

J. M. CEI y M. P. CASTRO

CORRELACION ENTRE TIEMPO
DE CONSERVACION Y PERDIDA
PROPORCIONAL DE PODER
ANTIGENICO EN SUEROS
DE ANUROS

De ACTA ZOOLOGICA LILLOANA, tomo XXVII, págs. 25 - 36

TUCUMAN
REPÚBLICA ARGENTINA
1970

CORRELACION ENTRE TIEMPO DE CONSERVACION
Y PERDIDA PROPORCIONAL DE PODER ANTIGENICO
EN SUEROS DE ANUROS

por J. M. CEI y M. P. CASTRO (*)

SUMMARY

Correlation between conservation time and proportional lost of antigenic power in Anura sera. Antigenic activity of the Batrachian serum proteins decreases in agreement with the aging of the iced sera. The strongest progressive lost of antigenic activity in the precipitin tests is showed by *Phyllomedusa*, followed by *Bufo arenarum*, being the lowest lost showed by *Leptodactylus*. General conclusions on the fitness of the serological reactions are exposed.

El método de los tests de precipitinas, en su moderna versión de la técnica fotronreflectométrica de Libby, es un instrumento de análisis taxinómico no morfológico particularmente sensible y merece ser continuamente perfeccionado en su nivel de aproximación, reduciendo al mínimo las posibilidades de error, a veces inevitables. Las proteínas séricas y las identificadas con actividad de antígenos en los líquidos plasmáticos o tisulares, pueden conservarse liofilizadas o refrigeradas, a baja temperatura, hasta -15°C , -20°C . La segunda modalidad es la que más se emplea, también en centros de investigaciones serológicas altamente calificados, como el Serological Museum de la Rutgers University, en New Brunswick, U.S.A. La creación de verdaderos "Museos de proteínas específicas", destinadas a utilizations sucesivas en el curso de estudios sistemáticos de diferentes taxa, ha sido allí sustentada en el pasado por Alan Boyden, destacado serólogo y continuador de la línea de trabajo iniciada pionerísticamente hace muchas décadas por Nuttall (1902).

Nos hemos propuesto investigar si las proteínas séricas de los Anfibios Anuros, grupo que ha sido repetidamente objeto

(*) Inst. Biología Animal, Fac. Cienc. Agr., Univ. Nac. Cuyo, Mendoza.

de nuestros estudios, pueden mantener prácticamente inalterado, durante un período prudencial de algunos años, su poder antigénico específico, en las reacciones de precipitinas. Es decir, si su inestabilidad no añade factores de perturbación a los límites habituales de la variación experimental, o de la normal oscilación galvanométrica durante la evaluación fotoeléctrica de densidad óptica de los precipitados. Es obvio que de no mantenerse durante un período suficientemente largo una relativa estabilidad del poder antigénico del suero, podrían surgir inconvenientes notables para la confrontación y significado taxinómico de las reacciones homo-heterólogas, y el mismo estático concepto de un Museo serológico, arriba mencionado, se vaciaría sustancialmente de contenido. Así planteado, el problema reviste interés inmediato para establecer criterios prácticos de empleo de técnicas y materiales. Al existir una pérdida progresiva de poder antigénico de las proteínas conservadas, cualquier ensayo zoo-taxinómico por vía precipitínica debería fundarse esencialmente en factores básicos experimentales de simultaneidad de "tests": obtención contemporánea de antígenos, inmunización simultánea, rápida evaluación de las reacciones, etcétera.

Los sueros utilizados en estos ensayos se conservaron durante años, desde 1960, en condiciones normales de refrigeración (-15°C); casi accidentalmente, por no haberse planeado inicialmente el trabajo. Todos habían sido extraídos de la misma manera, por punción cardíaca y sucesiva coagulación. No se utilizaron sueros liofilizados, pero es probable que también a ellos puedan aplicarse, por lo menos en parte, nuestras presentes conclusiones. Pudimos disponer de cantidades variables de sueros de diferente edad de las especies siguientes: *Leptodactylus ocellatus* (L.) (Mendoza), *Leptodactylus chaquensis* Cei (Tucumán), *Bufo arenarum* Hensel (Mendoza), *Phyllomedusa sauvagii* Boul. (Tucumán). Los sueros inmunes fueron preparados en conejos, inyectando con coadyuvantes los antígenos específicos más recientes, extraídos poco tiempo antes de la inmunización y de los tests. Se hicieron en total 5 sueros anti-*arenarum*, 3 anti-*ocellatus*, 3 anti-*chaquensis*, 5 anti-*sauvagii*. La técnica seguida en las reacciones de precipitación y su evaluación fue la indicada por Boyden y col. (1947). Fue

