

Absorción de antígenos solubles ABH por larvas de *Ascaris lumbricoides* *in vitro*

Absortion of ABH soluble antigens by Ascaris lumbricoides larvae in vitro

► Patricia Ponce de León^{1,a}, Santiago Di Vita^{2,a}, Claudia Biondi^{3,b}, Juana Valverde^{3,b}

-
1. Bioquímica.
 2. Estudiante de Bioquímica.
 3. Doctora en Ciencias Bioquímicas.

- a. Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.
- b. Laboratorio de Inmunohematología, Hemoreología e Inmunogenética. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

Resumen

En investigaciones previas se identificaron antígenos ABH en ejemplares adultos de *Ascaris lumbricoides*. Los parásitos sólo presentaron epitopes expresados en sus respectivos hospedadores, adquiridos por absorción. Como el parásito adulto vive en el intestino delgado, podría presentarlos debido a que la larva de cuarto estadio conserva los epitopes absorbidos en la migración y los mantiene durante el proceso madurativo a adulto o bien el ejemplar adulto los adquiriría de las secreciones intestinales. El objetivo fue estudiar la absorción de epitopes solubles ABH por larvas mantenidas en cultivo. Las larvas fueron obtenidas de la eclosión de huevos y se recolectaron y cultivaron en medio RPMI. Se adicionó antígeno soluble B en tres tubos que fueron incubados 2, 3 y 6 días y antígeno soluble A en dos tubos cultivados 6 días. Cada tiempo de cultivo tuvo su control negativo de absorción, donde se investigaron productos de excreción-secreción (ES) Tipo antígenos ABH. La técnica de Inhibición de la Aglutinación Semicuantitativa demostró epitopes B en las larvas cultivadas 3 días y en las incubadas 6 días epitopes A y B. Solamente se evidenciaron productos ES símil A y B en el Control de 6 días. Se concluye que *A. lumbricoides* puede absorber determinantes ABH a partir de antígenos solubles.

Palabras clave: absorción * antígenos solubles ABH * *Ascaris lumbricoides*

Summary

Previous experiences have identified ABH antigens in *A. lumbricoides*'s adult specimens. The parasites only showed epitopes expressed in their respective hosts. It was demonstrated that epitopes are acquired by absorption by means of the culture of larvae with erythrocytes. As the adult parasite lives in the small intestine, it could be present there because the fourth stage larva retains the epitopes absorbed in the migration and keeps them during the maturation process to adult, or the adult specimen would acquire them from intestinal secretions. Larvae were obtained by hatching of eggs and they were collected and cultured in RPMI medium. The aim of this work

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Incorporada al Chemical Abstract Service.
Código bibliográfico: ABCLDL.
ISSN 0325-2957
ISSN 1851-6114 en línea
ISSN 1852-396X (CD-ROM)

was to study the ABH soluble epitopes by larvae in culture. B soluble antigen was added into three tubes, which were incubated for 2, 3 and 6 days, and A soluble antigen was poured into two tubes, both cultured for 6 days. Each culture time had its absorption Negative Control where ABH like antigen excretion/secretion products (ES) were investigated. The Semiquantitative Inhibition Agglutination Test showed B epitopes in the larvae cultured for 3 days and A and B epitopes in the larvae incubated for 6 days. Similar A and B ES products were only evidenced in the Control of 6 days. The results conclude that *A. lumbricoides* may absorb ABH antigenic determiners from soluble antigens.

Keywords: absorption * ABH soluble antigens * *Ascaris lumbricoides*

Introducción

La mejor comprensión de la biología de los parásitos y de la inmunogenética permitió conocer con mayor precisión la participación de los parásitos en el proceso evolutivo de la respuesta inmunológica del hospedador. Uno de los aspectos más interesantes de la evolución de los parásitos lo representan los mecanismos creados por éstos para evadir la inmunidad de quienes los albergan (1).

Los helmintos son de mayor tamaño y tienen estructuras y ciclos de vida más complejos que los protozoos, por lo que presentan mayor número de antígenos con especificidad de estadio (2).

