

Actividad del Complemento y de la Lisozima Sérica en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* inmunizados con fracciones de membrana externa de una cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum* - Complement and serum lysozyme activity in *Oncorhynchus mykiss* juveniles immunized with outer membrane fractions from a *Flavobacterium psychrophilum* native strain

Colona Vallejos, E.¹, Mayanga Herrera, A.¹, de Amat Herbozo, C.¹, Alzamora Gonzales, L.¹, Elías Paredes, J.¹, Echevarría Del Valle, R.¹, Jiménez Espinoza, A.¹, Cabello Napuri, M.¹, Martínez Álvarez, J.L.², Woll Toso, P.³, Diestro Diestro, A.⁴ y García de la Guarda, R.⁵.

(1) Laboratorio de Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Correo electrónico: ecolonav@unmsm.edu.pe o ecolonav@gmail.com

(2) Profesor Honorario de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

(3) Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.

(4) Laboratorio de Entomología Médica y Veterinaria. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.

(5) Laboratorio de Microbiología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.

Resumen

La finalidad del trabajo fue evaluar la actividad del complemento y de la lisozima sérica en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) inmunizados con fracciones de membrana externa (FME) de la cepa nativa *Flavobacterium psychrophilum* USM-3, e infectados con la cepa estándar *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T.

Se inmunizaron por vía intraperitoneal 15 especímenes con 10 µg de FME en 0.1 ml y 15 con 0.1 ml de agua bidestilada estéril (grupo control). Los animales fueron mantenidos a 15± 2 °C por tres semanas y alimentados con hojuelas comerciales cada dos días (1g/pez), al cabo de ese tiempo se infectaron por vía intraperitoneal con la cepa estándar de *F. psychrophilum* 1947^T. El suero obtenido de las sangrías de los peces₁

tanto de los inmunizados como de los controles se evaluó midiendo la actividad del complemento por la vía alternativa y de la lisozima sérica.

La actividad de la lisozima sérica en las truchas estimuladas con fracciones de membrana y en el grupo control fue de 150 U/ml y 50 U/ml respectivamente ($p < 0,05$); la actividad hemolítica del complemento se incrementó en los peces estimulados (28.01%) en relación al grupo control (11.06%) ($p > 0,05$).

Se concluye que las fracciones de membrana externa empleadas para inmunizar a los juveniles de *O. mykiss* produjeron un incremento significativo de la actividad de la lisozima sérica.

Palabras Claves: Lisozima, Complemento, Fracciones de membrana externa, *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*.

Abstract

The aim of this study was to evaluate complement and serum lysozyme activity in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) juveniles immunized with outer membrane fraction (OMF) from *Flavobacterium psychrophilum* USM-3 native strain and challenged with *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T standard strain.

Fifteen specimens were immunized intraperitoneally with 10 µg of OMF and fifteen specimens with 0.1ml of bidistilled water. Fish were kept at $15 \pm 2^\circ\text{C}$ for three weeks and fed with commercial flakes each two days (one gram per fish). Serum obtained from bleedings from both immunized and control groups were evaluated measuring serum lysozyme and complement activity by the classical pathway.

Serum lysozyme in stimulated trout with outer membrane fraction and control group was 150 U/ml and 50 U/ml respectively ($p < 0.05$); complement hemolytic activity was increased in stimulated fish (28.01%) in comparison to the control group (11.06%) ($p > 0.05$)

It is concluded that outer membrane fractions used to immunize *Oncorhynchus mykiss* juveniles produced a significant increase in serum lysozyme activity.

Keywords: Outer membrane fraction, *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*, lysozyme, complement.

Introducción

La inmunidad innata es un mecanismo fundamental en peces y constituye la primera línea de defensa contra las infecciones. Esta se divide en respuesta humoral y celular. La respuesta celular incluye las barreras físicas (mucus y tejido epitelial de la piel, agallas y estómago) y células especializadas como monocitos, macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas capaces de digerir y eliminar patógenos, mientras que, la respuesta humoral está constituida por una variedad de proteínas y glicoproteínas como péptidos antimicrobianos, proteasas, complemento, transferrinas y proteínas antivirales que destruyen e inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos (Aoki y col., 2008).

