

## COMENTARIO

**Aspectos evolutivos del Sistema del Complemento**

Castro, Felipe; Francisco Fernández

Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, San Miguel de Tucumán. Tel 0381-4330516. e-mail juanfelipecastro@yahoo.com.ar

► **Resumen** — El Sistema del Complemento parecía ser propio de los vertebrados. Los estudios llevados a cabo sobre la estructura de genomas completos en algunas especies, nos muestra que los genes del Sistema del Complemento de los mamíferos tienen sus homólogos parálogos en modelos genómicos del protocordado anfioxo que serían el origen genético de los tetrápodos. En los agnados y las lampreas sobreviven funciones primitivas, genes y proteínas de este Sistema. Es importante el hallazgo de sistemas funcionalmente análogos a los del Complemento en diferentes especies. El Complemento está muy asociado a la función de la respuesta inmunológica, a los fenómenos inflamatorios y a la coagulación. Su principal mecanismo antimicrobiano es la lisis de las células extrañas mediante una reacción en cascada de factores. Evolutivamente el Complemento pasó de ser un mecanismo efector independiente en el origen de los vertebrados, a estar asociado a la respuesta inmunológica, tanto lítica como antiinflamatoria. Las observaciones y estudio de estos mecanismos efectores de los vertebrados anamniotas ofrecen una mirada al pasado evolutivo.

**Palabras clave:** Sistema de Complemento, evolución, cordados, filogenia.

► **Abstract** — “Evolutionary Aspects of the Complement System”. The Complement System seems to have been specific to vertebrates. Studies carried out on the structure of entire genomes in some species, show that the Complement System genes of mammals have paralog counterparts in the protocordado amphioxus genomic models that would correspond to the genetic common origin of tetrapods. In agnathans, and lampreys, primitive functions survive: genes and proteins of this system. It is important the finding of other systems functionally analogous to those of the Complement in different species. The Complement is closely associated to the immune function response, to inflammatory phenomena and to coagulation. The main antimicrobial mechanism is the lysis of foreign cells through a cascade of factors. From an evolutionary point of view, the Complement changed from being an independent effector mechanism at the origin of vertebrates, to being associated with lytic and antiinflammatory immune responses. The observations and study of these effector mechanisms of anamniote vertebrates offers a view into the evolutionary past.

**Keywords:** Complement System, evolution, chordata, phylogeny.

## INTRODUCCIÓN

El Sistema del Complemento tiene su origen en proteínas que cumplían funciones muy esenciales de defensa contra organismos patógenos en especies de protostomados hace 600 millones de años. En la actualidad, el sistema ha llegado a un grado de desarrollo que muestra una enorme complejidad y gran eficiencia, sobre todo en los homeotermos aves y mamíferos.

El Sistema del Complemento de los mamíferos tiene numerosas funciones. De ellas la más conocida y destacada corresponde a

la actividad lítica sobre células extrañas, lo cual incluye a los virus, bacterias y hongos. Este Sistema tiene una característica muy especial: las funciones que puede desarrollar incluyen un amplio arco de acciones que mantienen relaciones que incluyen desde colaboración circunstancial hasta mutua dependencia con otras funciones fisiológicas importantes. Ejemplos de estos sistemas son la coagulación, la inflamación y el sistema de la inmunidad adaptativa. El Sistema del Complemento está integrado por un conjunto de proteínas, la mayor parte de las cuales lo sirven en exclusividad, o casi exclusividad. Una cantidad menor de ellas atienden también a otras funciones fisiológicas. No obstante la complejidad y variedad actual, hay

consenso en el sentido que el Complemento empezó como parte del sistema de inmunidad innata (Dodds y Matsushita, 2007).

Dentro del reino animal los condrictios constituyen el grupo más antiguo que posee un Sistema de Complemento con la casi totalidad de las funciones (atribuibles a los mecanismos de defensa) que observamos en los mamíferos. Como veremos, las lampreas poseen solamente algunas funciones que son similares a las encontradas en los mamíferos. En el anfibio (cefalocordado) se observan funciones aisladas a las cuales se les atribuyen ser las antecesoras de las que se encuentran en los vertebrados más complejos.

Todas las funciones (especiales) del Complemento están a cargo de proteínas particulares. Se puede adelantar que las tareas que éstas llevan a cabo son complejas, en el sentido de que la participación de cada proteína implica más de una función, resultando ser desde bifuncionales hasta polifuncionales. Esta complejidad se basa en el hecho que las proteínas constan de dominios, es decir sectores estructurales precisos que poseen características definidas, con funciones distintas dentro de la misma proteína. Los más comunes corresponden a dominios con función enzimática, dominios con capacidad de reconocimiento de estructuras especiales (tanto de patógenos como de células propias), y dominios que se unen específicamente a dominios de otras proteínas, del mismo o de otros sistemas.

Por otra parte, hay que agregar que la evolución de las proteínas se lleva a cabo no solamente mediante los cambios internos que acaecen dentro de cada dominio proteico (mutaciones), o mediante duplicación génica y posterior diferenciación. Además de estos cambios ocurrió que los genes codificantes para las proteínas mencionadas, intercambiaron, durante los últimos 500 millones de años, sectores génicos correspondientes a dominios con otras proteínas relacionadas, o sea pertenecientes al Sistema (o protosistema) del Complemento. También pudieron intercambiar dominios con los genes de proteínas que tenían funciones ajenas a las del Complemento.

Conviene mencionar que, en la mayor parte de los casos, los dominios se corresponden muy ajustadamente con los exones del gen. El mezclado (*shuffling*) de exones debe haberse producido en una etapa temprana del desarrollo del Complemento y probablemente aconteció en varias oportunidades acompañando las diversificaciones filéticas.

Se entiende que en una situación como la nombrada la descripción de la historia evolutiva es complicada, laboriosa y necesariamente elusiva en sus resultados.

El mayor aporte actual de información indicativa u orientadora sobre el tema proviene de la genética molecular. Cuando se tiene en cuenta la necesaria relación entre los dominios y las funciones, podemos apreciar el valor que tiene el conocimiento de las estructuras proteicas conocidas o conjeturadas (y sus funciones) para trazar una filogenia de los orígenes de las actuales funciones del Complemento.

Debido a que la mayor parte de las proteínas de este Sistema están relacionadas funcionalmente y que éste es el principal, sino único, sentido que tienen. Esta situación tiene una cierta semejanza con un rompecabezas en el cual cada ficha tiene un dibujo central más o menos claro, pero cuyos bordes son borrosos. Ello obliga a un estudio amplio de cómo se integran las funciones en cada especie.

Las proteínas que forman el Complemento tienen una rica y compleja historia evolutiva, la cual se remonta prácticamente a la aparición de los animales multicelulares según describiremos.

Un aspecto importante del estudio corresponde a la óptica que se utiliza en la tarea de apreciar/conjeturar las raíces del Sistema del Complemento. Una aproximación consiste en encontrar las similitudes existentes entre los dominios de las proteínas de diferentes especies animales, para lo cual se toman como referencia las estructuras de las proteínas reconocidas por su pertenencia al Sistema del Complemento más evolucionado. Para ello, se analizan las estructuras génicas de los genomas de especies que representan actualmente a organismos primitivos tenien-

do en cuenta su vínculo con taxones de los cuales se han encontrado restos fósiles. Con una alta probabilidad, el hallazgo de dominios proteicos con gran similitud a los homólogos de las especies más estudiadas, nos permitiría hipotetizar que los organismos primitivos poseían funciones similares a las que ahora encontramos, por ejemplo, en los mamíferos modernos. Sin embargo, existen algunos problemas.

Hay grandes dificultades para llevar a cabo estudios funcionales interespecíficos. Entre las más importantes se encuentra el hecho que, con frecuencia, no se pueden hacer pruebas cruzadas por la incompatibilidad entre especies.

Asimismo, en los estudios comparativos, la exacta definición de las funciones de los componentes del Complemento es problemática (Dodds y Matsushita, 2007). De hecho, solamente en la especie humana han sido claramente definidas las vías de activación.

Algunos grupos presentan multigenia para algunas proteínas, por ejemplo, en los peces óseos se encuentra la multigenia de C3 (multiplicación del C3), presentando los subtipos existentes diferentes funciones, lo cual es problemático en las comparaciones.

Como un problema básico se encuentra lo señalado por Dodds y Matsushita (2007: 235): «Se debe recordar que los invertebrados existentes son nuestros primos lejanos y no nuestros antecesores. Es muy posible que algunos componentes adicionales, que no se encuentran en los mamíferos, se hayan agregado en algunas líneas (filéticas).»

#### FUNCIONES DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO

El Sistema de Complemento es, por una parte, un componente vital en la respuesta inmune innata y, además representa un gran mecanismo efector en la respuesta inmune adaptativa a través de la vía clásica de activación. La función reconocida como la más importante es producir la muerte celular a partir de la formación de múltiples poros en la membrana de la célula blanco. De esta

manera, se produce la lisis de microorganismos patógenos.

También es importante en el proceso de opsonización que corresponde a la fagocitosis de antígenos particulados. Sin embargo, las funciones de este Sistema exceden lo relacionado con la respuesta inmune.

Una función clara de interrelación con otros sistemas fisiológicos, la constituye las señalizaciones que, partiendo del Sistema del Complemento, actúan sobre células de otros sistemas fisiológicos. Por ejemplo, el C1q, proteína que integra el Factor C1 del Complemento, puede actuar sobre varios tipos de células induciendo respuestas específicas (Eggleton *et al.*, 1998). Sobre los neutrófilos y macrófagos induce quimiotaxis, aumento de la fagocitosis, y destrucción microbiana. Sobre los linfocitos B tiene el efecto de aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Sobre las plaquetas induce aumento de la expresión de proteínas de adherencia. En los fibroblastos hace aumentar la síntesis de DNA, la quimiotaxis y la fagocitosis. Sobre los músculos lisos estimula el metabolismo oxidativo. Asimismo otros factores o fragmentos activados, fundamentalmente C3a y C5a actúan promoviendo la inflamación, mientras otros tienen funciones inmunorreguladoras.

