

Artículo original

Estudio de la desialización producida por larvas musculares de *Trichinella spiralis*

Patricia Ponce de León^{*.a}, Estefanía Pintagro^a, Gabriel López Murúa^a, Liliana Racca^b

^aÁrea de Parasitología. ^bÁrea de Estadística y Procesamiento de Datos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Recibido 19 de diciembre de 2015; aceptado 29 de junio de 2016

Resumen: *Trichinella spiralis* es agente causal de una zoonosis endémica en Argentina. El objetivo fue estudiar la desialización eritrocitaria producida por larvas musculares (LM) de *T. spiralis*. Se trabajó con concentrados de LM, incubados en partes iguales con glóbulos rojos (GR) Grupo O (37 °C) durante 3 horas (con y sin agitación controlada) durante 150 minutos, a intervalos de 30 minutos, para estudiar el curso de la desialización en el tiempo. Los GR controles fueron incubados de la misma manera, con igual volumen de solución fisiológica. Se aplicó el método de titulación de la agregación, calculando título y coeficiente de puntuación total (CexpST). Se encontró que los eritrocitos incubados con LM presentaron mayor agregación que los controles. El valor medio de CexpST con agitación (0,43) fue significativamente menor que cuando los GR no se agitaron (0,72). El estudio de la desialización eritrocitaria en el tiempo mostró que el título de los GR control disminuyó significativamente a los 90 minutos en 5/10 repeticiones y a los 150 minutos en 9/10. El aumento del tiempo de incubación produjo el incremento de la desialización excepto a los 120 y 150 minutos donde no existieron diferencias significativas en el valor de CexpST. La experiencia realizada *in vitro*, sugeriría que en la infección *in vivo*, las LM podrían captar el ácido siálico a partir de los residuos sializados presentes en la célula muscular.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, larvas musculares, desialización, eritrocitos humanos, método de Polibrene.

Desialylation study produced by muscle larvae of *Trichinella spiralis*

Abstract: *Trichinella spiralis* is the cause of an endemic zoonosis in Argentina. The objective was to study the erythrocyte desialylation by *T. spiralis* muscle larvae (ML) applying an aggregation titulation method. We worked with ML concentrates, which were incubated with an equal volume of O Group erythrocytes (RBCs) at 37° C for 3 hours, (with and without controlled agitation) and for 150 minutes, taking samples at 30 minutes intervals to study the course in time of the desialylation. RBCs control were incubated with an equal volume of physiological saline solution. Aggregation titulation method was applied and the title and total score coefficient (TSexpC) were calculated. The results showed that erythrocytes incubated with ML showed more aggregation than controls. The average TSexpC with agitation (0.43) was significantly lower than when erythrocytes were not stirred (0.72). The course in time of the erythrocyte desialylation showed that the RBCs control title decreased significantly at 90 minutes in 5/10 repetitions and at 150 minutes in 9/10. Increasing the incubation time produced an increase in erythrocyte desialylation, except at the 120 and 150 minutes interval where no significant differences in TSexpC values were found. The *in vitro* experience would suggest that in cases of *in vivo* infection, ML could capture sialic acid from sialylate residues present in the muscle cell.

Keywords: *Trichinella spiralis*, muscle larvae, desialylation, human erythrocytes, Polybrene method.

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

Introducción

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 carbohidratos poseen una enorme capacidad para transmitir información, mucho mayor que los ácidos nucleicos y las proteínas, cumpliendo roles específicos cruciales en la infección, inflamación, inmunidad, fertilización, diseminación de células tumorales y plegamiento de proteínas [1].

La comprensión a nivel molecular del enlace

carbohidrato/proteína ha posibilitado el conocimiento de las funciones biológicas de los carbohidratos. Su estudio ha permitido relacionarlos con enfermedades, y ya existen ejemplos concretos en infecciones bacterianas, virales y parasitarias, tales como malaria, leishmaniasis, amibiasis, tripanosomiasis y ascariasis [2-9].

