
REACTIVIDAD INMUNOQUÍMICA DE SUEROS ANTI- *CAIMAN YACARE* Y *CAIMAN LATIROSTRIS* FRENTE A SUEROS DE DIFERENTES ESPECIES

ADOLFO RAFAEL DE ROODT

Área Investigación y Desarrollo / Serpentario, Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán", Ministerio de Salud, Av. Vélez Sarsfield 563 (1281), Buenos Aires.
 aderoodt@gmail.com

R E S U M E N. — Se estudió la reactividad inmunoquímica entre los sueros de distintas especies de reptiles frente a sueros hiperinmunes experimentales anti-suero de *Caiman yacare* y anti-suero de *Caiman latirostris*. Los sueros que se probaron fueron los homólogos de *Caiman yacare*, *Caiman latirostris* y los heterólogos de *Alligator mississippiensis*, *Tupinambis merinae*, *Tupinambis rufescens*, *Chelonoidis chilensis*, *Clelia rustica*, *Waglerophis merremii*, *Lystrophys dorbignyi*, *Phyton molurus*, *Boa constrictor occidentalis*, *Eunectes notaeus*, *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops diporus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Pitangus sulphuratus* y *Gallus gallus*. La reactividad inmunoquímica se determinó mediante las técnicas de doble inmunodifusión y ELISA, mostrándose importante entre los sueros de los crocodrilidos y baja entre estos y los de las otras especies de reptiles estudiadas. Se observó mayor reactividad entre los antisueros anti-*Caiman* respecto a los sueros de *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* que frente al suero de *Alligator mississippiensis*. Además, se encontró una fuerte reactividad entre ambos sueros anti-*Caiman* y el de *Gallus gallus* poniendo en evidencia la fuerte reactividad entre los sueros de arcosaurios.

PALABRAS CLAVE: Cocodrilos, antisueros, inmunología, ELISA, reptiles, suero.

A B S T R A C T. — In order to study the immunochemical reactivity among sera from different species of reptiles regarding sera from *Caiman*, the immunoreactivity of sera from reptiles against antisera to *Caiman yacare* or anti-*Caiman latirostris* sera was studied. These hyperimmune sera were tested against sera from *Alligator mississippiensis*, *Tupinambis merinae*, *Tupinambis rufescens*, *Chelonoidis chilensis*, *Clelia rustica*, *Waglerophis merremii*, *Lystrophys dorbignyi*, *Phyton molurus*, *Boa constrictor occidentalis*, *Eunectes notaeus*, *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedii*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Pitangus sulphuratus* and *Gallus gallus*. The immunochemical reactivity was tested by double immunodiffusion and ELISA. The results showed high reactivity among the sera from crocodiles while the reactivity against sera from the other species of reptiles studied was lower. The reactivity among sera of both species of *Caiman* was higher with the anti-*Caiman latirostris* and anti-*Caiman yacare* sera when compared with the reactivity against serum of *Alligator mississippiensis*. In addition, a strong reactivity of both anti *Caiman* sera on serum from *Gallus gallus* was observed, indicating a high reactivity between achosauria sera.

KEYWORDS: Crocodile, antisera, immunology, ELISA, reptiles, serum.

INTRODUCCION

Las técnicas inmunológicas han sido utilizadas para proveer información sobre al filogenia entre organismos vivos

desde principios del siglo XX (Haas *et al.*, 1992). El grado de reactividad inmunoquímica cruzada usualmente refleja la relación filogenética entre especies y la homología estructural entre los antígenos

nos individuales, pudiendo así brindar información sobre la evolución de las proteínas y la relación entre ellas (Jefferis *et al.*, 1982; Mizejewski, 1995). Si bien los estudios sobre el ADN brindan una enorme utilidad para los estudios filogenéticos entre las diferentes especies (Deessauer *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2004; Shedlock *et al.*, 2007), los datos sobre las características de las proteínas de los seres vivos también brindan informaciones provechosas en este sentido

Por este motivo, los estudios sistemáticos de reactividad cruzada entre proteínas plasmáticas brindaron elementos útiles para asignar grupos evolucionarios (Bauer 1974; Jefferis *et al.*, 1982). Entre las proteínas consideradas a estos efectos pueden mencionarse a las albúminas, las transaminasas, la transferrina, hemoglobina, haptoglobina y las inmunoglobulinas entre otras (Córdoba, 1965; Javid & Fuhrman, 1971; Esteves & Binaghi 1972; Raymond & Fletcher, 1983; Montgelard *et al.*, 1990; Haas *et al.*, 1992; Jefferis *et al.*, 1982; Grouban Botros *et al.*, 1996; Omatsu *et al.*, 1992).

A causa de lo mencionado, las técnicas inmunoquímicas pueden ser utilizadas para estudios zoológicos entre especies animales emparentadas (Charnyi, 1969; Bernard *et al.*, 1982). Además, las características inmunoquímicas de las proteínas de origen animal se pueden utilizar para el diagnóstico de enfermedades y aún para la identificación de las diferentes proteínas animales en alimentos mediante la aplicación de técnicas inmunológicas (Bequer Lombar *et al.*, 1999; Ofori & Hsie 2007; Hsie *et al.*, 2009).

Las características bioquímicas e inmunológicas de las proteínas séricas de los reptiles, también han sido y son herramientas útiles para los tipos de estudios mencionados. Se han observado diferencias bioquímicas importantes entre las características séricas de algunas especies de reptiles (Zweig, 1957; Baril

et al., 1961; Cohen, 1971; De Smet 1978) y la relación entre las proteínas séricas de algunas especies de reptiles como en Lacertilia (Blanc, 1978) e Iguanidos (Higgins & Rand, 1975), entre otros, se ha estudiado por técnicas inmunológicas.