El Complemento contribuye tanto a la inducción de la respuesta adaptativa inmunitaria Th1, como a su limitación temporal (Heeger y Kemper, 2012). Esta última función es indispensable para evitar las consecuencias de tipo autoinmunitarias.

El papel que juega en el sistema nervioso no se limita a la defensa contra organismos patógenos y eliminación de material propio dañado, sino que abarca funciones en el mantenimiento y desarrollo de las neuronas y sinapsis (Horstman *et al.*, 2011; Veerhuis *et al.*, 2011). En el caso del C5a, se ha comprobado que aumenta la sensibilidad al dolor y la inflamación en ratones de prueba (Liang *et al.*, 2012).

Los factores C3a y C5a actúan sobre los osteoblastos aumentando su respuesta a la inflamación. En este caso, además, induce

un aumento en la formación de osteoclastos (Ignatius *et al.*, 2011).

Es importante destacar una función del Complemento que consiste en la depuración plasmática que elimina complejos inmunitarios de la circulación. De otra forma, estos inmuno-complejos formados por la unión de antígenos a anticuerpos se podrían depositar en diferentes órganos, como el riñón, produciendo graves daños, razón por la cual deben ser eliminados. También se ha destacado el papel de algunos factores del sistema en el sentido que facilitan un adecuado desarrollo del proceso de la apoptosis (Flierman y Daha, 2007).

#### SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN MAMÍFEROS

Lo que se describe a continuación corresponde a la estructura y funciones del Sistema de Complemento en los mamíferos, más concretamente a lo conocido en la especie humana, que es la especie más estudiada y sobre la cual se conocen en totalidad las secuencias aminoacídicas de las proteínas integrantes del mencionado sistema.

El Sistema del Complemento está constituido por moléculas implicadas principalmente en la defensa frente a infecciones y a células tumorales. Parte de los factores del Complemento potencian la inflamación y la fagocitosis y actúan produciendo la lisis de células y microorganismos. Una definición más amplia sostiene que este Sistema tiene dos funciones principales, la lítica y la de detectar señales de peligro en el organismo (Sjöberg *et al.*, 2009). Esto último lo efectúa descubriendo formas moleculares alteradas o dañadas de tejidos propios que son reconocidas por C1q. Esta capacidad de reconocimiento de formas alteradas o dañadas está vinculada con la fisiopatología del sistema cuando una excesiva activación causa daños al propio organismo (Carrol y Sim, 2011).

La mayor parte de los factores del Complemento son proteínas plasmáticas y una pequeña proporción de ellos son proteínas de membrana. De esta manera está integrado por proteínas llamadas factores, que reci-

ben denominaciones, por una parte, que se enumeran desde C1 hasta C9, otras se identifican mediante letras (Factor B, factor H, Factor I, factor P, etc.) y otras por siglas que hacen a su función, por ejemplo MBL (lectina de unión a la manosa), MASP (serín-proteasa asociada a la MBL).

Además de lo antes mencionado, hay que señalar que varias de estas proteínas están constituidas por sub-unidades independientes. Por ejemplo, C1 está integrada por tres proteínas: C1q, C1r, C1s, que tienen distintas funciones. Aparte de ello, las proteínas principales pueden ser escindidas por enzimas específicas del Complemento en fragmentos con distintas funciones: es lo que ocurre por ejemplo con C3 que es separada en C3a y C3b.

El hepatocito es el principal productor de factores del Complemento. No obstante, los componentes de C1 son sintetizados también por las células epiteliales del intestino y del sistema genito-urinario. Por otra parte los adipocitos sintetizan el factor D. Se ha observado que los macrófagos activados producen algunos factores del Complemento. Sin embargo, esto solo tiene relevancia en el foco inflamatorio. Las citocinas inflamatorias (IL1, IL6 y TNF) e IFN-gamma incrementan la síntesis de algunos factores del Complemento en el hígado.

#### LAS VÍAS DE ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

La activación del Complemento se inicia con reacciones consecutivas que componen tres cascadas enzimáticas, con una vía lítica final común. A partir de cada uno de los componentes del Complemento se genera un componente activo que actúa en el paso siguiente de la cascada. Gran parte de los factores son enzimas proteolíticas (Berrón Pérez *et al.*, 2003). En la activación, algunas moléculas son separadas en dos o más fragmentos, los cuales promueven la etapa siguiente. Estos fragmentos poseen diversas funciones biológicas: por ejemplo ser mediadores de la inflamación como ocurre con C3a y C5a.

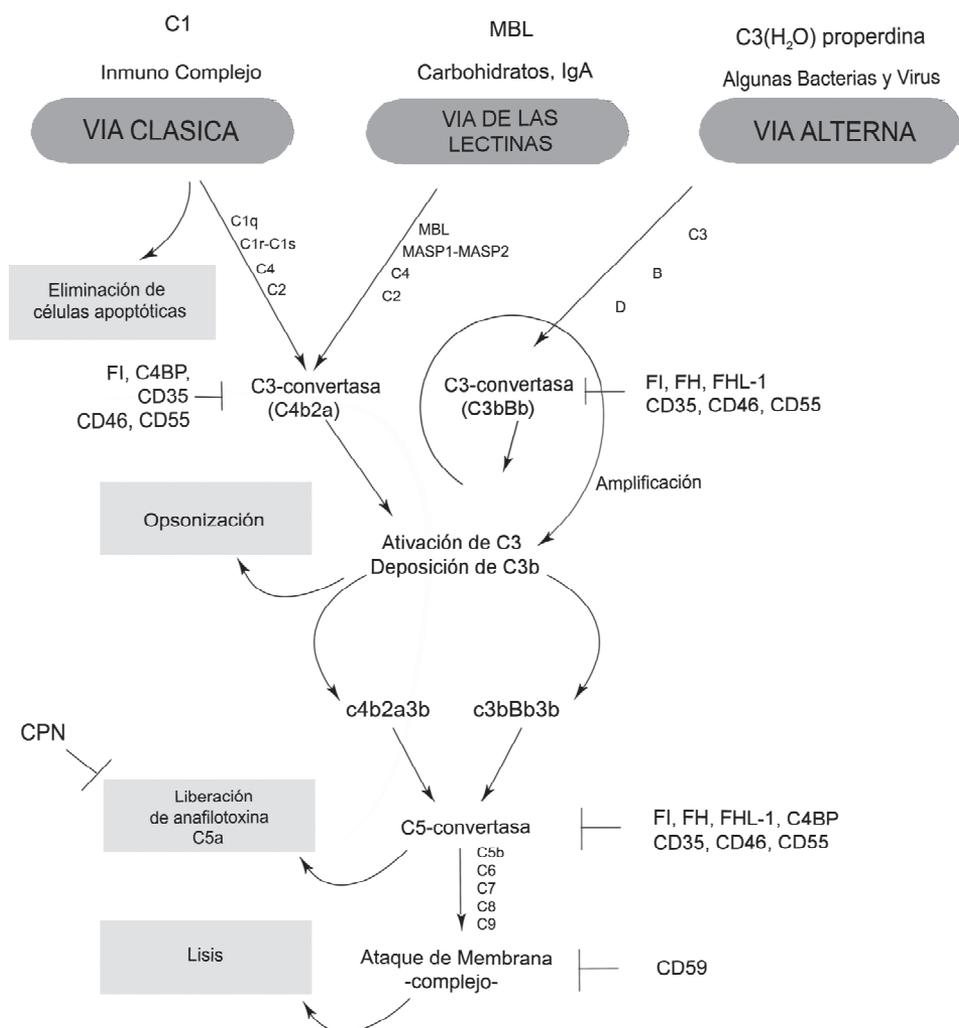
La activación del Sistema puede efectuarse por tres vías. La vía clásica, la vía alterna y la vía de las lectinas (Fig. 1).

La aparición de la vía Clásica se llevó a cabo conjuntamente con el desarrollo del sistema Inmune Adaptativo, lo que parece haber ocurrido durante el surgimiento de los peces mandibulados. Las novedades más importantes aportadas por la defensa adaptativa a la inmunidad general fueron: a) los dos tipos de Complejos Mayor de Histocom-

patibilidad, b) el receptor de célula T, y c) los genes activadores de recombinación que posibilitaron la aparición de las inmunoglobulinas.

VÍA CLÁSICA

Se activa por la unión de un antígeno y un anticuerpo. El anticuerpo por sí solo no activa el Complemento. Cuando la inmunoglobulina (IgM o IgG) se une al antígeno se produce un cambio de conformación en



**Figura 1.** Vías de activación del Sistema de Complemento. Cada etapa de las respectivas cascadas de activación se representa con la letra C y el número correspondiente. La vía Clásica se activa por la unión antígeno-anticuerpo. La vía Alterna se activa por reconocimiento de componentes del patógeno. El iniciador de la vía de las lectinas es una lectina como la MBL. Figura basada en los trabajos de Dunkelberger y Song (2010) y (Mabbott, 2004)

