

Ascaris lumbricoides: epitopes del Sistema P por método de cinética de la hemaglutinación

Ascaris lumbricoides: P system epitopes by haemogglutination kinetics method

► Patricia Ponce de León¹, Patricia Foresto², Juana Valverde²

-
1. Bioquímica.
 2. Doctora en Bioquímica.

Área de Parasitología. Área de Inmunohematología, Hemorreología e Inmunogenética. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Resumen

Experiencias previas demostraron epitopes P_1 en *Ascaris lumbricoides* por inhibición de la aglutinación. La cinética de la hemaglutinación aplica la extinción óptica relativa producida por un haz de luz transmitido a través de una suspensión de pequeñas partículas, y permite obtener una estimación paramétrica de la tasa de hemaglutinación. El objetivo de este trabajo fue utilizar este método para demostrar la presencia de epitopes del Sistema P en extractos de *A. lumbricoides*. La técnica de inhibición de la aglutinación permitió seleccionar 10 extractos: 3 con y 7 sin epitopes P_1 . Se registró la cinética de la reacción Control: anti- P_1 - eritrocitos - P_1 y la cinética de la misma reacción, previo contacto del anticuerpo con el extracto. Se calcularon y se compararon los valores de Δ EOR % (variación en el porcentaje de extinción óptica relativa) para ambas reacciones. Los resultados evidenciaron la presencia de epitopes P_1 , que no habían sido detectados por inhibición de la aglutinación, en 3 extractos. Para los extractos restantes, hubo coincidencia entre los resultados obtenidos por los dos métodos. La cinética de la hemaglutinación es sencilla, rápida y fácilmente adaptable para las experiencias en que se necesite evaluar una reacción antígeno-anticuerpo a través de la hemaglutinación.

Palabras clave: cinética de la hemaglutinación * epitopes P_1 * *Ascaris lumbricoides*

Summary

Previous experiences have demonstrated P_1 epitopes in *Ascaris lumbricoides* by inhibition agglutination. Haemogglutination kinetics applies the relative optical extinction produced on a light beam transmitted through a suspension of small particles, giving a parametric estimate of the haemagglutination rate. The aim was to use this method for the demonstration of P System epitopes presence in *A. lumbricoides* extracts. inhibition agglutination test enabled the selection of 10 extracts: 3 with and 7 without

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

P₁ epitopes. Kinetics of anti- P₁ - P₁ erythrocyte control reaction and kinetics of the same reaction with a previous contact between antibody and extract were registered. Δ EOR % values (relative optical extinction variation) for both reactions were calculated and compared between themselves. The results proved P₁ epitopes presence in 3 extracts, which had not been detected by inhibition agglutination. The results coincided for the remaining extracts by both methods. Haemagglutination kinetics is simple and fast and it is easily adapted for experiences in which the investigator needs to assess the antibody-antigen reaction by haemagglutination.

Key words: haemagglutination kinetics * P₁ epitopes * *Ascaris lumbricoides*

Introducción

Muchos antígenos de grupo sanguíneo han sido detectados en parásitos, pero se desconoce el significado clínico de este hecho. El Sistema de Grupo Sanguíneo P tiene un único antígeno: P₁, que se expresa en linfocitos, granulocitos, monocitos y plaquetas y se encuentra en forma soluble en huevos blancos de paloma y en líquido de quiste hidatídico (1). Los epitopes del Sistema P fueron identificados en especies de *Echinococcus* sp, *Ascaris suum*, *Fasciola gigántica*, *Paragonimus westermani* y *Dicrocoelium dendriticum* (2). Experiencias previas demostraron su presencia en extractos de *Ascaris lumbricoides* por técnicas de inhibición de la aglutinación (3) (4). Estos epitopes pueden estar presentes en pequeñas cantidades en los extractos parasitarios y la utilización de técnicas de mayor sensibilidad incrementa la posibilidad de detección.

El método de cinética de la hemaglutinación fue adaptado para la identificación de epitopes del Sistema ABO en *A. lumbricoides* y se comprobó su mayor sensibilidad con respecto a la inhibición de la aglutinación (5).