considerada como reacción básica la reacción de los sueros in-
munes de cada especie con su mismo antígeno más reciente
utilizado para la producción de anticuerpos; medida en uni-
dades galvanométricas con el Photroner de Libby (U.P.), se
le asignó valor porcentual de 100 %. Sucesivamente con los
antisueros de cada especie se realizaron tests con sus mismos
antígenos específicos de edad progresivamente creciente, se-
gún la disponibilidad de sueros conservados. Los resultados
aparecen reunidos en la tabla I, y varias de las familias de
curvas conseguidas en la evaluación de las medidas de tur-
bidez de las precipitinas, para cada especie y cada antisuero,
se representaron en los gráficos de la fig. 1.

Es evidente, observando los datos expuestos, la caída pro-
gresiva y relativamente regular del poder antigénico regis-
trada en los sueros específicos conservados en relación con
su edad y frente al índice de reacción 100 % del suero más
reciente. Analizando los valores obtenidos, aparece evidente
su significado estadístico y la correlación entre tiempo de con-
servación y disminución de actividad antigénica se hace ma-
nifiesta.

En la tabla II se refieren los valores de r , o coeficientes
de correlación negativa obtenidos y sus respectivas significan-
cias, considerando en nuestros cálculos de r cada serie de medi-
ciones realizadas para cada antisuero específico en sus reaccio-
nes homólogas sucesivas con antígenos progresivamente más
viejos. Se puede notar que todos los valores de r están com-
prendidos entre -0.9226 y -0.9994 , los que, en las tablas
de Fisher y Yates (1949) de los valores del coeficiente de co-
rrelación para diferentes niveles de significación determinan
un elevado grado de significación estadística. En efecto, sobre
16 valores, 4 son significativos al nivel de 0.001, 3 al nivel de
0.01, 7 al nivel de 0.05. Esto permite sustentar la correlación
inversa entre las dos variables consideradas.

Las conclusiones de las presentes observaciones son bas-
tante claras. Como en nuestra hipótesis inicial, se debe usar
para tests de afinidad serológica por precipitinas, sueros ex-
traídos aproximadamente en el mismo período, a los fines de
que la pérdida de poder antigénico, proporcional con la edad
progresiva del suero, no interfiera como factor biológico de

perturbación superior a las oscilaciones del error instrumental. Comparando los valores de la tabla I, durante el primer año, el riesgo de ese factor biológico aparece algo más elevado para *Bufo* y *Phyllomedusa*, que para *Leptodactylus*. Ahora bien, trasladando nuestras comprobaciones a la interpretación crítica de los tests homo-heterólogos, intraespecíficos o poblacionales, e inter-específicos, es fácil destacar su importancia. En los gráficos de la fig. 2, A-B, aparecen las reacciones del suero inmune anti-*Bufo arenarum* de Mendoza, antígeno 18-X-1967, con ese mismo antígeno, y con sueros de *Bufo arenarum* de la población de Tucumán, y de *Bufo paracnemis* de Santiago del Estero. Si el porcentaje de reacción con suero de *arenarum* de Tucumán, extraído el 7-VI-1967 (4 meses de conservación), llega al 97,6 %, es decir, cabe indudablemente en los límites de la variación poblacional intra-específica, el porcentaje de reacción con suero de *arenarum* de Tucumán, extraído el 2-XII-1963 (3 años y 10 meses de conservación), es del 85,2 %, alterando desde luego hacia un nivel de rango inter-específico, la realidad efectiva de la distancia serológica poblacional (cfr. *Bufo paracnemis*).

