLA: Titulación con la mezcla en partes iguales de ácido hialurónico y concentrados larvarios.

Grados de aglutinación:

++ aglutinación moderada. + aglutinación leve. +/- aglutinación muy leve. - sin aglutinación

facilita la hidratación de los tejidos por sus radicales libres que se ligan a las moléculas de agua. Puede unirse a la proteína B, y formar un complejo que se asocia al estímulo de la actividad de proteína quinasa, participando en la transducción a nivel celular y en la interacción de la superficie celular con el citoesqueleto (15).

La respuesta inicial a los ataques de los tejidos incluye la formación de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico y fibrina que soporta la influencia de fibroblastos y células endoteliales dentro de la zona de ataque y la siguiente formación de tejido de granulación. La matriz de tejido de granulación, rica en ácido hialurónico, desarrolla funciones de reparación tisular. Además de ser un estimulador del proceso inflamatorio, el ácido hialurónico se caracteriza por su función moderadora de la inflamación debido a sus propiedades antioxidantes, a la eliminación de radicales libres y a su acción como barrera de degradación tisular (16).

Se ha establecido también la importancia del ácido hialurónico en los procesos infecciosos.

Streptococcus pyogenes sintetiza una cápsula de ácido hialurónico a los fines de evitar la actividad fagocítica de las células del sistema inmune (17), por otro lado se ha reportado que el ácido hialurónico se asocia al fenómeno de citoadherencia placentario de *Plasmodium* ya que se ha observado la liberación de parásitos de placentas infectadas cuando se tratan con condroitin sulfato A (18, 19).

En la mayoría de los trabajos de investigación, sin embargo, se reporta la existencia de microorganismos con capacidad de síntesis de hialuronidasas, como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. Los *Streptococcus* Grupo B producen una proteína que degrada al ácido hialurónico, y si bien se desconoce su función, teóricamente, facilitaría la diseminación del microor-

ganismo a través de los tejidos, siendo un determinante de virulencia productor de daño directo a los tejidos y de evasión de la actividad inmunológica (20, 21).

La hialuronidasa, llamada también factor de diseminación, es una enzima que despolimeriza de forma reversible al ácido hialurónico, lo que reduce temporalmente la viscosidad de la matriz extracelular. El ácido hialurónico es un constituyente importante de la sustancia intercelular del tejido conjuntivo, y su despolimerización favorece la diseminación del patógeno y produce daño a las células del hospedero (20-22).

La sanguijuela, un helminto parásito, también tiene en su saliva hialuronidasa que favorece el flujo de sangre y fluidos de las áreas afectadas y simultáneamente ejerce un efecto antibacteriano sobre *Streptococcus* sp. al destruir el ácido hialurónico de la superficie de la bacteria (23, 24).

La técnica utilizada en esta experiencia ya ha sido empleada en el estudio de pacientes hipertensos (25). El método se fundamenta en la competencia por la unión de ácido hialurónico entre el CD44 soluble presente en el suero y el CD44 presente en los eritrocitos; debido a que es una técnica de fácil implementación en el laboratorio y tiene buena sensibilidad, podría ser útil para estudiar el sistema CD44/hialuronato en otras patologías.

En experiencias previas, a los fines de evaluar la unión de ácido hialurónico (AH) a los extractos de *A. lumbricoides* (EA) (8, 9), la técnica fue modificada incorporando un primer paso donde ambos se ponen en contacto en partes iguales para permitir la reacción (mezcla AH- EA), de tal manera que la concentración final de ácido hialurónico se mantuvo en 1/128 que es la descrita en la técnica original. En esta experiencia, se reemplazó la cantidad de EA por CLAL. La primera serie de diluciones del pool se enfrenta con AH (1/128), y la se-

gunda con la mezcla AH-CLAL. Un mismo título de CD44 soluble en las dos series significa que el concentrado de estados larvales no tiene capacidad de unión a ácido hialurónico, y por el contrario si los títulos difieren en las series demuestran que las larvas de este parásito captaron ácido hialurónico. Se considera significativa una diferencia igual o mayor a 2 diluciones entre los títulos de CD44 soluble en las dos series.