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

Los ácidos siálicos son monosacáridos excepcionales, resultantes de la condensación de una molécula de ácido pirúvico con otra de manosamina, que se sitúan en el extremo de las moléculas de las que forman parte [10]. Presentan importantes funciones biológicas, entre las cuales se encuentran las debidas a su carga negativa, a su influencia sobre la estructura de macromoléculas y sobre la especificidad de antígenos, a su papel protector frente a ataques enzimáticos y a la característica de tener sitios de reconocimiento y a la vez efecto de enmascaramiento [10].

El grado de sialización de las glicoproteínas influye en su supervivencia en la circulación sanguínea, ya que la concentración a la que permanecen en el plasma disminuye notablemente cuando el ácido siálico es eliminado [11,12]. Por ejemplo, se ha comunicado que existe una relación directa entre la proporción de ácido siálico que contiene la eritropoyetina y su vida media sérica y actividad biológica [12,13]. Por lo tanto, puede deducirse que algunas funciones de los glicoconjugados están determinadas, al menos parcialmente, por la participación de los ácidos siálicos en su composición [11].

Trichinella spiralis es el agente causal de una zoonosis endémica en Argentina, llamada triquinelosis, la cual se trasmite de modo accidental al hombre por ingestión de carne o sus derivados crudos o insuficientemente cocidos, procedentes de animales infectados [14]. El ciclo biológico de este parásito incluye la migración de larvas recién nacidas por el torrente sanguíneo y sistema linfático, ubicándose finalmente en los músculos estriados. 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, modifica la actividad de sus organelos y puede adquirir una cápsula de colágeno. 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 [15].

Los eritrocitos pueden ser utilizados como modelo para estudiar la desialización [16]. En experiencias previas,

aplicando análisis digital de imágenes, se ha comunicado que los glóbulos rojos incubados con larvas infectantes de *T. spiralis* presentan un aumento de agregación en relación a la producida cuando los mismos glóbulos permanecen en solución salina, indicando que el parásito capta el ácido siálico eritrocitario [17]. Este hecho permitiría especular que el nematodo podría secuestrarlo a partir de otros glicoconjugados que posean residuos sializados, tal como se sugirió para *Ascaris lumbricoides* [16].

El único método directo de cuantificación de ácido siálico en el eritrocito es su cuantificación en la membrana eritrocitaria. Debido a que la implementación de esta técnica no es accesible a todos los laboratorios, surgieron varios métodos que permiten estudiar de manera indirecta la carga y el contenido de ácido siálico superficial del glóbulo rojo. Uno de ellos es el que utiliza bromuro de hexadimetrina (Polibrene). Este polímero sintético, cargado positivamente, tiene la propiedad de aglutinar los eritrocitos normales, pero no los glóbulos con carga negativa reducida [18]. Debido a la importancia biológica que podría tener la captación de ácido siálico en la interacción parásito-hospedador, el objetivo de este trabajo fue estudiar la desialización eritrocitaria producida por larvas musculares de *T. spiralis*, aplicando el método de titulación de la agregación por Polibrene.

Materiales y métodos

Muestras:

Larvas musculares de T. spiralis (LM): Se utilizaron larvas L1, obtenidas de músculo de ratones de la cepa CBI infectados y liberadas por digestión artificial con pepsina y ácido clorhídrico [19]. Los ratones fueron provistos por el bioterio del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Rosario). Los protocolos para la obtención de LM, así como también de otros estadios parasitarios de *T. spiralis*, fueron aprobados por los comités de bioética de las Facultades de Ciencias Médicas y de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario), debido a que son aplicados en líneas de investigación vigentes de ambas instituciones.

Las LM fueron contadas microscópicamente por duplicado y se prepararon concentrados de larvas no viables (10.000 ± 500 larvas/ mL).

Glóbulos rojos (GR): Se trabajó con suspensiones de eritrocitos frescos Grupo O, provenientes de donantes voluntarios sanos.

