

***Ascaris lumbricoides*: heterogeneidad en la expresión de epitopes ABO.**

Patricia Ponce-León¹, Patricia Foresto² y Juana Valverde².

¹Departamento de Microbiología, Área de Parasitología,

²Departamento de Bioquímica Clínica, Área de Inmunoematología, Inmunogenética y Hemorreología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.

Correo electrónico: tefu1958@hotmail.com

Palabras clave: *Ascaris lumbricoides*, expresión, epitopes ABO.

Resumen. *Ascaris lumbricoides* puede presentar los mismos epitopes del Sistema ABO que sus hospederos. El objetivo fue estudiar la expresión de epitopes ABO en el parásito por la técnica de Inhibición de la Aglutinación usando diferentes anticuerpos monoclonales y sueros policlonales. Se trabajó con 27 extractos parasitarios (14 de pacientes A, 2 AB, 1 B y 10 de Grupo ABO desconocido). Los extractos de pacientes A, AB y Grupo desconocido fueron enfrentados a anticuerpos monoclonales y suero policlonal de especificidad A; y los de pacientes B, AB y Grupo desconocido a anticuerpos monoclonales y suero policlonal de especificidad B. Se hizo la Inhibición Semicuantitativa a los extractos que inhibieron la aglutinación de algún anticuerpo. Se observó que el 50% de los extractos enfrentados a anticuerpos de especificidad A y el 46% de los enfrentados a anticuerpos de especificidad B inhibieron la aglutinación de forma significativa. Ningún extracto inhibió a la totalidad de los anticuerpos. Todos los anticuerpos reaccionaron con algún extracto, excepto un anticuerpo de especificidad B. La actividad ABO del extracto fue independiente de la clase de inmunoglobulina, concentración y título del anticuerpo; Se observó que sólo depende de la unión del anticuerpo al epitope al cual está dirigido. La heterogeneidad en la expresión de epitopes ABO de *A. lumbricoides* podría estar involucrada en la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Las técnicas de Inhibición utilizadas son sensibles, sencillas, rápidas y económicas. Se concluye que el uso de diferentes anticuerpos monoclonales permite la mejor definición de la especificidad antígeno-anticuerpo.

***Ascaris lumbricoides*: heterogeneity in ABO epitopes expression.**

Invest Clin 2006; 47(4): 393

Key words: *Ascaris lumbricoides*, ABO epitopes, expresión.

Abstract. *Ascaris lumbricoides* and its hosts can present the same ABO System epitopes. The aim was to study ABO epitopes expression in *A.lumbricoides* by Inhibition Agglutination Test using different monoclonal antibodies and policlonal sera. We worked with 27 parasite extracts (14 extracts from A Group patients, 2 AB Group 1, B Group and 10 from unknown ABO Group patients). Inhibition Agglutination Test was made facing the extracts from A, AB and unknown ABO Group patients against monoclonal antibodies and policlonal serum of A specificity and the extracts from B, AB and unknown ABO Group patients against monoclonal antibodies and policlonal serum of B specificity. The Semiquantitative Test was made with the extracts which inhibited the agglutination of any antibody. The 50% of the parasite extracts faced against A specificity antibodies and the 46% of the parasite extracts faced against B specificity antibodies significantly inhibited the agglutination in the Semiquantitative Test. No extract inhibited the totality of the antibodies. All the antibodies reacted with some extract, except one antibody of B specificity. The ABO activity in the extracts was independent of the antibody's immunoglobulin class, titre and concentration and it only was dependent on the antibody union with the epitope at which the antibody is directed. The heterogeneity in the ABO epitopes expression of *A.lumbricoides* might be involved in the escape of the host's immune response. The used Inhibition Tests are sensitive, simple, rapid and economic. We conclude that the use of different antibodies allows the best definition of the antigen-antibody specificity.

Recibido: 02-02-2006. Aceptado: 04-05-2006.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los Grupos Sanguíneos en el hombre ha sido uno de los acontecimientos más importantes de la biología, siendo el Sistema ABO el primero en ser descrito a principios del siglo pasado por Landsteiner.

La observación de antígenos eritrocitarios similares a los hallados en humanos, en otras especies dio comienzo al estudio de la serología comparativa de los Grupos Sanguíneos en un intento para explicar el origen evolutivo de las especies (1). Actual-

mente se acepta que muchos microorganismos y parásitos pueden portar antígenos de Grupo Sanguíneo, aunque aún el significado clínico de este hecho se desconoce (2-6). Estos antígenos eritrocitarios fueron identificados por pruebas de Inhibición de la Aglutinación o técnicas de Inmunofluorescencia (7). El desarrollo de anticuerpos monoclonales permitió distinguir pequeñas diferencias de reactividad en antígenos de varias especies (1).