La amplia experiencia entre la reactividad de anticuerpos de animales de laboratorio o de granja frente a los sueros homólogos o los heterólogos (Esteves & Binaghi, 1972), es aprovechada para estudios inmunoquímicos cuando no se dispone de reactivos no homólogos. Esta relación entre los componentes séricos de diferentes especies puede ser utilizada en la práctica. En este aspecto, considerando como un ejemplo a las inmunoglobulinas, proteínas que constituyen uno de los componentes mayoritarios de los sueros, ante la ausencia de reactivos específicos para una especie, como en el caso de los anti anticuerpos utilizados para estudios inmunológicos, pueden utilizarse anticuerpos heterólogos afines. Un ejemplo de esto lo constituye la detección de anticuerpos determinados por otros no específicos (heterólogos), como el uso de anticuerpos anti IgG de perro (*Canis familiaris*) para determinar los de especies de Géneros emparentados *Urocyon* o *Crisocyon* u otros de esa Familia (Silva *et al.*, 2005), lo mismo en el caso del uso de anti IgG de gato (*Felis catus*) para detectar anticuerpos de otros félidos (Kania *et al.*, 1997), el uso de anti IgG de oveja para estas determinaciones en otras especies de *Ovis* o del género *Hircus* (Esteves & Binaghi, 1972), o el uso de la reactividad entre proteínas del plasma humano y de primates (Bauer, 1974), entre otros muchos otros ejemplos de la práctica cotidiana (Esteves & Binaghi, 1972). Esta reactividad facilita los estudios en numerosas especies animales ya que anticuerpos comerciales, estandarizados y evaluados pueden ser adquiridos para la realización de estudios inmunológicos para una gran cantidad de mamíferos y aves. Sin embargo, en lo referen-

te a reptiles no existe tanta disponibilidad de reactivos y la mayoría de los necesarios son producidos artesanalmente por los investigadores (Jacobson & Origgi, 2002).

Respecto a los Crocodrílidos de la Argentina, se han comunicado diferencias bioquímicas entre los sueros de *Caiman*, que pueden apreciarse fácilmente en estudios electroforéticos (Figura 1) o cromatográficos (de Roodt *et al.*, 1994; 1997b). También se comunicó que existe reactividad inmunoquímica importante entre estos y el suero de *Alligator mississippiensis* y reactividad menor frente a sueros de otros reptiles (de Roodt *et al.*, 1997a).

En base a lo antes mencionado y a fin de observar la similitud entre sueros de diferentes especies de reptiles, en este trabajo se analizó la reactividad inmunoquímica de sueros de booides, colúbridos, crotalíneos, saurios, crocodrílidos, quelonios y aves frente a sueros hiperinmunes contra los sueros de *Caiman latirostris* y de *Caiman yacare*. Se

eligió utilizar el suero de estas especies de reptiles debido las diferentes vías evolutivas de los mismos: Arcosaurios, Lepidosaurios y Testudines (Cohen, 1971; Hickman *et al.*, 1992; Montero & Autino, 2009). De esta forma, el grado de reactividad entre estos antisueros y los diferentes sueros de reptiles y de aves probados podría indicar el grado de similitud entre estos y por lo tanto la viabilidad de utilización de estos sueros como heterólogos para estudios inmunológicos.

MATERIALES Y METODOLOGIA

Sueros de reptiles.— Se trabajó con sueros de *Caiman yacare* (Cy), *Caiman latirostris chacoensis* (Cl), *Alligator mississippiensis* (Am), *Tupinambis meriane* (Tm), *Tupinambis rufescens* (Tr), *Chelonoidis chilensis* (Chch), *Clelia rustica* (Cr), *Iguana iguana* (Ii), *Waglerophis merremii* (Wm), *Lystrophys dorbignyi* (Ld'O), *Phyton molurus* (Pm), *Boa constrictor*

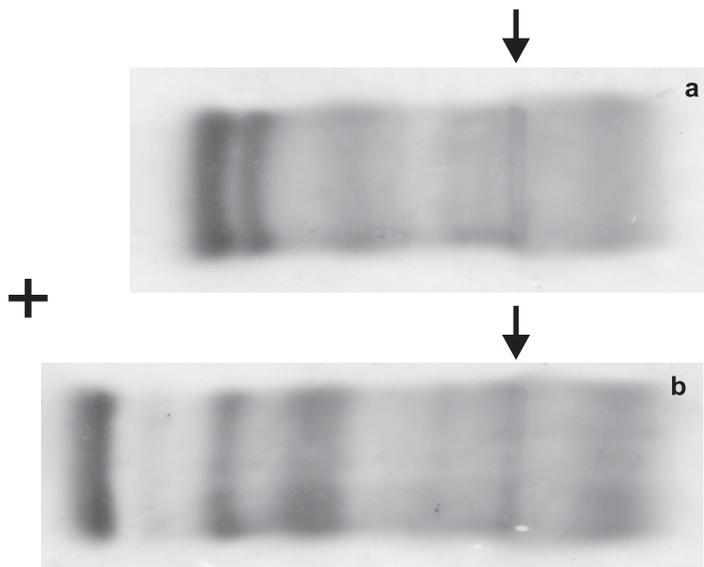


Figura 1. Electroforesis del plasma de *Caiman yacare* y de *Caiman latirostris*. Electroforesis en acetato de celulosa (Cellogel^{NR}) de 5 mg de plasma de *Caiman yacare* (a) y de *Caiman latirostris* (b). Los plasmas se disolvieron en buffer barbital pH 8.0 y se corrieron a una potencia de 200 mV durante 60 minutos. Fueron teñidos con Negro amido. El signo + indica el ánodo. Las flechas indican el punto de siembra. Obsérvese la mayor migración anódica del plasma de *Caiman latirostris*.

occidentalis (Bco), *Eunectes notaeus* (En), *Hydrodynastes gigas* (Hg), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), *Bothrops alternatus* (Ba), *Bothrops diporus* (Bd), *Bothrops jararaca* (Bjca), *Bothrops jararacussu* (Bjcu) y *Bothrops moojeni* (Bm), *Gallus gallus* (Gg) y *Pitangus sulphuratus* (Ps). Los sueros de los crotalidos, colúbridos y de *En* provinieron de especies en cautividad alojadas en el serpentario del Instituto Nacional de Producción de Biológicos – A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires. La sangre de *Tm*, *Tr*, *Bco*, *Pm* y de *Am* provino de especímenes del Zoológico de Buenos Aires S.A., Buenos Aires, Argentina. La sangre de las especies de *Caiman* provino del criadero “Yacaré Ranch”, Corrientes, Argentina. Los sueros de *Gg*, de *Chch* y *Ps* fueron donaciones de colecciones privadas. El suero de las diferentes especies se obtuvo a partir de sangre venosa total extraída por las venas de la cola. La extracción se realizó sin anticoagulante y en condiciones estériles. Tras la formación del coágulo a 37°C las muestras fueron centrifugadas y el suero se separó, tras lo cual se tomaron alícuotas que se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Elaboración de los sueros hiperinmunes.— Se obtuvieron inmunizando conejos neocelandeses adultos (2,5 kg) con suero total de *Cy* o de *Cl*. Los animales fueron alojados en cajas metálicas adecuadas para animales adultos y se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada, con ciclos de luz – oscuridad de 12 horas y agua y alimentación *ad libitum*. Para todas las maniobras efectuadas sobre, estos se siguieron los lineamientos éticos sugeridos por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 2002).