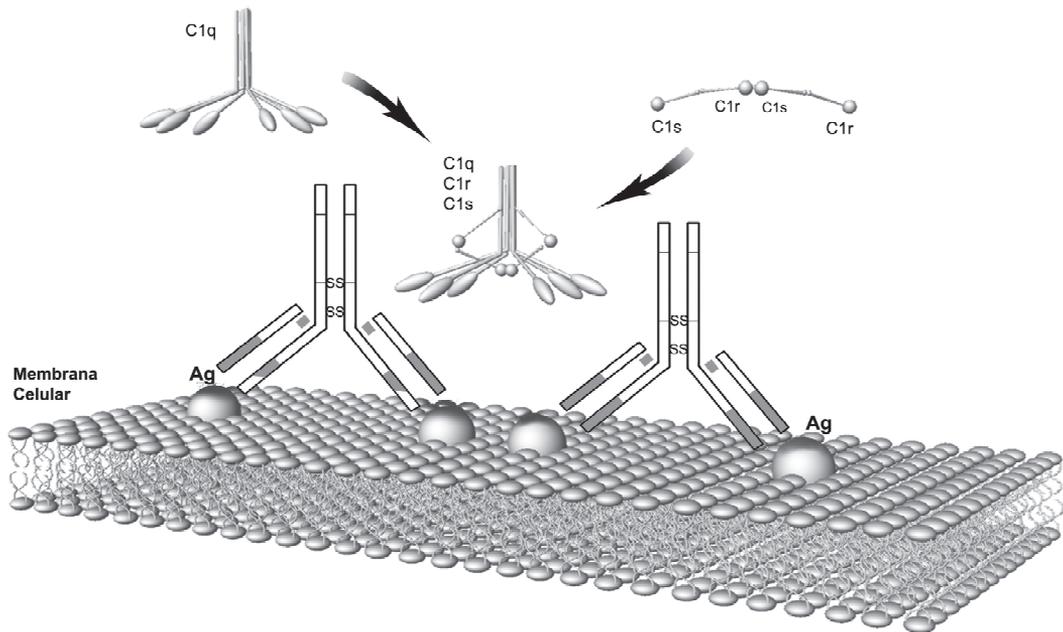
ésta, lo que facilita la agregación de varias Igs y la adherencia de C1q (Fig. 2). Esta proteína está unida a C1s y C1r, las cuales actúan sobre C2, provocando la división de esta molécula en dos fragmentos, C2a y C2b. El fragmento C2a se une al C4b para formar el complejo C4b2a (que es la convertasa C3 de la vía clásica). El complejo C4b2a, actúa sobre C3 dando lugar (convirtiéndose) en dos fragmentos activos: la anafilotoxina C3a, que pasa al medio líquido, y el fragmento C3b que se une a la membrana de la célula blanco. El complejo formado por C4b2a3b es la convertasa de C5 de la vía clásica, siendo éste el primer paso de la denominada vía lítica.

Parte de los detalles consiste en lo siguiente: la activación de C1q provoca que una molécula de C1r pierda por autocatálisis un trozo de bajo peso molecular, quedando activada. Esta molécula activa a otra molécula de C1r. Las dos moléculas de C1r atacan a dos moléculas de C1s liberando péptidos de bajo peso molecular y exponiendo sus dominios catalíticos. C1s actúa sobre una de

las cadenas de C4 produciendo su ruptura en dos moléculas, C4a y C4b, que se une a la membrana de la célula blanco. Esta unión de C4b se efectúa en presencia de iones  $Mg^{2+}$  (Dunkelberger y Song, 2010). C1q también se puede unir a algunos restos celulares y activar su fagocitosis.

#### VÍA ALTERNATIVA

Esta vía no necesita de anticuerpos para activarse. Lo hace reconociendo componentes en los patógenos, lo cual puede efectuarse a través de C3. Como ejemplos, se observan constituyentes de la pared celular de hongos como los glicanos (Agarwal *et al.*, 2011), zimosán (Kozel *et al.*, 1991) y melainas (Rosas *et al.*, 2002). En bacterias, se describe el ácido lipoteicoico (Fiedel y Jackson., 1978; Hummell *et al.*, 1985) y lipopolisacáridos (Lambris *et al.*, 1982; Grossman y Lieve, 1984). En el caso de virus, la actividad de neuraminidasa activa esta vía del Complemento (Hirsch *et al.*, 1986). También hay registros de componentes de protozoos que activan la vía alterna como es el



**Figura 2.** Activación de la vía Clásica del Complemento. Unión de C1 al antígeno. La unidad C1q se une a la Fc de las inmunoglobulinas que se encuentran en la membrana celular luego de la unión al antígeno. Figura modificada a partir de Carroll y Fischer (1997).

caso de la leishmaniasis (Mosser y Edelson, 1984) o *Acanthamoeba batrochozoites* (Pumidonming *et al.*, 2011). De hecho, normalmente siempre existe una pequeña fracción del contenido plasmático de C3 que está fragmentada en C3a y C3b. El fragmento C3b se puede unir a la membrana del patógeno. En este caso, el factor C3b unido a esta membrana capta al factor B formando el C3bB, sobre el cual a su vez actúa el factor D, liberando Ba, y quedando el complejo C3bBb que tiene actividad convertasa de C3. La unión de otro C3b aumenta el complejo a C3bBb3b, el que puede actuar sobre C5 (C3bBb3b es la convertasa de C5 de la vía alternativa) e iniciar la vía lítica. C3b puede unirse a receptores en la membrana de los fagocitos y favorecer la fagocitosis.

El fragmento C3a, por su actividad de anafilotoxina, activa mastocitos y basófilos induciendo la liberación de mediadores químicos, por parte de estas células, los cuales potencian la inflamación. Debemos mencionar aquí el caso de la properdina (P) que se une al complejo C3bBb, que es lábil, dando lugar a C3bBbP que es más estable, lo que contribuye a la amplificación de la activación del Sistema.

Es pertinente señalar en este lugar que algunos componentes de la inmunidad innata, sobre todo el Sistema del Complemento constituyen los principales mecanismos en la defensa de las infecciones que afectan al encefalo (Veerhuis *et al.*, 2011). En este sentido, tanto las neuronas como las células gliales expresan receptores para los componentes del Complemento, y para la activación Toll-símil de defensa. Además, el Complemento juega un papel importante en la depuración del material fibrilar Abeta por parte de la microglia en las fases iniciales del Alzheimer (Fu *et al.*, 2012).

#### VÍA DE LAS LECTINAS

Es una vía similar a la vía clásica de activación. El iniciador no es un anticuerpo sino una lectina (por ejemplo, la MBL: manose-binding protein) (Kuipers *et al.*, 2002) que reconoce ciertos componentes de las membranas de los gérmenes y es capaz de

activar, mediante la serín-proteasa MASP, a C4 y a C2 produciendo C4a, C4b y C2a, C2b.

Se debe señalar que la MBL circula unida a las enzimas MASPs. La MBL reconoce residuos de manosa en glicoproteínas o carbohidratos presentes en la superficie de microorganismos y a partir de ello las MABPs están en condiciones de actuar sobre C4, C2, como se ha dicho. Como consecuencia, estas proteínas actúan sobre C3 (se constituyen en C3 convertasas). Luego C4a y C2a junto a C3b constituyen la convertasa de C5, resultando en C5b que inicia la formación del Complejo de Ataque a la Membrana del organismo patógeno o la célula blanco correspondiente.

Cabe agregar que tan importantes como las MBL son las ficolinas, proteínas altamente conservadas durante la evolución. De hecho, su presencia casi constante en la filogenia se manifiesta en situaciones concretas tales como la subsistencia de alelos de estas proteínas en algunos genes en los primates (Hummelshoj *et al.*, 2011).

Conviene señalar que esta vía es, no solamente útil sino el más importante mecanismo para combatir algunas infecciones por bacterias en los mamíferos, como es el caso de la infección por neumococos (Ali *et al.*, 2012).

#### COMPLEJO DE ATAQUE DE MEMBRANA (MAC)

Esta es la parte de la cascada en la que convergen las tres vías antes mencionadas. A través de esta última etapa se produce la lisis del organismo patógeno mediante la creación de múltiples poros en su membrana (Fishelson *et al.*, 2002). El factor C5 se fija a C3b a través de las enzimas convertasas de C5. Este factor es escindido en C5a (que pasa al medio fluido) y el fragmento C5b que se une a C3b. La fracción C5b capta los factores C6 y C7, formando un complejo estable C5b67 que tiene actividad quimiotáctica y capacidad de fijación a las membranas. Si al complejo C5b67 se une la fracción C8, formando C5b678 deviene en citolítico, pues

el factor C8 modifica su configuración espacial ofreciendo zonas hidrofóbicas que determinan su inserción en la membrana. Este grupo de moléculas adquiere la capacidad de interactuar con moléculas de C9 formando el complejo C5b6789. Las moléculas de C9 sufren cambios conformacionales, desplegándose y presentando más zonas hidrofóbicas que aceleran la penetración del complejo formado en la membrana (MAC). Todo ello da origen a la formación de poros o canales hidrofílicos, que permiten el libre intercambio de agua, iones y moléculas pequeñas con el exterior de la célula, provocando la consiguiente lisis osmótica de la célula atacada (Fig. 3).

También se han descrito otros dos mecanismos de activación del Sistema de Complemento que son independientes de los anteriormente mencionados. Uno, que involucra a la properdina, promueve el ensamble *de novo* de la convertasa de C3 (Kimura *et al.*, 2008). Por otro lado, se sabe que C3 y C5 pueden ser clivados directamente por proteasas no dependientes del Complemento como son los casos de la calicreína y de la trombina.

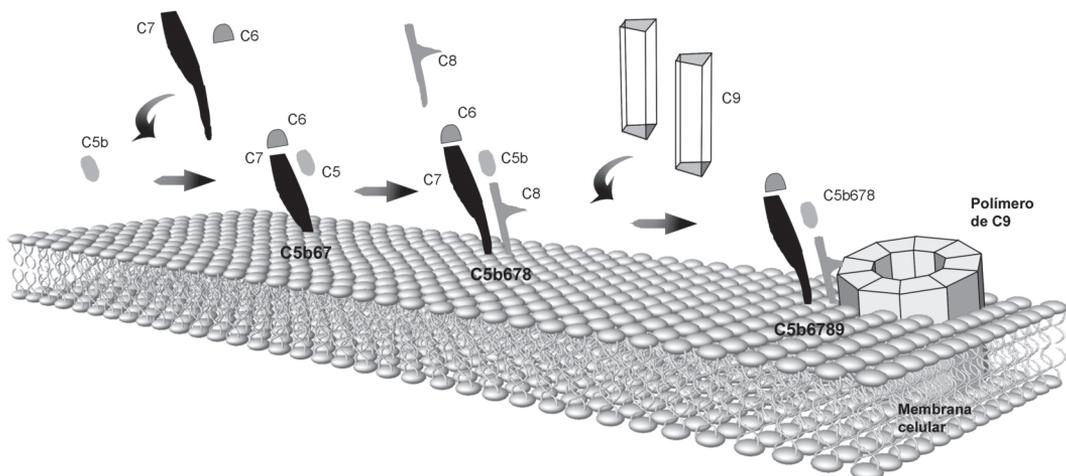
En nuestro laboratorio, se estudió la actividad del Sistema de Complemento en anuros y reptiles (Fernández 1986; Fernández y

Schoos 1990; Castro y Fernández, 2009). Nuestros estudios pusieron en evidencia la generalizada actividad lítica sobre eritrocitos de mamíferos llevada a cabo mediante la vía alternativa presente en una variedad de especies de anfibios y reptiles.

