

## DETECCIÓN DE LISOZIMA Y LACTOFERRINA POR WESTERN BLOT EN OVAS DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

José Miguel Torres\*, Juan Luís Concepción\*\* y José Ramón Vielma\*\*

\*Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Campo Experimental Truchícola La Mucuy.

jmtorresg@inia.gob.ve

\*\*Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Laboratorio de Enzimología de Parásitos.

concepci@ula.ve

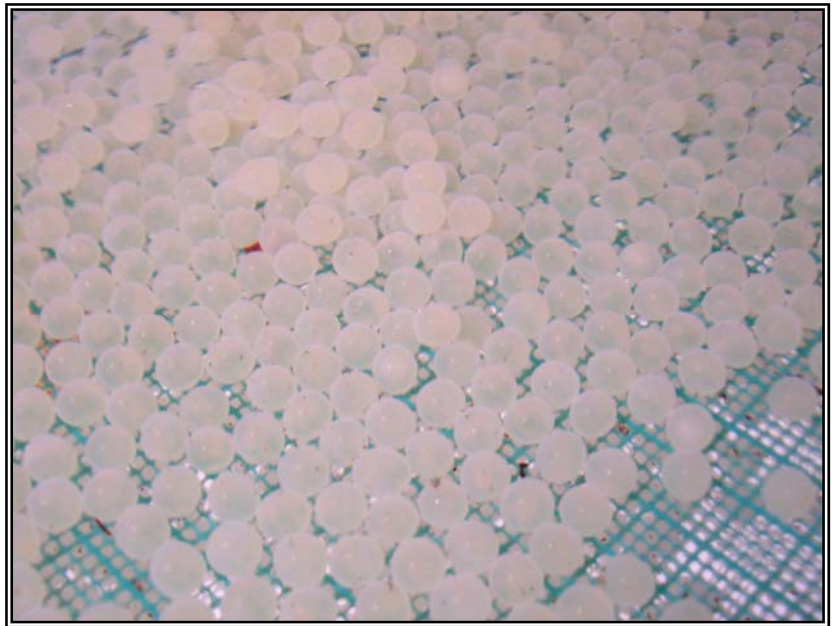
En 1922 A. Fleming identifica la lisozima como una sustancia antibacteriana, ésta es una enzima capaz de romper el enlace glicosídico tipo éster de polisacáridos de paredes celulares de bacterias, de algunos oomicetales y del exoesqueleto de insectos (Stryer, 1985). Esta enzima en su forma de cadena simple polipeptídica tiene una masa molecular de aproximadamente 14,6 kDa y se le consigue generalmente en las claras de los huevos de aves. Esta enzima también se presenta a nivel algunas secreciones de tejidos de animales.

La trucha es un salmónido exótico introducido en Venezuela en la tercera década de siglo pasado (Coche, 1996), forma parte de los rubros pecuarios andinos y también se consigue en cuerpos naturales de agua.

En el cultivo de trucha, la mortalidad de ovas fertilizadas, disminuye la cantidad de ovas embrionadas, mermando el alevinaje. Este problema se manifiesta por diversas causas, entre las que tenemos: sobre maduración, infertilidad, problemas ambientales, problemas nutricionales, la calidad del semen; también se presentan problemas por oportunistas bacterianos (*Pseudomonas* sp.) y oomicetos saprofitos (*Saprolegnia* sp). Estas infecciones afectan ovas vivas, siendo causa

de una alta mortalidad en ellas (Gonzáles y Heredia, 1998).

En el presente trabajo se dispuso identificar la lisozima y la lactoferrina, en extractos de ovas de trucha Arcoiris por Western blot. La lisozima y lactoferrina constituyen barreras humorales de primera línea, que pudiesen evitar la contaminación de las ovas de trucha (Fig. 1) y en segundo lugar pudieran ser indicadores fenotípicos de resistencia a infecciones por bacterias Gram positivas y Gram negativas.