Ascaris lumbricoides puede presentar los mismos epitopes del Sistema ABO que sus hospederos. Las experiencias previas

realizadas demostraron que los epitopes ABO encontrados en extractos de este nematode coinciden con los epitopes ABO de los pacientes de los que se obtiene el parásito, así como también se comprobó la ausencia de epitopes A y B en extractos parasitarios provenientes de pacientes Grupo O (8, 10).

El mecanismo más probable por el que *A. lumbricoides* presenta esta coincidencia de epitopes ABO con los de su hospedero sería por adsorción (8, 9), pero otro mecanismo que podría ser utilizado por el parásito, es la síntesis de moléculas superficiales para modificar la expresión de carbohidratos cuticulares, tal como fue comunicado para algunos nematodes de vida libre (11). Los epitopes ABO son de naturaleza glucocídica, y por lo tanto se puede pensar que *A. lumbricoides* tendría la capacidad de sintetizarlos.

El objetivo fue estudiar la expresión de epitopes del Sistema ABO en *A. lumbricoides* por medio de la técnica de Inhibición de la Aglutinación usando diferentes anticuerpos monoclonales y sueros policlonales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 27 extractos de *A. lumbricoides* (EA): 14 provenientes de pacientes Grupo A, 2 de Grupo AB, 1 de Grupo B y 10 de pacientes a los que no se les pudo determinar el Grupo Sanguíneo ABO porque no remitieron muestras de suero. Los extractos fueron seleccionados teniendo en cuenta el Grupo ABO de los pacientes, que previamente fue determinado por técnicas inmunohematológicas convencionales.

Los extractos se prepararon a partir de ejemplares adultos de *A. lumbricoides* que se obtuvieron: 12 por eliminación del parásito después del tratamiento específico de los pacientes y 15 por eliminación espontánea.

Para preparar los extractos, los parásitos fueron lavados 3 veces en solución fisiológica

durante un tiempo total de 1 a 2 horas, se continuó con los lavados en solución fisiológica suplementada con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomocina y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina durante otras 2 horas y finalmente se eliminó los restos de antibióticos con nuevos lavados en solución fisiológica durante 30 minutos a 1 hora. Se procedió a la remoción quirúrgica de las cutículas, y trituración en mortero con el agregado de solución fisiológica hasta un volumen final aproximado de 3 mL. Durante 5 días se hizo ruptura mecánica refrigerada. Los extractos finalmente fueron centrifugados a 2000-2500 rpm durante 30 minutos y se recolectaron los sobrenadantes que fueron conservados hasta el momento de uso a -20°C con una concentración final de timerozal 1:10.000 (12, 13).

Se realizó la prueba de Inhibición de la Aglutinación enfrentando los EA a anticuerpos monoclonales y a sueros policlonales en dosis óptimas durante 10 minutos usando como sistema revelador una suspensión globular fresca de isogrupo al 5% (14). Para determinar la dosis óptima se tituló el anticuerpo (diluciones al medio) con la suspensión eritrocitaria de trabajo. La dosis óptima es la dilución del anticuerpo correspondiente a la inversa del título dos veces menor al obtenido (14).

De acuerdo a los resultados previos publicados (8, 10), se estudió el comportamiento de los EA seleccionados enfrentándolos a los anticuerpos de la misma especificidad de sus hospederos. Los extractos provenientes de pacientes a los que no se les pudo determinar el Grupo Sanguíneo ABO se incorporaron al experimento enfrentándolos a todos los anticuerpos (anti-A y anti-B) considerando que algunos EA podrían pertenecer a pacientes Grupo A, B o AB. Por lo tanto, los EA provenientes de pacientes Grupo A, AB y de los pacientes de Grupo ABO desconocido (total: 26 EA) se enfrentaron a 7 anticuerpos monoclonales

de especificidad A y a suero policlonal anti-A (todos los anticuerpos fueron previamente titulados para la suspensión de eritrocitos A utilizada en el experimento).

Los EA provenientes de pacientes Grupo B, AB y de los pacientes de Grupo ABO desconocido (total: 13 EA) se enfrentaron a 9 anticuerpos monoclonales de especificidad B y a suero policlonal anti-B (previa titulación de los anticuerpos para la suspensión de eritrocitos B utilizada en la experiencia).