Una novel (y sorprendente) función del MAC ha sido recientemente propuesta a partir de las observaciones sobre las características del mecanismo molecular (Tegla *et al.*, 2011). Ella corresponde a la posibilidad real de situaciones en las cuales la cantidad de poros que se instalen en la membrana blanco sea pequeña y que la célula pertenezca al propio organismo. En estos casos de implementación sublítica del complejo C5a-C9, la pequeña cantidad de poros podría estar regulando procesos tales como activación celular, proliferación, diferenciación y como consecuencia, también manteniendo la homeostasis celular y tisular.

#### REGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

La activación y funcionamiento del Complemento está sujeta a regulación. De otra forma, dado el funcionamiento en cascada del Sistema y los ciclos de multiplicación



**Figura 3.** Complejo de Ataque de Membrana. En este Complejo convergen las vías de activación. C5b6789 lleva a la formación de poros o canales hidrofílicos en la membrana provocando la lisis osmótica de la célula atacante. Modificado a partir de García Olivares *et al.* (2010)

que posee, se podrían alterar sus efectos y desatarse una activación incontrolada que exceda los sitios donde sean necesarios. De hecho, al Complemento se le ha atribuido ser un componente causal importante de varias patologías (Alzheimer, lupus eritematoso sistémico, degeneración macular de la vejez, y otras) debido a una actividad localizada no controlada.

Existen varias proteínas que actúan inhibiendo la actividad del Complemento en distintos puntos de las cascadas (Sjöberg *et al.*, 2009). Las proteínas con efecto inhibitor se ubican, ya sea en las membranas celulares del organismo, o son solubles y viajan en el plasma sanguíneo. Las unidas a membranas impiden una actividad perjudicial hacia las células del propio organismo. Entre ellas, se destacan CD35, CD46, CD55 y CD 59. Estas actúan inhibiendo las convertasas de C3 y C5, y en el caso de CD59 inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana. Entre las solubles se destacan FH (Factor inhibitor del Complemento) que inhibe las convertasas de C3 de la vía alterna y de C5; y C4BP (proteína de unión a C4) que inhibe las convertasas de C3 de las vías clásica y de las lectinas, como así también la convertasa de C5.

Además se encuentran otros inhibidores que son menos potentes: FI (factor I), FH (factor H), FHL-1 (factor H-símil) y la carboxipeptidasa N que impide el ensamblaje del MAC. Hay información en el sentido que C46 además de las funciones en la regulación del Complemento, también modula negativamente la actividad tipo T-helper en la respuesta adaptativa (Cardone *et al.*, 2011)

#### FILOGENIA DEL SISTEMA INMUNE

Todo parece indicar que la vía de Complemento más antigua es la de las lectinas. Desde esta suposición se podría afirmar que un componente proteico intermedio entre C4 y C3 debe ser el factor/componente más antiguo; y entre las enzimas amplificadoras, las más antiguas deben corresponder a moléculas más cercanas a C2 (vía lectina) que al Factor B (vía alternativa) (Dodds y Matsushita, 2007).

La evidencia acumulada indica que la inmunidad adaptativa se estableció en etapas tempranas en la evolución de los vertebrados mandibulados. Se ha propuesto que ocurrieron dos eventos de tetraploidización que permitieron este paso en el proceso evolutivo (Nonaka y Yoshizaki, 2004). El primero ocurrió antes de la aparición de los agnatos y el segundo inmediatamente antes de los condrictios.

Las comparaciones estructurales de las proteínas que participan en las vías del Complemento sitúan el origen de este sistema en metazoarios primitivos que poseían mecanismos inmunitarios innatos rudimentarios (Fujita *et al.*, 2004). El proceso evolutivo de la generación del Sistema del Complemento implica la creación de las secuencias de pasos que integran las cascadas de funciones que culminan en cada uno de los objetivos fisiológicos (lisis, fagocitosis, inflamación, etc.). Para ello, se fueron agregando, durante la evolución, proteínas (factores) que perfeccionaron el proceso.

Se ha señalado que es mucho más fácil y posible que cada nuevo integrante de una cascada se agregue al principio o al final de la cadena, en lugar de insertarse entre dos integrantes preexistentes (Dodds y Matsushita, 2007).

Todos los organismos poseen mecanismos para defenderse de posibles ataques de patógenos y de invasiones externas. Estos mecanismos de defensa presentan diferencias significativas en las ramificaciones del árbol filogenético, tendiendo hacia una mayor complejidad en las respuestas de defensa y hacia un reconocimiento específico de los patógenos.

Se ha comprobado una diferencia entre peces y mamíferos en lo que respecta a la evolución de C3. Según sus estudios sobre los genes C3, Meng *et al.* (2012) sugieren que los peces estuvieron sujetos a una presión de selección positiva, mientras que los mamíferos sufrieron una presión de selección purificadora, debido a los distintos medios en los cuales habitan ambos grupos.

Los mecanismos de defensa son variados, siendo el más efectivo el de impedir la entra-

da de los patógenos a través del desarrollo de barreras físico-químicas. Este tipo de barreras se encuentra en todos los seres vivos, con características particulares dependiendo de qué organismo se trate. Podemos destacar la importancia de la piel, las escamas, el caparazón, las plumas en vertebrados, y el exoesqueleto en invertebrados. Los invertebrados poseen un Sistema Inmune Innato, donde participan componentes celulares y componentes humorales. Los animales vertebrados tienen otro nivel adicional de complejidad, el Sistema Inmune Adaptativo que permite reconocer específica y diferencialmente a las decenas de miles de antígenos que forman parte de los organismos nocivos. Algunos aspectos importantes de las diferencias entre los dos tipos de sistemas de defensa en los animales corresponden a los insectos (*Observaciones Sobre los Mecanismos de Defensa de los Insectos*. Pilar Medina Pereyra y Francisco M. Fernández, inédito).

Hay un problema con la identificación provisoria de las proteínas primitivas, o antecesoras de las actuales integrantes del Complemento. Ello abarcaría a las que se descubren y se presume que son homólogas funcionales de las ya conocidas. En general, se tiende a asignarle el mismo nombre que tiene la proteína (homóloga) más significativa del sistema actual, propio de los mamíferos. Por ejemplo, a la proteína considerada como supuesta antecesora de C3, cuyo gen homólogo se encontró recientemente en un urocordado, se le asigna el nombre de C3, a veces con dos letras (XxC3) que indican las iniciales de la especie estudiada, generalmente menos evolucionada. A todo esto mencionaremos que C3 y C4 son homólogos estructurales y que es indudable que tendrían una proteína antecesora en común. De ésta podría ser descendiente una versión algo cambiada de la proteína que se encuentra en los cordados no-vertebrados actuales.

Una forma más lógica es la utilizada por Dodds y Matsushita (2007) al designar a la proteína recientemente encontrada con los nombres que refieren al grupo de proteínas modernas que la englobarían como familia. Para el caso estos autores denominan a la

novel proteína encontrada como C4/C3. Creemos que en el caso que se mencione una proteína homóloga que supuestamente dio origen a las diversas líneas filéticas, se la podría designar provisoriamente como un proto-componente, para el caso denominarla *proto-C3*.

#### PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO

La evidencia indica que la inmunidad adaptativa se estableció en una etapa temprana en los vertebrados mandibulados y se ha propuesto que dos etapas de tetraploidización han jugado un papel decisivo en este proceso de evolución de los vertebrados. Se ha comprobado que entre los componentes de la vía clásica se encuentra una correspondencia uno a uno con los componentes de la vía alterna y de las lectinas. De hecho, se ve que C1q tiene el homólogo MBL; C1r y C1s tiene a MASP-1 y MASP-2; C2 tiene al factor B; C4 tiene a C3 (Dodds y Matsushita, 2007).

Todo ello indicaría que existieron por lo menos cuatro proteínas antecesoras una proto-MBL, una proto-MASP, una proto-C4 (que sería una  $\alpha 2$ -macroglobulina) y una proto-C2. En lo que respecta a su función en los Sistemas del Complemento modernos, las primeras proteínas en actuar son las que llevan a cabo la detección de la célula extraña, para el caso las MBL, las ficolinas, C3 y C1q.

*C3 y proteínas relacionadas.*— C3 es el componente más importante del Sistema de Complemento en los mamíferos porque juega un papel central en la activación y es común a las tres vías del Sistema. Se ha descrito la existencia de varios casos de expresión de genes que codifican proteínas significativamente similares a las de la superfamilia de C4/C3/ $\alpha 2$ M. Una de las características de estas proteínas consiste en que poseen dominios con un grupo tioéster reactivo que en circunstancias definidas puede unirse covalentemente a otras proteínas. Estos genes son transcritos en baja proporción durante todas las etapas del desarrollo y se expresan marcadamente ante la entrada de un patógeno (Lagueux *et al.*, 2000).

El Sistema de Complemento con una función lítica y de opsonización se creía propio de vertebrados, pero recientemente se descubrió en equinodermos y tunicados un C4/C3 con actividad opsonizante y potencial actividad de convertasa de C3. De esta manera, se ha sugerido que el desarrollo del Complemento con función efectora opsonizante es más temprano en los deuterostomados (Zhu *et al.*, 2005). Estos elementos juegan un rol importante en el desarrollo de la inmunidad innata. Un gen similar al de la  $\alpha 2$ -M ha sido encontrado en los protostomados.

En el caso de los mamíferos, y seguramente en todos los vertebrados, C3 es homólogo a C4 y C5, y estas tres moléculas están relacionadas (no en forma cercana) con un inhibidor de las proteasas del suero, la  $\alpha 2$ -macroglobulina ( $\alpha 2$ M) del cual se cree que derivan (Sottrup-Jensen *et al.*, 1985). Cabe mencionar que se ha descrito un nuevo miembro de esta familia, una proteína de membrana GPI de anclaje de células sanguíneas denominada CD109 (Lin *et al.*, 2002).

En las lampreas se ha identificado solamente un gen que pertenece estructuralmente al grupo C3/C4/C5. Este nuevo gen es distinguible del gen de la  $\alpha 2$ -M. La estructura C3a se encuentra en las lampreas, pero no en urocordados, ni erizos de mar. Su presencia en cefalocordados (Zhang *et al.*, 2009) indica que la definición del linaje de C3 es un problema abierto.

Hay un antecesor común de C4/C3 (un proto C4) y de B (proto-C2), del cual son descendientes los que están presentes en ascidias y erizo de mar.

En el equinodermo *Apostichopus japonicus* se han analizado dos isoformas del C3, denominadas AjC3-2, y AjC3-3, cuya expresión varía durante el desarrollo y que aumenta su expresión cuando el animal es estimulado con lipopolisacáridos bacteriano (Zhou *et al.*, 2011), lo cual probaría su compromiso con los mecanismos de defensa.

En el quelicerado *Lymulus polyphemus* se encontraron componentes homólogos a los del Sistema de Complemento de vertebrados (Tagawa *et al.*, 2012) lo que agrega un pa-

norama interesante en el estudio del origen de este Sistema.

En el genoma de las garrapatas se han encontrado varios genes que codificarían para proteínas que contienen el grupo reactivo tioéster, y que integran la familia  $\alpha 2$ M. Entre ellas, se encuentra una proto-C3, una proto- $\alpha 2$ M, y otras proteínas tioéster portadoras. La proto-C3 tiene capacidad de facilitar la fagocitosis sobre las bacterias (Buresova *et al.*, 2011).

Suzuki *et al.* (2002) analizaron la filogenia de C3 teniendo en cuenta a las proteínas que presentan un grupo tioésterreactivo. De sus estudios, se desprende que los genes correspondientes se han duplicado en la primera etapa de la evolución de los metazoos, antes de la divergencia de protostomados y deuterostomados. Como en general se encuentra solamente una dotación de genes, se deduce que una rama principal de C3/C4/C5 se ha perdido en el ancestro común protostomado. En la rama C3/C4/C5, la secuencia en anfibios (Suzuki *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2009; ), ascidias (Ji *et al.*, 1997; Nonaka *et al.*, 1999), y erizos de mar (Al-Sharif *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2001; Smith, 2002; Clow *et al.*, 2004; Multerer y Smith 2004) ha divergido antes de la duplicación de C3-C5 que se habrían desarrollado en los deuterostomados. Ello indicaría que estas duplicaciones de genes se produjeron en el linaje de los vertebrados después de la divergencia de cefalocordados y urocordados.

Existe una vasta literatura sobre el tema de funciones y proteínas similares a C3 presentes en animales no mamíferos. Parte de ésta ha sido compilada por Dodds y Matsushita (2007), cuyo trabajo se resume a continuación.

Los Celenterados poseen en el genoma secuencias C3/C4-símil y C2/fB-símil. Es lo más antiguo que se ha encontrado sobre proteínas proto-complementarias.

El coral *Swiftia excerta* posee una proteína que es más parecida a los componentes C3/C4 del Complemento de vertebrados que a la  $\alpha 2$ -macroglobulina (Dodds y Matsushi-

ta, 2007), lo cual indica que si los corales tuvieran Sistema del Complemento, el origen de este Sistema se encontraría prácticamente al inicio de la aparición de los organismos multicelulares.

En los equinodermos, en los cuales la especie más estudiada es el erizo de mar, se ha comprobado que tienen proto-C3, un proto-C2, un proto-C1q, y una lectina, a partir de lo cual se deduce que tendría un sistema de defensa opsónico.

Sobre las Ascidias, se ha propuesto que tienen un Sistema de Complemento tipo vía lectina, que es opsónico, basado en la deposición de proto-C3 sobre el organismo extraño, que es fagocitado por los hemocitos. Tienen dos tipos de moléculas de reconocimiento, una tipo lectina y otra tipo ficolinas. Estas unen a MASP, lo cual activa a C3/C4. También tienen un sistema de amplificación C2/fB. La C3/C4 es opsónica y es reconocida por una proteína de membrana de los hemocitos similar a las integrinas.

En anfibios se ha comprobado que poseen dos MASP muy similares a las MASP de los mamíferos. Asimismo tienen moléculas tipo C3/C4 y una proteína similar a las del MAC de los vertebrados, un proto-C6. Este hallazgo lleva a pensar que la proteína inicial, original del MAC, debía haberse parecido a C6. En esta especie existe un mecanismo con todas las características de la vía de las lectinas de los vertebrados pero que se basa exclusivamente en las ficolinas (Huang *et al.*, 2011). Este mecanismo es claramente fagocítico y activaría en el último paso a una proto-C3.

Los peces agnatos no tienen un sistema inmune basado en las inmunoglobulinas. Los agnatos divergieron del resto de los vertebrados antes que se produjera la duplicación genómica que abarcó a la línea C3, C4 y C5. Tienen C3/C4, C2/fB, MASP, C4 binding protein control protein, C1q-like, y MBL-like lectinas. Asimismo tienen MBL y C1q-like y una vía de lectinas. La vía clásica de reconocimiento de inmunoglobulinas puede haber evolucionado a partir de estas proteínas. Por otra parte, también poseen un mecanismo

lítico que no estaría relacionado con el Sistema de Complemento.

*Serín-proteasas.*— Estas enzimas proteolíticas son responsables de la activación, en cada uno de los pasos, del Sistema de Complemento. Podemos destacar MASP-1, MASP-2, y MASP-3. También es pertinente mencionar las sMAPs encontradas en carpas que se producen por un corte-empalme alternativo. MASP -2 y MASP-3 comparten con C1r y C1s, al menos 3 dominios de serín proteasas. La mayoría de estas enzimas de los mamíferos, excepto el factor D, muestran características estructurales similares (Volanakis y Arlaud, 1998). Además del dominio catalítico serín proteasa en su extremo C-terminal, estas proteasas tienen varios dominios. Tales son el dominio clase A del receptor de LDL (LDLRA), las secuencias consenso repetidas (SCR), C1, uEGF, la proteína morfogenética ósea (CUB), EGF, factor I, las proteínas del complejo de ataque de membrana (FIMAC), y receptor rico en cisteína (SRCR). Todos estos dominios están presentes en los genomas de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Venter *et al.*, 2001).

El factor B (o similar B) es muy importante porque actúa sobre C3. La presencia del factor B da indicios de la existencia de la vía Alterna. Se estudió en lampreas y se observó que tiene la misma estructura que Bf y C2 de vertebrados mandibulados. Habría un ancestro común a los factores B y C2 de los vertebrados superiores.

La especialización estructural del dominio serín-proteasa de B/C2 parece haber ocurrido en el linaje de los vertebrados mandibulados después de la divergencia de agnatos, pero antes de la divergencia de los condrictios (Terado *et al.*, 2001). Las consecuencias funcionales de este cambio estructural aún no fueron aclaradas en su totalidad. Sin embargo, es interesante notar el hecho que esta variación se habría producido simultáneamente con la aparición del sistema inmune adaptativo. Recientemente, utilizando análisis genómico en diferentes animales se reveló que proteínas similares a B, MASP y

C3 se habrían originado en un ancestro común de eumetazoarios, hace 600 millones de años (Kimura *et al.*, 2009)

#### COMPONENTES LÍTICOS

Los componentes terminales del Sistema de Complemento tienen la finalidad de crear poros en la membrana de los organismos invasores, lo que lleva a la lisis celular. Este conjunto molecular es llamado complejo de ataque de membrana (MAC). Los componentes que intervienen en la formación de MAC son C5, C6, C7, C8 y C9. Entre ellos, C6, C7, C8 y C9 comparten una estructura característica, que también se encuentra en la perforina, proteína utilizada por el sistema inmune en la toxicidad mediada por células (Shinkai *et al.*, 1988).

La perforina merece un apartado especial, mediadora de la función de lisis celular, que es monomérica cuando se encuentra en solución y se oligomeriza cuando se inserta en la membrana para formar los poros. Esta proteína es producida por los linfocitos NK y linfocitos-T. Posee ciertas similitudes con las proteínas que forman el Complemento y pertenece, junto a las serín-proteasas pre-apoptóticas, y granzimas, al grupo de moléculas encargadas de la regulación del sistema inmunitario (Urrea Moreno *et al.*, 2008).

Todas las moléculas clave que participan en la citotoxicidad inmunológica parecen haberse originado a partir de una molécula ancestral común que contiene el dominio MAC/perforina. Hasta hace poco, estas moléculas se habían identificado sólo en especies de mamíferos. Las excepciones fueron el MAC y el cDNA de C8 y C9 que se encontraron en los peces óseos. Ello dejaba el origen evolutivo de las moléculas inmunológicas citotóxicas sin resolver. Los recientes avances en genómica arrojaron algo de luz sobre la evolución de estas moléculas que contienen el dominio MAC/perforina. No hay ningún dominio MAC/perforina en el genoma de *Drosophila* pero si se la describió en moluscos marinos (Mah *et al.*, 2004). A juzgar desde el punto de vista funcional, la reacción inmunológica citotóxica se remonta a los tiburones.

El Sistema de Complemento en lamprea trabaja como un sistema de opsonización sin función citolítica. Se ha informado sobre el hallazgo de una molécula similar a C6 en anfibios que funciona como un factor citolítico (Liang *et al.*, 2009). Es también sorprendente que se hayan identificado más de 10 genes con el dominio MAC/perforina en la secuencia del genoma de una ascidia, *Ciona intestinalis*. El análisis de la filogenia indica que la expansión de MAC/perforina se produjo de forma independiente en las ascidias y los vertebrados.