La cinética de la hemaglutinación aplica la extinción óptica relativa producida por un haz de luz transmitido a través de una suspensión de pequeñas partículas (glóbulos rojos y sus aglutinados). La extinción óptica relativa decrece cuando aumenta el tamaño de los aglutinados, y permite obtener una estimación paramétrica de la tasa de hemaglutinación (6).

El objetivo de este trabajo fue demostrar la presencia de epitopes del Sistema P en extractos de *A. lumbricoides* utilizando el método de cinética de la hemaglutinación.

Materiales y Métodos

Se prepararon extractos de *A. lumbricoides* (EA) por remoción quirúrgica de la cutícula de ejemplares adultos y ruptura mecánica refrigerada (7) (8). Se realizó la técnica de inhibición de la aglutinación enfrentando los extractos parasitarios a anticuerpo monoclonal

anti- P₁ en dosis óptimas, utilizando una suspensión de eritrocitos frescos bromelinizados como sistema revelador (9). El anticuerpo monoclonal anti- P₁ fue suministrado por "Monoclonal Antibodies against Blood Group Antigens" (Workshop, París, 2001). Los resultados de la prueba de inhibición de la aglutinación permitieron seleccionar 3 extractos parasitarios que presentaron epitopes P₁ (EA 1; EA 5; EA 9) y 7 que no evidenciaron determinantes antigénicas del Sistema P (EA 2, EA 3; EA 4; EA 6; EA 7; EA 8; EA 10)

Para la aplicación del método de cinética de la hemaglutinación, el anticuerpo monoclonal anti- P₁ fue titulado (diluciones al medio) con una suspensión al 5% de eritrocitos frescos P₁. Los eritrocitos fueron previamente tratados con bromelina 15 min a 37 °C. La dosis óptima es la dilución del anticuerpo correspondiente a la inversa del título dos veces menor al obtenido (9).

Las lecturas de absorbancia se efectuaron en fotocolorímetro Andali Digital (Rosario, Argentina) a 660 nm. El aparato se calibró, estableciendo el cero de la escala con el anticuerpo y el 100 de la escala se determinó con la mezcla del anticuerpo (en dosis óptima) y la suspensión globular.

El instante de calibración del 100 de la escala es considerado como el inicio de la reacción (tiempo cero). Para ello se mezclan 500 μ L de anticuerpo diluido en su dosis óptima con 500 μ L de la suspensión eritrocitaria y se dispara el cronómetro. Se agita el tubo de reacción 15 segundos por inversión manual para favorecer las colisiones erráticas entre los hematíes, se coloca inmediatamente en el fotocolorímetro, se deja en reposo otros 15 s y se lee el valor de absorbancia al cumplirse los 30 s (valor de absorbancia inicial).

Se registra la cinética de la hemaglutinación de la reacción control: anti- P₁ - eritrocitos P₁ durante 10 min, con lecturas de absorbancia cada 30 s siguiendo los mismos ciclos de agitación, reposo y lectura. El valor de absorbancia inicial corresponde al 100% y para cada valor de absorbancia registrado se determina el porcentaje de extinción óptica relativa al tiempo de lectura. Se calcula Δ EOR % (variación en el porcentaje de extinción óptica relativa) como la diferencia entre la extin-

ción óptica inicial (100%) y la final (a los 10 minutos). Este parámetro representa una estimación de la tasa de hemaglutinación para la reacción control.

Para estudiar los extractos parasitarios, el anticuerpo se diluye de tal manera que la dilución corresponda a la inversa del título 3 veces menor al obtenido en la titulación.

Los extractos parasitarios son enfrentados a esta dilución del anticuerpo monoclonal durante 30-60 min, a 4 °C colocando 500 µL del extracto y 500 µL de anticuerpo (el anticuerpo queda ahora diluido en su dosis óptima).

Luego se mide la cinética de la hemaglutinación de igual forma que con la reacción control, registrando la absorbancia inicial al momento de agregar la suspensión eritrocitaria, y prosiguiendo con las lecturas cada 30 s durante 10 min. Se calcula el Δ EOR % para cada reacción anti- P₁ con extracto-eritrocitos.