Los anticuerpos monoclonales fueron suministrados por "Monoclonal Antibodies against Blood Group Antigens" (Workshop, París, 2001). Las características de producción de los anticuerpos monoclonales (especificidad, tipo de inmunoglobulina y concentración) y el título que se determinó para la suspensión globular de isogrupo utilizada en el experimento, se muestran en la Tabla I.

Los sueros policlonales anti-A y anti-B fueron mezclas de sueros obtenidas a partir de un grupo de individuos normales. El título determinado en los dos sueros policlonales (anti-A y anti-B) para las respectivas suspensiones eritrocitarias de isogrupo fue 4.

La técnica de Inhibición de la Aglutinación es cualitativa y los aglutinados muy finos a veces pueden no ser fácilmente observados. Por lo tanto, se realizó la Prueba de Inhibición de la Aglutinación Semicuantitativa a los EA que inhibieron la aglutinación de algún anticuerpo monoclonal y/ o suero policlonal con los eritrocitos de isogrupo. Para realizar esta técnica se hicieron dos baterías de diluciones al medio del anticuerpo (desde puro hasta 1:1024) con un volumen final de 25 μ L en cada tubo. A la primera batería se le agregó 25 μ L de solución fisiológica a todos los tubos y a la segunda igual volumen de EA. Después de 10

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Anticuerpo Monoclonal	Especificidad	Clase de Inmunoglobulina	Concentración (μ g/mL)	Título
2.7	A	IgM	0,7	64
2.11	A	IgM	49,9	256
2.18	A	IgM	59,9	32
2.20	A	IgM	51,9	32
2.22	A	IgM	89,6	256
2.23	A	IgM	< 0,5	16
2.28	A ₄	IgM	< 0,5	8
2.45	B	IgM	12	64
2.51	B	IgM	6,8	32
2.54	B	IgG ₃	< 0,5	16
2.55	B	IgM	71,8	64
2.57	B	IgM	45,3	128
2.58	B	IgM	86,3	16
2.59	B	IgM	36	512
2.62	B	hIgM	< 0,5	64
2.63	B	IgM	13	8

minutos ambas se revelaron con una suspensión de eritrocitos frescos de isogrupo al 5% y se determinó el título del anticuerpo en cada batería.

Si el EA estudiado presenta epitopes ABO, reacciona con el anticuerpo lo que origina una menor concentración de anticuerpo libre y por lo tanto el título será menor que en la batería donde se agrega solución fisiológica en lugar del extracto parasitario. Se considera significativa la inhibición de la aglutinación en la prueba Semicuantitativa cuando la diferencia de títulos entre las 2 baterías es mayor o igual a 2 (14).

RESULTADOS

De los 26 EA enfrentados a anticuerpos de especificidad A, 14 (8 EA de pacientes Grupo A, 1 Grupo AB y 5 EA de pacientes de Grupo ABO desconocido) inhibieron la aglutinación de algunos anticuerpos con los eritrocitos de isogrupo.

A estos 14 EA se les realizó la técnica Semicuantitativa. Se observó que sólo un extracto correspondiente a un paciente Grupo A no presentó inhibición significativa, mientras que los 13 EA restantes inhibieron la aglutinación con una diferencia de título del anticuerpo entre las dos baterías mayor o igual a 2.

Todos los sueros monoclonales y el suero policlonal de especificidad A fueron inhibidos por al menos uno de los extractos parasitarios. Los resultados de la prueba Semicuantitativa se muestran en la Tabla II.

De los 13 EA enfrentados a anticuerpos de especificidad B, 6 (1 EA de paciente Grupo AB y 5 EA de pacientes Grupo ABO desconocido) inhibieron la aglutinación de algunos anticuerpos con los eritrocitos B. Se les realizó la prueba Semicuantitativa y se observó que los 6 extractos inhibieron la aglutinación de por lo menos un anticuerpo de especificidad B con los eritrocitos de iso-

grupo, con una diferencia de título del anticuerpo igual o mayor a 2.

El anticuerpo monoclonal 2.63 fue el único de especificidad B que no fue inhibido por ninguno de los extractos. Los resultados se muestran en la Tabla III.

Se observa en las Tablas II y III que 5 extractos (1 EA de paciente Grupo AB y 4 EA de pacientes de Grupo ABO desconocido) reaccionaron con anticuerpos de ambas especificidades (A y B).

Ninguno de los EA estudiados inhibió la aglutinación de todos los anticuerpos a los que fueron enfrentados.

