

ACTIVIDAD HEMOLITICA Y AGLUTINANTE NATURAL EN VARIAS
ESPECIES DE ANUROS DEL NOROESTE ARGENTINO.

por FRANCISCO M. FERNANDEZ *

Se encuentra en la literatura varios trabajos en los cuales se comunica o se cita los hallazgos de actividad aglutinante o hemolítica sobre glóbulos rojos de mamíferos por parte de sueros sanguíneos de vertebrados inferiores (Gigli y Austen, 1971; Sanchez y Gajardo, 1980; Kawaguchi et al., 1980; Jurd, 1978). En cada caso se trata el hallazgo como excepcional y se demuestra el caracter inmunológico de dicha actividad mediante el aislamiento de los anticuerpos responsables. Quisimos averiguar la extensión del fenómeno y, paralelamente a un trabajo destinado a estudiar la actividad hemolítica del suero de *Bufo paracnemis* que se trata aparte, se han efectuado determinaciones de la capacidad hemolítica y aglutinante del suero de varias especies de anuros del NOA, lográndose los resultados que se describen a continuación.

Curiosamente, y al contrario de lo que podría esperarse, hemos comprobado que la actividad hemolítica o aglutinante es más bien la regla que la excepción entre los anuros estudiados. Para llevar a cabo los ensayos se usaron las técnicas convencionales. Todos los animales fueron capturados en la provincia de Tucumán salvo *L. laticeps* y algunos ejemplares de *B. arenarum* que provenían de Santiago del Estero. Se extrajo sangre por punción cardíaca a los

animales pertenecientes a las especies listadas en el Cuadro I y el suero resultante de centrifugación se ensayó para hemólisis sobre eritrocitos de ratón al 5%. Una alícuota de cada uno de los sueros se inactivó a 56°C durante 30' y se utilizó para aglutinación. Los resultados representados como Lg₂ de los títulos correspondientes se muestran en el cuadro. La mayor capacidad de aglutinación corresponde a *L. laticeps*; por otra parte *B. spinulosus* y *O. americanus* no mostraron actividad hemolítica pero sí aglutinante. En el caso de *C. cranwelli* se encontró que dos de los cinco ejemplares estudiados no poseían actividad hemolítica pero todos aglutinaban los eritrocitos del roedor. También en todos los casos el efecto sobre los eritrocitos de rata, caninos y humanos fue similar. En todos se encontró el mismo patrón con ligeras diferencias en los títulos. Para comprobar si esta actividad se ejercía uniéndose a una molécula de la membrana de tipo glucídico se trataron varios sueros (*B. paracnemis*, *B. arenarum*, *L. chaquensis*, *L. laticeps*) mediante incubación con los siguientes azúcares: arabinosa, glucosamina, sacarosa, manosa, glucosa-1-fosfato, galactosa, estaquiosa, rhamnosa, melibiosa, N-acetilglucosamina, eritrosa e inositol. Las sustancias citadas se usaron en concentraciones finales que iban de 1 mM hasta 150 mM. En todos los casos se utilizó una dilución fija de suero de anuro (1/4). El único glucídico que produjo desaparición de la hemólisis y de la aglutinación fue la N-acetilglucosamina, y lo hizo en una concen-

*Fundación Miguel Lillo - Facultad de Ciencias Naturales.

tración de 71 mM, lo que podemos calificar de débil inhibición. Con el mismo fin de identificar la molécula de la membrana sobre la cual se ejercen las actividades descriptas, se trataron los eritrocitos de ratón con las siguientes enzimas: tripsina, papaína, pepsina y neuraminidasa. En ninguno de los casos el tratamiento enzimático evitó la aglutinación o hemólisis. En los casos en que el volumen disponible lo permitió (las mismas especies del ensayo de incubación con glúcidos) se precipitaron los sueros con sulfato de amonio al 50% de saturación para separar la fracción gama globulina. El sobrenadante, después de dializado, fue ensayado para hemólisis y aglutinación con resultado negativo. El precipitado, redisoluto y dializado, aglutinaba los eritrocitos, si bien con un título menor. La actividad hemolítica en todos los casos fue inhibida por el tratamiento con zimosán.