Si el extracto carece de epitopes del Sistema P, el valor de Δ EOR % obtenido será similar al valor de Δ EOR % de la reacción control. Cuando el extracto presenta determinantes antigénicas de este sistema, éstas reaccionan con el anticuerpo monoclonal, lo que determina una menor cantidad de anticuerpo libre para unirse a la suspensión eritrocitaria. La cantidad de aglutinado formado será menor y el valor de Δ EOR % inferior al de la reacción control (6).

El método de cinética de la hemaglutinación desarrollado por Rasia y cols. para la reacción anticuerpos anti-A- eritrocitos A (6) fue modificado para determinar epitopes del Sistema P.

Las modificaciones realizadas fueron:

1. Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 660 nm en vez de 750 nm, para lograr mayor pendiente en las curvas de reacción, coincidiendo con observaciones previas donde se identificaron por este método epitopes B en extractos de *A. lumbricoides* (5).
2. La suspensión globular se preparó al 5% a partir de eritrocitos en medio enzimático de bromelina (15 minutos a 37 °C). El medio enzimático favorece la aglutinación entre antígenos y anticuerpos del Sistema P.

Las experiencias fueron realizadas por duplicado y se consideró el valor promedio de Δ EOR % para cada reacción control y reacción con el EA.

Se aplicó la prueba estadística de Mc Nemar Exacta para estudiar la sensibilidad en la detección de epitopes del Sistema P por cinética de la hemaglutinación y por inhibición de la aglutinación (10). Se analizó también la influencia de la variación relativa (VR) de los valores de Δ EOR % de las reacciones controles utilizando la fórmula estadística que expresa en porcentajes la variación de un valor con respecto a otro tomado como referencia (10).

$$VR = \frac{\text{Valor } \Delta \text{ EOR } \% \cdot 100}{\text{Valor } \Delta \text{ EOR } \% \text{ Control}}$$

Resultados

PRIMERA EXPERIENCIA

Se comparó la Cinética de la reacción control (anticuerpo anti- P₁ . eritrocitos P₁) con la cinética de la misma reacción, previo contacto del anticuerpo con el EA1 y el EA 2. El EA 1 había presentado epitopes P₁ en la prueba de inhibición de la aglutinación mientras que el EA 2 no los había evidenciado con esa técnica.

El Δ EOR % obtenido para esta primera reacción control (control 1) fue 19,05%. Los valores observados de Δ EOR % para la reacción con EA 1 y EA 2 fueron inferiores (7,09% y 3,42% respectivamente), demostrando por este método la presencia de epitopes del Sistema P en ambos extractos.

SEGUNDA EXPERIENCIA

Se evaluó la cinética de la reacción control entre el anticuerpo y una nueva suspensión globular (control 2) y se la comparó con la misma reacción, previo contacto del anticuerpo con EA 3 y EA 4. Ninguno de estos extractos había presentado epitopes P₁ por inhibición de la aglutinación.

Los resultados corroboraron la ausencia de epitopes P₁ en los extractos, pues el valor del parámetro Δ EOR % de la reacción control (8,23%), fue similar al obtenido para las reacciones con los extractos (8,27% y 8,09%).

TERCERA EXPERIENCIA

La cinética de la reacción entre el anticuerpo y la suspensión globular utilizada mostró un valor de Δ EOR % para esta reacción control (control 3) de 8,42%. Los valores de este parámetro para la misma reacción, pero enfrentando previamente el anticuerpo a los extractos parasitarios fueron: 2,95% (EA 5); 8,4% (EA 6); 8,15% (EA 7); 1,76% (EA 8); 1,82% (EA 9) y 2,01% (EA 10).

La técnica de inhibición de la aglutinación había demostrado epitopes P₁ en los EA 5 y EA 9 y ausencia de estas determinantes antigénicas en los EA 6 y EA 7, coincidiendo con los resultados observados por cinética de la hemaglutinación. Los EA 8 y EA 10, que no habían mostrado epitopes del Sistema P por inhibición de la aglutinación, presentaron determinantes antigénicas P₁ cuando se evaluó la cinética de la reacción.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La prueba de Mc Nemar Exacta se aplicó para determinar si existen diferencias en las proporciones de

detección de epitopes P₁ entre el método de cinética de la hemaglutinación y el de inhibición de la aglutinación. Se concluye que no existen diferencias significativas en la proporción de detección de epitopes por ambas metodologías ($p = 0,25$).