En la primera inmunización se inyectaron por la vía subcutánea en varios puntos en la parrilla costal, con una solución de suero de *Cy* o *Cl* en un volumen final de 1 ml con NaCl 0,15 M,

ajustada a una cantidad de 5 mg de proteína, con adyuvante de Freund completo. La segunda inmunización se realizó de la misma manera pero utilizando adyuvante de Freund incompleto, a los 15 días. La tercera se realizó de la misma manera utilizando como adyuvante gel de hidróxido de aluminio al 10% en el día 45. La última inoculación se realizó de la misma manera el día 60 con el suero diluido en NaCl 0,15M.

Una vez detectada la presencia de anticuerpos específicos en el suero por doble difusión (Harlow & Lane, 1989), la fracción de gammaglobulinas fue separada por precipitación salina con una solución sobresaturada de sulfato de amonio al 33%, tras lo cual fue desalinizada en una columna cromatográfica de Sephadex G-25 Superfine (Sigma), concentrada con polietilenglicol 20.000 y dializada frente a 0,15 M NaCl hasta una concentración proteica de 6,0 g/dl. Los anti sueros anti-*Cl* (A-*Cl*) y anti-*Cy* (A-*Cy*) procesados fueron acondicionados, separados en alícuotas y conservados a -20°C hasta su utilización.

Determinación de proteínas totales.— Para todos los sueros de reptiles así como la de los sueros hiperinmunes de conejos preparados para esta experiencia, la concentración proteica se determinó utilizando un equipo comercial de medición de proteínas (Bio-Merieux, Paris, Francia).

Doble inmunoprecipitación (Técnica de Ouchterlony).— Se realizó con todos los sueros de todos los ofidios, *Tupinambis*, crocodrílidos, aves y *Chch*. Se realizó en agarosa (Sigma, Ultrapure) al 1,0% en NaCl 0,15 M según técnicas convencionales (Harlow & Lane, 1989) enfrentando el suero de los reptiles frente a los antisueros obtenidos.

Enzima Inmuno Ensayo (ELISA).— Se realizó en policubetas de poliestireno de 96 pocillos (Corning) que fueron sensibilizadas con sueros de *Cl*, *Cy*, *Am*, *Tt*,

Tr, *Ba*, *Bd*, *Bja*, *Bju*, *Bm*, *Cdt*, ajustados a una concentración de proteínas de 1 µg/ml en solución tampón barbital sódico pH 8,8 durante 12 horas a 4°C. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C con los antisueros anti-crocodrilidos como anticuerpo primario. Como control negativo se usó suero normal de equino para detectar uniones inespecíficas. Tras la incubación las placas fueron lavadas y se incubaron con anticuerpo secundario, una anti-IgG de conejo conjugada a peroxidasa (Sigma). La reacción se reveló con Ortoparafenilendiamina (OPD) (Sigma) y peróxido de hidrógeno y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 3M. La lectura se realizó en un lector automático (BioRad) a una Absorbancia (A) de 490 nm de longitud de onda.

La reactividad se determinó como la Concentración Efectiva Media (EC₅₀) que indica la dilución del antiveneno que da el 50% de la lectura de máxima Absorbancia a A_{490nm} para el suero y antisuero estudiados. La EC₅₀ se determinó graficando la dilución de los antisueros versus la lectura de la A_{490nm} y se analizó por regresión no lineal utilizando el software Prism 4.0 (Graph Pad, CA). Con fines comparativos también se consideró la máxima lectura de la A_{490nm} en coincidencia con la mínima dilución de los antisueros.

RESULTADOS

Mediante la técnica de doble inmunoprecipitación solamente se pudieron ob-

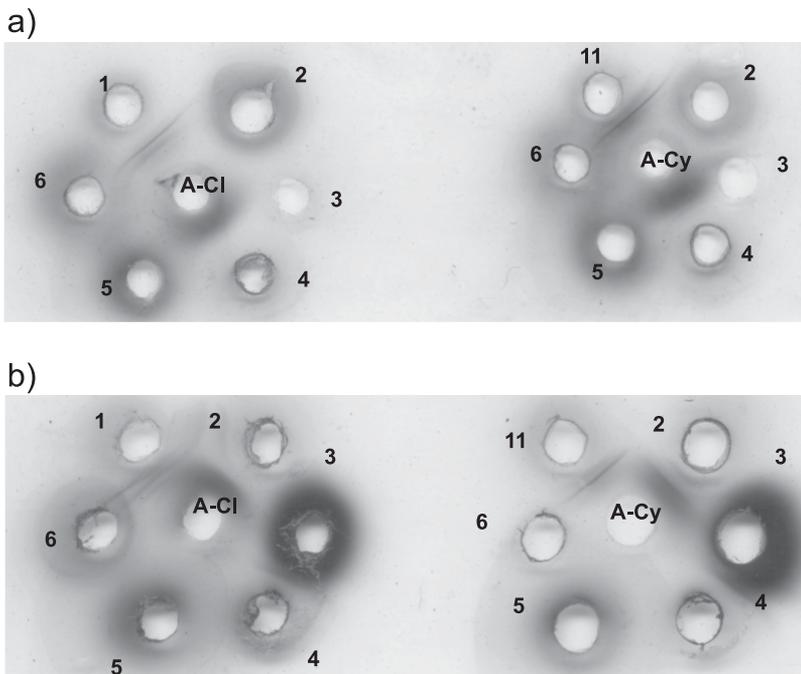


Figura 2. Pruebas de doble inmunodifusión. **a)** Doble difusión de sueros de diferentes especies frente al sueros anti *Caiman latirostris* (A-Cl) y anti *Caiman yacare* (A-Cy). Se ejemplifican las pruebas realizadas con los diferentes sueros probados. Los antisueros (15 µl) se sembraron en pocillos que se enfrentaron a un volumen similar del suero de las diferentes especies estudiadas. 1- *Gallus gallus*; 2- *Chelonoidis chilensis*; 3- *Iguana iguana*; 4- *Caiman latirostris*; 5- *Eunectes notaeous*; 6- *Hydrodynastes gygas*. **b)** Idem, 1- *Gallus gallus*; 2- *Caiman latirostris*; 3- *Oryctolagus cuniculi*(control negativo); 4- *Tupinambis merinae*; 5- *Eunectes notaeous*, 6- *Chelonoidis chilensis*.

servar bandas de precipitación entre los sueros de *Cl*, *Cy*, *Am* y *Gg*. frente a los dos antisueros estudiados. Por medio de esta técnica y en las condiciones del estudio, no se observaron bandas de precipitación entre los antisueros con ninguna de las otras especies estudiadas.