Métodos:

Tratamiento de los eritrocitos: El tratamiento consistió en incubar el sedimento globular con igual volumen de concentrado larval (GR tratados). Los eritrocitos control, fueron incubados de la misma manera, con igual volumen de solución fisiológica.

En la primera experiencia se realizaron 10 repeticiones en las cuales se incubaron los GR tratados y controles durante

3 horas, con y sin agitación continua a 37 °C.

Para estudiar el curso en el tiempo de la desialización eritrocitaria, en la segunda experiencia se efectuaron otras 10 repeticiones incubando los GR (tratados y controles) durante 150 minutos a intervalos de 30 minutos a 37 °C.

En las dos experiencias realizadas, al finalizar cada uno de los tiempos de incubación, todos los eritrocitos fueron lavados 3 veces en solución fisiológica (NaCl: 0,90 g/100 mL; 308 mOsm/L - pH 4,5-7,0) y se prepararon suspensiones globulares al 20%, a partir de los sedimentos.

Método de titulación de la agregación por Polibrene: El método se aplicó simultáneamente en GR control y en los mismos eritrocitos incubados con el concentrado larval (GR tratados), para lo cual se prepararon las suspensiones globulares al 20% en solución fisiológica. Se trabajó con una solución de bromuro de hexadimetrina (Polibrene) al 0,1% (Sigma), a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas progresivas en solución fisiológica: 1/2; 1/4; 1/8...1/128). Luego, en una placa de vidrio, se adicionaron 10 µL de la suspensión globular al 20% (GR tratados y control) a 10 µL de Polibrene al 0,1% y a cada una de sus diluciones. Se mezcló con varilla de vidrio y se homogenizó mediante movimientos circulares de la placa durante un minuto. En esta etapa se produjo la agregación entre los eritrocitos con carga negativa y el policatión Polibrene. Se evaluó la carga aniónica de los GR control y GR tratados por titulación de la agregación, considerando el título a la última dilución del policatión que presentó agregación. Se consideró significativa una diferencia de título \geq a 2 diluciones entre los GR control y los GR tratados [16].

A los fines de comparar la agregación de los GR tratados con la del respectivo control, se semi cuantificó con cruces (4+; 3+; 2+; 1+; +/-; -) y se le asignó una puntuación a cada una según Goudemand y Marsalet [20], de acuerdo a la siguiente escala: (4+)=10; (3+)=8; (2+)=5; (1+)=2; (+/-)=1 (agregación apenas visible); (-)=0 (sin agregación).

Se calculó el coeficiente experimental de puntuación total (CexpST), definido como el cociente entre la puntuación total de agregación de los GR tratados y control [16]:

$CexpST = \text{puntuación total de agregación de los GR tratados con el parásito} / \text{puntuación total de agregación de los GR control}$, donde la puntuación total = $\sum S_i$ (S_i : puntuación individual).

Este coeficiente es igual a 1 cuando no hay diferencia entre la puntuación total del control y de los GR tratados (no hay modificación de ácido siálico por acción del parásito) y es igual a 0 cuando los GR tratados no agregan con el Polibrene puro (0,1%) ni con ninguna de sus diluciones (el tratamiento ocasiona la pérdida total o casi completa del ácido siálico del eritrocito, o sea que la captación del mismo es máxima).

En el estudio del curso en el tiempo de la desialización eritrocitaria, se utilizó el método de titulación de la agregación por Polibrene descrito, determinando para cada uno de los tiempos el título de los GR (control y tratados) y el CexpST.

Análisis estadístico: Se determinaron las estadísticas resumen a la variable CexpST en las incubaciones con y sin agitación. Se aplicó un análisis de varianza unifactorial y las comparaciones múltiples de Tukey, previa verificación de los supuestos exigidos, a los fines de estudiar el efecto del tiempo de incubación sobre la variable CexpST [21].

Resultados

Los resultados de la incubación durante 3 horas mostraron que la puntuación total de agregación de los GR incubados con LM fue menor que la del control en las 10 repeticiones realizadas, indicando la pérdida de ácido siálico globular.