Los antígenos de superficie representan para el parásito, mecanismos importantes de evasión, especialmente cuando se comparten estructuras moleculares con el hospedador, fenómeno que se conoce como "mimetismo molecular" (1). Los antígenos de Grupo Sanguíneo pueden ser receptores de invasión y algunos de ellos se encuentran presentes en la superficie de diversos microorganismos y parásitos (3-7). Si bien el significado clínico de su identificación sobre la cubierta de los patógenos no está claramente establecido, actualmente se lo relaciona con el mimetismo.

En investigaciones previas se identificaron antígenos del Sistema ABO en extractos de ejemplares adultos de *Ascaris lumbricoides* y se observó que los parásitos sólo presentaban determinantes antigénicos que estaban expresadas en sus respectivos hospedadores (8-11). Se cultivaron estadios larvales con eritrocitos (antígenos particulados) de distintas especificidades ABO y se demostró que la absorción es el mecanismo por el cual *A. lumbricoides* adquiere estos epitopes (12).

En los nematodos la transición de una etapa de vida a la siguiente se caracteriza por una muda, en la cual se sintetiza la nueva cubierta y la anterior se elimina. Esto origina que los estadios puedan ser morfológica y antígenicamente distintos (2).

A. lumbricoides presenta durante su ciclo biológico cuatro mudas larvales. Las tres primeras (L1, L2 y L3) se desarrollan en el medio ambiente, en el interior de

los huevos. Cuando éstos son ingeridos, eclosionan en intestino y las larvas de tercer estadio (L3) penetran en la mucosa y comienzan su migración por el torrente circulatorio hasta llegar a los pulmones. Las larvas rompen el endotelio de los alvéolos, ascienden por los bronquiolos y bronquios a la faringe, donde son deglutidas, para regresar nuevamente al aparato digestivo. Algunos autores consideran que en los pulmones las larvas L3 sufren una nueva muda a larva de cuarto estadio (L4), mientras otros señalan que la última muda ocurre en intestino.

Las larvas L4 crecen y maduran a machos y hembras en el duodeno, siendo el yeyuno el hábitat principal de los ejemplares adultos (13).

Debido a que se había demostrado previamente que las larvas podían absorber determinantes antigénicos del Sistema ABO a partir de eritrocitos (12), la identificación de estos epitopes en la cutícula del parásito adulto sugiere dos explicaciones posibles. La primera considera que la larva L4 conservaría los epitopes absorbidos en la migración y los mantendría durante el proceso madurativo a estado adulto. La segunda sostiene que tanto L4 como el ejemplar adulto podrían adquirir las determinantes antigénicas a partir de las secreciones intestinales. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue estudiar la absorción de epitopes solubles ABH por larvas mantenidas en cultivo.

Materiales y Métodos

Obtención de estadios larvales de A. Lumbricoides

Se trabajó con huevos del helminto obtenidos de heces y concentrados por el método de flotación de salmuera (13). Los huevos lavados en agua destilada fueron colocados en SO₄H₂ 0,1 N durante 12 a 24 días a 37 °C hasta la observación microscópica de huevos larvados (14). Se consideró que los estados larvales eran una mezcla de larvas de primer y segundo estadio (L1/ L2) debido a comunicaciones sobre el tiempo requerido

para el desarrollo de la larva durante la embrionación *in vitro* (15). El sedimento fecal con los huevos larvados se neutralizó con *buffer* fosfato 0,5 M pH 7, se lavó con agua destilada, y se removió la cubierta de los huevos con hipoclorito de sodio 1% a 37 °C en atmósfera del 5% de CO₂ (30 min). Posteriormente se lavó en agua destilada estéril y en el mismo *buffer* suplementado con antibióticos (vancomicina 300 µg/mL; colistina 750 µg/mL; nistatina 1250 U/mL; trimetoprima 500 µg/mL). Los huevos larvados se colocaron en el medio de eclosión a 37 °C agitando constantemente 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) (14).

Las larvas (L1/ L2) fueron recolectadas por el método de Baermann-Moraes (16) en medio RPMI 1640 a las 2 horas a la misma temperatura. Completada la recolección fueron concentradas por centrifugación y se procedió al recuento de larvas en microscopio óptico, por duplicado. Se determinó que el concentrado de larvas ([CLAL]) tenía una cantidad de 2500 a 3000 larvas/ mL).