DISCUSIÓN

La experiencia realizada demostró la heterogeneidad de la expresión de epitopes del Sistema ABO en los extractos de *A. lumbricoides*. El 50% (13 EA) de los 26 EA estudiados con anticuerpos de especificidad A y el 46% (6 EA) de los 13 EA estudiados con anticuerpos de especificidad B inhibieron la aglutinación de forma significativa en el ensayo Semicuantitativo, indicando la presencia de epitopes A y/o B en estos extractos. Los resultados obtenidos muestran que ninguno de ellos inhibió la aglutinación de la totalidad de los anticuerpos a los que fueron enfrentados.

La variabilidad en la expresión de antígenos en las cubiertas de los nematodos, puede ser una ventaja para la evasión del sistema inmune, independientemente que esta variabilidad sea natural del parásito o bien que la presente por adquisición de moléculas del hospedero (15, 16).

Los nematodos pueden tener naturalmente variabilidad intra-específica en la expresión de epitopes de superficie, lo que tiene una considerable participación en el desarrollo de la inmunidad frente a los nematodos (15). Las posibilidades para esta variabilidad son: la existencia de diferencias metabólicas entre los distintos estados lar-

TABLA II
INHIBICIÓN SEMI-CUANTITATIVA: TÍTULOS DE LOS ANTICUERPOS DE ESPECIFICIDAD A

Anticuerpos de Especificidad A	2.7	2.11	2.18	2.20	2.22	2.23	2.28	Suero policlonal
Título	64	256	32	32	256	16	8	4
Título frente al EA 1 (A)	64	256	32	32	256	16	2	4
Título frente al EA 2 (A)	4	128	8	16	32	16	2	IT
Título frente al EA 3 (A)	2	128	2	16	32	16	2	4
Título frente al EA 4 (A)	2	256	2	16	16	16	8	4
Título frente al EA 5 (A)	64	256	32	32	128	16	8	4
Título frente al EA 6 (A)	64	256	32	32	256	16	2	4
Título frente al EA 7 (A)	64	256	32	32	256	16	IT	4
Título frente al EA 8 (A)	64	256	32	32	256	16	2	4
Título frente al EA 9 (AB)	64	128	32	32	8	16	IT	4
Título frente al EA 10 (D)	4	256	32	16	64	16	2	4
Título frente al EA 11 (D)	64	256	32	32	16	16	8	4
Título frente al EA 12 (D)	4	64	32	8	4	16	IT	4
Título frente al EA 13 (D)	32	256	16	32	128	16	2	IT
Título frente al EA 14 (D)	64	256	32	32	128	IT	2	IT

IT: el extracto inhibió totalmente la aglutinación del anticuerpo con los eritrocitos A. Los títulos de los anticuerpos en negritas son los que mostraron una diferencia de 2 o más diluciones al ser enfrentados al extracto. () Grupo ABO del paciente del que se obtuvo el EA: (A) Grupo A; (AB) Grupo AB; (D) Grupo ABO desconocido.

TABLA III
INHIBICIÓN SEMI-CUANTITATIVA: TÍTULOS DE LOS ANTICUERPOS DE ESPECIFICIDAD B

Anticuerpos de Especificidad B	2.45	2.51	2.54	2.55	2.57	2.58	2.59	2.62	2.63	Suero policlonal
Título	64	32	16	64	128	16	512	64	8	4
Título frente al EA 9 (AB)	64	32	16	16	128	16	512	64	8	4
Título frente al EA 10 (D)	64	4	4	16	32	16	512	8	8	4
Título frente al EA 11 (D)	16	4	16	32	64	16	512	64	8	4
Título frente al EA 13 (D)	64	IT	16	32	16	IT	64	64	8	4
Título frente al EA 14 (D)	64	4	16	64	128	IT	512	64	8	IT
Título frente al EA 15 (D)	64	2	4	32	128	16	512	16	8	IT

IT: el extracto inhibió totalmente la aglutinación del anticuerpo con los eritrocitos A. Los títulos de los anticuerpos en negritas son los que mostraron una diferencia de 2 o más diluciones al ser enfrentados al extracto. () Grupo ABO del paciente del que se obtuvo el EA: (AB) Grupo AB; (D) Grupo ABO desconocido.

varios que se refleja en la síntesis de antígenos superficiales, así como se ha sugerido para explicar la heterogeneidad intra-clonal en larvas de *Schistosoma mansoni* (17); diferencia en la expresión de genes; o existencia de antígenos superficiales polimórficos dentro de la población de parásitos, como se ha comunicado para *Onchocerca lienalis* (18).