En las tres experiencias se utilizaron distintas suspensiones globulares, y se obtuvieron diferentes valores de Δ EOR % para la reacción control. Para analizar la influencia del grado de variación relativa (VR) del control en la técnica de cinética de la hemaglutinación, se evaluó cuál es el porcentaje del control que representa el valor obtenido en la misma reacción con el EA.

Para la primera experiencia, donde el Δ EOR % control es 19,05%, VR es 37,11% (EA 1) y 17,95% (EA 2), marcando una diferencia significativa entre el valor de la reacción control y el valor de la reacción con los extractos parasitarios. Se demuestra, de esta manera, la presencia de epitopes del Sistema P en los dos EA.

Para la segunda experiencia, el Δ EOR % control es 8,23%, VR es 100,49% (EA 3) y 98,30% (EA), lo que demuestra la ausencia de epitopes P₁ pues no existen diferencias entre los valores de Δ EOR % control y los obtenidos en las reacciones con los extractos.

Para la tercera experiencia, donde el Δ EOR% control es 8,42%, los valores de VR son: 99,76% (EA 6); 96,79% (EA 7); 35,04% (EA 5); 23,87% (EA 10); 20,90% (EA 8); 21,62% (EA 9). No hay diferencia significativa entre el valor de la reacción control y los valores de las reacciones con los EA 6 y EA 7, por lo que se corrobora que dichos extractos carecen de epitopes del Sistema P. Se demuestra diferencia significativa entre los valores del control y los valores obtenidos para las reacciones con los EA 5, EA 8, EA 9 y EA 10, y se determina en esos extractos la presencia de epitopes P₁.

Los resultados de los métodos de cinética de la hemaglutinación y de inhibición de la aglutinación fueron coincidentes demostrando la presencia de epitopes del Sistema P en EA 1, EA 5 y EA 9 y la ausencia de los mismos en EA 3, EA 4, EA 6 y EA 7.

La prueba de cinética de la hemaglutinación permitió demostrar la presencia de determinantes antigénicas P₁ en tres extractos (EA 2, EA 8 y EA 10).

Los resultados se muestran en la Tabla I.

Discusión y Conclusiones

Investigaciones previas permitieron demostrar la presencia de epitopes de los Sistemas P y ABO en extractos de *A. lumbricoides* (3-5) (11) (12). Aunque el significado clínico de este hecho no está aún claramente dilucidado, se cree que el parásito podría utilizarlos para el mimetismo molecular. Debido a las similitudes bioquímicas entre los Sistemas P y ABO, se cree que los glicolípidos de membrana podrían estar involucrados en el mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero (3). Los antígenos de Grupo Sanguíneo han sido identificados usualmente en especies parásitas por las técnicas de inhibición de la aglutinación e inmunofluorescencia (2).

El método de cinética de la hemaglutinación tiene mayor sensibilidad que el de inhibición de la aglutinación, debido a que evalúa la tasa de aglutinación, permitiendo la detección de pequeñas variaciones en las cantidades de aglutinado formado (6). El valor paramétrico Δ EOR% (diferencia entre la extinción óptica inicial y final) representa una estimación de la agluti-

Tabla I. Resultados del método de cinética de la hemaglutinación para determinar epitopes del Sistema P en *A. lumbricoides*.

| Valores/ reacciones | Absorbancia inicial | % EOR inicial | Absorbancia final | % EOR final | Δ EOR % |
|------------------------|------------------------|------------------|----------------------|----------------|----------------|
| Control 1 | 1.680 | 100 | 1.360 | 80,95 | 19,05 |
| Control 1 con EA 1 *IA | 1.778 | 100 | 1.652 | 92,91 | 7,09 * CH |
| Control 1 con EA 2 | 1.665 | 100 | 1.608 | 96,58 | 3,42 * CH |
| Control 2 | 1.568 | 100 | 1.439 | 91,77 | 8,23 |
| Control 2 con EA 3 | 1.559 | 100 | 1.430 | 91,73 | 8,27 |
| Control 2 con EA 4 | 1.458 | 100 | 1.340 | 91,91 | 8,09 |
| Control 3 | 1.900 | 100 | 1.740 | 91,58 | 8,42 |
| Control 3 con EA 5 *IA | 1.593 | 100 | 1.546 | 97,05 | 2,95 * CH |
| Control 3 con EA 6 | 1.905 | 100 | 1.745 | 91,60 | 8,40 |
| Control 3 con EA 7 | 1.890 | 100 | 1.736 | 91,85 | 8,15 |
| Control 3 con EA 8 | 1.793 | 100 | 1.757 | 97,99 | 2,01 * CH |
| Control 3 con EA 9 *IA | 1.588 | 100 | 1.560 | 98,24 | 1,76 * CH |
| Control 3 con EA 10 | 1.593 | 100 | 1.564 | 98,18 | 1,82 * CH |