Cultivo de estadios larvales de A. lumbricoides

Se prepararon 4 Tubos (Tubos 1, 2, 3 y 4) con 5 mL y 4 (Tubos 5, 6, 7 y 8) con 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 1% de la mezcla de antibióticos descrita y 1% de complejo (Concentraciones finales del complejo en g/L: Vitamina B12 0,010; L-glutamina 10,000; CLH guanina 0,030; Adenina 1,000; Ácido p-aminobenzoico 0,013; L-cistina 1,100; NAD –coenzima 1- 0,250; Cocarboxilasa 0,100; Nitrato férrico 0,020; CLH tiamina 0,003; CLH cisterna 25,900; Glucosa 100,000). En todos los Tubos se sembró 1 mL de [CLAL].

Los Tubos 1, 5 y 7 fueron usados como Controles negativos y para investigar productos de Excreción/ Secreción (ES) Tipo o Símil antígenos ABO. En los restantes se agregaron 30 µL de saliva por cada mL de RPMI. La saliva de individuo secretor A fue adicionada a los Tubos 2 y 3 y la de secretor B a los Tubos 4, 6 y 8.

Los Tubos 1, 2, 3 y 4 fueron cultivados 6 días, los Tubos 5 y 6, 48 horas y los Tubos 7 y 8, 72 horas, a 37 °C en atmósfera de N₂-CO₂-O₂ (90-5-5).

Investigación de antígenos ABO en las larvas

Finalizado el tiempo de cultivo, las larvas (L1/ L2) de los Tubos donde se había agregado saliva, fueron separadas por migración utilizando el método de Baermann-Moraes (13) y se las recolectó en solución fisiológica (SF). Las larvas fueron lavadas en SF, concentradas por centrifugación (2500-3000 rpm) y posteriormente se re-

alizó el recuento de cada [CLAL] recuperado del cultivo.

Las larvas de los Tubos Controles fueron separadas y concentradas por centrifugación (2500-3000 rpm). Se efectuaron los contajes de larvas de cada uno.

Todos los recuentos se hicieron por duplicado en microscopio óptico.

Se utilizó la técnica de Inhibición de la Aglutinación Semicuantitativa (IAS) (17), y se prepararon 2 series de diluciones geométricas seriadas de anti A y anti B monoclonal comercial (Marca Wiener: anti-A: lote 0808013940; anti-B: lote 0905027770) (volumen final 25 µL).

En la primera serie se agregó 25 µL de SF a todos los tubos y en la segunda igual volumen de [CLAL]. Se dejó en contacto 30' a temperatura ambiente. Se reveló agregando 25 µL de una suspensión al 2-5% de eritrocitos frescos de isogrupo. Se consideró significativa una diferencia de Título igual o mayor a dos diluciones entre ambas series. Se incluyó un Testigo negativo de aglutinación en cada prueba, para lo que se utilizó el [CLAL] del Tubo Control correspondiente.

Investigación de productos de excreción/ secreción (ES) Tipo Grupo Sanguíneo ABO de las larvas

Los medios RPMI separados de los Tubos Controles (tubos 1, 5 y 7) se concentraron por centrifugación a 2500-3000 rpm durante 15'. En los sedimentos se realizó IAS (17), utilizando anti-A y anti-B monoclonales comerciales (Wiener, lote: anti-A 0808013940; anti-B 0905027770). Se prepararon dos series de diluciones de los anticuerpos (volumen final 25 µL). A la primera serie se le agregó 25 µL de SF y a la segunda serie igual volumen del medio RPMI concentrado. El sistema revelador fue una suspensión de eritrocitos de isogrupo (2-5%). Se determinó el Título del anticuerpo monoclonal en las dos series y se consideró significativa una diferencia de Título igual o mayor a dos diluciones entre ambas.

Procesamiento de la saliva de individuos secretores (17)

Se determinó la presencia de antígenos solubles ABH en saliva, por el Método de Inhibición de la Aglutinación (IA) utilizando anticuerpos anti-A y anti-B monoclonales comerciales (Wiener, lote: anti-A 0808013940; anti-B 0905027770) y una suspensión de eritrocitos frescos isogrupo al 2-5%.