El reconocimiento fue mucho mayor entre los sueros *Caiman* que entre estos y el suero de *Alligator* (bandas débilmente teñidas). Fue muy importante el reconocimiento de ambos anti *Caimán* frente al suero de *Gg*. La reactividad observada se ejemplifica en la Figura 2. Por esta técnica, de baja sensibilidad, no pudo observarse reactividad frente a los sueros de las diferentes especies de reptiles estudiados. Esto muestra una alta reactividad entre los sueros de *Alligatorinae* y *Gallus* que respecto a las otras especies estudiadas, lo que indica mayor similitud de las proteínas séricas de estos grupos. Las bandas de ambos anti *Caiman* frente a los sueros de *Cl* y *Cy* fueron más fuertes que frente a *Am* y *Gg*.

En el ensayo de ELISA la lectura del control negativo fue inferior en todos los casos a los sueros de reptiles estudiados ($p < 0,05$). Reafirmando y cuantificando los resultados anteriores, la técnica de ELISA mostró inmuno-

reactividad importante entre los sueros de los tres *Alligatorinae* estudiados, siendo también esta más fuerte entre *Cl* y *Cy* que con *Am* con ambos antisueros ($p < 0,05$). En el resto de los casos los valores de las lecturas fueron mucho menores pero claramente se observó reactividad entre los diferentes sueros con los antisueros anti *Caiman*. Figuras 3 y 4, Tablas 1 y 2.

DISCUSIÓN

Se observó una reactividad importante entre los sueros de los tres *Alligatoridae*, siendo más fuerte entre *Cl* y *Cy* que entre estos y *Am*. La reactividad frente al suero de *Gg* fue muy importante ante ambos anti *Caimán* utilizados mediante la técnica de doble inmunodifusión (Figura 2). No se observaron bandas de precipitación frente a los otros sueros mediante esta técnica, lo que indica una reactividad inmunológica mucho menor o ausente. Por otro lado, la presencia de bandas de precipitación indica un fuerte reconocimiento entre los *Crocodrílidos* y *Gg*, dado que esta técnica permite detectar complejos antígeno-anticuerpo en el orden de los microgramos (<1 mg/100 ml), mientras que

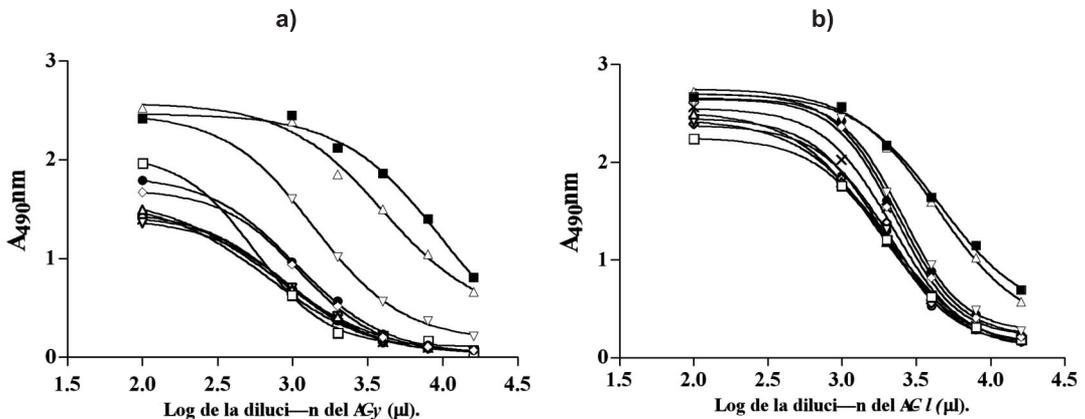


Figura 3. Reactividad inmunoquímica determinada por ELISA de los sueros anti Caimán con los sueros de otras especies de reptiles. **a)** Reactividad frente al A-Cy. **Figura b)** Reactividad frente al A-Cl. (■) *C. yacare*; (▲) *C. latirostris*; (▼) *A. mississippiensis*; (◆) *T. merinae*; (●) *T. rufescens*; (○) *B. jararacussu*; (□) *B. jararaca*; (△) *B. alternatus*; (◻) *B. diporus* (×) *B. mojeni*; (◻) *C. d. terrificus*.

la técnica de ELISA puede detectar en el orden de los nanogramos (<1 µg/100 ml) (Stites & Channing Rodgers, 1993).

Los ensayos de ELISA también mostraron mayor reactividad entre los dos anti *Caiman* frente los Alligatorinae respecto a otros reptiles, y una mayor reactividad entre ambas especies de *Caiman* respecto a la observada con *Am*.

Considerando la menor dilución utilizada en el ensayo de ELISA (1×10^2) los antisueros mostraron una gran reactividad (Figura 3) frente a todos los sueros estudiados por esta técnica, siendo esta diferente en los distintos grupos (Figuras 4.a y 4.b). El A-*Cl* mostró una lectura mayor frente a los sueros de saurios que el A-*Cy*. Si bien estas diferencias solo podrían ser debidas a limitaciones de la técnica, o a característi-

cas individuales de la respuesta inmune de los conejo utilizados, también podrían indicar una diferencia mayor entre los componentes séricos de *Cy* y las otras especies estudiadas respecto a *Cl*. Estas diferencias se pueden observar bien al comparar las EC_{50} (Figura 4.a y 4.b). Estudios adicionales podrían aclarar este punto.