De las observaciones efectuadas concluimos que la existencia de actividad hemolítica o aglutinante puede ser un fenómeno común en sueros de anuros. Si bien todavía no hemos efectuado determinaciones en animales provenientes de otras partes del continente, creemos que puede ser un fenómeno bastante extendido pues se comportaron de la misma manera, en el caso de *B. arenarum*, los ejemplares provenientes de la zona chaqueña, bosque montano inferior y bosque montano superior. Como en otros casos descriptos en la literatura y por el hecho de precipitar con sulfato de amonio, creemos que la aglutinación se debe a la existencia de anticuerpos precipitantes. Estos deben estar dirigidos contra sustancias antigénicamente

similares a alguna (o algunas) de las que se encuentran en la membrana de los eritrocitos. Esta sustancia no debe ser una proteína, por la persistencia de los resultados después de los tratamientos enzimáticos, ni un azúcar de los utilizados en los ensayos de inhibición; quizás en todo casos incluya en su molécula a la N-acetilglucosamina o algún azúcar estrechamente relacionado. También subsiste la posibilidad que se trate de la cabeza polar de un fosfolípido no compartido por anuros y mamíferos. Por la susceptibilidad a la inactivación por calor y zimosán es evidente que la hemólisis tiene como base la actividad del complemento del suero de los anuros. Como se ve en el cuadro, en algunos animales hay actividad aglutinante exclusivamente. Esta debe ser producida por anticuerpos que no fijan el complemento. Queda abierto el problema sobre la estimulación que provoca la síntesis de éstos anticuerpos. Siguen siendo hipótesis probables las ya señaladas por otros autores: estimulaciones por microorganismos que presenten reacción cruzada con los eritrocitos, o anticuerpos naturales como los sueros anti-grupos sanguíneos en los mamíferos (Kawaguchi et al, 1980; Wiener, 1951); a esto habría que agregar la posibilidad que sean estimulaciones producidas por sustancias presentes en los alimentos.

En lo referente a posición sistemática y actividad encontrada, se observan algunas coincidencias que quizás convenga destacar. Por ejemplo, existen algunas constancias: los *Leptodactylus* tienen los títulos de aglutinación y hemólisis más altos; los títulos de aglutinación

CUADRO I

	Hemólisis	Aglutinación
<i>Ceratophrys cranwelli</i> Barrio	0 - 4	6
<i>Odontophrynus americanus</i> (Duméril y Bibron)	-	2
<i>Telmatobius laticeps</i> Laurent	2	2
<i>Pleurodema borelli</i> (Peracca)	1	2
<i>Leptodactylus chaquensis</i> Cei	5	6
<i>Leptodactylus laticeps</i> Boulenger	5	7
<i>Bufo arenarum</i> Hensel	4	3
<i>Bufo paracnemis</i> Lutz	4	3
<i>Bufo spinulosus spinulosus</i> Wiegmann	-	3
<i>Phyllomedusa sauvagii</i> Boulenger	2	2
<i>Hyla pulchella andina</i> Müller	2	2

son similares para todos los Bufo; para los hílidos son similares la hemólisis y la aglutinación. Para los demás, con sólo una especie por género, los datos no muestran similitudes. Cabe la posibilidad que las coincidencias encontradas tengan relación con una tendencia de tipo genérico en algunos casos, o familiar en otros, en lo referente a una síntesis diferencial de estos anticuerpos.

Agradecimiento: al Dr. R. Laurent las sugerencias efectuadas al leer el manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- GIGLI, I. y AUSTEN, F. K., 1971. Phylogeny and function of complement system.- *Ann. Rev. Microbiol.* 2: 309 - 332.
- JURD, R. D., 1978. A natural heterohemoagglutinin in *Xenopus laevis* serum.- *Immunology*, 34: 389 - 392.
- KAWAGUCHI, S., KINA, T. y MURAMATSU, S., 1980. Natural hemolytic activity of snake serum. IV. Physicochemical and immunochemical properties of natural hemolysin in *Elaphe quadrigata*.- *Dev. Comp. Immunol.* 4: 691 - 701.
- SANCHEZ, G. A. y GAJARDO, M. K., 1980. IgM-like natural hemagglutinin from ratfish serum: isolation and physico-chemical characterization (*Callorhynchus callorhynchus*).- *Dev. Comp. Immunol.* 4: 667 - 678.
- WIENER, A. S., 1951. Origin of naturally occurring hemagglutinins and hemolysins: a review.- *J. Immun.* 66: 287 - 292.