Sea cual fuera la causa de la variabilidad en la expresión antigénica, podría indicar una ventaja selectiva de miembros de una población parásita con respecto a la respuesta inmune del hospedero y también una heterogeneidad en la inmunidad adquirida debida a exposiciones previas (15).

La heterogeneidad también puede deberse a la presencia de moléculas del hospedero sobre la superficie del nematodo. Los parásitos tienen la capacidad de escapar de la respuesta inmune del hospedador por varias estrategias que incluyen la evasión del reconocimiento específico (mediado por anticuerpos o linfocitos T) o por supresión de la respuesta inmune innata o adaptativa generada por el hospedero. Para la evasión del reconocimiento específico pueden enmascararse o cubrirse con antígenos del hospedador (Mimetismo) (16).

Actualmente se llama "mimetismo molecular" a la presencia de moléculas del hospedero sobre la superficie del parásito adquiridas de forma activa o pasiva. Se ha comprobado que la variación antigénica es un mecanismo de escape utilizado por diversas clases de protozoos (16). *Schistosoma* puede expresar sobre su superficie proteínas del hospedero muy variadas como moléculas clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, receptores de inmunoglobulinas, α -2 macroglobulina y antígenos de Grupo Sanguíneo, lo que ilustra la diversidad de las estructuras involucradas en el mimetismo (19).

En este estudio, la selección de los extractos y los anticuerpos a los que fueron

enfrentados para la Prueba de Inhibición, se hizo teniendo en cuenta el Grupo ABO del paciente del que se obtuvo el parásito. En las investigaciones previas publicadas, los EA fueron evaluados con anticuerpos de distintas especificidades, y los resultados mostraron que los epitopes determinados en los extractos siempre se correspondían con los del hospedero (8, 10). En esta investigación se decidió incorporar los extractos provenientes de pacientes a los que no se le pudo determinar el Grupo Sanguíneo ABO. El comportamiento de estos EA fue estudiado con todos los anticuerpos (especificidad A y B), debido a la posibilidad de que sus hospederos fueran Grupo A, B, o AB. Se encontró 5 EA (4 Grupo ABO desconocido y 1 Grupo AB) que inhibieron la aglutinación de anticuerpos de especificidad A y B, demostrando la presencia en el parásito de epitopes de ambas especificidades.

Todos los anticuerpos monoclonales y los sueros policlonales utilizados en las experiencias, reaccionaron con al menos uno de los extractos, a excepción del anticuerpo 2.63 (de especificidad B), indicando que este anticuerpo monoclonal no está dirigido hacia ninguno de los epitopes presentes en los extractos estudiados.

Se observó mejor inhibición de los EA frente a los anticuerpos monoclonales que a los policlonales. La causa probable de estos resultados puede ser debida a las características de los anticuerpos utilizados. Los reactivos monoclonales suministrados por "Monoclonal Antibodies against Blood Group Antigens" (Workshop, París, 2001), son de excelente calidad y pureza, dirigidos hacia un único epitope específico. Muchos de estos monoclonales tenían altas concentraciones y altos títulos determinados para las suspensiones eritrocitarias de la experiencia. Los reactivos policlonales fueron mezclas de sueros de individuos normales (generalmente estos sueros policlonales tienen un título no mayor a 8, en algunas ra-

ras ocasiones 16). Los sueros policlonales utilizados para esta experiencia tenían un título: 4 para las suspensiones globulares de isogrupo. Este valor de título determina que en la prueba Semicuantitativa, (donde se considera significativa una diferencia entre ambas baterías de por lo menos 2 títulos), se esté trabajando en el límite de sensibilidad de la técnica (14).

La expresión de la actividad ABO en los extractos resultó ser independiente de la clase de inmunoglobulina, concentración y título de los anticuerpos utilizados en la prueba de Inhibición de la Aglutinación y sólo pareciera depender de la unión del anticuerpo con el epítipo al cual está dirigido, coincidiendo con observaciones previas realizadas sobre expresión de epítopes del Sistema P en extractos de *A. lumbricoides* (20).

Sería interesante habiendo ya comprobado la heterogeneidad en la expresión de epítopes en *A. lumbricoides*, poder determinar si el parásito y su hospedero presentan la misma heterogeneidad, debido a que si ambos tuvieran la misma variedad de epítopes, significaría que este nematode tiene capacidad de adsorción y/o de síntesis de diversas determinantes antigénicas, probablemente con la finalidad de asemejarse a su hospedero. También se podría saber si este parásito puede adquirir todos o sólo algunos de los epítopes de su hospedador.