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano constituido por residuos alternantes de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. No tiene una forma definida en el espacio, sino que se extiende aleatoriamente tendiendo a ocupar un volumen muy grande debido a la repulsión electrostática de los grupos carboxilo del ácido urónico. La quitina es otro polisacárido de función estructural, indispensable para el desarrollo de las cubiertas de los helmintos. Está constituida por un derivado de la glucosa que es la N-acetil glucosamina (26).

Recientemente se ha demostrado similitud entre los mecanismos biosintéticos del ácido hialurónico y de la quitina, y se sugiere un ancestro común entre las enzimas Ácido Hialurónico Sintasa y Quitina Sintasa (27). Las experiencias realizadas con los EA obtenidos a partir de ejemplares adultos del parásito, demostraron que el 63,89% de los extractos estudiados tenían capacidad de unión a ácido hialurónico (8). Esta unión podría deberse a la presencia de uno o más tipos de receptores en el parásito adulto, pero se desconoce hasta el momento si este receptor es específico para ácido hialurónico, o es un receptor para quitina, o si existen ambos que en forma simultánea pueden realizar la captación. A los fines de conocer la naturaleza del receptor involucrado en la unión de ácido hialurónico a *A. lumbricoides* se decidió estudiar estados larvales del parásito ya que carecen de quitina. En esta experiencia los 4 CLAL

unieron ácido hialurónico. Los resultados de la Inhibición de la Aglutinación por Agregación permitieron observar una captación levemente superior de ácido hialurónico (tal como se demostró por la disminución del título de CD44 soluble) en los CLAL que tenían una cantidad de larvas igual o mayor a 600-800 larvas/mL, aunque se observó también unión significativa de ácido hialurónico en el CLAL₄ (110 a 120 larvas/mL). Esta experiencia *in vitro* nos permitiría inferir que, *in vivo*, una infección con una moderada cantidad de huevos larvados podría provocar una competencia del parásito con los receptores habituales del hospedero a los fines de secuestrar ácido hialurónico. Durante los procesos de coevolución, los parásitos pueden haber compartido y conservado estructuras moleculares equivalentes a las de sus respectivos hospedadores, que puede reflejar la adaptación para evadir los mecanismos inmunitarios (28). Los resultados obtenidos permiten suponer la existencia de un receptor con especificidad para ácido hialurónico en *A. lumbricoides*.

Experiencias futuras deberían orientarse a los fines de establecer el rol del hialuronato en la ascariosis. Debido a las comunicaciones realizadas en relación al ácido hialurónico y otros patógenos, se podría suponer que es un mecanismo que *A. lumbricoides* utilizaría para la evasión de la respuesta inmune. Sería interesante para comprender el proceso de infección, estudiar la posible participación de este parásito en fenómenos de adherencia celular, como así también determinar si este nematodo tiene capacidad de síntesis de hialuronidasa. El conocimiento completo de las diversas estrategias que los parásitos han desarrollado a lo largo de la evolución, para poder sobrevivir al sistema inmune de los hospederos, es aún uno de los desafíos científicos de nuestra época.