En trabajos realizados con antisueros anti IgG de *Am* se observó una mayor reactividad sobre el suero homólogo que frente a los sueros de *Cl* y *Crocodylus niloticus* (Brown *et al.*, 2001). En este estudio, también observamos mayor reactividad frente a los sueros homólogos, del mismo grado frente a los sueros de *Caiman* y, algo menor frente a suero de *Am*, que teniendo en cuenta las EC_{50} reaccionó 52,9% frente al A-*Cl*

Porcentaje de reactividad respecto a los otros sueros de reptiles a la dilución 1×10^2

Sueros	<i>Cy</i>	<i>Cl</i>	<i>Am</i>	<i>Tm</i>	<i>Tr</i>	<i>Cdt</i>	<i>Ba</i>	<i>Bn</i>	<i>Bja</i>	<i>Bju</i>	<i>Bm</i>
Anti- <i>Cl</i>	98,2	100	96,4	96,2	98,1	81,9	91,4	88,6	86,4	89,1	92,7
Anti- <i>Cy</i>	100	100	100	68,7	74,6	79,7	66,1	56,7	59,7	64,2	58,3

Tabla 1. Porcentaje de reactividad de los antisueros a su reactividad a la dilución 1×10^2 de los antisueros anti-*Caiman*. Reactividad porcentual medida por el método de ELISA de los sueros de las diferentes especies ante los antisueros de *Cl* y *Cy*. Los valores son el porcentaje de lectura a 490 nm respecto al suero específico (considerado como el 100%) de cada uno de los sueros estudiados. Se tomó como valor comparativo la lectura a una Absorbancia de 490 nm de la reactividad de los antisueros de *Caiman*, a la dilución 1/100 frente a los sueros de los diferentes reptiles.

Porcentaje de reactividad de los antisueros respecto a su EC_{50}

Sueros	<i>Cy</i>	<i>Cl</i>	<i>Am</i>	<i>Tm</i>	<i>Tr</i>	<i>Cdt</i>	<i>Ba</i>	<i>Bn</i>	<i>Bja</i>	<i>Bju</i>	<i>Bm</i>
Anti- <i>Cl</i>	112	100	52,9	46,1	49,3	26,2	29,1	29,6	31,9	31,3	38,7
Anti- <i>Cy</i>	100	64,7	39,2	13,6	10,4	6,8	7,2	9,6	8,7	6,7	9,0

Tabla 2. Porcentaje de reactividad de los antisueros anti-*Caiman* respecto a los otros sueros de reptiles. Reactividad porcentual medida por el método de ELISA de los sueros de las diferentes especies ante los antisueros de *Cl* y *Cy*. Los valores son el porcentaje de lectura a 490 nm respecto al suero específico (considerado como el 100 %) de cada uno de los sueros estudiados. Se tomó como valor comparativo la EC_{50} , que significa la dilución del antisuero con la que se obtiene una lectura a una Absorbancia de 490 nm del 50% respecto a la mayor obtenida con el suero homólogo.

y 32,9% frente al A-Cy (Figura 4.b y Tabla 2). Considerando la dilución menor de los antisueros reaccionó 96,4% frente al A-Cl y 100% frente al A-Cy (Figura 4.a y Tabla 1).

El reconocimiento fue menor frente a los sueros de *Tupinambis* y menor aún frente a los sueros de las *Crotalinae*. Estos resultados, si bien podrían esperarse, hasta la fecha no se habían descrito.

Estudios inmunoquímicos con componentes séricos aislados como inmunoglobulinas, albúminas u otros podrían brindar más información básica de este tipo. De hecho se ha observado que mediante las características inmunoquímicas de las albúminas pueden obtenerse datos evolutivos respecto a los Crocodrilidos (Hass *et al.*, 1992). Estos mismos auto-

res encontraron diferencias evolutivas entre *Cl* y *Cy* y entre estos y *Am*. Estos datos son congruentes con la reactividad de los anti suero total de *Caiman* (este trabajo) y de anti Igs de *Alligator mississippiensis* (Brown *et al.*, 2001).

Si bien es conocida la relación filogenética entre las aves y los crocodrilidos (Montero & Autino, 2009), fue sorprendente la reactividad cruzada entre ambos sueros anti *Caiman* y el suero de *Gg*, dado que esta reactividad se observó por la técnica menos sensible, lo que indica una reactividad muy grande entre los antisueros y ese suero (Stites & Chan-nig Rodgers, 1993). El estudio de la reactividad inmunoquímica entre los sueros o componentes séricos de los diferentes grupos de aves y los crocodrilidos podría brindar información importante sobre la relación de estos arcosaurios.

Independientemente de la información de importancia zoológica sobre las similitudes entre los componentes séricos de las diferentes especies, estos resultados tienen utilidad en el campo del diagnóstico. La necesidad de contar con anticuerpos anti especie o anti-Igs de reptiles proviene tanto del campo de las ciencias básicas como de los de la salud animal y humana. Independientemente de aquellas investigaciones que pudiesen requerir este tipo de reactivos, en la práctica médico veterinaria o en los estudios de epidemiología de campo, el conocimiento del grado de relación inmunoquímica entre las proteínas séricas puede ser de suma utilidad. Como un ejemplo del primer caso, puede mencionarse la implementación de métodos de diagnóstico inmunológico para las poblaciones de las diferentes especies de reptiles en zoológicos o criaderos frente a enfermedades infecciosas (Jacobson & Origgi, 2003).

En este caso particular, se observa que tanto el A-Cl como el A-Cy pueden ser utilizados para el diagnóstico serológico de cualquiera de ambas especies. También cualquiera de esos antisueros, podrían servir para la detección de sue-

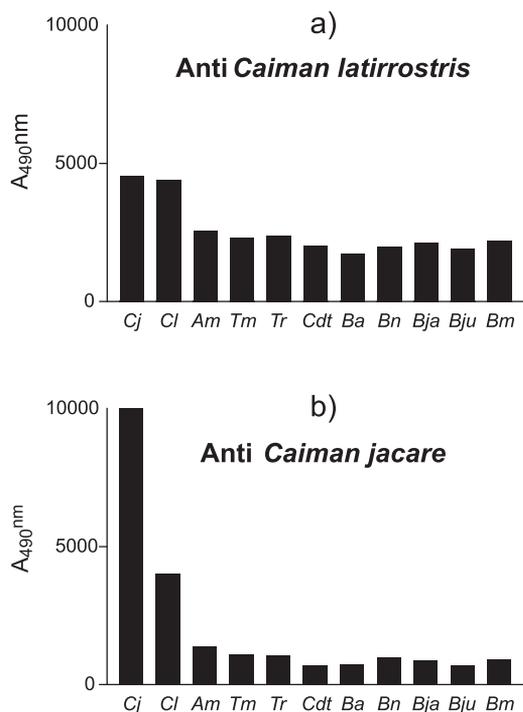


Figura 4. Reactividad de los sueros anti *Caiman latirostris* y anti *Caiman yacare* frente a sueros de diferentes especies de reptiles. Las barras indican dilución a la que se observa la absorbancia media (EC₅₀) de las curvas de lectura de los ensayos con sueros anti - *Caiman latirostris* (a) y *Caiman yacare* (b) frente a los otros sueros de reptiles.

ro de *Alligator mississippiensis*, en coincidencia con lo observado respecto al suero anti IgG(Y) de *Alligator mississippiensis* que reconoce, aunque con menos reactividad, a los sueros de *Caiman latirostris* y de *Crocodylus niloticus* (Brown *et al.*, 2001).

