

**ACTIVIDAD HEMOLITICA NATURAL  
DE  
WAGLEROPHIS MERREMI (WAGLER) (REPTILIA, COLUBRIDAE)**

por

FRANCISCO M. FERNANDEZ \* y SILVIA S. de SCHOOS \*\*

**SUMMARY**

**Natural hemolytic activity of *Waglerophis merremi* (Wagler) (Reptilia, Colubridae).** The natural hemolytic activity present in sera and eggs of *Waglerophis merremi* was studied. The results showed that this activity depends on an alternative pathway of complement's activation. The high activity in eggs and young animals suggest a defense transmission from mother to offspring. This mechanism is considered as an original form of natural non specific passive immunity not previously reported.

**Introducción**

Es un hecho bien documentado de que los reptiles son capaces de llevar a cabo una respuesta inmune similar a la de los restantes vertebrados. Sin embargo, existe poca información sobre la naturaleza y función del sistema del complemento (C') en estos tetrápodos. Situación de conocimiento similar, por otra parte, a la existente sobre el resto de los poiquiloterms. En muchos casos la actividad bacteriostática, bacteriolítica o hemolítica, depende de la actividad del C'. Existen varias publicaciones en las cuales se informa sobre estos fenómenos en vertebrados inferiores (Gigli & Austen, 1971; Rijkers, 1982; Kawaguchi, Kina & Muramatsu, 1980; Koch, Josephsen, Nicolaisen & Simonsen, 1982; Ourth & Wilson, 1982; Fujii & Murakawa, 1981). No obstante, en la mayor parte de los trabajos donde se han descrito algunas de estas actividades, se lo ha hecho de una manera claramente referida a la participación de las inmunoglobulinas (Kawaguchi, Kina & Muramatsu, 1980; Rijkers, 1982; Gigli & Austen, 1971).

Esta particularidad implica la existencia de una vía clásica de activación del C'. Si bien la distinción entre vía clásica y alterna proviene de los estudios de mamíferos, por los datos existentes se cree que los dos mecanismos de activación existirían en todos los tetrápodos y posiblemente en todos los vertebrados (Gigli & Austen, 1971; Rijkers, 1982).

En el presente trabajo se describen algunos aspectos de la actividad hemolítica natural existente en el suero sanguíneo y en los huevos de un ofidio del noroeste argentino, *Waglerophis merremi* (Wagler), que presenta la propiedad de lisar eritrocitos de varias especies de mamíferos y anfibios. Los hechos observados sugieren que la actividad depende de una activación de la llamada vía alterna del C'.

**Materiales y métodos**

Se utilizaron varios ejemplares de *Waglerophis merremi* (Wagler) capturados en Yerba Buena, Lules y El Cadillal (Tucumán), en los meses de noviembre de 1983 y enero de 1985. La extracción de sangre se realizó mediante punción cardíaca y el suero se guardó congelado a -20°C hasta el momento de su utilización. Los huevos se extrajeron de tres hembras y se guardaron congelados a la misma temperatura.

\* Facultad de Ciencias Naturales (U.N.T.) y Fundación Miguel Lillo.

\*\* Facultad de Ciencias Naturales (U.N.T.).

### Pruebas de hemólisis

Las pruebas de hemólisis se llevaron a cabo en placas Cooke Microtiter tipo U o en tubos de hemólisis, según se necesitara determinar el título de la muestra o el grado de inactivación inducido por un tratamiento determinado. Cada ensayo en placa se efectuó con 50 o 25 ul de su dilución del suero más 50 o 25 ul de glóbulos rojos (GR) en suspensión del 5%. En todos los casos se utilizó buffer TCC<sup>++</sup> (ClNa 140 mM, Tris 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM) pH 7,2 (Weir, 1973). En los casos en que se ensayó EDTA o EGTA se empleó el mismo buffer pero sin Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup> (buffer TCC). Para determinar el título se efectuaron diluciones sucesivas de 1:2, de manera que los títulos ensayados fueron 1/2; 1/4; 1/8; 1/16, etc. Los controles incluyeron buffer y GR, y muestras inactivadas por calor y GR. Se utilizaron en los ensayos GR humanos, murinos, de ratas, de conejo y de los anfibios *Leptodactylus chaquensis* y *Bufo arenarum*. La mayor parte de los experimentos se llevaron a cabo en GR de ratón debido a la facilidad de obtención. En el caso de los huevos, el contenido se diluyó con el buffer citado y se utilizó de la misma manera.