Por otro lado, el porcentaje de reacción alcanza el 84,2 % con suero de *Bufo paracnemis*, extraído el 7-III-1968 (algo más reciente que el antígeno *arenarum* de Mendoza del 18-X-1967), valor perfectamente significativo para especies del mismo grupo y de historia filética común. Pero el porcentaje de reacción baja al 74,6 % con suero de *paracnemis* extraído el 23-XII-1963 (3 años y 10 meses de conservación). Estos últimos valores son suficientemente demostrativos (fig. 2, B). Ellos señalan el paralelismo del proceso macromolecular de desnaturalización en las albúminas y globulinas de las diferentes especies, cuya distancia serológica se mantiene, de acuerdo con las relaciones filéticas, pero cuyos valores porcentuales relativos pueden peligrosamente modificarse en una serie comparativa de tests homo-heterólogos donde no se ponga debida atención al factor simultaneidad de reacción y a una razonable conservación homogénea, en el mismo espacio de tiempo, de los sueros específicos intervinientes.

Se agradece vivamente la colaboración del Ing. Agr. E. G. Mavrich (Fac. Ciencias Agr., Univ. Nac. de Cuyo, Mendoza), para el control de los datos estadísticos.

TABLA I. Valores en U. P. (Unidades Photroner de Libby) y porcentajes de reacción precipitínica, con sueros inmunes preparados con antígenos más recientes y antígenos de la misma especie, de edad progresivamente creciente. (Dilución progresiva de los antígenos a partir de 1:5, Buffer de Evans).

Bufo arenarum (Mendoza): reacciones homólogas de precipitinas con sueros inmunes preparados en conejos con antígeno 18-10-1967.

FECHA DEL ANTIGENO	Antisuero 1		Antisuero 2		Antisuero 3		Antisuero 4		Antisuero 5		CONSERVACION ANTIGENO
	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	
18-10-1967	387	100	367	100	398	100	198	100	302	100	—
31-8-1966	350	90.4	331	90.1	—	—	181	91.4	—	—	1 año y 2 meses.
2-6-1965	341	88.1	315	85.8	342	85.8	168	85.3	254	84.1	2 años y 4 meses.
5-12-1963	326	84.2	307	83.6	—	—	—	—	—	—	3 años y 10 meses.
14-11-1962	318	82.1	297	80.9	312	78.3	157	79.2	239	79.1	4 años y 11 meses.

Leptodactylus ocellatus: reacciones homólogas de precipitinas con sueros inmunes preparados en conejos con antígeno 15-11-1968.

FECHA DEL ANTIGENO	Antisuero 1		Antisuero 2		Antisuero 3		CONSERVACION ANTIGENO
	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	
15-11-1968	270	100	450	100	485	100	—
31-8-1966	255	94.4	420	93.3	—	—	1 año y 8 meses.
3-8-1965	251	92.9	408	90.6	434	89.4	2 años y 8 meses.
2-1963	235	87.0	377	87.8	399	82.2	5 años y 4 meses.
6-10-1961	201	74.4	324	77.0	359	74.0	6 años y 8 meses.

Leptodactylus chaquensis: reacciones homólogas de precipitinas con sueros inmunes preparados en conejos con antígeno 15-11-1968.

FECHA DEL ANTIGENO	Antisuero 1		Antisuero 2		Antisuero 3		CONSERVACION ANTIGENO
	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	
15-11-1968	576	100	580	100	560	100	—
12-1964	510	88.5	518	89.3	488	87.1	3 años y 11 meses.
23-12-1963	499	86.6	498	85.8	475	84.8	4 años y 11 meses.
6-10-1961	454	78.8	456	78.6	440	78.5	7 años.
1-1960	431	75.9	441	76.0	429	76.6	8 años y 11 meses.

Phyllomacrusa savagii: reacciones homólogas de precipitinas con sueros inmunes preparados en conejos con antígeno 7-2-1968.