Las salivas de individuos secretores ABO fueron sometidas a 5 ciclos de congelamiento (-20 °C) y descongelamiento, durante 2 o 3 días. Se centrifugaron (2.500-3.000 rpm) y se separaron los sobrenadantes que fueron titulados por IA. Ambas se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Resultados

Identificación de epitopes ABO en las larvas

Los Títulos de anti-A y anti-B para las salivas de individuos secretores A y B respectivamente fueron 512.

Los Tubos 5 (Control negativo) y 6 (con saliva de individuo secretor B) fueron cultivados 2 días. El recuento de [CLAL] en ambos determinó la cantidad de 600-800 larvas/ mL. IAS no demostró epitopes A ni B en ninguno de ellos.

Los Tubos 7 (Control negativo) y 8 (con saliva de individuo secretor B) se cultivaron durante 3 días. La recuperación de larvas fue notablemente mayor a la de los Tubos anteriores (Tubo 7: 2200 – 2500 larvas/ mL; Tubo 8: 2000- 2200 larvas/ mL). IAS identificó epitopes B en el [CLAL] del Tubo 8.

Los Tubos restantes fueron cultivados por 6 días. En el Tubo 1 (Control negativo) el recuento fue de 1400-1600 larvas/ mL. IAS identificó epitopes A en los Tubos

2 y 3 (1400- 1500 larvas/ mL), donde se había adicionado saliva de individuo secretor A y epitopes B en el Tubo 4 (1200- 1400 larvas/ mL) donde se incorporó antígeno soluble B.

En ninguno de los [CLAL] incubados con antígenos solubles se evidenciaron epitopes de distinta especificidad ABO a la de la saliva adicionada al cultivo.

Las pruebas realizadas en los [CLAL] de los Tubos Controles demostraron que las larvas, por sí mismas, no presentan estos epitopes.

Los resultados se muestran en la Tabla I.

Identificación de Productos de ES Tipo Grupo Sanguíneo ABO de las larvas

La aplicación de la técnica de IAS en los medios RPMI concentrados de los Tubos Controles, solamente evidenció productos de ES Tipo o Símil A y B en el Tubo 1, en el cual las larvas fueron cultivadas durante 6 días.

Los resultados se muestran en la Tabla II.

Tabla I. *Técnica de IAS: identificación de epitopes ABO en las larvas.*

[CLAL]	Título de anti-A Primera serie	Título de anti-A Segunda serie	Título de anti-B Primera serie	Título de anti-B Segunda serie
Tubo 5 (cultivo 2 días) (Control negativo) 600- 800 larvas/ mL	32	32	64	64
Tubo 6 (cultivo 2 días) (con saliva secretor B) 600- 800 larvas/ mL	32	32	64	32
Tubo 7 (cultivo 3 días) (Control negativo) 2200- 2500 larvas/ mL	32	32	64	64
Tubo 8 (cultivo 3 días) (con saliva secretor B) 2000- 2200 larva/mL	32	16	64	16
Tubo 1 (cultivo 6 días) (Control negativo) 1400- 1600 larvas/ mL	32	32	64	64
Tubo 2 (cultivo 6 días) (con saliva secretor A) 1400- 1500 larvas/ mL	32	Inhibición Total	64	64
Tubo 3 (cultivo 6 días) (con saliva secretor A) 1400- 1500 larvas/ mL	32	Inhibición Total	64	64
Tubo 4 (cultivo 6 días) (con saliva secretor B) 1200- 1400 larvas/ mL	32	16	64	8

Tabla II. Técnica de IAS: identificación de productos ES Tipo o Símil ABO de las larvas

Medio RPMI concentrado	Título de anti-A Primera serie	Título de anti-B Segunda serie	Título de anti-B Primera serie	Título de anti-B Segunda serie
Control Negativo (sin larvas)	32	32	16	16
Tubo 5 (cultivo 2 días)	32	32	16	16
Tubo 7 (cultivo 3 días)	32	32	16	16
Tubo 1 (cultivo 6 días)	32	Inhibición Total	16	4

Discusión y Conclusiones

Durante la evolución, los parásitos desarrollaron diversas estrategias para evadir al sistema inmune del hospedador, dificultando la elaboración de vacunas eficaces. En este contexto, los antígenos de superficie representan para los parásitos extracelulares, mecanismos importantes de evasión (1).