### Determinación del grado de inactivación de la hemólisis por diferentes tratamientos

Se determinaron en un primer momento las diluciones de suero que eran capaces de producir hemólisis del 50% (DH<sub>50</sub>) en una suspensión de eritrocitos al 5%. A continuación, a diferentes alícuotas del suero original se las sometieron a los tratamientos con EDTA, EGTA, salicilaldoxima (SLA), zymosán, hidracina y OHNH<sub>4</sub>, luego se diluyó a la DH<sub>50</sub> y se ensayó la actividad. A la mencionada DH<sub>50</sub> se le atribuyó un valor arbitrario de 100% de actividad. Con referencia a ésta se registraron los distintos grados de inactivación.

Los glóbulos rojos se incubaron a temperatura ambiente durante 30' con las muestras previamente tratadas y luego se centrifugaron rápidamente los tubos, se recogió el sobrenadante y se leyó la absorción a 541 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss. Se utilizó como blanco el sobrenadante de una suspensión de GR en buffer TCC<sup>++</sup>.

### Pruebas de aglutinación

Para probar aglutinación se inactivó el suero a 60°C durante 30' y se procedió de la misma forma que en los ensayos con placa.

### Tratamiento con zymosán

El zymosán fue preparado de acuerdo a las técnicas usuales (Weir, 1973). Se tomaron 33 ul de precipitado de zymosán al que se le agregó 100 ul de suero y se incubó a 37°C, a temperatura ambiente durante una hora con agitación intermitente. Se centrifugó y el sobrenadante se utilizó para hemólisis.

### Tratamiento con EDTA y EGTA

A 25 ul de suero se le agregó el mismo volumen de EDTA o EGTA 5 mM o 10 mM y se dejó 15' a temperatura ambiente. A estos sueros se los denominó suero-EDTA a suero-EGTA y se ensayaron para aglutinación o hemólisis después de diluirlo hasta DH<sub>50</sub> con buffer TCC. Para probar el efecto independiente del Ca<sup>++</sup> o el Mg<sup>++</sup>, al suero-EDTA se le agregó CaCl<sub>2</sub> 5 mM o 10 mM según se tratara del quelante 5 mM o 10 mM.

### Tratamiento con SLA

A diferentes alícuotas del suero DH<sub>50</sub> se trató con SLA en concentraciones finales de 5 mM, 10 mM y 20 mM. Se dejó a temperatura ambiente durante 15' y se probó la actividad hemolítica.

### Inactivación por calor

Se probó actividad a diferentes temperaturas, colocando durante 30' alícuotas de suero entre 37° y 60°C cada 2°C. Entre 46° y 49°C se probó cada 1°C.

### Tratamiento con compuestos de amonio

Se incubaron muestras con hidracina 15 mM durante 30' a 37°C, y luego 30' a temperatura ambiente; se diluyó hasta DH<sub>50</sub> y se usó en hemólisis.

También se incubaron muestras de suero con OHNH<sub>4</sub> 40 mM según la técnica descrita por Ourth & Wilson (1982), para obtener R4, luego se diluyó de la misma manera y se ensayó en hemólisis.

## CUADRO I

Tratamiento	%Hemólisis
A.- Del suero	
Ninguno	100
Zymosán	2
EDTA 10 mM	1
EDTA 5 mM	1
EGTA 10 mM	60
EGTA 5 mM	95
EDTA 5 mM + Ca <sup>++</sup> 5 mM	95
EDTA 5 mM + Mg <sup>++</sup> 5 mM	94
SLA 5 mM	78
SLA 10 mM	17
SLA 20 mM	6
Hidracina 15 mM	97
OHNH <sub>4</sub> 40 mM	98
30' a 47°C	40
30' a 48°C	0
B.- De los huevos	
Ninguno	100
Zymosán	5
EDTA 10 mM	3
EDTA 10 mM + Mg <sup>++</sup> 10 mM	86
30' a 49°C	0

## Resultados

En el Cuadro I se muestran los resultados de someter a diversos tratamientos el suero o el contenido de los huevos. Los títulos encontrados para las DH<sub>50</sub> fueron de 1/64 para el suero sanguíneo y de 1/412 para el contenido de los huevos, ambos sobre GR de ratón. Los títulos hemolíticos para los GR de diferentes especies, establecidos sobre placa hemolítica Microtiter, fueron los siguientes: 1/8 sobre *B. arenarum*, 1/16 sobre *L. chaquensis*, 1/32 sobre Homo, 1/16 sobre conejo, 1/32 sobre rata y 1/32 sobre ratón.