La reactividad heteróloga observada frente al suero de *Gg* podría indicar la utilidad de los sueros anti-*Caiman* para detectar suero de algunas especies de aves. Pero esta utilidad es secundaria, dado que los anti sueros de ave son fáciles de obtener comercialmente. Estos resultados indican entonces que es importante considerar la alta reactividad heteróloga entre estos sueros al momento de realizar pruebas inmunoquímicas con los mismos, a fin de evitar resultados erróneos. Esto es especialmente importante en el caso de los estudios forenses o sobre alimentos, ya que la reactividad puede ocultar adulteraciones de productos que contengan sueros de estas especies. Para descartar esa posibilidad, las mismas deberían realizarse con anticuerpos elaborados contra antígenos específicos o con sueros absorbidos para evitar inespecificidades entre sueros de *Gallus* y *Caiman*.

También, se detectó una reactividad menor de ambos antisueros frente a los sueros de *Tupinambis* y menor aún frente a los sueros de *Bothrops* y *Crotalus*. Esta reactividad, si bien baja, utilizando los antisueros con diluciones bajas (por ejemplo 1×10^2) permitirían mediante la técnica de ELISA detectar la presencia de proteínas de estas especies.

La reactividad frente a *Tupinambis* por ELISA fue mayor que la observada frente los sueros de serpientes, lo que indicaría una mayor alejamiento de estas especies respecto a los crocodrílidos.

La reactividad cruzada podría ser de utilidad para el caso de los crocodrílidos, no solo para el diagnóstico de enfermedades en la naturaleza sino en zoológicos o en los diferentes sistemas de cría (Brown *et al.*, 2001), incluso podrían utilizarse para el diagnóstico de otros

grupos para los que se ha demostrado buen nivel de reactividad cruzada, como *Tupinambis*, aún cuando se requerirían menores diluciones de los antisueros

Ante la ausencia de reactivos específicos, lo que ocurre en el caso de los reptiles (Jacobson & Origgi, 2003) esta reactividad cruzada podría ser utilizada en el diagnóstico, de la misma manera que la reactividad heteróloga entre proteínas séricas se aprovecha para el diagnóstico serológico en diferentes grupos de mamíferos como rumiantes (Esteves & Binaghi 1972), cánidos (Silva *et al.*, 2005) o félidos (Kania *et al.*, 1997). Si bien se debe a alentar al uso de antisueros específicos, ante la ausencia de estos reactivos, la reactividad cruzada podría en determinados casos ser una herramienta útil para algunos tipos de estudios inmunológicos.

No se debe entender que el diagnóstico serológico en los reptiles se limite solamente al manejo sanitario. Las técnicas inmunológicas en estas especies poseen una importancia epidemiológica muy importante en el campo de la salud pública. Los reptiles son reservorios de diversos microorganismos zoonóticos. Entre éstos, respecto a las bacterias se pueden mencionar a *Leptospira* spp. (Stanchi *et al.*, 1986; Rosetti *et al.*, 2003), *Salmonella* spp. (Passman *et al.*, 2002), *Mycobacterium* spp. y *Chlamydia* spp. (Soldati *et al.*, 2004) entre muchas otras. También pueden ser reservorios de virus, manteniendo la actividad viral en la naturaleza. En este caso se destacan, entre muchos otros, los arbovirus causantes de encefalomyelitis en el humano como los de la Encefalitis Equina del Oeste (Spalatin *et al.*, 1964; Thomas *et al.*, 1980; Hidalgo Martínez *et al.*, 2008), la Encefalitis del Nilo (Miller *et al.*, 2003; Jacobson *et al.*, 2005) o la Encefalitis Japonesa (Shortridge *et al.*, 1974). El monitoreo de los niveles de anticuerpos en especies silvestres es una herramienta fundamental para conocer la dinámica de muchos agentes infecciosos en la natu-

raleza que tienen a sus reservorios y fuentes de infección en animales salvajes (Acha & Szyfres, 1986). De esta forma, conociendo la reactividad cruzada entre diferentes especies, se facilitarían las labores de vigilancia epidemiológica en estos casos.

En estudios preliminares observamos que antisueros anti suero total de *Bothrops alternatus* y anti fracción gammaglobulínica de esta especie, cruzan inmunoquímicamente bien con sueros de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops diporus* y *Crotalus durissus terrificus*. Esos mismos antisueros, cruzan aunque con menor reactividad con los sueros de *Tm*, *En*, *Hg* y tiene menor reactividad frente a los sueros de *Ii* y de *Chch* (de Roodt *et al.*, 2008). Esto junto a los resultados hallados con los sueros anti *Caiman*, indican una reactividad mayor entre los sueros de especies pertenecientes a una misma familia, si bien la reactividad cruzada se observa en todos los casos.

La importancia de los estudios serológicos en la medicina de reptiles así como la necesidad de contar con reactivos para estudios epidemiológicos de enfermedades infecciosas en que los reptiles actúan como reservorios, son motivos importantes para que se realicen estudios inmunológicos con los diferentes componentes de los sueros de estas especies. Esto redundará en mayor conocimiento entre las relaciones de las especies y en brindar herramientas útiles en el campo de la medicina humana y veterinaria.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Med. Vet. Eduardo Gould y al Sr. Jorge Gould (*in memoriam*) de la Fundación de Estudios Biológicos, Buenos Aires, por la donación de ejemplares de *Wm*, *Cr* y *Ld'*, al Med. Vet. Juan Carlos Troiano del Yacaré Ranch, Corrientes, por la donación de sangre de *Cl* y *Cy*, y al Med. Vet.