La agitación continua durante el tratamiento favoreció el contacto entre los GR y las LM, lo que se tradujo en un valor menor de CexpST en relación al obtenido cuando los mismos glóbulos no fueron agitados durante el tratamiento. El análisis estadístico concluyó que el valor medio de CexpST en incubaciones con agitación (0,43) fue significativamente menor que el valor del coeficiente cuando no se agitaron (0,72); $p < 0,0001$.

El título de agregación de los GR tratados con agitación continua disminuyó de manera significativa en relación al control (\geq a 2 diluciones) en 4 de las 10 repeticiones, pero sólo en una de ellas se observó la misma disminución del título de los GR tratados en la incubación sin agitación. Los GR control presentaron el mismo título y puntuación total en los tratamientos con y sin agitación, demostrando que ésta no es responsable de la alteración de la carga. La tabla 1 muestra los valores obtenidos en la titulación de los GR (control y tratados) y los valores de CexpST, en las incubaciones con y sin agitación.

Con base en los resultados obtenidos, se estudió el curso en el tiempo de la desialización eritrocitaria,

Tabla 1. Títulos de agregación de GR control y tratados y valores del CexpST en tratamientos con y sin agitación.

N°	Tratamiento sin agitación			Tratamiento con agitación		
	Título GRC	Título GRT	CexpST	Título GRC	Título GRT	CexpST
1	16	8	0,98	16	8	0,56
2	16	16	0,79	16	2	0,15
3	32	16	0,77	32	8	0,56
4	8	4	0,75	8	4	0,38
5	4	4	0,68	4	4	0,42
6	16	4	0,63	16	4	0,42
7	16	16	0,67	16	8	0,47
8	16	4	0,67	16	4	0,33
9	16	8	0,61	16	4	0,50
10	32	32	0,75	32	32	0,67

N°: número de repetición. GRC: Glóbulos rojos control. GRT: Glóbulos rojos tratados.

realizando todos los tratamientos con agitación continua. La experiencia mostró que el título de los GR control disminuyó significativamente (\geq a 2 diluciones) a los 90 min de incubación en 5/10 repeticiones y a los 150 min en 9/10 repeticiones. La figura 1 muestra los valores medios de CexpST para cada uno de los tiempos estudiados.

Los análisis estadísticos determinaron que los promedios del coeficiente no fueron iguales para todos los tiempos ($p < 0,0001$). La tabla 2 muestra que los valores del coeficiente disminuyeron con el aumento del tiempo de incubación, excepto a los 120 y 150 min, donde no existieron diferencias significativas en los valores promedios de la variable.

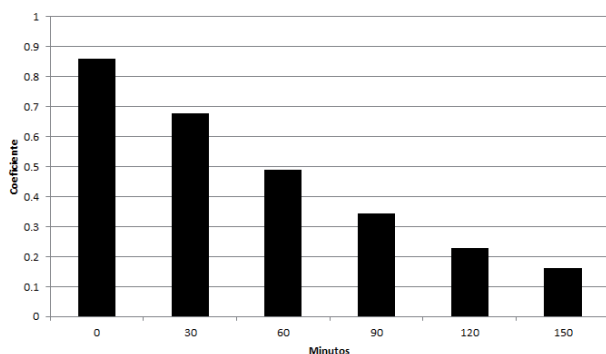


Figura 1. Valores medios del coeficiente experimental de puntuación total (CexpST) en función del tiempo.

Tabla 2. Medias aritméticas de coeficiente experimental de puntuación total (CexpST) para cada tiempo y grupos homogéneos según las comparaciones múltiples de Tukey.

Tiempos	n	Media aritmética	Grupos homogéneos
150	10	0,161	X
120	10	0,229	X
90	10	0,345	X
60	10	0,489	X
30	10	0,677	X
0	10	0,860	X

Interpretación: según las comparaciones múltiples de Tukey, cuando las X están alineadas significa que los valores de la media aritmética correspondientes a esos tiempos no presentan entre ellos diferencia significativa, mientras que cuando las X no están alineadas, los valores de la media aritmética tienen diferencias significativas en esos tiempos de incubación.