FECHA DEL ANTIGENO	Antisuero 1		Antisuero 2		Antisuero 3		Antisuero 4		Antisuero 5		CONSERVACION ANTIGENO
	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	U.P.	%	
7- 2-1968	308	100	250	100	457	100	224	100	201	100	—
13- 2-1967	272	88.3	220	88.0	404	88.4	199	88.8	178	88.5	1 año.
9-12-1966	268	87.0	219	87.6	—	—	—	—	—	—	1 año y 2 meses.
21-12-1965	258	83.7	207	82.8	384	84.0	185	82.5	166	82.5	2 años y 2 meses.
23-12-1963	230	74.6	184	73.6	—	—	—	—	—	—	4 años y 1 mes.
18-12-1962	205	66.6	164	65.6	306	66.8	150	66.9	136	67.6	5 años y 2 meses.

Tabla 1 (cont.).

TABLA II

Valores de los coeficientes de correlación y sus respectivas significancias, entre medidas de turbidez total (U.P.) y edad progresiva del antígeno en las reacciones homólogas de diferentes antisueros específicos contra seroproteínas de anfibios anuros. Las diferentes series de valores o medidas de turbidez considerados en correlación con la otra variable (período de conservación del antígeno) corresponden a las que aparecen tabuladas, en el mismo orden, en la Tabla I.

Bufo arenarum - Antisueros:

- 1) $r = -0.9429$ +
- 2) $r = -0.9341$ +
- 3) $r = -0.9767$ °
- 4) $r = -0.9521$ +
- 5) $r = -0.9450$ °

Leptodactylus ocellatus

Antisueros:

- 1) $r = -0.9226$ +
- 2) $r = -0.9736$ ++
- 3) $r = -0.9913$ +++

Leptodactylus chaquensis

Antisueros:

- 1) $r = -0.9973$ +++
- 2) $r = -0.9934$ +++
- 3) $r = -0.9866$ ++

Phyllomedusa sauvagii - Antisueros:

- 1) $r = -0.9751$ +++
- 2) $r = -0.9994$ +++
- 3) $r = -0.9828$ +
- 4) $r = -0.9825$ +
- 5) $r = -0.9740$ +

+ : valores significativos al nivel de 0.05.

++ : valores significativos al nivel de 0.01.

+++ : valores significativos al nivel de 0.001.

° : valores no significativos por escaso número de medidas en la serie.

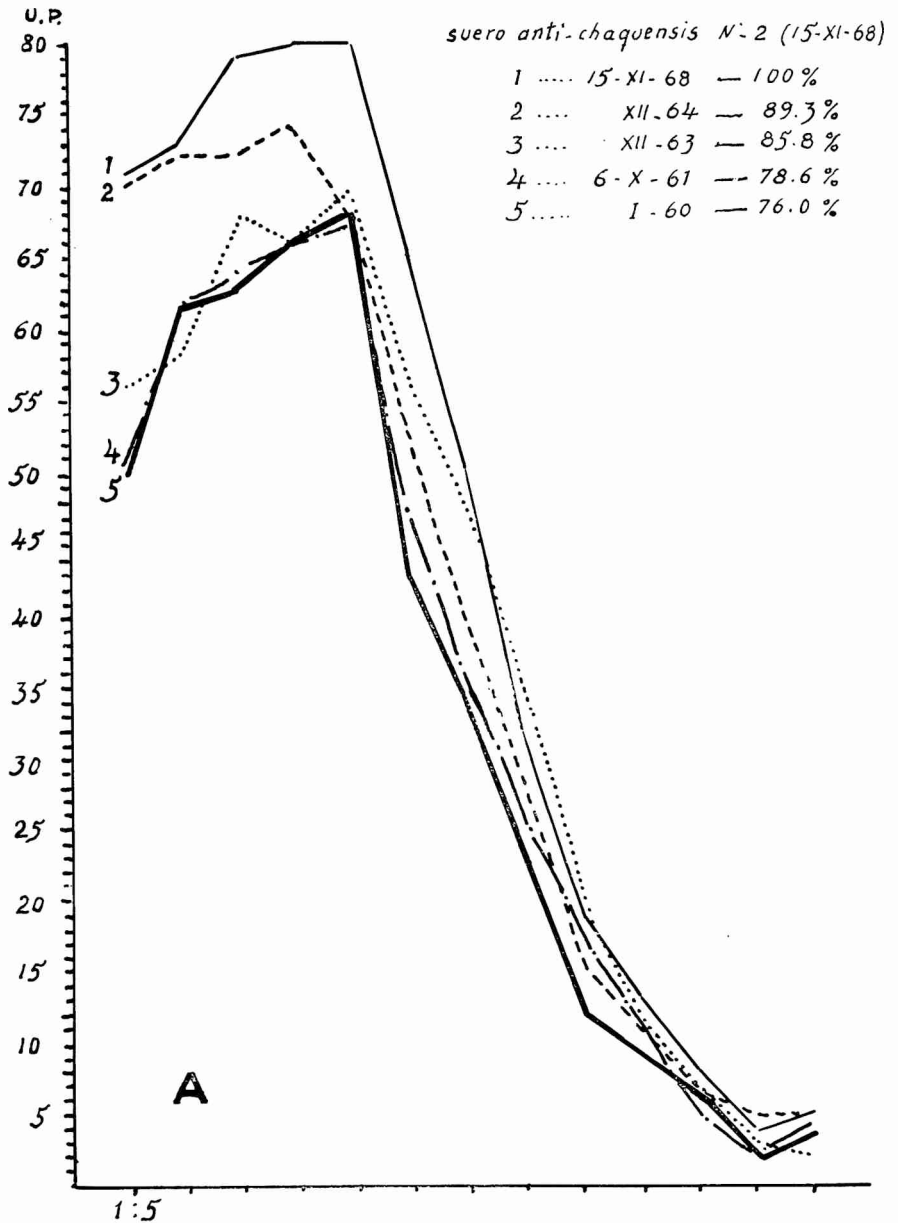


FIG. 1 - A. — Curvas fotorefractométricas de precipitinas de un suero anti-*chaquensis* (antígeno 15-XI-68) con antígenos *chaquensis* de edad progresivamente creciente: aparecen indicados en el gráfico los porcentajes relativos de reacción.