Gabriel Aguado del Zoológico de Buenos Aires S.A., por permitir la extracción de sangre a ejemplares de *Tm*, *Tr*, *Bco*, *Pm* y de *Am*. Se agradece al Sr. Daniel I.J. Herman por la donación de suero de *Gg* y a los Med. Vet. Vanessa Oliveira y Pablo Regner por la donación de suero de *ChCh* y *Ps*. El autor agradece la asistencia técnica de los Sres. Hernán Dinápoli, Pedro P. Galarce y la de los Lic. Silvana Litwin, José Ch. Dokmetjian, Laura C. Lanari y Laura Sáez.

LITERATURA CITADA

- ACHA, P. N. & B. SZYFRES. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud, Pub. Científica 503. Organización Mundial de la Salud, Washington DC. 989 pp.
- BARIL, E. F.; PALMER, J. L. & A. H. BARTEL. 1961. Electrophoretic analysis of young alligator serum. *Science* 173: 278-279.
- BAUER, K. 1974. Cross-Reactions between Human and Animal Plasma Proteins. VI. An Assay Method for Ape and Monkey Plasma Proteins Using Antihuman Antisera. *Humangenetik* 21, 273-278.
- BECQUER LOMBARD, A.; GARCÍA GÓMEZ, M.; VALLADARES, C.; RÍOS DE SALGRAT, M. & G. BELTRÁN LLERANDI. 1999. Identificación serológica de especies animales usadas como ingredientes de productos cárnicos. *Rev cubana Alimentación y Nutrición* 13 (1): 14-17.
- BERNARD, P.; BOUCHERART, M. & R. MALLEIN. 1982. Comparative immunochemical study of serum and urine proteins in *Macaca irus* and in humans. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 71 (3): 461-468.
- BLANC, F. 1978. Comparative immunochemical study of the serum proteins of Lacertilia (Reptilia). *Archi-*

- ves de l'Institute Pasteur de Tunis 55 (3): 327-36.
- BROWN, D. R.; SCHUMACHER, I. M.; NOGUEIRA, M. F.; RICHEY, L. J.; ZACHER, L. A.; SCHOEB, T. R.; VLIET, K. A.; BENNET, R. A.; JACOBSON, E. R. & M. B. BROWN. 2001. Detection of Antibodies to a Pathogenic *Mycoplasma* in American Alligators (*Alligator mississippiensis*), Broad-Nosed Caimans (*Caiman latirostris*), and Siamese Crocodiles (*Crocodylus siamensis*). *Journal of Clinical Microbiology* 39 (1): 285-292.
- COHEN, N. 1971. Reptiles as Models for the Study of Immunity and Its Phylogenesis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 159 (11): 1662-1671.
- CÓRDOBA F. 1965. The molecular identity of the vertebrates. An immunochemical study of L-aspartico-2-oxyglutaric (transaminase) aminotransferase of mammal heart and liver. *Gaceta Médica Mexicana* 95 (9): 827-837.
- CHARNYI V. I. 1969. Differentiation of blood stains of phylogenetically closely related animals through immunoelectrophoresis. *Sudebno-Meditsinskaja Ekspertiza* 12 (1): 27-31.
- DE ROODT, A. R.; TROIANO, J. C. & G. DURONTO. 1994. Valores y patrones electroforéticos de las proteínas séricas del yacaré negro (*Caiman crocodylus yacare*) y del yacaré overo (*Caiman latirostris*). *Crocodyles Specialist Group, Newsletter*, December, pp. 24-25.
- DE ROODT, A. R.; DOLAB, J. A., DOKMETJIAN, C. J.; LITWIN, S.; ACCATTOLI, C.; ZUÑIGA, S. N.; VIDAL, J. C.; GOULD, E.; DINÁPOLI, H.; GOULD, J.; GALARCE, P.; D'ANDREA, C. L.; HECKER, J.; TROIANO, J. C. & L. SEGRE. 1997a. Reactividad inmunoquímica entre el suero de diferentes especies de reptiles. VI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral "Dr. Joaquín Frenguelli", Corrientes, Argentina. Libro de Resúmenes, pp. 73-74.
- DE ROODT, A.; TROIANO, J. C.; DOKMETJIAN, C.; ACCATTOLI, C.; DINÁPOLI, H.; DOLAB J.; ZUÑIGA S.; SEGRE L.; GOULD E. & J. C. VIDAL. 1997b. Relación entre el suero de tres Crocodrilidos americanos: *Caiman yacare*, *Caiman latirostris* y *Alligator mississippiensis*. VI Congreso Argentino de Herpetología. Corrientes, Argentina. Libro de Resúmenes, pp. 28.
- DE ROODT, A. R.; LANARI, L. C.; GUILLERON, D. C.; MANZANELLI, V. M. & A. STEFANI. 2008. Reactividad del un antisuero anti suero total de *Bothrops alternatus* y un anti gamma globulinas de *Bothrops alternatus* frente a los sueros de diferentes especies de reptiles. Congreso Argentino de Herpetología 2008. Libro de Resúmenes.
- DE SMET, W .H. (1978). The Total Protein Content in the Blood Serum of Veterebrates. *Acta Zoologica et Pathologica Antverspiensia* 70: 35-56.
- DESSAUER, H. C; GLENN, T. C. & L. D. DENSMORE. 2002. Studies on the molecular evolution of the Crocodylia: footprints in the sands of time. *Journal of Experimental Zoology* 2002 294 (4): 302-311.
- ESTEVEZ M.- B. & R. A. BINAGHI. 1972. Antigenic Similarities Among Mammalian Immunoglobulins. *Immunology* 23, 137-145.
- GOUBRAN BOTROS, H.; GREGOIRE, C.; RABILLON, J.; DAVID, B.; & J.- P. DANDEU. 1996. Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies *Immunology* 1996 88 340-347.