**Figura 1. FOTOGRAFÍA DE OVAS DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

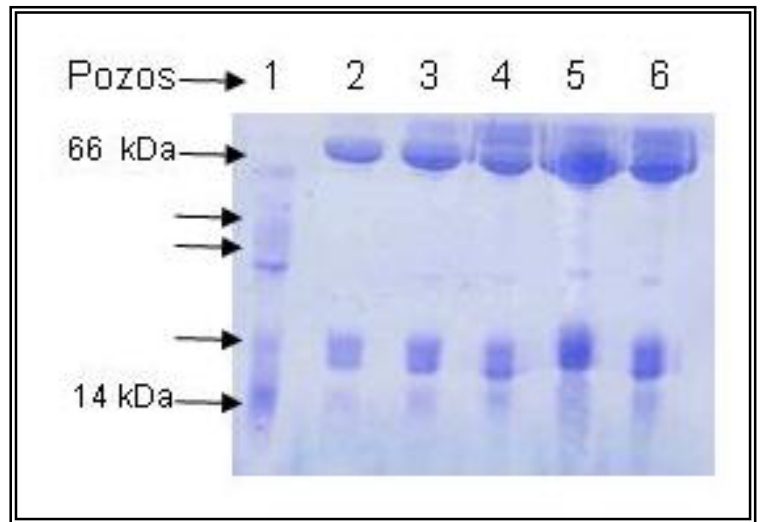
Se tomaron 20 gramos de ovas recién extraídas de truchas por desove manual, se lavaron con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.5). Posteriormente estas se sometieron a ruptura mecánica por presión con un pistón de teflón. Seguidamente la mezcla de ovas rotas se diluyó como

homogenato en un PBS pH 7.5, y se centrifugó a 3000 g por 15 min. a 5 °C.

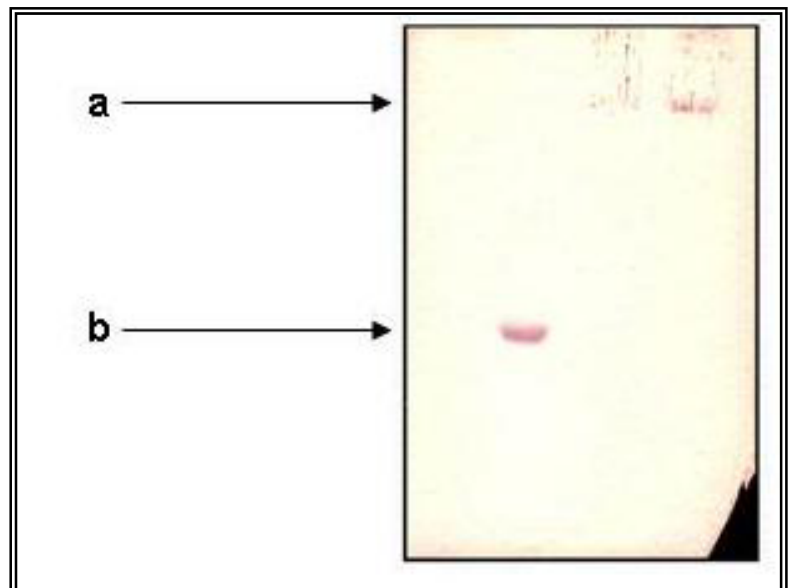
El homogenato se separó en una fase acuosa (sobrenadante), y una sólida (precipitado). En la fase acuosa se determinaron proteínas totales por el método de Lowry (Lowry et. al., 1951). Esto permitió cargar en la electroforesis (PAGE-SDS) la cantidad de muestra de 4 µg de proteínas totales por pozo en el gel de poliacrilamida al 12.5 %, las corridas electroforéticas se hicieron durante 40 min, a una corriente de 25 mA y un potencial libre.

Las corridas de electroforesis se hicieron en condiciones desnaturalizantes, tanto para determinar las proteínas en la fase acuosa del extracto de ovas (Fig. 2), y para la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa (Concepción et al, 1999)