El tratamiento con zymosán anuló la actividad hemolítica casi completamente, tanto en el suero como en los huevos. Otros tratamientos que disminuyeron la actividad señalada fueron los efectuados con salicialdoxima y con EDTA. La primera, a una concentración 20mM redujo la actividad a un 94%; el EDTA anuló, prácticamente, la actividad a todas las concentraciones usadas. Cuando se agregó Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup> al medio que contenía EDTA se restauró la ca-

pacidad hemolítica. En cuanto al tratamiento con EGTA, se observó que éste reducía la actividad de las ya señaladas DH<sub>50</sub> en un 40% cuando se lo utilizó en una concentración 10 mM, pero no afectaba prácticamente a aquella cuando se lo usó a 5 mM.

El tratamiento con hidracina a una concentración de 15 mM no afectó prácticamente la hemólisis ni tampoco lo hizo el OHNH<sub>4</sub> 40 mM.

El efecto de la temperatura demostró que el sistema es sensible a partir de los 47°C. A esta temperatura se inactiva en un 60% en 30'. A 48°C se produce la inactivación total en el mismo tiempo.

En cuanto al contenido de los huevos, se comprobó que el zymosán anula la actividad hemolítica, también lo hace el EDTA 10 mM y la actividad puede restablecerse en un 86% cuando se restituye el Mg<sup>++</sup> al medio.

La actividad hemolítica mencionada se encontró en ejemplares adultos, machos y hembras, y también en ejemplares muy jóvenes de menos de 5,5 gr de peso.

Los títulos de aglutinación obtenidos fueron siempre inferiores a los hemolíticos. Estos últimos mostraron una gran variabilidad individual que oscilaba entre 1/2 a 1/32.

La falta de correspondencia entre los títulos hemolíticos y los aglutinantes, y la constancia de la  $DH_{50}$ , permitió tratarlos como fenómenos independientes.

Los sueros conservados a  $-20^{\circ}C$  mantuvieron intacta su actividad hemolítica durante seis meses.

### Discusión

Los ensayos llevados a cabo en este trabajo estaban destinados no solamente a demostrar la participación del complemento en la actividad hemolítica del suero y el contenido de los huevos de *Waglerophis*, sino también a dilucidar cuál de las vías de activación se pone en marcha en el mecanismo. Todos los resultados obtenidos indican, con un elevado margen de razonabilidad, que en el caso que nos ocupa es la vía alterna la responsable de la actividad citolítica.

Es un hecho comprobado que el tratamiento con los polisacáridos de la pared de la levadura de cerveza (zymosan) elimina el  $C_3$  del medio, interfiriendo, por lo tanto, en la actividad de la vía alterna (Margni, 1982). En nuestros ensayos tal tratamiento inhibió prácticamente toda la actividad hemolítica. También es sabido que la salicilaldoxima a una concentración de 20mM, no tiene mayor efecto sobre la vía clásica pero inhibe significativamente la vía alterna (Ourth & Wilson, 1982). Las pruebas con el suero de *Waglerophis* indican que éste se comporta según se espera para una activación alterna. Los ensayos con los compuestos de amonio, hidracina e hidróxido de amonio, no disminuyeron la actividad en forma significativa. Estos hechos son coherentes con la actividad tipo vía alterna, pues los compuestos de amonio afectan al  $C_4$  (Ourth & Wilson, 1982), inactivando, por consiguiente, la vía clásica.

En cuanto al efecto de los compuestos quelantes EDTA y EGTA, se ha comprobado en el presente trabajo que ambos afectan la hemólisis, pero de diferente manera. Cuando se utiliza EDTA solamente, se inactiva el mecanismo de las concentraciones usadas; en cambio, el EGTA sólo lo afecta parcialmente, a la mayor

concentración. A la menor concentración (5 mM) no disminuye la capacidad hemolítica del suero. Es un hecho comprobado que el EGTA tiene la capacidad de unir fuertemente el  $Ca^{++}$ , dejando  $Mg^{++}$  en solución. Esto es coincidente con el mecanismo de la vía alterna, que es magnesio dependiente, a diferencia de la vía clásica que necesita de calcio y magnesio simultáneamente (Margni, 1982).

El único hecho diferente a los observados en el sistema de los mamíferos, en los cuales no se puede activar ninguna de las dos vías con  $Ca^{++}$  solamente, es el resultado de agregar  $Ca^{++}$  al suero EDTA. Esto demostraría que en el suero de *Waglerophis* se puede activar la vía alterna con el agregado de este catión, a diferencia de lo que ocurre en los mamíferos. Creemos que estos hechos están indicando que la vía alterna de *Waglerophis* es diferente y menos exigente que la de los mamíferos, pues solamente necesita de uno sólo de cualquiera de los dos cationes mencionados.

Los hechos señalados indican que cuando se usan inhibidores de la vía alterna, la actividad desaparece, pero que no se afecta por los inhibidores de la vía clásica, y que esta vía alterna es más primitiva en cuanto a sus requerimientos de cofactores metálicos.