Si bien las lampreas constituyen los primeros vertebrados y poseen varios de los componentes del Complemento, con algunas características que remiten al origen de la respuesta inmune adaptativa, existe información para sostener que los orígenes estructurales de la inmunidad adaptativa se llevaron a cabo en los cefalocordados (Zhang *et al.*, 2009). Estos autores observan que los representantes actuales de este grupo, los anfibios (*Branchiostoma belcheri* y *B. floridae*) poseen los genes necesarios para soportar una respuesta inmune adaptativa, incluido un proto-Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Asimismo poseen las vías alternativa y de las lectinas de activación del Complemento. En Fig. 4, se enumeran los genes de los principales Phyla animales, vinculados a los procesos en que interviene el Complemento.

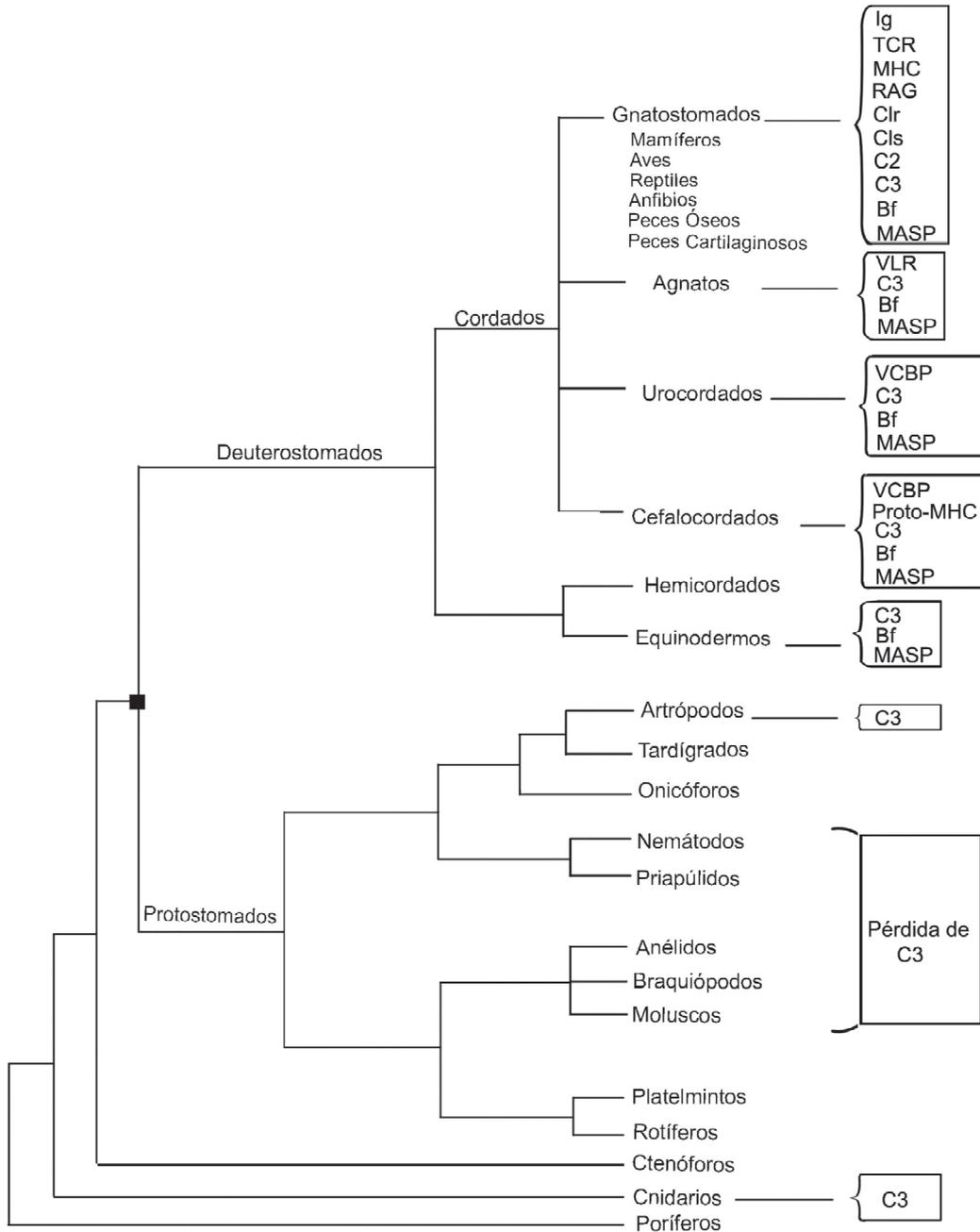
#### EVOLUCIÓN DE ÓRGANOS LINFOIDES

La existencia de linfocitos T y B en los animales vertebrados está asociada a la presencia de órganos linfoides dedicados a la producción o diferenciación de estas células. Al respecto cabe mencionar que se han encontrado agregados linfoides asociados al intestino en todos los animales vertebrados.

El timo es un órgano que se encuentra a partir de los tiburones, y se mantiene en toda la filogenia de los vertebrados como órgano linfóide primario de linfocitos T. Con el bazo ocurre algo similar dado que se encuentra en todos los animales vertebrados excepto en los agnatos.

Se ha observado que se necesita una correcta estructura esquelética para el desarrollo de la médula ósea. Ésta no apareció hasta que los vertebrados se adaptaron al me-

dio terrestre. De esta forma observamos que los peces no tienen médula ósea, pero que en los anfibios existe contenido de tejido linfocítico en sus huesos, siendo la médula ya to-



**Figura 4.** Componentes del Sistema de Complemento a lo largo de la evolución. En el recuadro de la derecha se muestran los componentes de Complemento que se encuentran en cada grupo zoológico. Figura inspirada en Nonaka y Yoshizaki (2004) y en Fujita *et al.* (2004).

talmente funcional en anfibios anuros, reptiles, aves y mamíferos.

El riñón (porción del riñón anterior) se comporta como órgano linfoide primario en peces y en algunos anfibios.

Entre las estructuras linfoides más organizadas tenemos a los ganglios linfáticos, que están constituidos por folículos primarios de células B, rodeadas de linfocitos T. Estos ganglios aparecen ya bien definidos a partir de los anfibios anuros, y se encuentran en el resto de animales vertebrados, aunque con ciertas diferencias entre ellos.

Cabe hacer una referencia a las inmunoglobulinas (Igs), moléculas especializadas en unirse a componentes que el organismo reconoce como no-propios, facilitando su destrucción mediante lisis o fagocitosis. Los anticuerpos, proteínas pertenecientes por sus dominios a la superfamilia de las inmunoglobulinas, constituyen la forma funcional y estructuralmente más perfeccionada de las moléculas asociadas a la inmunidad. Se distinguen porque son muy específicas frente a patógenos. Teniendo en cuenta el número y tipo de inmunoglobulinas se observa que hay una evolución hacia una mayor variedad y complejidad de los anticuerpos, siendo los mamíferos los que mayor diversidad poseen.

Los peces agnatos no presentan anticuerpos tetracatenarios como los descritos en el resto de vertebrados, sino que sintetizan grandes proteínas multiméricas que funcionan como cadenas pesadas tipo M sin puentes disulfuro, y carecen de cadena ligera.

El resto de vertebrados presentan inmunoglobulina M, siendo en muchos casos la única inmunoglobulina que producen. La inmunoglobulina Y, que aparece en peces pulmonados y se mantiene en anfibios, reptiles y aves, se considera precursora de las IgE e IgG de los mamíferos por compartir algunas de sus funciones como su participación en infecciones parasitarias y en la memoria antigénica, respectivamente. Una IgA similar es producida en las aves. En los mamíferos la IgA es una inmunoglobulina monomérica en la sangre, pero en las secreciones es dimerica, como se la encuentra en la leche y el tracto entérico. La mayor diversidad pare-

ce hallarse en mamíferos, donde surgieron otras clases como la IgG, la IgE y la IgD.

#### OTRAS ENZIMAS DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA

Además de las que forman parte de mecanismos definidos y complejos existen varias enzimas que cumplen con funciones antibacterianas en los seres vivos. Entre ellas, se destacan dos que han sido muy estudiadas en los mamíferos: la lisozima y la lactoperoxidasa. La lisozima se encuentra en prácticamente todos los seres vivos, virus, hongos, plantas y animales y la lactoperoxidasa si bien parece estar restringida a los mamíferos, forma parte conjuntamente con otras enzimas de una de las familias de peroxidases, a la cual se le atribuye actividad antibacteriana. Cabe señalar que, en general, estas enzimas no forman parte ni se activan conjuntamente con otros sistemas de la defensa inmune innata.

*Lisozima.* — La lisozima, también conocida como hidrolasa del ácido N-acetilmurámico, es una enzima que hidroliza la unión  $\alpha$  1-4 entre los enlaces del ácido N-acetil-murámico (NAM) y N-acetil glucosamina (NAG) que forman parte de la pared celular bacteriana. Es una enzima muy ubicua, muy antigua y constituye la más difundida forma de defensa inespecífica de los animales (Lesnierowski y Kijowski, 2007).

Entre éstos se han identificado tres grandes tipos de lisozima, designados como C (*chicken*), G (*goose*) y el I (o *i*) (invertebrados), las cuales difieren en secuencias de aminoácidos y propiedades enzimáticas (Callewaert y Michiels 2010). Según el trabajo de Chapelle *et al.* (2009) se identificaron 5 genes en *Spodoptera frugiperda* que codifican proteínas de la familia de la lisozima tipo C, y corresponden a 3 proteínas de esta familia y a 2 proteínas similares a lisozima con actividad antibacteriana. Esto demuestra la capacidad de multiplicarse que tienen algunos genes en especies particulares. También en *Bombyx mori* y *Antheraea mylitta* se describieron tres proteínas similares a la li-

sozima pero con una actividad de muramidasa diferente de la clásica lisozima (Gandhe *et al.*, 2007).