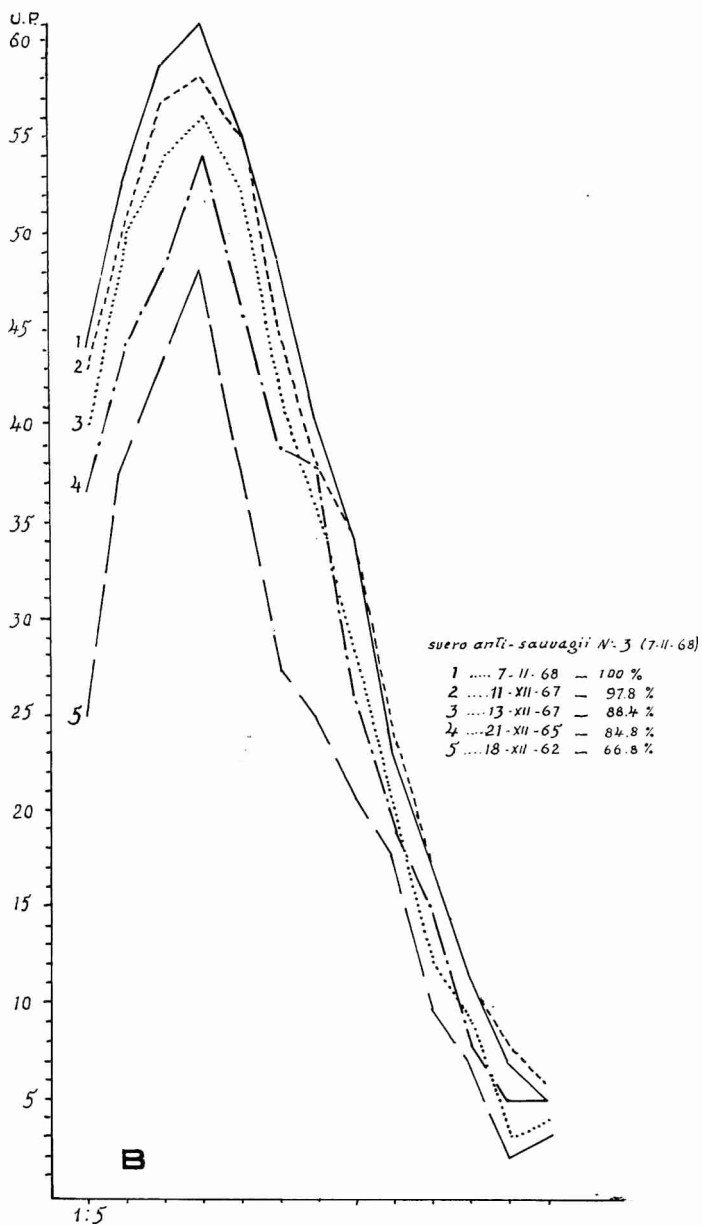


FIG. 1-B. — *idem*, suero anti-sauvagii (7-XI-68).

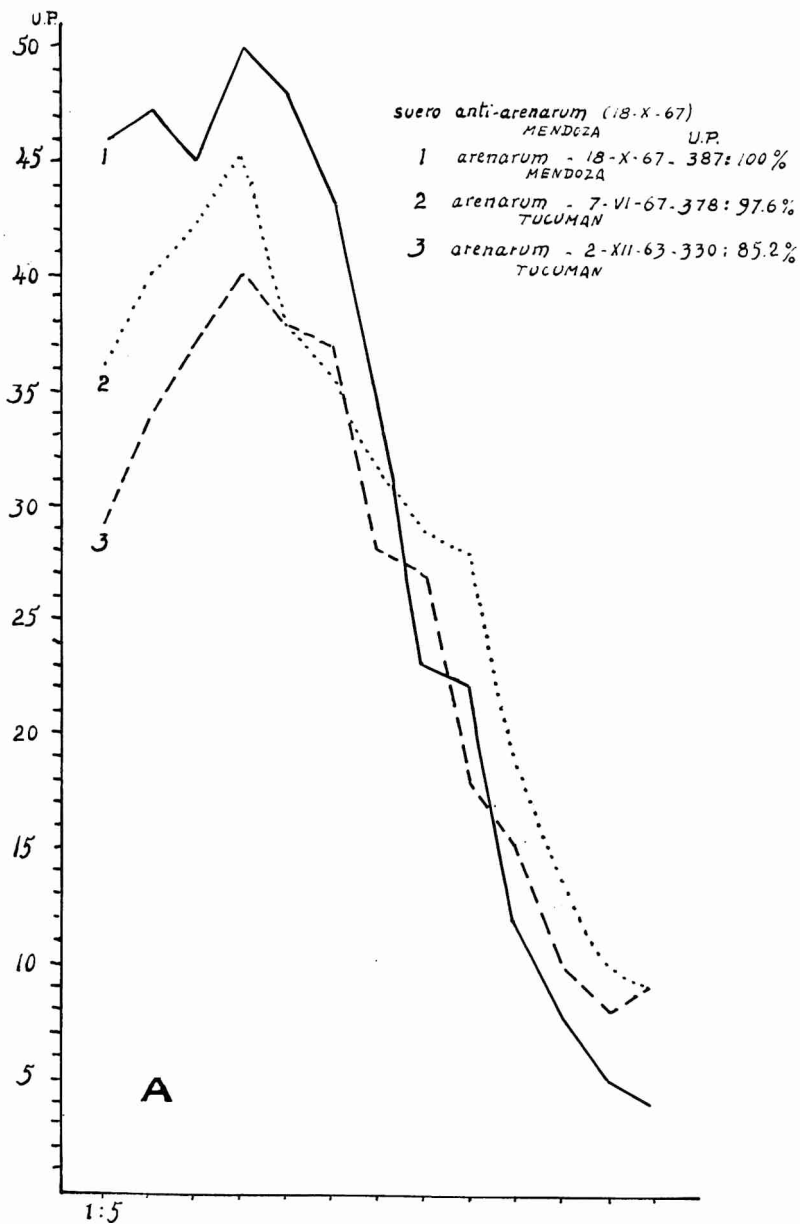


FIG. 2-A. — Curvas fotreflectométricas de precipitinas de un suero anti-arenarum Mendoza (18-X-67), con el mismo antígeno (Mendoza, 18-X-67) y antígenos arenarum Tucumán de diferente edad. (U.P., Unidades Phothroner de Libby: dilución progresiva antígeno 1:5, Buffer de Evans.)