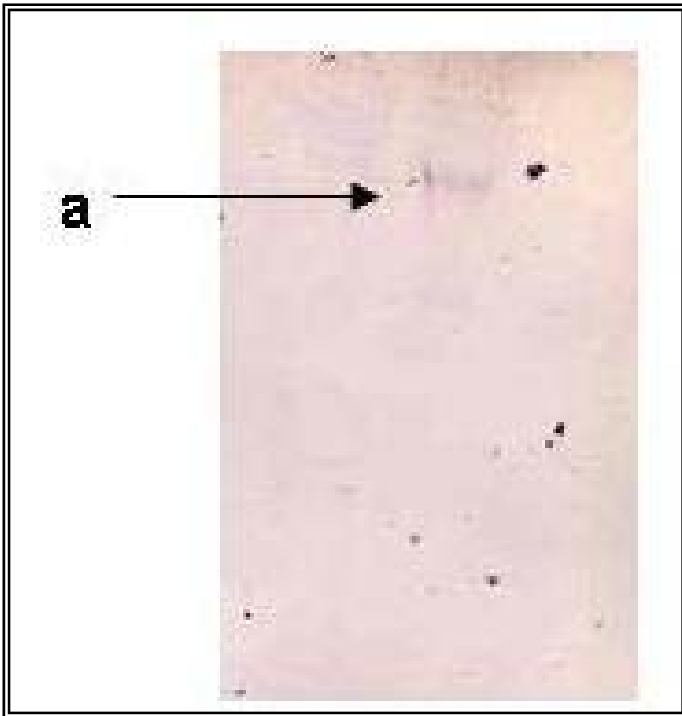
La inmunodetección permitió la detección de lisozima (Fig. 3) y lactoferrina (Fig. 4) proveniente de ovas, empleando anticuerpos contra lisozima de huevo de gallina (suero antilisoizima) y anticuerpos contra lactoferrina bovina (suero antilactoferrina), estos anticuerpos se obtuvieron en el laboratorio, el revelado se hizo con una anti Ig G acoplada a una peroxidasa de rábano que descompone el peróxido de hidrógeno, modificando a su vez un cromógeno que cambia de incoloro a marrón, apareciendo una tinción sobre la membrana donde se genera la interacción con conjugado de anticuerpos (Figs 3 y 4).



**Figura 2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL (SDS-PAGE 14 %). POZO 1, MARCADORES DE PESO MOLECULAR, POZOS DESDE 2 HASTA EL 6 (7,88; 15,77; 22,66; 31,54; 47,3 µg PROTEÍNAS)**



**Figura 3. DETERMINACIÓN DE LISOZIMA EN EXTRACTO DE OVAS DE TRUCHA POR Western blot. a 0.5 µg DE LISOZIMA DE HUEVO DE GALLINA COMERCIAL; b 3.15 µg DE EXTRACTO DE OVAS DE TRUCHA.**



**Figura 4. DETERMINACIÓN DE TRANSFERRINA EN EXTRACTO DE OVAS DE TRUCHA POR Western blot. a 0.5 µg DE TRANSFERRINA.**

En la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) del extracto de las ovas de trucha, se pueden evidenciar al menos cuatro tipos de proteínas con masas moleculares entre 14 y 66 kDa.

#### **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:**

- ✓ La presencia de lisozima en el tracto digestivo de la trucha Arcoiris se conoce, sin embargo en ovas se ha estudiado poco, esto es igual para la lactoferrina.
- ✓ En cuanto a los Western-blot, vemos que la lisozima de trucha mostró diferencia respecto al peso molecular de la lisozima de huevo de gallina, pero fue reconocida por los anticuerpos del suero antilisoizima huevo de gallina.
- ✓ Tanto la lisozima de huevos, lágrimas, moco y saliva, como lactoferrina en la leche materna, evitan la contaminación por algunos microorganismos, así la

presencia de estas moléculas pudiera emplearse como marcador molecular útil en la resistencia a infecciones por micro-organismos sensibles a estas proteínas.

✓ Lo indicado anteriormente podría ser útil en el rubro trucha al permitir seleccionar líneas con distintos niveles de estas proteínas, obteniéndose peces con mayor resistencia a infecciones.

✓ En próximos estudios se cuantificará y estudiará la presencia de lisozima en los distintos tejidos de la trucha Arcoiris

**AGRADECIMIENTO.** A personal técnico del Campo Experimental Truchícola La Mucuy por la ayuda prestada para conseguir parte del material biológico. Al Laboratorio de Bioquímica y Enzimología de Parásitos en el desarrollo de las electroforesis.

#### **Referencias.**

- ✓ COCHE, Z. 1996. Evaluación de algunas poblaciones de truchas en lagunas de gran altura del estado Mérida, Venezuela. **Tesis de Maestría.** UNELLEZ.
- ✓ CONCEPCIÓN J, CHATAING B, DUBOURDIEU M. Purification and properties of phosphoglucose isomerases of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** (1999) 211 – 222.
- ✓ GONZÁLES, J. A Y HEREDIA B. 1998. El cultivo de la cachama (*Colossoma macropomum*). 2 ed. **FONAIAP.** Centro de investigaciones agropecuarias del Estado Guárico.
- ✓ LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., LEWIS FARR, A., RANDALL, R. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** (1951) 193 – 265.
- ✓ STRYER, L. 1985. **Bioquímica.** 2 Ed. Editorial Reverte.