El "mimetismo molecular" interfiere en el reconocimiento específico realizado por las células inmunes. La presencia de epitopes similares a los del hospedador no induce la activación de los linfocitos T y/ o B o lo hace en forma poco eficiente (18).

Recientemente se ha comunicado que los antígenos de Grupo Sanguíneo están involucrados en el mimetismo (3). *S. mansoni* presenta antígenos ABH sobre su superficie cuando es cultivado con sangre humana. Se demostró que la presencia de una determinada especificidad sobre la superficie de los parásitos es dependiente de la especificidad de los eritrocitos agregados al medio de cultivo (19-21). Experiencias previas mostraron que *A. lumbricoides* presenta el mismo comportamiento, ya que los estados larvarios presentan únicamente el antígeno A, B o H al ser cultivados con eritrocitos A, B u O respectivamente (12).

Los antígenos ABH participan en el recambio y el tráfico transcelular y tienen gran importancia para la interacción celular durante el desarrollo y crecimiento. Algunos antígenos pluritisulares son productos secundarios de genes que codifican glucosiltransferasas específicas y su expresión está bajo regulación sinérgica de varios sistemas genéticos, entre los que se encuentran los Sistemas ABO, H, I, LE y los relacionados con el carácter secretor del individuo (22) (23).

Los antígenos del Sistema ABO se expresan en glóbulos rojos y otras células del organismo, como así también en distintas secreciones. Están presentes en la membrana del glóbulo rojo en forma de glicoesfingolípidos. Aproximadamente el 80% de la población es secretora y presenta los mismos antígenos expresados en sus eri-

trocitos, en forma de glicoproteínas, en saliva, lágrimas, leche, bilis, jugo gástrico y otras secreciones (24-26).

El ciclo de vida de *A. lumbricoides* incluye una migración de larvas por el torrente circulatorio. Según algunos autores, las larvas de tercer estadio (L3) sufren una nueva muda a larva de cuarto (L4) en los pulmones. Otros investigadores sostienen que la última muda ocurriría en el intestino (27). En esta última localización, las larvas L4 crecen y maduran a machos y hembras adultos. El pasaje de un estadio a otro va acompañado por la segregación de una nueva cubierta. La antigua se desprende entera o en fragmentos, pero puede ser absorbida parcialmente por la nueva. En el ejemplar adulto no hay mudas, pero la cutícula continúa expandiéndose mientras el parásito crece (28).

En investigaciones previas, la técnica de IAS demostró que las larvas de *A. lumbricoides* pueden absorber epitopes a partir de antígenos ABH particulados (12), su utilización en esta experiencia permitió comprobar que también los pueden absorber de antígenos solubles.

Los resultados obtenidos indican que si el hospedador es ABO secretor, el helminto podría adquirir las determinantes antigénicas a partir de las secreciones presentes en el intestino; probablemente ambos estadios del desarrollo intestinal del parásito (L4 y adulto) puedan absorberlas en ese ambiente.

Si bien aún no se puede descartar la hipótesis de que la última muda larval conserve total o parcialmente los epitopes absorbidos durante su migración, es lógico considerar que las determinantes antigénicas ABO identificadas en el adulto provienen principalmente de antígenos solubles, ya que si las únicas posibilidades de adquisición de epitopes para el parásito ocurriesen durante la migración, la diferencia de tamaño existente entre L4 y adulto diluirían tanto los antígenos ABH en la cutícula de este último, que posiblemente no pudiesen ser identificados por IAS.

La experiencia realizada demostró la adquisición de epitopes por las larvas a partir del tercer día de cultivo.

La técnica de IAS permitió estimar, en base a la diferencia de Título del anticuerpo entre las dos series, la cantidad de determinantes antigénicas absorbidas por los estados larvales. Los resultados sugieren que el [CLAL] cultivado 6 días presentó mayor cantidad de epitopes B que el de 72 horas.

No se evidenciaron epitopes B en el [CLAL] incubado 48 horas, posiblemente debido a que la cantidad de larvas recuperadas de este cultivo, fue marcadamente menor a las cantidades recuperadas de los medios incubados durante 3 y 6 días.

En 1975 Savigny informó que las larvas de segundo estadio de *Toxocara canis*, cultivadas *in vitro* excretaban o secretaban sustancias antigénicas dentro del medio de cultivo. Estas sustancias se llamaron productos de excreción/secreción (ES) (29) (30).