Discusión

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 inmunológico y

daño [22,23]. La glicobiología ha aportado una nueva visión, al demostrar la importancia y la participación de los glicoconjugados del hospedador y del parásito en el mecanismo de infección. En este contexto, la aplicación de técnicas inmunohematológicas ha posibilitado establecer relación entre *A. lumbricoides* y los glicoconjugados de los sistemas ABO, P y GLOB [24-27], el ácido hialurónico [28,29] y el ácido siálico [16,30].

El ácido siálico es el principal responsable de la carga eritrocitaria, pero debido a sus múltiples funciones, actualmente se reconoce su rol en la respuesta inmune, ya que está involucrado en los procesos de reconocimiento celular, vida media de células y proteínas plasmáticas, modulación y apoptosis. También inhibe la vía alternativa del complemento y es ligando de moléculas de adhesión, como por ejemplo, selectinas o sialoadhesinas, mediando adhesión celular o transducción de señales [10,11]. Si bien se ha demostrado la participación del ácido siálico en infecciones parasitarias producidas por *Trypanosoma cruzi*, *T. congolense*, *T. brucei*, *T. evansi* [5-7,31,32], *Plasmodium falciparum* [2,33], *Entamoeba histolytica* [4] y *A. lumbricoides*, aún es escasa la información relacionada a helmintos [16,30].

Muchos parásitos utilizan el ácido siálico en su mecanismo de invasión, en sus rutas metabólicas o para evadir la respuesta inmune del hospedador. *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo*, por lo que lo secuestra de los glicoconjugados del hospedador y lo transfiere a moléculas de su propia superficie, lo cual le confiere resistencia al ataque por proteínas del complemento y por anticuerpos con capacidad citolítica, así como también las moléculas sializadas estarían involucradas directamente en el reconocimiento e invasión celular [5,31]. En la tripanosomiasis debida a *T. congolense*, *T. brucei* y *T. evansi* se ha comunicado que la adhesión es mediada por estructuras filamentosas que contienen residuos de ácido siálico [7,32,34,35] y que en la infección por *P. falciparum* existen vías de invasión eritrocitarias por receptores de ácido siálico [2,33]. Chayen *et al*, han demostrado que si bien el ácido siálico se encuentra ausente en los trofozoitos y quistes de las especies de *Entamoeba*, los cambios morfológicos durante el enquistamiento de *E. histolytica* y *E. invadens* se acompañan por la aparición de nuevas glicoproteínas que lo contienen [4].

La triquinosis es una parasitosis cosmopolita. Debido a que las larvas migratorias que han llegado al músculo esquelético, pueden sobrevivir por años antes de ser ingeridas por un nuevo hospedador, y que la célula nodriza está altamente vascularizada y es rica en residuos sializados [36], se investigó la captación de ácido siálico por las LM utilizando eritrocitos como modelo de desialización. En comunicaciones previas, donde se estudió la captación de ácido siálico por *A. lumbricoides*, se aplicaron los métodos de partición en sistema bifásico acuoso (Dex/PEG) [37], espectrofotométrico de Azul de Alcian [38] y de agregación con poliacrilato Polibrene [8,16]. La aplicación de estas técnicas mostraron que las larvas del helminto captan *in*

vivo el ácido siálico de la membrana globular [9] y que el contacto *in vitro* de los GR, en medio salino y enzimático, con larvas y extractos parasitarios de *A. lumbricoides* produce la disminución de ácido siálico y la alteración de la carga superficial eritrocitaria. Los resultados obtenidos podrían relacionarse con la formación de trombos y la anemia comunicada en ascariosis [39-41], así como también sugerirían que el parásito podría secuestrar ácido siálico como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador.