EA Extracto de *A. lumbricoides*.
 * IA Extracto parasitario con epitopes P₁ evidenciados por inhibición de la aglutinación.
 *CH Extracto parasitario con epitopes P₁ evidenciados por cinética de la hemaglutinación.

nación en la reacción antígeno- anticuerpo (6). Este método puede ser utilizado con fines inmunohematológicos, o microbiológicos. En las experiencias descritas, la comparación entre el valor de Δ EOR % de una reacción control y el valor de Δ EOR % de la misma reacción, previo contacto del extracto con el anticuerpo, permite la detección de epitopes del Sistema P en el parásito.

Los resultados previos obtenidos al evaluar la presencia de epitopes del Sistema ABO en *A. lumbricoides* por inhibición de la aglutinación y cinética de la hemaglutinación, demostraron la mayor sensibilidad de este último método (5). En estas experiencias, si bien los resultados mostraron la presencia de determinantes antigénicos P₁ que no habían sido evidenciadas por inhibición de la aglutinación en tres extractos parasitarios, no se pudo corroborar estadísticamente la mayor sensibilidad de la cinética de la hemaglutinación con respecto al método de inhibición de la aglutinación. La prueba de Mc Nemar exacta no evidenció diferencias significativas entre la detección por ambas metodologías, probablemente debido al pequeño número de determinaciones utilizadas.

Se concluye que el método de cinética de la hemaglutinación es sencillo, rápido y fácilmente adaptable para las experiencias en que se necesite evaluar una reacción antígeno-anticuerpo a través de la hemaglutinación.

CORRESPONDENCIA

DRA. PATRICIA PONCE DE LEÓN

Área de Parasitología.

Fac.Cs. Bioq. y Farm. UNR

Suipacha 531

2000 ROSARIO. Argentina

E-mail: tefu1958@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Daniels GL, Fletcher A, Garraty G, Henry S, Jorgensen J, Judd WJ, *et al.* Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for red cell surface antigens. *Vox Sanguinis* 2004; 87: 304-15.
2. Salmon C. Les groupes sanguins ou l'écriture des genes. París: Mason; 1997.
3. Ponce de León P, Valverde J. P System epitopes in *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44: 115-6.
4. Ponce de León P, Valverde J. P System antigenic determiners expression in *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45: 53-4.
5. Ponce de León P, Valverde J. ABO System: molecular mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45: 107-8.
6. Rasia JR, García Rosasco M, Valverde de Rasia J, Foresto P. Evaluación de la cinética de la hemaglutinación por medio de una técnica fotométrica simple. *Sangre* 1989; 34: 368-70.
7. Capron A, Biguet J, Vernes A, Afchain D. Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path Biol* 1968; 16: 121-38.
8. Monroy-Ostria A, Gomez-Gutierrez IJ, Ramírez-Ramírez A, Carrillo-Landin G. Reconocimiento por inmunotransferencia de antígenos de *Taenia solium* y su larva. *Rev Lat-amer Microbiol* 1992; 34: 33-8.
9. Marcelli A, Fine JM, Homberg JC, Ribat I. Techniques in Inmunohematologie. París: Flammarion; 1981.
10. Armitage P, Berry G. Estadística para la Investigación Biomédica. Madrid: Harcourt Brace; 1997.
11. Ponce de León P, Valverde J, Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42: 295-6.
12. Ponce de León P, Foresto, P, Valverde J. H Antigen presence in an *Ascaris lumbricoides* extract. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005; 47: 159-60.

Aceptado para su publicación el 1 de febrero de 2007