Los productos ES se originan en los órganos secretorios del parásito (glándula esofágica y poro secretor). En su mayoría son glicoproteínas, no específicas de especie, por lo que pueden reaccionar con anticuerpos séricos de individuos con toxocariasis u otras patologías (31).

Smith *et al.*, comunicaron que los productos de ES de las larvas de *T. canis* unen anti-A y anti-B humano y producen elevados títulos de isoaglutininas contra A y B que pueden provocar reacciones cruzadas con los anticuerpos ABO del hospedador (32).

Los productos ES Tipo o Símil ABO (A y B) de larvas de *A. lumbricoides* ya habían sido detectados en experiencias previas, aplicando la técnica de IAS. Estas sustancias fueron identificadas en el medio de cultivo (cantidad inicial de RPMI: 3 mL) sembrado con 1100 a 1200 larvas/mL durante 10 días y concentrado después de la separación de las larvas (12). En esta investigación, los medios de cultivo fueron sembrados con 2500 a 3000 larvas/mL. Los productos ES sólo se identificaron en el cultivo de 6 días (cantidad inicial de RPMI: 5 mL). La técnica de IAS no los detectó en los cultivos de 48 y 72 horas a pesar de que las larvas estaban más concentradas porque había menor cantidad de medio RPMI. Espinosa *et al.*, utilizaron condiciones similares a las de esta experiencia para la recolección de antígeno excretado-secretado de *T. canis* con el objeto de estandarizar la técnica ELISA. Estos investigadores incubaron las larvas en RPMI con antibióticos a 37 °C durante 7 días (33). Sin embargo, otros autores, utilizando pruebas de Western Blot, caracterizaron los productos de ES de larvas de *Ascaris suum* incubadas 24 y 46 horas a 37 °C en medio *Minimum Essential Medium* (MEM Eagles-Sigma) con antibióticos (34).

Se ha comunicado que los antígenos ES de *A. lumbricoides* son potencialmente más antigénicos que los antígenos somáticos que provienen de la gruesa cutícula del parásito (34) (35). Se ha logrado identificar los antígenos de excreción/secreción de la larva L2, así como de L3 y L4 de *A. lumbricoides* utilizando la técnica de inmunoprecipitación, encontrando antígenos que tienen un

peso molecular que varía de 14 a 410 KDa. También se ha observado homología en cuanto a niveles moleculares e inmunológicos entre los productos de ES de *A. lumbricoides* y los de *A. suum* (34) (36) (37).

Los resultados de esta experiencia y los obtenidos en investigaciones previas, permiten concluir que *A. lumbricoides* absorbe determinantes A y B a partir de glicoproteínas (antígenos solubles) o glicolípidos (antígenos particulados), por lo tanto el parásito en todas las etapas evolutivas del ciclo biológico que se desarrollan dentro del hospedador (estadios larvales y ejemplar adulto), podría adquirir epitopes ABH.

CORRESPONDENCIA

DRA. PATRICIA PONCE DE LEÓN

Laboratorio de Parasitología. Dpto. de Microbiología

Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas

Suipacha 531

2000 ROSARIO, Santa Fe

E-mail: tefu1958@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Barnes KC. Parasite evolution and the immune system. *Allergy Clin Immunol Int* 2005; 17 (6): 229-36.
2. Caballero Soto ML. Inmunología de la infección por helmintos. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1998; 13 (6): 299-313.
3. Salmon C. Les groupes sanguins ou l'écriture des genes. París: Mason; 1997.
4. Garraty G. Asociación entre grupos sanguíneos y enfermedad. ¿Desempeñan un papel biológico los antígenos-anticuerpos de los grupos sanguíneos? *Rev Argent Transf* 1997; 23: 217-29.
5. Alphen L, Poole J, Overbeek J. The Anton blood group antigens is the erythrocyte receptor for *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microb Lett* 1986; 37: 69.
6. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B₁₉ parvovirus. *Science* 1993; 262: 114-7.
7. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the duffy blood group antigen. *Blood* 1997; 89(9): 3077-91.
8. Ponce de León P, Valverde J, Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2000; 42 (5): 295-6.
9. Ponce de León P, Valverde J. ABO System: Molecular mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45 (2): 107-8.
10. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. H Antigen presence in an *Ascaris lumbricoides* extract. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005; 47 (3): 159-60.
11. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: heterogeneidad en la expresión de epitopes ABO. *Invest Clin* 2006; 47 (4): 385-93.

12. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. Identificación de epitopes Tipo Grupo Sanguíneo ABO en larvas de *Ascaris lumbricoides* mantenidas in vitro. Acta Bioquim Clin Latinoam 2009; 43 (1): 21-6.
13. Beaver P, Jung R, Cupp EW. Parasitología Clínica. 2º Ed. Buenos Aires: Salvat; 1986.
14. Fairbairn D. The in vitro hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. Can J Zool 1961; 39: 153-62.
15. 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): 616-22.
16. Shore García L, Ash L. Diagnóstico parasitológico. 2ª Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1983.
17. Marcelli A, Fine JM, Homberg JC, Ribat I. Techniques in Immunohematologie. París: Flammarion; 1981.
18. Fainboim L. Introducción a la Inmunología Humana. 5ª Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005.
19. Clegg J, Smithers S, Terry J. Acquisition of human antigens by *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. Nature 1971; 232: 653-5.
20. Thompson A. Molecular mimicry in schistosomes. Trends Parasitol 2001; 17: 168.
21. Goldring OL, Clegg JA, Smithers R, Terry RJ. Acquisition of human blood group by *Schistosoma mansoni*. Clin Exp Immunol 1976; 26: 181-7.
22. Mollison PI, Emgelfriet CP, Contreras P. Clinical Medicine. 9ª Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1993.
23. Campi C, Escovich L, Racca A, García Borrás S, Racca L, Cotorruelo C et al. Pérdida de la expresión antigénica ABH en pacientes con lesiones orales precancerosas y cancerosas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2008; 24(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086402892008000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es (Fecha de acceso 8 de abril de 2010).
24. Schoroeder ML. Wintrobe's Clinical Hematology. 10ª Ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.
25. Herrera Parga JM. Fundamentos de Medicina. 5ª Ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1998.
26. Dueñas V. El Banco de Sangre. 2ª Ed. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2003.
27. Beaver CH, Cupp EW, Jung RC. Clínica de Craig Faust. 3ª Ed. México: Masson Editores; 2003.
28. Campbell NA, Reese JB, Lawrence G, Reese M. Biología: conceptos y relaciones. 3ª Ed. México: Pearson Educación; 2001.
29. Savigny DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J Parasitol 1975; 61(4):781-2.
30. Sugane K, Oshima T. Purification and characterization of secretory and excretory antigen of *Toxocara canis* larvae. Immunol 1983; 50: 113-20.
31. Santillán GS. Caracterización de proteínas específicas para el diagnóstico de *Toxocara canis*. Tesis de la Maestría en Biología Molecular. Buenos Aires: Inst Nac Parasitol Administr Nac Laborat e Instit de Salud Dr. Carlos G Malbrán; 2000.
32. Smith HV, Kusel JR, Girdwood RW. "The production of human A and B blood group like substances by in vitro maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on the outer larval surfaces and in their excretions/ secretions". Clin Exp Immunol 1983; 54 (3): 625-33.
33. Espinoza Y, Huapaya P, Suárez R, Chavéz V, Sevilla C, Dávila E, et al. Estandarización de la técnica de Elisa para el diagnóstico de toxocariasis humana. An Fac med 2003; 64 (1): 7-12.
34. Escalante H, Liñan R, Díaz E, Davelois K, Huamanchay O. Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. Parasitol latinoam 2005; 60: 132-7.
35. Knox DP, Kennedy MW. Proteinases released by the parasitic larval stages of *Ascaris suum*, and their inhibition by antibody. Mol Biochem Parasitol 1988; 28: 207-16.
36. Kasuga-Aoki H, Tsuji N, Susuki K, Arakawa T, Matsumoto Y, Yoshihara S. Identification of larval-stage of *Ascaris suum* recognized with immune sera from pigs. J Vet Med Sci 2001; 63: 683-5.
37. Kennedy MW, Qureshi F. Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stage of the nematode *Ascaris*. Immunology 1995; 58: 512-22.

Aceptado para su publicación el 1 de noviembre de 2010