REFERENCIAS

1. Longaker MT, Chiu ES, Adzick US, Stern M, Harrison MR, Stern R. Studies in fetal wound healing. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann Surg* 1991; 213: 292-296.
2. Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep Reg* 1999; 7: 79-89.
3. Knudson Cb, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* 1993; 7:1233-1241.
4. Cortivo R, Brun P, Cardarelli L, O'regan M, Conconi Mt, Radice M, Abatalenco G. Antioxidant effects of hyaluronan and its alpha-methyl-prednisolone derivative in chondrocyte and cartilage cultures. *Sem Arthritis Rheum* 1996; 26:492-501.
5. Nitzan DW, Nitzan U, Dan P, Yedgar S. The role of hyaluronic acid in protecting surface-active phospholipids from lysis by exogenous phospholipase A(2). *Rheumatology* 2001; 40: 336-340.
6. Presti D, Scott JE. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH) radical is dependent on hyaluronan molecular mass. *Cell Biochem Funct* 1994; 12:281-288.
7. Faimon L. Introducción a la Inmunología Humana. 5º Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005, p 389-392.
8. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: Capacidad de unión a hialuronato. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41(4):519-524.
9. Ponce De León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: Expresión de un receptor de hialuronato. *Memorias del VIII Congreso- XXVI Reunión Anual- Sociedad de Biología de Rosario*, 2006. Rosario, Argentina. p172.
10. Beaver P, Jung R, Cupp EW. *Parasitología Clínica*. 2º Ed. Buenos Aires: Salvat; 1986, p 802-803.
11. Fairbairn D. The in vitro hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Canad J Zool*, 1961; 39: 153-162.
12. Geenen PL, Bresciani JB, Pedersen A, Eirksen H, Fagerholm PN. The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg. *J Parasitol* 1999; 85(4):616-622.
13. Shore-García L, Ash L. *Diagnóstico parasitológico*. 2º Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1983, p 39-40.
14. D'Arrigo. M. Incidencia de la relación estructura- función del Sistema de Grupo Sanguíneo MN y del receptor CD 44 en la adhesión eritrocitaria. [Tesis Doctoral] Rosario: Facultad de Cs. Bioq. y Farm. Univ. Nacional de Rosario, Argentina; 2000.
15. Silvera-Arenas LA, Barrios De Zurbarán C. La matriz extracelular: el ecosistema de la célula. *Rev Salud Uninorte* 2002; 16: 9-18.
16. Mazzitelli S, Caccianiga GL, Ariello F, Baldoni M. Eficacia de un preparado galénico para uso tópico en la cura de los tejidos blandos. *Ciencia* 2005; 162:3-6.
17. Wegner A, Claveria C, Donoso A, Perret C. Meningitis bacteriana aguda por *Streptococcus pyogenes*: Caso clínico y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect* 2000; 17(2):135- 138.
18. Beeson JG, Rogerson SJ, Brown GV. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. *Trends Parasitol* 2001; 17(7):331-337.
19. Piñeros JG, Blair S. Malaria y embarazo. *Infectio* 2002; 6(3): 168-176.
20. Valentin-Weigand P, Chhatwal GS. Correlation of epithelial cell invasiveness of group B streptococci with clinical source of isolation. *Microb Pathog* 1995; 19: 83-91.
21. Gibson RL, Nizet V, Rubens CE. Group B streptococcal b-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 1999; 45:626-634.
22. Campos M, Vargas A, Herrera ML, Yok I. Infecciones por *Streptococcus pyogenes* en el Hospital Nacional de Niños, 1994-1998. *Rev med Hosp Nac Niños (Costa Rica)* 1998; 33 (1-2):43-47.
23. Vera C, Blu A, Torres M. Sanguijuelas, parásitos presentes ayer y hoy. *Rev Chil Infect* 2005; 22 (1):32-37.

24. Mancuso G, Cusumano V, Genovese F, Gambuzz M, Beninati C, Teti G. Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by group B streptococci. *Infect. Immun* 1997; 65: 3731-3735.
25. Lebenson N, D'Arrigo M, Filippini F, Barberena L, Gallo R, Valverde J, Foresto P. Estudio del Sistema CD44/Hialuronato soluble en pacientes hipertensos. *Med* 2006; 66(II): 95.
26. Battaner-Arias E. Modelos Moleculares, 2: Hidratos de Carbono. Disponible en: www.usal.es/~dbbt/modmol/modmol02/mm02t01.htm/ind.
27. Takeo S, Fujise M, Akiyama T, Habuchi H, Itano N, Matsuo T, Aigaki T, Kimata K, Nakato H. *In vivo* hyaluronan synthesis upon expresión of the mammalian hyaluronan cintaza gene in Drosophila. *J Biol Chem* 2004; 279:8920-18925.
28. Alarcon De Noya B, Colmenares C, Noya O. Comunidad Antigénica y Reactividad Cruzada: su repercusión en el Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Parasitarias. Especial referencia a Esquistosomiasis. *Arch Venez Farmacol Terap* 2001; 20(2):163-171.