La lisozima tipo i se encuentra distribuida en poríferos, equinodermos, algunos artrópodos, nematodos, anélidos y algunos moluscos. Por ejemplo, en los bivalvos se informó que su lisozima es del tipo i. Por otro lado, la lisozima tipo C se encuentra en cefalocordados, vertebrados, y artrópodos no crustáceos. La tipo G se encuentra en cordados no vertebrados, vertebrados y moluscos (Bachali *et al.*, 2002). *Drosophila melanogaster* se destaca como uno de los pocos registros donde se encontraron tanto lisozima C como i. Todo indicaría que estas dos lisozimas estuvieron presente en un ancestro común de bilateria hace 600 millones de años.

Cabe mencionar el caso de la á-lactalbúmina, proteína que se encuentra en los mamíferos y que tiene la función de actuar como proteína especificadora en la síntesis de la lactosa por parte de la glándula mamaria. La lisozima C y la á-lactalbúmina tienen una similitud de ~40 % en sus secuencias de aminoácidos, una organización intrón-exón similar, y estructuras secundaria y terciaria semejantes (Philip, 1966). La á-lactalbúmina no posee actividad lítica. La divergencia entre las dos proteínas ocurrió durante la aparición de los mamíferos. En el equidna (*Tachyglossus aculeatus*), se ha descrito una molécula con actividad de lisozima y á-lactalbúmina (Hopper y McKenzie, 1974).

Es interesante el hecho que no se haya demostrado que la lisozima forme parte de mecanismos de expresión fisiológicos que se co-activan con otros mecanismos de defensa, ya sean específicos o inespecíficos. De hecho una de las razones parece basarse en la circunstancia que las mediciones de la actividad de esta enzima, basadas en los métodos turbidimétricos, no están adecuadamente formalizados de manera que los resultados sean comparables. En nuestro laboratorio hemos desarrollado y modificado métodos para determinar la actividad de la lisozima contra *Micrococcus luteus* a los efectos de hacer reproducibles y comparables los resul-

tados. Se midieron las actividades en varias especies de mamíferos, reptiles, e insectos (Castro *et al.*, 2009; Medina Pereyra *et al.*, 2012). A partir de ellos hemos logrado hacer comparable la actividad de esta enzima en distintos organismos pertenecientes a taxones no relacionados.

## CONCLUSIONES

Desde los primeros metazoos, que resultaron exitosos a punto de dejar descendientes evolutivamente eficientes, se generaron proteínas que tenían funciones de defensa. Entre sus características se encontraba, necesariamente, la capacidad de unirse a microorganismos potencialmente dañinos afectando su viabilidad. Al mismo tiempo se formaron células capaces de unir a sus membranas estos microorganismos, de ingerirlos y destruirlos. Por un proceso de selección, se perfeccionaron estos mecanismos originando moléculas y células con mecanismos de reconocimiento más específicos. El camino que llevó a la generación de un sistema que destruya la célula extraña mediante lisis necesitó más de media docena de proteínas funcionalmente asociadas para cumplir los objetivos parciales sucesivos necesarios. En los primeros organismos el proceso se limitó a la fagocitosis de material extraño. Un paso adelante fue la aparición del proceso lítico, que se efectivizó en la vía de las lectinas. El paso más avanzado lo constituyó la detección de los organismos invasores mediante anticuerpos, y su destrucción mediante la vía clásica.

No es fácil elaborar una opinión sintética sobre los cambios acaecidos por un sistema tan complejo como el Complemento. Ello es debido a varios motivos: a) sus características solamente se pueden apreciar a partir de una información muy restringida, dado el escaso número de especies representativas estudiadas; b) es muy probable que todavía no haya suficiente información sobre la diversidad de tipos de mecanismos de defensa existente en los animales; c) existe la posibilidad cierta que la información buscada, quizás represente solamente una fracción

de la información importante y verdadera, cuya naturaleza solamente podemos imaginar. Este punto se debe aclarar. La mayoría de las investigaciones sobre el Complemento se efectúa indagando sobre estructuras y funciones que corresponden al campo propio de los mamíferos. Esta actitud de búsqueda, si bien es pertinente, no podemos asegurar que sea completa. El hecho de llegar a conocer (en otros taxones) todo lo relacionado con el modelo actual del Complemento en los mamíferos, no garantiza tampoco que estemos apreciando el panorama completo de lo que ocurre en el resto de las especies, y menos que alcancemos un conocimiento completo del devenir de la historia evolutiva del Sistema del Complemento.

Para avalar lo anterior podemos mencionar un ejemplo: el caso del RNA interferente en los insectos. Hasta hace una década las explicaciones sobre los mecanismos de defensa antivirales de los insectos incluían lo relacionado con la fagocitosis, las enzimas citolíticas, los péptidos antimicrobianos, etc. Ellos no explicaban completamente la defensa anti-virósica. Con el advenimiento de los conocimientos del mecanismo del RNA interferente hace algo más de una década, se amplió notablemente, aunque no completamente, la comprensión de la defensa antiviral en los insectos. El novel mecanismo constituía una forma absolutamente novedosa de defensa. De la misma manera sería sorprendente, pero claramente posible, que en algunos taxones animales no vinculados a los mamíferos hubiérase producido la generación de nuevos procesos antimicrobianos a partir de sistemas no directamente comprometidos en los mecanismos de defensa, los cuales todavía no han sido estudiados. Relacionado con esto se debe mencionar que existe escasa información sobre los mecanismos de defensa en los invertebrados. De hecho, sobre grupos muy importantes, como el caso de los moluscos, existe solamente una reducida información.

Seguramente en los próximos años el conocimiento sobre el tema crecerá lo suficiente para completar el cuadro existente.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Juan Díaz Ricci por sus pertinentes sugerencias y su aporte en la lectura del borrador. Al Lic. Pablo Pereyra por el diseño gráfico.

## LITERATURA CITADA

- Agarwal, S., Specht, C. A., Haibin, H., Ostroff, G. R., Ram, S., Rice, P. A. y Levitz, S. M. 2011. Linkage specificity and role of properdin in activation of the alternative complement pathway by fungal glycans. *American Society for Microbiology*, 2 (5): 11-17.
- Ali, Y. M., Lynch, N. J., Haleem, K. S., Fujita, T., Endo, Y. y Hansen, S. 2012, Thelectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathogens*, 8: e1002793.
- Al-Sharif, W. Z., Sunyer, J. O., Lambris, J. D. y Smith, L. C. 1998. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *Journal Immunology*, 160, 2983-2997 (published erratum appeared in 1999 in *Journal of Immunology*, 162 (5), 3105).
- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A. y Deutsch, J. S. 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozyme and the evolution of lysozyme function. *Molecular Evolution*, 54: 652-664.
- Berrón Pérez, R., Penagos-Paniagua, M. J., Zaragoza-Benitez, J. M., Rodríguez-Álvarez, J. y Blancas-Galicia, L. 2003. El complemento. Vías clásica y de las lectinas que se une a la manosa. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica*, 2 (12): 46-52.
- Buresova, V., Hajdusek, O., Franta, Z., Loosova, G., Grunclova, L. y Levashina, E. A. 2011. Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *Journal of Innate Immunology*, 3: 623-630.
- Callewaert, L. y Michiels, C. W. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35 (1): 127-160.
- Cardone, J., Le Fric, G. y Kemper, C. 2011. CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clinical and Experimental Immunology*, 164: 301-311.
- Carroll, M. C. y Fischer, M. B. 1997. Complement and immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9: 64-69.
- Castro, F. y Fernández, F. 2009. Actividad del sistema de complemento y de lisozima en suero sanguíneo de tortuga, *Chelonoidis chilensis* (Quelonia). *Acta Zoológica Lilloana*, 53 (1-2): 57-63.
- Castro, F., Rodríguez, A., Juárez, G. y Fernández, F. 2009. Aspectos comparativos de la determina-