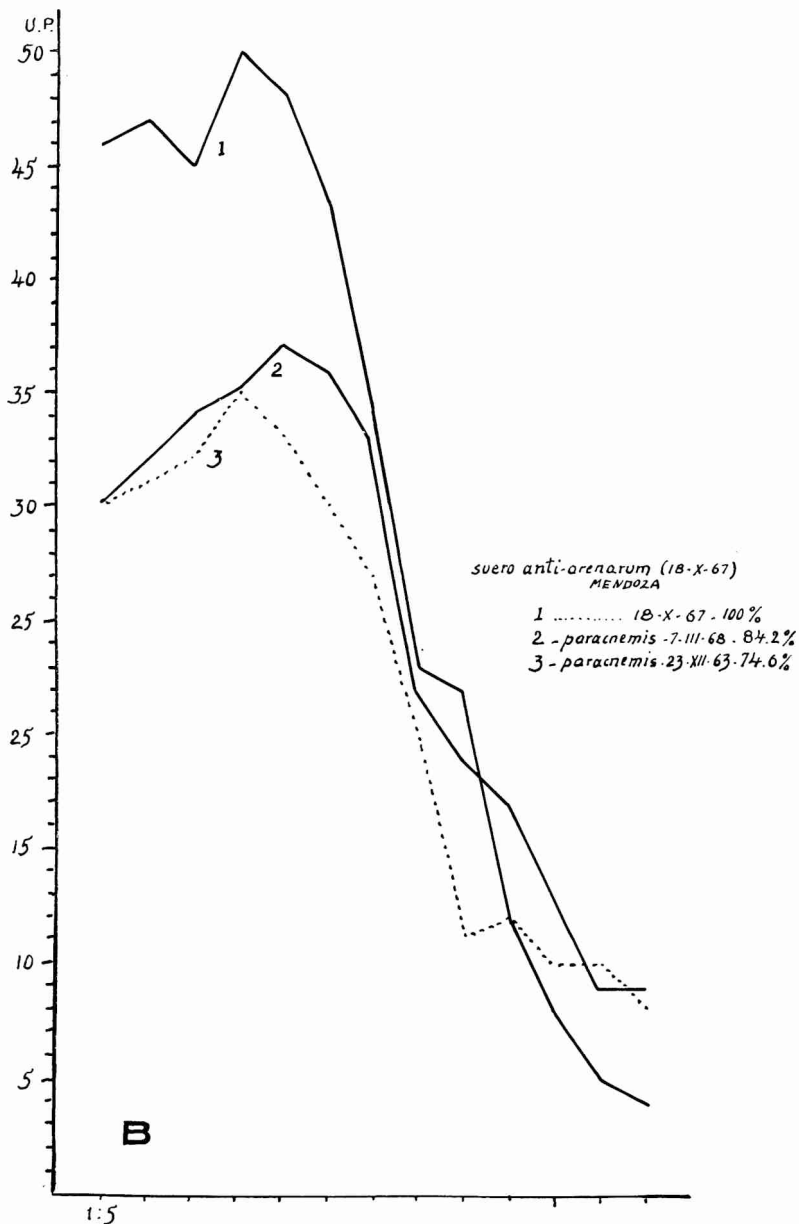


FIG. 2 - B. — fdem, con el mismo suero anti-arenarum Mendoza (18-X-67) y antígenos *paracnemis* de diferente edad.
(En A y B aparecen indicados los porcentajes de reacción).

BIBLIOGRAFÍA

- BOYDEN, A., BOLTON, E. T., GEMEROY, D. G. 1947. Precipitin testing with special reference to the photoelectric measurement of turbidity. — *J. Immun.*, 57: 211-227.
- FISHER, R. A., YATES, F. 1949. *Tablas estadísticas para investigadores científicos*. — Ed. Aguilar, Madrid.
- NUTTALL, G. H. F. 1902. Progress report upon the biological test for blood as applied to over 500 bloods from various sources, together with a preliminary note upon a method of measuring the degree of reaction. — *Br. med. J.* 3: 825-827.