La lisozima es una de las enzimas más estudiadas de la respuesta innata en peces. Esta enzima actúa sobre el peptidoglicano de las paredes de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Tort y col., 2003).

En los peces la lisozima es un frecuente indicador de las funciones inmunes inespecíficas (Yavuzcan H., 2006). Además funciona como una opsonina y activador del sistema de complemento y la fagocitosis (Watts y col., 2001). Está presente en el mucus, tejido linfoide, plasma, suero y otros fluidos del cuerpo de muchos peces (Magnadóttir, 2006).

La actividad de la lisozima se ha demostrado que varía dependiendo del sexo, edad y tamaño, estación, temperatura del agua, pH, sustancias tóxicas, infecciones y grado de exposición a sustancias que generan estrés (Saurabh y Sahoo 2009).

El sistema de complemento parece ser uno de los mecanismos centrales de la respuesta inmune en peces y además participa como nexo entre la respuesta inmune natural y adaptativa. Se han descrito la vía clásica, la alternativa y en algunos peces teleosteos la vía de las lectinas (Tort y col., 2003).

El nivel de actividad de la vía alternativa del complemento en el suero de peces es mayor en relación al suero de mamíferos (Balcázar J.L. y col., 2007).

Se han detectado lisinas naturales en el suero de peces con efecto hemolítico espontáneo en eritrocitos heterólogos que usualmente se han atribuido a la activación de la vía alternativa del sistema de complemento (Magnadóttir, 2006).

Existen estudios que indican que la actividad del complemento aumenta o disminuye dependiendo de la dosis del inmunoestimulante, tiempo de administración y diferencias en su activación (Rodríguez y col., 2002; Pylkkö y col., 2002).

La finalidad del presente estudio fue evaluar la actividad del complemento y de la lisozima sérica en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) inmunizados con fracciones de membrana externa (FME) de la cepa nativa *Flavobacterium psychrophilum* USM-3 y desafiados con la cepa estándar *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T.

Material y Métodos

Peces.- Se emplearon 30 juveniles de trucha arco iris de un tamaño promedio de 10 cm divididos en dos grupos de 15 especímenes cada uno correspondientes al grupo de peces inmunizados con FME y el grupo control (Figura 1).



Figura 1. Juveniles de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de 10 cm de tamaño procedentes de la provincia de Canta-Lima aclimatándose a condiciones de laboratorio.

b. Cepa Nativa. La cepa de *F. psychrophilum* USM-3 aislada de truchas procedentes de piscigranjas de Puno en el año 2006 (datos no publicados) fue proporcionada por la Blga. Veronica Kojagura G. El cultivo se realizó en 100 ml de caldo cytophaga modificado, a pH 7.2 por

24 horas a 15 °C en agitación constante.

c. Obtención de Fracciones de Membrana Externa (FME).- El cultivo de *F. psychrophilum* USM-3 se centrifugó a 3000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente; el pellet obtenido se lavó dos veces con Tris-HCl 10 mM pH 7.3. Luego las células se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 7.3 y fue sonificado 8 veces a 60W por 1 minuto en baño de hielo. El lisado se centrifugó a 17800 xg por 1 minuto a 4°C para eliminar las células intactas y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 17800 xg por 60 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 750 ul de Tris-HCl 10 mM pH 7.3. Luego se añadió 750 ul de lauril sarcosinato de sodio al 1.2% (p/v) obteniendo una concentración final de 0.6% para solubilizar la membrana interna e incubado a 20°C durante 20 minutos. La suspensión fue centrifugada a 17800 xg por 30 minutos a temperatura ambiente. El pellet conteniendo las FME se resuspendió en 100 ul de agua bidestilada. Luego las proteínas fueron precipitadas con 3 volúmenes de acetona fría por 2 horas a 4°C; se centrifugó a 17800 xg por 15 minutos a 4°C y se resuspendió en 250 ul de agua bidestilada y se almacenó a menos 20 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo a las especificaciones del método de BIOQUANT® Proteínas Bradford.

d. Inmunización.- Se inmunizaron por la vía intraperitoneal 15 especímenes con 10 µg de FME en 0.1 ml y 15 especímenes con 0.1 ml de agua bidestilada estéril (grupo control), fueron mantenidas a 15± 2°C por tres semanas y alimentadas con hojuelas comerciales cada dos días (1g/pez). Posteriormente los dos grupos fueron desafiados con la cepa estándar de *F. psychrophilum* 1947^T y se evaluaron diariamente. El suero obtenido de las sangrías de los peces tanto de los inmunizados como de los controles se evaluó midiendo la actividad de la lisozima sérica y del complemento por la vía alternativa.

e. Infección Experimental.- Las truchas inmunizadas fueron inoculadas por vía intraperitoneal con un cultivo en fase log de la cepa estándar *F. psychrophilum* 1947^T a una densidad óptica de 0.2 a 520nm y diluido 1/10 en 0.5% ClNa pH 7.2 (Madetoja y col., 2006) y evaluadas diariamente.

f. Actividad de la lisozima sérica.- Se determinó por turbidimetría (Parry y col., 1965) adicionando 180 µl de *Micrococcus lysodeikticus* a 20 µl de suero. La lectura de la absorbancia se realizó a 492 nm cada minuto desde 0 a 15 minutos a 22 °C. Una unidad de lisozima fue definido como una reducción de la absorbancia de 0.001 min⁻¹.

g. Actividad del complemento.- Se cuantificó mediante la prueba de la actividad hemolítica del suero agregando glóbulos rojos de conejo al 2% a diluciones seriadas del suero de truchas de 1:2 a 1:512. Las muestras se incubaron a 25°C durante 1 hora, luego se centrifugaron y el sobrenadante fue leído a 540 nm. El porcentaje de hemólisis se determinó mediante la ecuación $Y=100 \text{ (Abs A-Abs B)/(Abs C-Abs B)}$ donde A es la muestra problema, B es la muestra de hemólisis espontánea (control con buffer) y C es la muestra de hemólisis total (control con agua destilada). Los valores se expresaron en unidades líticas del complemento 50% (ACH50/ml de suero).

h. Análisis estadísticos de los resultados.- Se aplicó los test de ANOVA para detectar diferencias significativas en cada grupo experimental; considerándose diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$. Se empleó el programa SPSS 17.0.

Análisis y Discusión

En peces, la lisozima, es una enzima con propiedades antibióticas que es liberada por los leucocitos y tienen un mayor espectro de actividad que la lisozima de mamíferos; siendo un frecuente indicador de las funciones inmunes innatas (Yavuzcan, 2006). Se ha determinado que la actividad de la lisozima varía en su potencia dependiendo de la especie y localización tisular (Tort, L. y col., 2003). Otros autores han observado un incremento de la actividad de lisozima en el suero de salmones y truchas después de una inoculación de productos extracelulares bacterianos, infección bacteriana, suplemento de glucanos o probióticos en otros (Verlhac, y col., 1998; Balcázar y col., 2007; Saurabh y Sahoo 2009).

En nuestro estudio la actividad de la lisozima sérica en las truchas estimuladas con fracciones de membrana externa y el grupo control fue de 150 U/ml y 50 U/ml respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 2). Estos datos se corroboran con los de Ortega y col., (1999) quienes encontraron un incremento en la actividad de la lisozima 5 a 7 días posinfección en truchas desafiadas con *Aeromonas salmonicida*, b-glucanos y suero fisiológico en relación al grupo control.