- HASS, C. A.; HOFFMAN, M. A. ; DENSMORE, L. D. 3RD & L. R. MAXSON. 1992. Crocodylian evolution: insights from immunological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1 (3): 193-201.
- HARLOW, E. & D. LANE. 1989. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- HIDALGO-MARTÍNEZ A.; PUERTO F. I.; FARFAN-ALE J. A.; GARCÍA-REJÓN J. E.; ROSADO-PAREDES E. DEL P.; MENDEZ-GALVAN J.; FIGUEROA-OCAMPO R.; TAKASHIMA I. & C. RAMOS. 2008. Prevalencia de infección por el virus del Nilo occidental en dos zoológicos del estado de Tabasco. *Revista de Salud Pública de México* 50 (1): 76-85.
- HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S. & F. M. HICKMAN. 1992. *Zoología. Principios integrales*. Interamericana – McGraw Hill Healthcare Program. Madrid. 1119 pp.
- HIGGINS, P. J. & C. S. RAND. A comparative immunochemical study of the serum proteins of several Galapagos iguanids. *Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology* 49 (2): 347-355.
- HSIEH, Y. H.; CHEN, Y. T. & K. GAJEWSKI. 2009. Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for reliable identification of imported *Pangasius catfish*. *Journal of Food Science* 74 (8): 602-607.
- JACOBSON, E. R., GINN, P. E., TROUTMAN, J. M., FARINA, L., STARK L., KLENK K., BURKHALTER K. L. & N. KOMAR. 2005. West Nile virus infection in farmed American alligator (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *Journal of wildlife diseases* 41 (1): 96-106.
- JACOBSON, E. R. & F. ORIGGI. 2002. Use of Serology in Reptile Medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11 (1): 33-45.
- JAVID, J. & M. H. FUHRMAN. 1971. Structural markers of haptoglobin in man and in the non human primates. *American Journal of Human Genetics* 23 (5): 496-506.
- JEFFERIS, R.; LOWE, J.; LING, N. R.; PORTER, P. & S. SENIOR. 1982. Immunogenic and antigenic epitopes of immunoglobulins. I. Cross-reactivity of murine monoclonal antibodies to human IgG with the immunoglobulins of certain animal species. *Immunology*: 45: 71-77.
- KANIA, S. A.; KENNEDY, M. A. & L. N. D. POTGIETER. 1997. Serologic reactivity using conserved envelope epitopes in feline lentivirus-infected felids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9: 125-129.
- MILLER, D. L.; MANUEL M. J.; BALDWIN C.; BURTLE G.; INGRAM D.; HINES M. E. 2ND & K. S. FRAZIER. 2003. West Nile virus in farmed alligators. *Emerging Infectious Diseases* 9: 794-799.
- MIZEJEWSKI, G. L. 1995. The phylogeny of alpha-fetoprotein in vertebrates: survey of biochemical and physiological data. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 5 (3-4): 281-316.
- MONTERO, R. & A. AUTINO. 2009. Reptilia. En: *Sistemática y Filogenia de los Vertebrados con Énfasis en la Fauna Argentina*. 2^º Edic., pags. 173-174. Eds. de los autores. Tucumán. 414 pp.
- MONTGELARD, C.; BENYAMIN, Y. & C. ROUSTAN. 1990. Immunological comparison between albumins of three species of mice (Genus mus). *Experientia* 46 (3): 303-307.
- MURPHY, W. J.; PEVZNER, P. A. & S. J. O'BRIEN. 2004. Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends Genet* 20 (12): 631-639.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2002. *Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio*. 2002. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sci-

- ences. Academia Nacional de Medicina, Eds. México DF.
- OFORI, J. A. & Y. H. HSIEH. 2007. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine blood in animal feed, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (15): 5919-5924.
- OMATSU, T.; ISHII, Y.; KYUWA, S.; MILANDA, E.; TERAOKA, K. & Y. YOSHIKAWA. 2003. Molecular Evolution Inferred from Immunological Cross-reactivity of Immunoglobulin G among Chiroptera and Closely Related Species. *Experimental Animals* 52 (5): 425-428.
- PASMAN, F.; DE HERDT, P.; DEWULF, J. & F. HAESBROUCK. 2002. Pathogenesis of infection with *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Muenchen in the turtle *Trachemys scripta scripta*. *Veterinary Microbiology* 87 (4): 315-325.
- RAYMOND, M. A. & S. FLETCHER. 1983. Hemoglobin typing as an aid to species identification. *Central African Journal of Medicine* 29 (3): 51-53.
- ROSETTI, C. A.; ROMERO, G. N.; UHART, M. & W. PRADO. 2003. Detection of leptospiral antibodies in caimans from the Argentinean Chaco. *Veterinary Record* 153 (20): 632-633.
- SHEDLOCK, A. M.; BOTKA, C. W.; ZHAO, S.; SHETTY, I.; ZHANG, T.; LIU, J. S.; DESCHAVANNE, P. J. & S. V. EDWARDS. 2007. Phylogenomics of nonavian reptiles and the structure of the ancestral amniote genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104 (8): 2767-2772.
- SHORTTRIDGE, K. F.; NG, M. H.; OYA, A.; KOBAYASHI, M.; MUNRO, R.; WONG, F. & V. LANCE. 1974. Arbovirus infection in reptiles: immunological evidence for a high incidence of Japanese encephalitis virus in cobra *Naja naja*. *The Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68 (6): 454-460.
- SILVA, D. A. O.; VITALIANO, S. N.; MINEO, T. W. P.; R. A. FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E. & J. R. MINEO. 2005. Evaluation of Homologous, Heterologous, and Affinity Conjugates for the Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *Journal of Parasitology* 91 (5): 1212-1216.
- SPALATIN, J.; CONNELL, R.; BURTON, A. N. & E. J. GOLLOP. 1964. Western Equine encephalitis in Saskatchewan. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 28 (6): 131-142.
- SOLDATI, G.; LU, Z. H., VAUGHAN, L.; POLKINGHORNE, A.; ZIMMERMAN, D. R.; HUDER, J. B. & A. POSPISCHIL. 2004. Detection of Mycobacteria and Chlamydiae in Granulomatous Inflammation of Reptiles: A Retrospective Study. *Veterinary Pathology* 41: 388-397.
- STANCHI, N. O.; GRISOLIA C. S.; MARTINO, P. E. & F. O. PELUSO. 1986. Presence of antileptospira antibodies in ophidia in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 18 (3-4): 127-130.
- STITES D. P. & R. P. CHANNING RODGERS. 1993. Métodos de laboratorio clínico para la detección de antígenos y anticuerpos. En: *Inmunología Básica y Clínica*, D.P. Stites y A.I Terr Editores. *El Manual Moderno*, México. pp 243-292.
- THOMAS, L. A.; PATZER, E. R.; CORY, J. C. & J. E. COE. 1980. Antibody development in garther snakes (*Tamnophis* spp.) experimentally infected with Western equine encephalitis virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29 (11): 112-117.
- ZWEIG, G. (1957). Differentiation of Species by Paper Electrophoresis of Serum Proteins of *Pseudemys* Turtles. *Science* 126: 1065-1066.