La heterogeneidad de expresión de epítopes demostrada, también debe considerarse para la estandarización de métodos. Es indispensable conocer las características de los anticuerpos utilizados, pues se podrían obtener resultados no reproducibles en las experiencias en las que se use anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un epítipo específicamente determinado o anticuerpos monoclonales comerciales. Los anticuerpos monoclonales comerciales de uso corriente en las pruebas inmunohematológicas son mezclas y no permiten visualizar estas diferentes reactividades.

La técnica de Inhibición de la Aglutinación y la técnica de Inhibición Semicuantitativa tienen muy buena sensibilidad, y la ventaja de ser metodologías rápidas, sencillas y económicas, que las hace accesibles a cualquier laboratorio sin necesidad de infraestructura especial.

Se concluye que el uso de diferentes anticuerpos monoclonales permite la mejor definición de la especificidad antígeno-anticuerpo.

REFERENCIAS

1. Nieto-Gallegos MD. Antígenos eritrocitarios compartidos. Rev Arg Transf 1998; 24: 295-311.
2. Alphen I, Poole J, Overbeek J. The Anton blood group antigen is the erythrocyte receptor for *Haemophilus influenzae*. FEMS Microbiol Lett 1986; 37:69.
3. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B₁₉ parvovirus. Science 1993; 262: 114-117.
4. Garraty G. Asociación entre grupos sanguíneos y enfermedad. ¿Desempeñan un papel biológico los antígenos-anticuerpos de los grupos sanguíneos? Rev Arg Transf 1997; 23:217-229.
5. Hadley TJ, Miller LH, Haynes JD. Recognition of red cells by malaria parasites: the role of erythrocyte-binding proteins. Trans Med Rev 1991; 5:108-122.
6. Miller LH, Mason LJ, Dovack JA, MacGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for *Plasmodium knowlesi* malaria: duffy blood group determinants. Science 1975; 189:561-563.
7. Salmon CH. Les groupes sanguins ou l'écriture des genes. 2nd Ed. París: Mason; 1997; pp. 427- 433.
8. Ponce-León P, Valverde J, Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris lumbricoides*. Rev Inst Med Trop S Paulo 2000; 42:295-296.
9. Ponce-León P, Valverde J. ABO System: Molecular mimicry of *Ascaris lumbricoides*. Rev Inst Med Trop S Paulo 2003; 45:107-108.

10. **Ponce-León P, Foresto P, Valverde J.** H Antigen presence in an *Ascaris lumbricoides* extract. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005; 47:159-160.
11. **Blaxter ML, Page AP, Rudin W, Maizels RM.** Nematode Surface Coats: Actively Evading Immunity. *Parasitology Today* 1992; 8:243-247.
12. **Capron A, Biguet J, Vernes A, Afchain D.** Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path Biol* 1968; 16:121-138.
13. **Monroy-Ostria A, Gomez-Gutiérrez IJ, Ramírez-Ramírez A, Carrillo-Landin G.** Reconocimiento por inmunotransferencia de antígenos de *Taenia solium* y su larva. *Rev Latinoamer Microbiol* 1992; 34:33-38.
14. **Marcelli A, Fine JM, Homberg JC, Ribat I.** Techniques in Inmunohematologie. 1^{ra} Ed. París: Flammarion, 1981; pp. 31- 32.
15. **Fraser EM, Kennedy MW.** Heterogeneity in the expression of surface-exposed epitopes among larvae of *Ascaris lumbricoides*. *Parasite Immunol* 1991; 13: 219-225.
16. **Fainboim L.** Introducción a la Inmunología Humana. 5^{ta} Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2005; pp. 398- 403.
17. **Jones JT, Kusel JR.** Intra-specific variation in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Today* 1989; 5:37-39.
18. **Bianco AE, Robertson BD, Kuo YM, Townson S, Ham PJ.** Developmentally regulated expression and secretion of a polymorphic antigen by *Onchocerca* infective-stage larvae. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39:203-212.
19. **Salzet A, Capron A, Stefano GB.** Molecular Crosstalk in Host-Parasite Relationships: Schistosome- and Leech- Host Interactions. *Parasitology Today*. 2000; 16:536-540.
20. **Ponce-León P, Valverde J.** P System antigenic determiners expression in *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45:53-54.