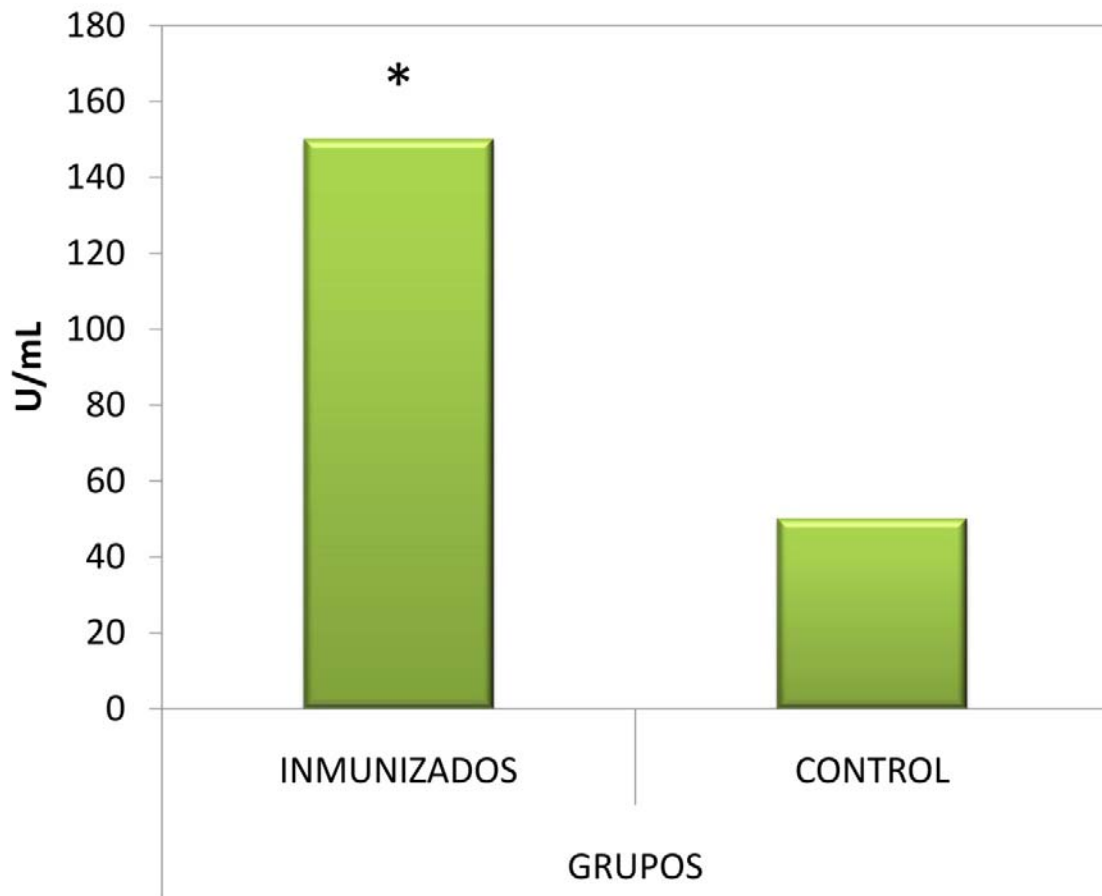


Figura 2. Promedio de la actividad de la lisozima sérica (U/ml) en truchas inmunizadas y el control.

* representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En salmónidos inoculados intraperitonealmente con lipopolisacáridos microbianos y β -glucanos se ha observado un incremento de la actividad de la lisozima en el suero (Paulsen, 2003).

Abbas y col., 2010 demostraron el efecto protector de las proteínas de pared celular, proteínas membrana externa y lipopolisacáridos de bacterias probióticas contra *Yersinia ruckeri* en trucha arco iris.

El nivel de actividad de la vía alternativa del complemento en el suero de peces es mayor en relación al suero de mamíferos; lo cual indica la importancia de esta vía en su sistema inmune natural (Balcázar y col., 2007). Probablemente el factor defensivo innato de los peces mejor estudiado es el complemento, que está constituido por una serie de proteínas séricas involucradas en los procesos de opsonización, fagocitosis e inflamación (Aoki, y col., 2008; Rubio-Godoy, 2010).

En nuestra investigación el efecto hemolítico del complemento se incrementó en los peces estimulados (28.01%) en relación al grupo control (11.06%) aunque la actividad del complemento en el suero de truchas estimuladas y desafiadas no supero el CH50 en relación al grupo control no mostrando diferencias significativas ($p > 0,05$).

Rodríguez y col., 2002, encontraron en doradas inmunoestimuladas un incremento significativo a las dos semanas, luego del cual no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Balcázar y col., 2007, demostraron en el suero de truchas marrón previamente estimuladas con bacterias lácticas un incremento significativo de la actividad hemolítica de la vía alternativa a la segunda semana de tratamiento.

Pylkkö y col., 2002, demostraron que la actividad hemolítica del complemento por ambas vías no fue afectado por la vacunación o por la temperatura posvacunación luego de inocularles la vacuna bivalente de *Aeromonas salmonicida* atípica con formalina y *Aeromonas salmonicida* típica viable en adyuvante. La activación del complemento estaría relacionada con el incremento de la lisozima y la temperatura.