El método de Polibrene, descrito por Lim [42] en placa y Mollison [18] en tubo, fue seleccionado para esta experiencia por ser más sencillo y rápido que los de partición en sistema bifásico acuoso y espectrofotométrico, fácilmente reproducible y de sensibilidad comparable al de Azul de Alcian [38]. La aplicación del método de titulación de la agregación por Polibrene posibilita además comparar la agregación de los GR tratados en relación al control, a través de la puntuación total de agregación y del CexpST, así como también semi cuantificarla al determinar los títulos de agregación de ambas suspensiones globulares (GR control y tratados) [16], por lo que puede ser aplicado fácilmente al estudio de otras infecciones. Esta simple metodología permitió comprobar que el contacto de los GR con las LM produce la disminución de ácido siálico, el cual se ve favorecido con la agitación durante la incubación y el aumento del tiempo de tratamiento. Los resultados se correlacionan con los comunicados aplicando análisis digital de imágenes [17].

El movimiento no provocó disminución de carga eritrocitaria por destrucción globular, ya que el título y la puntuación total de agregación de los GR controles fue el mismo en las incubaciones con y sin agitación, por lo que se comprobó que la pérdida de ácido siálico se debió únicamente al contacto con las larvas.

Mollison ha comunicado que la deficiencia de ácido siálico debe superar el 12% para que los hematíes no sean agregados a la concentración de Polibrene empleada (0,1%) [18]. Ninguno de los tratamientos realizados en estas experiencias provocó que los hematíes no se agregaran, por lo que la pérdida de ácido siálico debería ser inferior al 12%. El estudio del curso en el tiempo de desialización eritrocitaria por contacto con LM de *T. spiralis*, mostró que el aumento del tiempo de incubación produce el incremento de la agregación eritrocitaria, tal como se comunicó para *A. lumbricoides* [16,30].

Conclusiones

Los resultados obtenidos *in vitro* permitirían sugerir que en la infección *in vivo*, las LM podrían captar ácido siálico a partir de los residuos sializados presentes en la célula nodriza, posiblemente para utilizarlos en ruta metabólica y/o modular la respuesta inmune del hospedador.

Referencias

- Gimeno EJ, Barbeito CG. Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la Biología y de la Patología. Anales de la Academia de Agronomía y Veterinaria. 2014; 58:6-34. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29379/Documento_completo.pdf?sequence=1. Acceso: 22 de noviembre de 2015.
- 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 USA. 2009; 106:5348-52.
- 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.
- Chayen A, Avron B, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of *Entamoeba histolytica*. Infect Immun. 1988; 56:673-81.
- Souto Padron T. The surface charge of trypanosomatids. An Acad Bras Ciênc. 2002; 74:649-75.
- Nok AJ, Humprey C, Zelibe N, Yako SK. Sialidase: surface localization, properties and hydrolysis of ghost red blood cells and brain cells-identification in tripanosomiasis. Zentrabl Natur. 2003; 58:504-601.
- 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; 14:431-9.
- Ponce de León P, Biondi C, Valverde J. Efecto producido por *Ascaris lumbricoides* sobre la carga superficial eritrocitaria utilizando el Método de Polibrene. Acta Bioq Clin Latinoamer. 2010; 44:689-96.
- 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 Bioq Clin Latinoamer. 2011; 45:455-61.
- Cabezas JA. Acides sialiques: leur signification biochimique. Le Pharm Biol. 1961; 2:9-19.
- Cabezas Fernández del Campo JA. Influencia de la sialización y de la "pegilación" de la molécula de ciertos medicamentos en su actividad. An R Acad Nac Farm. 2008; 74:409-32.
- 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.
- Ashwell G, Morell AG. Galactose: a cryptic determinant of glycoprotein catabolism. In: Jamieson GA, Greenwalt TJ, eds. Glycoproteins of blood cells and plasma. 1ª ed. Philadelphia: Lippincott Company; 1971. p173.
- Chávez Guajardo EG, Saldivar Elías S, Muñoz Escobedo JJ, Moreno García. Trichinellosis una zoonosis vigente. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. 2006; 7.

- Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606/060601.pdf>. Acceso: 22 de noviembre de 2015.
15. Universidad Autónoma de México UNAM [Internet]. Departamento de Microbiología y Parasitología. Recursos en Parasitología. Uribarren Berrueta T. Trichinelosis o triquinelosis. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trichinelosis.html>. Acceso: 22 de noviembre de 2015.
 16. 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 Bioq Clín Latinoamer. 2012; 46:247-56.
 17. Ponce de León P, López Murúa G, Bertorini G, Vasconi MD, Riquelme B. Efecto biorreológico de larvas de *Trichinella spiralis* sobre la agregación eritrocitaria mediante análisis digital de imágenes. En: Ciencia y Tecnología. 1° ed. Rosario: Universidad Nacional de Rosario; 2013. pp. 452-4.
 18. Mollison PL. Transfusión de sangre en medicina clínica. 1° ed. Barcelona: Reverté; 1987.
 19. Luebke RW. Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. Methods. 2007; 41:38-47.
 20. Goudemand M, Marsalet ID. Elements d'immunohématologie. 3° ed. Paris: Flammarion; 1974.
 21. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. Estadística matemática con aplicaciones. 7ª ed. México: Thomson Learning; 2013.
 22. 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.
 23. Gutiérrez Hernández JA, Hernández Bautista VM, Huerta López JG. Respuesta inmune a virus y parásitos. Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica. 2006; 15:94-6. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2006/al063d.pdf>. Acceso: 22 de noviembre de 2015.
 24. Ponce de León P, Valverde J. ABO System: molecular mimicry of *Ascaris lumbricoides*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003; 45:107-8.
 25. Ponce de León P, Valverde J. P system antigenic determiners expression in *Ascaris lumbricoides*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003; 45:53-4.
 26. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: heterogeneidad en la expresión de epitopes ABO. Invest Clin. 2006; 47:385-93.
 27. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: capacidad inhibitoria relacionada al antígeno P1. Acta Bioq Clin Latinoam. 2007; 41:225-8.
 28. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: capacidad de unión a hialuronato. Acta Bioq Clin Latinoam. 2007; 41:519-24.
 29. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. Estados larvales de *Ascaris lumbricoides*: capacidad de unión a ácido hialurónico. Invest Clin. 2009; 50:5-12.
 30. 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 Cuba Med Trop. 2011; 63:87-90.
 31. Buscaglia C. Trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*: un blanco potencial para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá. 2002; 21:24-7.
 32. Colli W, Hemphil A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endotelial cells. Parasitol Res. 1995; 81:412-20.
 33. Colli W, Pasvol G, Wainscoat JS, Weatherall DJ. Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Nature. 1982; 297:64-6.
 34. Hemphil A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endotelial cells. Parasitol Res. 1995; 81:412-20.
 35. 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.
 36. Riva E, Steffan PE, Fiel CA. Trichinellosis: aspectos múltiples de una zoonosis global. En: Mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América Latina y el Caribe, Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2007. pp 94-109.
 37. 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.
 38. 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 Cubana Med Trop. 2011; 63:263-7.
 39. García-Leiva J, Barreto-Zuñiga R, Estradas J, Torre A. *Ascaris lumbricoides* and iron deficiency anemia. Am J Gastroenterol. 2008; 103:1051-2.
 40. Amuga GA, Onwuliri COE, Oniye SJ. Relative contribution of hookworm and *Ascaris lumbricoides* to iron deficiency anemia among school pupils in Nasarawa area, Nigeria. Int J Nat Appl Sci, 2006; 2:205-9. Disponible en: <http://www.ajol.info/index.php/ijonas/article/view/36090>. Acceso: 22 de noviembre de 2015.
 41. Beaver CH, Cupp EW, Jung RC. Parasitología Clínica. 3ª ed. México: Masson Editores; 2003.
 42. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. Transfusion Today. 2006; 66:28.