- ción de la actividad lítica de la lisozima. *Acta Zoológica Lilloana*, 53 (1-2): 49-56.
- Chapelle, M., Girar, P. A. y Cousserans, F. 2009. Lysozymes and lysozymes-like proteins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Molecular Immunology*, 47: 261-269.
- Clow, L. A., Raftos, D. A., Gross, P. S. y Smith, L. C. 2004. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. *Journal of Experimental Biology*, 27 (12): 2147-2155.
- Dodds, A.W. y Matsushita, M. 2007. The Phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway. *Immunobiology*, 212: 233-243.
- Dunkelberger, J. R. y Song, W. C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20: 34-50.
- Eggleton, P., Reid, K. B. M. y Tenner, A. J. 1998. C1q-how many functions? How many receptors? *Trends in Cell Biology*, 8: 428-431.
- Fernández, F. M. 1986. Actividad hemolítica y aglutinante natural en varias especies de anuros del noroeste argentino. *Acta Zoológica Lilloana*, 38 (2): 211-221.
- Fernández, F. M. y Saad de Schoos, S. 1990. Actividad hemolítica natural de *Waglerophis merremi* (Wagler) (Reptilia, Colubridae). *Acta Zoológica Lilloana*, 39 (2): 17-21.
- Fiedel, B. A. y Jackson, R. W. 1978. Activation of the alternative complement pathway by a streptococcal lipoteichoic acid. *Infection and Immunity*, 22: 286-287.
- Fishelson, Z., Hochman, L., Greene, L. L. y Eisenberg, E. 2002. Contribution of heat shock proteins to cell protection from complement-mediated lysis. *International Immunology*, 13 (8): 983-991.
- Flierman, R. y Daha, M.R. 2007. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*, 212: 363-370.
- Fu, H., Liu, B., Frost, J.L., Hong, S., Jin, M. y Ostaszewski, B. 2012. Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar A $\beta$  by microglia. *Glia*, 60: 993-1003.
- Fujita, T., Endo, Y. y Nonaka, M. 2004. Primitive complement system-recognition and activation. *Molecular Immunology*, 41: 103-111.
- Gandhe, S. A., Janardhan, G. y Nagaraju, J. 2007. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silk moths (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 655-666.
- García Olivares, E., Alonso, A., Miró, M. y Peña, J. 2010. Sistema del complemento. <http://www.inmunologiaenlinea.es>.
- Grossman, N. y Leive, L. 1984. Complement activation via the alternative pathway by purified Salmonella lipopolysaccharide is affected by its structure but not its O-antigen length. *Journal of Immunology*, 132: 376-385.
- Heeger, P. S. y Kemper, C. 2012. Novel roles of complement in T effector cell regulation. *Immunobiology*, 217: 216-224.
- Hirsch, R.L., Wolinsky, J. S. y Winkelstein, J. A. 1986. Activation of the alternative complement pathway by mumps infected cells: relationship to viral neuraminidase activity. *Archives of Virology*, 87: 181-190.
- Hopper, K. E. y McKenzie, H. A. 1974. Comparative studies of  $\alpha$ -Lactalbumin and lysozyme: Echidna lysozyme. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 3 (2): 93-108.
- Horstman, L. L., Jy, W., Ahn, Y. S., Maghzi, A. H., Etemadifar, M. y Alexander, J. S. 2011. Complement in neurobiology. *Frontiers in Bioscience*, 16: 2921-2960.
- Huang, H., Huang, S., Yu, Y., Yuan, S., Li, R. y Wang, X. 2011. Functional characterization of a ficolin-mediated complement pathway in amphioxus. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 36739-36748.
- Hummel, D. S., Swift, A. J., Tomasz, A. y Winkelstein, J. A. 1985. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal lipoteichoic acid. *Infection and Immunity*, 47: 384-387.
- Hummelshoj, T., Nissen, J., Munthe-Fog, L., Koch, C., Bertelsen, M. F. y Garred, P. 2011. Allelic lineages of the ficolin genes (FCNs) are passed from ancestral to descendant primates. *PLoS One*, 6: e28187.
- Ignatius, A., Schoengraf, P., Kreja, L., Liedert, A., Recknagel, S. y Kandert, S. 2011. Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1 $\beta$ . *Journal of Cell Biochemistry*, 112: 2594-2605.
- Ji, X., Azumi, K., Sasaki, M. y Nonaka, M. 1997. Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (12): 6340-6345.
- Kimura, Y., Miwa, T. y Song, W. C. 2008. Activator-specific requirement of properdin in the initiation and amplification of the alternative pathway complement. *Blood*, 111 (2): 732-740.
- Kimura, A., Sakaguchi, E. y Nonaka, M. 2009. Multi-component system of cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea urchin anemone, *Nematostella vectensis*. *Immunobiology*, 214 (3): 165-178.
- Kozel, T. R., Wilson, M. A. y Murphy, J. W. 1991. Early events in initiation of alternative complement pathway activation by the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 59: 3101-3110.
- Kuipers, S., Aerts, P. C., Sjöholm, A. G., Harmsen, T. y van Dijk, H. 2002. A hemolytic assay for the estimation of functional mannose-binding lectin

- levels in human serum. *Journal of Immunological Methods*, 268: 149-157.
- Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M. y Hoffmann, J. A. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (21): 11427-11432.
- Lambris, J., Papamichail, M., Ioannidis, C. y Dimitracopoulos, G. 1982. Activation of the alternative pathway of human complement by the extracellular slime glycolipo protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectology Disease*, 145: 78-82.
- Lesnierowski, G. y Kijowski, J. 2007. Lysozyme. En: R. Houplahti, R. López-Fandiño, M. Anton y R. Schade, R. (eds.), *Bioactive egg compounds*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 33-40.
- Liang, Y., Zhang, S. y Wang, Z. 2009. Alternative complement activity in the egg cytosol of amphioxus *Branchiostoma belcheri*: evidence for the defence role of maternal complement components. *PLoS One*, 4 (1): 1-6.
- Liang, D. Y., Li, X., Shi, X., Sun, Y., Sahbaie, P. y Li, W. W. 2012. The complement component C5a receptor mediates pain and inflammation in a postsurgical pain model. *Pain*, 153: 366-372.
- Lin, M., Sutherland, D. R., Horsfall, W., Totty, N., Yeo, E., Nayar, R., Wu, X. F. y Schuh, A. C., 2002. Cell surface antigen CD109 is a novel member of the alpha(2) macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood*, 99, 1683–1691.
- Mabbott, N. A. 2004. The complement system in prion diseases. *Current Opinion in Immunology*, 16:587–593.
- Mah, S. A., Moy, G. W., Swanson, W. J. y Vacquier, V. D. 2004. A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochemical and Biophysical Research*, 316 (2): 468-475.
- Medina Pereyra, P., Castro, F. y Fernández, F. M. 2012. Actividad de lisozima en hemolinfa de larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 56 (1-2): 31-37.
- Meng, F., Sun, Y., Liu, X., Wang, J., Xu, T. y Wang, R. 2012. Analysis of C3 suggests three periods of positive selection events and different evolutionary patterns between fish and mammals. *PLoS One*, 7: e37489.
- Mosser, D. M. y Edelson, P. J. 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania promastigotes*: parasite lysis and attachment to macrophages. *Journal of Immunology*, 132: 1501-1505.
- Multerer, K. A. y Smith, L. C. 2004. Two cDNAs from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, encoding mosaic protein with domains found in factor H, factor I, and complement C6 and C7. *Immunogenetics*, 56(2): 89-106.
- Nonaka, M. y Yoshizaki, F. 2004. Evolution of the complement system. *Molecular Immunology*, 40: 897-902.
- Nonaka, M., Azumi, K., Ji, X., Namikawa-Yamada, C., Sasaki, M., Saiga, H., Dodds, A. W., Sekine, H., Homma, M. K., Matsushita, M., Endo, Y. y Fujita, T. 1999. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Journal of Immunology*, 162, 387–391.
- Philip, D.D. 1966. The tree-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, 215: 78-90.
- Pumidonming, W., Walochnik, J., Dauber, E. y Petry, F. 2011. Binding to complement factors and activation of the alternative pathway by *Acanthamoeba*. *Immunobiology*, 216: 225-233.
- Rosas, A. L., MacGill, R. S., Nosanchuk, J. D., Kozel, T. R. y Casadevall, A. 2002. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Journal of Immunology*, 168: 144-148.
- Shinkai, Y., Takio, K. y Okumura, K. 1988. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature*, 334: 525–527.
- Sjöberg, A. P., Trouw, L. A. y Blom, A. M. 2009. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends in Immunology*, 30:83-90.
- Smith, C. 2002. Thioester function is conserved in SpC3, the sea urchin homologue of the complement component C3. *Developmental and Comparative Immunology*, 26 (7): 603-614.
- Smith, L. C., Clow, L. A. y Terwillinger, D. P. 2001. The ancestral complement system in sea urchin. *Immunological Review*, 180 (1): 16-19.
- Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T. M., Kristensen, T., Lonblad, P. B., Jones, C. M., Wierzbicki, D. M., Magnusson, S., Domdey, H., Wetsel, R. A. y Lundwall, A. 1985. Common evolutionary origin of alpha2-macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 9–13.
- Suzuki, M. M., Satoh, N. y Nonaka, M. 2002. C6-like and C3-like molecules from the cephalochordate amphioxus, suggest a cytolytic complement system in invertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, 54 (5): 671-679.
- Tagawa, K., Yoshihara, T., Shibata, T., Kitazaki, K., Endo, Y., Fujita, T., Koshiba, T. y Kawabata, S. 2012. Horseshoe crab complement system in a C2/Factor B-dependent or-independent manner. *PLoS One*, 7 (5): 1-9.
- Tegla, C. A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe, R., Rus, V. y Niculescu, F. 2011. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunology Research*, 51: 45-60.
- Terado, T., Smith, S. L., Nakanishi, T., Nonaka, M. I., Kimura, H. y Nonaka, M. 2001. Occurrence of structural specialization of the serine protease domain of complement factor B at the emergence

- of jawed vertebrates and adaptive immunity. *Immunogenetics*, 53: 250-254.
- Urrea Moreno, R., Gil, J., Rodríguez-Sainz, C., Cela, E., LaFay, V., Oloizia, B., Herr, A. B., Sumegi, J., Jordan, M. B. y Risma, K. A. 2008. Functional assessment of perforin C2 domain mutations illustrates the critical role for calcium-dependent lipid binding in perforin cytotoxic function. *Blood*, 113: 338-346.
- Veerhuis, R., Nielsen, H. M. y Tenner, A. J. 2011. Complement in the brain. *Molecular Immunology*, 48: 1592-1603.
- Venter, J. C. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304-1351.
- Volanakis, J. E. y Arlaud, G. J. 1998. Complement enzymes. En: J. E. Volanakis y M. M. Frank (eds.), *The Human Complement System in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 49-81.
- Wang, G., Zhang, S., Zhuang, Z. y Wang, Z. 2008. Synergistic actions of complement lysozyme in clearance of *Escherichia coli* from amphioxus *Branchiostoma belcheri*. *Progress in Natural Science*, 19 (2): 179-185.
- Zhang, S., Liang, Y., Ji, G. y Zhuang, Z. 2009. Protochordate amphioxus is an emerging model organism for comparative immunology. *Progress in Natural Science*, 19: 923-929.
- Zhang, S., Wang, C., Hideharu, Y. W., Wei, R., Hede-haru, G. J. y Ju, H. 2003. Presence and characterization of complement-like activity in the amphioxus *Branchiostoma belcheri* *singtauense*. *Zoological Science*, 20 (10): 1207-1214.
- Zhou, Z., Sun, D., Yang, A., Dong, Y., Chen, Z. y Wang, X. 2011. Molecular characterization and expression analysis of a complement component 3 in the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 31: 540-547.
- Zhu, Y., Thangamani, S., Ho, B. y Ding, J. L. 2005. The ancient origin of the complement system. *European Molecular Biology Organization Journal*, 24: 382-394.