En general, el complemento de los peces tiene actividad bactericida contra cepas no virulentas de bacterias Gram negativas, pero no contra bacterias Gram positivas ni cepas virulentas de bacterias Gram negativas (Rubio-Godoy, 2010).

Se ha demostrado que la actividad de la vía alterna del complemento no reduce el número de células de *F. psychrophilum* (Barnes y Brown, 2011).

Esta diferencia entre algunos autores que han demostrado el incremento espontáneo de la actividad hemolítica después de una inmunización; estaría relacionada con diferencias en la activación del complemento en salmónidos (Pylkkö y col., 2002) o en relación al tiempo de evaluación del suero.

Conclusiones

Las fracciones de membrana externa empleadas para inmunizar a los juveniles de *Oncorhynchus mykiss* produjeron el incremento significativo de la actividad de la lisozima sérica.

Referencias Bibliográficas

Actividad del Complemento y de la Lisozima Sérica en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* inmunizados con fracciones de membrana externa de una cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum*
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010113/011306.pdf>

1. Abbass A, Sharifuzzaman SM, Austin B. 2010. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis; 33(1):31-37.
2. Aoki, T., Takano, T., Santos, M.D., Kondo, H. y Hirono, I. 2008. Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives. Fisheries for Global Welfare and Environment, 5 th World Fisheries Congress, pp. 263-276.
3. Balcázar, J.L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela I.; Vendrell, D.; Calvo, A.C.; Márquez, I.; Gironés, O. y Muzquiz, J.L. 2007. British Journal of Nutrition; 97: 522-527.
4. Barnes, M.E y Brown M.L. 2011. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. The Open Fish Science Journal. 4: 40-48.
5. Bergljót Magnadóttir. 2006. Innate immunity of fish (overview) Fish Shellfish Immunol.; 20:137-151.
6. Madetoja J, Lonnstrom L-G, Bjorkblom C, Ulukoy G, Bylund G, Syvertsen C, Gravningen K, Norderhus y Wiklund T. 2006. Efficacy of injection vaccines against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) Journal of Fish Diseases 29:9-20.
7. Möck, A. y Peters, G. 1990. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *Journal of Fish Biology* 37, 873-885.
8. Parry, R. M., Chandau, R. C., Shahani, R. M. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. exp. Biol.Med. 119: 384-386
9. Pylkko, P., Lyytikainen, T., Ritola, O., Pelkonen, S. y Valtonen, E.T. 2002. Temperature effect on the immune defense functions of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. Dis. Aquat. Org., 52(7):47-55.
10. Rahman, MH.; Kuroda, A.; Dijkstra, JM.; Kiryu, I.; Nakanishi, T. y Ototake, M. 2002. The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. Fish Shellfish Immunol.,12:169-79.
11. Rodríguez, A., Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuño, J., Polaina, J. y Meseguer, J. 2002. Enriquecimiento del pienso de dorada con quitina y paredes de levaduras con fines preventivos. Boletín del Instituto Español de Oceanografía 18(1-4):119-125.
12. Rubio-Godoy, M. 2010. Inmunología de los peces óseos. Revisión. Rev. Mex. Cienc. Pec., 1(1): 47-57.
13. Saurabh, S.y Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research; 39: 223-239.

14. Paulsen, S.M., Lunde, H., Engstad, R.E y Robertsen B. 2003. In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* Jan; 14(1):39-54.
15. Tort, L., Balasch, J.C. y Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*; 22(3): 277-286.
16. Verlhac, V., A. Obach, J. Gabaudan, W. Schüep y R. Hole.1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 8: 409-424.
17. Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M.: Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.*, 2001; 79: 570-574.
18. Yavuzcan, H. 2006. Plasma Lysozyme Levels and Secondary Stress Response in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after Exposure to Leteux-Meyer Mixture. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 30: 265-269.

REDVET: 2013, Vol. 14 Nº 1

Recibido 10.06.2012 / Ref. prov. ENE1208B_RED VET / Revisado 09.09.2012
Aceptado 22.12.2012 / Ref. def. 011306_RED VET / Publicado: 01.01.2013

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010113.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010113/011306.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®-
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>