Esta función de la vía alterna que se activa en presencia de células heterólogas, ya ha sido observada en peces (Ourth & Wilson, 1982), anfibios (Fernández, 1985) y aves (Koch, Josephsen, Nicolaisen & Simonsen, 1982), lo cual nos lleva a sostener que la vía alterna es filogenéticamente antigua, y deja abierto el interrogante sobre si existen realmente, fuera de los mamíferos, dos vías diferentes de activación del  $C'$ .

Acerca del significado biológico de esta actividad hemolítica natural en el suero de Wm, creemos que puede tratarse de un mecanismo defensivo inespecífico frente a bacterias o protozoarios. Es probable que algunos microorganismos patógenos compartan determinantes antigénicos con los glóbulos rojos de vertebrados, posibilidad que ha sido señalada por otros autores (Kawaguchi, Kina & Muramatsu, 1980; Jurd, 1978). A estos determinantes se uniría uno de los componentes del  $C'$ , posiblemente  $C_3$ , de manera que se produciría una reacción cruzada que implicaría activación del sistema de  $C'$  por sustancias presentes en estos GR.

El hallazgo de actividad hemolítica en los huevos no embrionados de este ofidio pone de manifiesto otro hecho interesante. Es muy probable que esta alta actividad hemolítica de los huevos constituya una forma de transmisión de un mecanismo defensivo desde la madre a la cría en estos ofidios. Esto se ve apoyado por el hecho de haber encontrado actividad hemolítica en animales de pocos días de edad.

La transmisión de mecanismos defensivos en forma de moléculas de inmunoglobulinas para proteger la prole en las primeras semanas de vida es un hecho común a las aves y mamíferos. En todos los casos descritos en la literatura se han detectado anticuerpos que se transfieren a través de la placenta, calostro, o los huevos en las aves. Pero no tenemos información sobre la transmisión defensiva que implique a los componentes del C'.

Creemos que este es el aspecto más llamativo de los hallazgos, pues de ser éste un mecanismo de transmisión de defensa natural inespecífica constituiría una forma no descripta hasta ahora.

### Conclusiones

El suero sanguíneo de *Waglerophis merremi* (Wagler) posee actividad lítica contra eritrocitos de mamíferos dependiente de la vía alterna del complemento. Esta constituye a nuestro criterio una forma de defensa inespecífica natural contra antígenos celulares extraños.

El mecanismo de activación de la vía alterna en estos animales es menos exigente que la de los mamíferos pues se puede activar con  $Ca^{++}$  o  $Mg^{++}$  indiferentemente.

Estos ofidios transmiten un mecanismo de defensa inespecífico a sus crías a través de los huevos en forma de una elevada actividad de complemento que se activa espontáneamente

por la vía alternativa contra las células extrañas mencionadas.

### Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Perdigón por la lectura crítica del manuscrito.

### BIBLIOGRAFIA

- FERNANDEZ, F. M. Actividad hemolítica y aglutinante en varias especies de anuros del Noroeste Argentino.- Acta zool. lilloana (en prensa).
- FUJII, T., y S. MURAKAWA, 1981. Immunity in Lamprey. III-Occurrence of the complement-like activity.- Dev. Comp. Immunol. 5: 251-259.
- GIGLI, I., y F. K. AUSTEN, 1971. Phylogeny and function of the complement system.- A. Rev. Microbiol. 2: 309-332.
- JURD, R. D., 1978. A natural heterohemagglutinin in *Xenopus laevis* serum.- Immunology 34: 389-396.
- KAWAGUCHI, S., T. KINA, y S. MURAMATSU, 1980. Natural hemolytic activity of snake serum. IV-Physicochemical and immunochemical properties of natural hemolysis in *Elaphe quadrivirgata*.- Dev. Comp. Immunol. 4: 691-701.
- KOCH, C., J. JOSEPHSEN, E. M. NICOLAISEN, y M. SIMONSEN, 1982. Complement mediated lysis in chickens.- Dev. Comp. Immunol. 6: 141-148.
- MARGNI, R. A. Editor, 1982. Inmunología e Inmunología. Editorial Panamericana. México Buenos Aires.
- OURTH, D. D., y E. A. WILSON, 1982. Alternative pathway of complement and bactericidal response of the channel catfish to *Salmonella paratyphi*.- Dev. Comp. Immunol. 6: 75-85.
- RIJKERS, G. T., 1982. Non-lymphoid defense mechanism in fish.- Dev. Comp. Immunol. 6: 1-13.
- WEIR, D. M. Editor, 1973. Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications.