

# Actividad del sistema de complemento y de lisozima en suero sanguíneo de tortuga, *Chelonoidis chilensis* (Quelonia)

Castro, Felipe<sup>1</sup>; Francisco M. Fernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, Tucumán, Argentina. juanfelipecastro@yahoo.com.ar

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

► **Resumen** — El objetivo del presente trabajo consistió en comprobar la actividad del sistema de Complemento y de lisozima en la sangre de *Chelonoidis chilensis*. Los resultados evidenciaron la presencia de actividad lítica contra eritrocitos de mamíferos, la cual es dependiente de Mg iónico, inactivable por EDTA y por zimosán, afectada por la presencia de membranas de eritrocitos y termolábil. Asimismo, el suero sanguíneo poseía una cinética con una fase de latencia idéntica a la correspondiente a una activación de la vía alternativa del complemento. También se evidenció la presencia de actividad lítica contra la bacteria gram (+) *Micrococcus luteus*, la cual no dependía de la presencia de cationes y era inhibida por quitina. Estas son las primeras observaciones sobre las actividades de defensa inespecífica en la especie, y también de la coexistencia de ambas en un quelonio.

**Palabras clave:** Lisozima, complemento, mecanismos de defensa, tortuga, *Chelonoidis chilensis*.

► **Abstract** — “Activity of the complement system and lysozyme in blood serum of the turtle *Chelonoidis chilensis* (Quelonia)”. The aim of the present study was to verify activity of the complement system and lysozyme in blood serum of *Chelonoidis chilensis*. Results showed evidence for hemolytic activity against mammal erythrocytes, which is Mg ionic dependent, inactivated by EDTA and by zymosan, affected by the presence of erythrocyte membranes and thermolabile. In addition, the blood serum had a time lag with an identical latency phase to the one corresponding to activation of an alternative pathway of the complement. Moreover, hemolytic activity was observed against the gram (+) bacterium *Micrococcus luteus*, which did not depend on cation presence and was inhibited by chitin. These are the first observations on activities of nonspecific defense in the species, and also the coexistence of both in a turtle.

**Keywords:** Lysozyme, complement system, defense mechanism, turtle, *Chelonoidis chilensis*.

## INTRODUCCIÓN

El sistema de Complemento se encuentra, con distinto grado de desarrollo, en la sangre de todos los vertebrados y forma parte de los mecanismos de defensa inespecíficos asociados a la respuesta inmune. Está formado por más de veinte proteínas plasmáticas y de membrana (Regueiro y López Lareira, 1998) y tiene efectos líticos u opsonizantes frente a microorganismos y células tumorales (Masaru, 2001). Algunos de los factores del Complemento potencian la inflamación, por ejemplo C3a, C4a y C5a (Caliezi *et al.*, 2000), y están relacionados con otros procesos intercelulares (Anderson *et al.*, 2004). La activación del Complemento

puede iniciarse por tres vías: las vías Clásica, Alternativa y de las Lectinas (Alsenz *et al.*, 1992). La vía Clásica que, evolutivamente, es considerada la más reciente, se activa por la unión antígeno-anticuerpo, siendo este último de tipo IgM o IgG. La vía Alternativa se activa por productos bacterianos, es más antigua, no necesita de la unión antígeno-anticuerpo para activarse, funciona de forma continua a un bajo nivel y se amplifica en presencia de factores presentes en la superficie de microorganismos (Berangere y Regis, 2003). La vía de las Lectinas se activa por un mecanismo independiente de anticuerpos, la inician componentes constitutivos que se unen a patógenos, e induce la actividad lítica del complejo de ataque a la membrana. El bloqueo de la vía Clásica anula al mismo tiempo la vía de las Lectinas. Todas

las vías de activación promueven la fagocitosis a través de la generación de moléculas derivadas de los factores constituyentes del Complemento (Regueiro y López Larrea, 1998). El zimósán es un compuesto complejo carbohidrato/proteína que forma parte de la pared de la levadura de cerveza que tiene la propiedad de eliminar la actividad del C3 del medio. A partir de trabajos previos se sabe que en el suero sanguíneo de peces (Suner y Tort, 1994), de anuros (Fernández, 1986), y de ofidios (Fernández y Saad de Schoos, 1990), se encuentra actividad del sistema de Complemento capaz de lisar eritrocitos de mamíferos a través de la vía Alternativa.

La lisozima, otro de los componentes de los mecanismos de defensa inespecíficos, juega un papel muy importante en las funciones bacteriolíticas. Esta enzima que tiene una masa molecular de unos 15 kDa se encuentra en todos los vertebrados, invertebrados, virus, plantas, hongos y bacterias. Entre sus inhibidores se encuentra la quitina (Tompkins *et al.*, 1991) y sus derivados de hidrólisis. La actividad enzimática consiste en la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los peptidoglicanos de la pared bacteriana, lo que produce la lisis de la célula. Existen varios trabajos que señalan la presencia de lisozima en la clara de huevos y/o en suero sanguíneo de tortugas (Gayen *et al.*, 1977; Chaudhuri *et al.*, 1993; Araki *et al.*, 1998; Chattopadhyay *et al.*, 2006; Chijiwa *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006; Day *et al.*, 2007; Siritapetawee *et al.*, 2009). No hemos encontrado publicaciones que mencionen la existencia de los dos sistemas en una misma especie de tortuga. El objetivo de este trabajo consiste en investigar la presencia del sistema de Complemento y lisozima en el suero sanguíneo de tortuga *Chelonoidis chilensis* y caracterizar su funcionamiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Animales utilizados y métodos empleados.*— Se utilizó suero sanguíneo de 5 ejemplares de *Chelonoidis chilensis* pertenecientes a la Reserva Experimental de Horco Molle de la

Universidad Nacional de Tucumán, y a la Reserva del Instituto Dr. Carlos Pellegrini de San Pedro de Colalao (Tucumán). Las muestras de sangre se extrajeron por punción de la vena yugular, en individuos previamente anestesiados con Ketamina 200 mg/Kg de animal en una dosis intrapleurales. La sangre se dejó coagular, se centrifugó y se separó el suero sobrenadante. Para llevar a cabo los ensayos se realizó un pool con las muestras de los cinco ejemplares.

Se utilizaron glóbulos rojos de mamíferos para probar la hemólisis. La sangre, extraída de ratas *Rattus rattus* por punción cardíaca del animal anestesiado con uretano 1.3 gr/kg de animal, se colectó con heparina. Las ratas fueron adquiridas en el Departamento de Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán. Los glóbulos rojos se lavaron con buffer Complemento y para su utilización se suspendieron en este buffer en una relación de volúmenes de 5 %. Los buffers utilizados para llevar a cabo los ensayos de hemólisis, en condiciones que permitan o que impidan la actividad del sistema del Complemento, se prepararon de la siguiente manera:

Buffer Complemento: Na Cl 140 mM, Tris (tris-hidroximetilaminometano) 10 mM, Ca Cl<sub>2</sub> 0,1 mM, Mg Cl<sub>2</sub> 0,1 mM. Buffer EDTA (etilendiamino-tetraacético): Na Cl 140 mM, Tris 10 mM, EDTA 5 mM. Buffer EGTA (ácido etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N', N'-tetraacético): Na Cl 140 mM, Tris 10 mM, EGTA 5 mM, Mg Cl<sub>2</sub> 5 mM.

*Detección de la presencia del sistema de Complemento.* La reacción se llevó a cabo en placa o en tubos (Fernández y Saad de Schoos, 1990) y se utilizaron controles con buffer EDTA o con buffer Complemento. En cada tubo se pusieron 100  $\mu$ l de glóbulos rojos al 5 % y 20  $\mu$ l de suero de tortuga. El blanco contenía además 30  $\mu$ l de EDTA 10 mM. Se llevaron a baño de maría a 30 °C durante 25 minutos. Al término de la incubación se le agregó a cada tubo 2 ml de buffer EDTA frío, se centrifugó, se tomó el sobrenadante y se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 460 nm para determinar la cantidad de hemoglobina liberada

por la hemólisis. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro HP 8453.

Para la titulación de la capacidad hemolítica del suero se utilizaron diluciones sucesivas del suero de tortuga de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64, procediendo de la misma manera que en lo anteriormente descrito.

*Efectos del zimosán en la hemólisis de los glóbulos rojos.*— Para este ensayo se preparó el zimosán según el método de Weir (1973). El ensayo incluyó tres mediciones: suero de tortuga, suero de tortuga tratado con zimosán y control de suero inhibido por EDTA. El tratamiento previo del suero se hizo en tubos de hemólisis con 50  $\mu$ l de suero de tortuga, 50  $\mu$ l de buffer Complemento y 50  $\mu$ l de suspensión de zimosán al 5 %. El resto del ensayo fue idéntico a lo antes mencionado donde se colocaron buffer Complemento y los glóbulos rojos. El control se llevó a cabo con buffer-EDTA. En todos los casos los tubos se colocaron a baño de maría a 30 °C por 30 minutos y luego se midió la hemólisis.

*Ensayo de inactivación de la vía Clásica.*— Este ensayo se basa en el hecho que la presencia de EDTA, al quelar el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  impide que se lleve a cabo la activación del Complemento. El EGTA tiene la capacidad de unirse fuertemente al  $\text{Ca}^{2+}$ , pero no al  $\text{Mg}^{2+}$ , lo cual inhibe la vía Clásica y deja indemne la vía Alternativa. Los ensayos se llevaron a cabo en las condiciones siguientes: En el primer tubo, se colocaron glóbulos rojos suspendidos en buffer Tris-EGTA, más suero de tortuga. En el segundo tubo, se colocaron glóbulos rojos suspendidos en buffer Complemento, más suero de tortuga. En el tercer tubo, se colocó suero de tortuga que había sido previamente incubado a 60 °C durante 30 minutos para inactivación por calor del Complemento, más glóbulos rojos suspendidos en buffer Complemento. En el cuarto tubo, se colocaron glóbulos rojos suspendidos en buffer-EDTA, más suero de tortuga. Se incubaron los tubos a 30 °C durante 25 minutos, se agregaron 2 ml de buffer EDTA frío, se centrifugó y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 450 nm.

*Preparación de membranas de eritrocitos.*— Se lavaron eritrocitos de rata con buffer Tris-HCl y luego se lisaron con Triton X-100 al 0,1 % en agua destilada. Se separaron las membranas por centrifugación en frío.

*Hemólisis en función del tiempo.*— En cada uno de una serie de diez tubos se pusieron 100  $\mu$ l de buffer Complemento y 100  $\mu$ l de suspensión de glóbulos rojos de rata al 5 %. A un tubo, que se usó como control, se le agregó suero de tortuga inactivado por calor. A los restantes se llevaron a baño de maría a 30 °C y se le agregaron 50  $\mu$ l de suero de tortuga. Luego se tomaron tubos sucesivos a los 30 seg, 1, 15, 25, 45 y 65 minutos para leer la marcha de la hemólisis. Se le agregó 2 ml de buffer-EDTA a cada uno, se centrifugó y se leyó el sobrenadante a 480 nm en el espectrofotómetro.

*Capacidad aglutinante del suero de tortuga.*— Se usaron tubos de ensayo en donde se realizaron las diluciones sucesivas del suero de tortuga de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 en buffer EDTA. A todos se les agregó glóbulos rojos al 5 %, se los puso a baño de maría a 30 °C, durante 25 minutos.

*Actividad bacteriolítica del suero de tortuga no dependiente del Complemento.*— Se usó una suspensión de *Micrococcus luteus* en buffer fosfato 10 mM pH 7,0 con una D.O. de 0,600 a 540 nm. Se utilizó suero de tortuga en buffer EDTA. Un control consistió en suero de tortuga y buffer Complemento. La reacción se llevó a cabo en cubetas para espectrofotómetro y se determinó la D.O. cada minuto hasta los 45 minutos.

*Efecto de la quitina sobre la actividad bacteriolítica en el suero de tortuga.*— Para este ensayo se utilizó quitina extraída de crustáceos según el método de Skujins *et al.* (1965). Con los tubos controles se procedió de la misma manera que en el caso anterior. En otros tubos se puso: 100  $\mu$ l de suero de tortuga, 100  $\mu$ l de EDTA 5 mM, 100  $\mu$ l de quitina al 10 % en buffer. Se llevaron los tubos a baño de maría a 30 °C por 30 minutos y al terminar

este tiempo, se centrifugó y del sobrenadante obtenido se tomaron 100  $\mu$ l que se agregaron a 1,9 ml de suspensión de *Micrococcus luteus* y se midió el cambio de la absorbancia de la misma forma que en el anterior ensayo.

## RESULTADOS

*Presencia de un sistema hemolítico en el suero de tortuga.*— Los ensayos destinados a investigar la existencia de actividad hemolítica espontánea contra eritrocitos de mamíferos en el suero de tortuga demostraron esta actividad contra eritrocitos de rata. Los glóbulos rojos fueron lisados por el suero en un medio que contenía calcio y magnesio y esta actividad lítica fue anulada por la presencia de EDTA, sustancia quelante de cationes divalentes (Fig. 1). Asimismo la capacidad hemolítica disminuye con la dilución del suero, y se observó que esta se llevaba a cabo hasta la dilución 1/16.

*Efecto del zimósán sobre la hemólisis.*— El suero tratado con zimósán no produjo hemólisis, respecto al control sin tratamiento. Esta inhibición alcanzó un valor medio del 98 %.

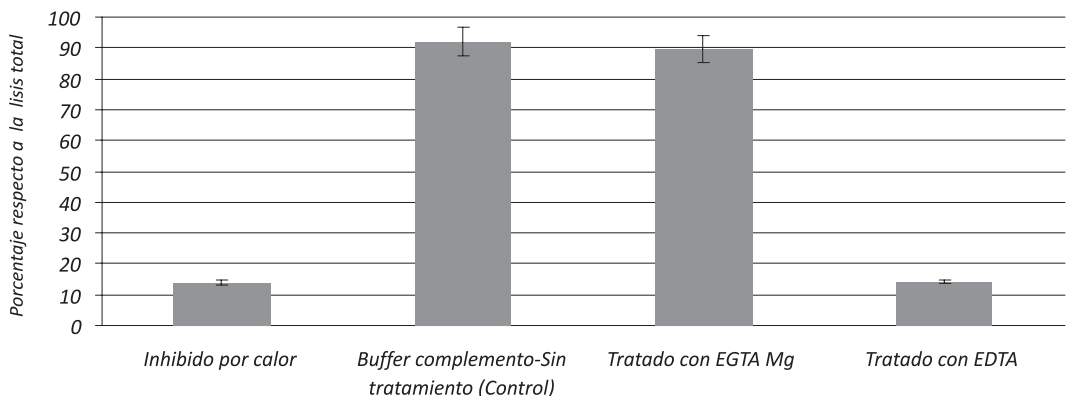
*Inactivación de la vía Clásica.*— En los tubos que tenían buffer EGTA que contenía magnesio iónico, se observó hemólisis, mientras que en los tubos que tenían EDTA, y por lo tanto no contenían ni  $\text{Ca}^{2+}$ , ni  $\text{Mg}^{2+}$ , la he-

mólisis no se produjo. En los tubos que tenían buffer Complemento la hemólisis fue normal. En los que fueron sometidos a calor, que inactiva el sistema de Complemento, no se observó hemólisis (Fig. 1). En el ensayo destinado a detectar capacidad del suero de tortuga de aglutinar los eritrocitos se observó que la aglutinación sólo llegó hasta dilución de 1/8.

*Hemólisis en función del tiempo.*— En Fig. 2 se muestra el desarrollo de la actividad hemolítica medida como incremento de la densidad óptica producido por la liberación de hemoglobina a medida que transcurría la actividad lítica.

*Efecto de la presencia de membranas de glóbulos rojos sobre la lisis.*— El incremento de la concentración de membranas de eritrocitos en los ensayos disminuye la capacidad hemolítica del suero de tortuga en forma dependiente (Fig. 3). El ensayo donde se probó el efecto del sobrenadante resultante de centrifugar las membranas no arrojó ninguna diferencia con el control, que para el caso era la lisis producida por suero de tortuga sin tratar.

*Actividad bacteriolítica del suero de tortuga.*— En Fig. 4, se ilustra el cambio de la absorbancia ocasionado por la lisis de las bacterias. En los ensayos en los que se usó buffer fosfato con EDTA, la lisis bacteriana



**Figura 1.** Actividad hemolítica del suero de tortuga, inhibido por calor 30 minutos a 60 °C, en presencia de buffer EGTA 5 mM y EDTA 5 mM. Valores promedios para n = 5.

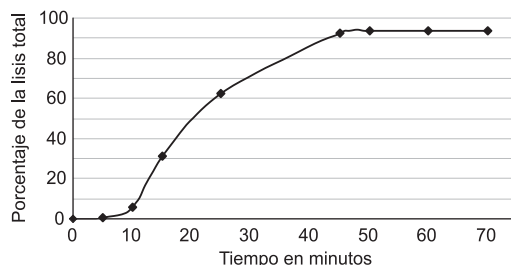
no se vió afectada. Si bien la forma en que se desarrolló la lisis fue ligeramente distinta, como se aprecia en las curvas, no hubo inhibición. Por otra parte, la velocidad de lisis de los micrococos sí resultó afectada por la presencia de quitina. El suero tratado con quitina mostró un grado de lisis 63 % menor que la del suero no tratado.

## DISCUSIÓN

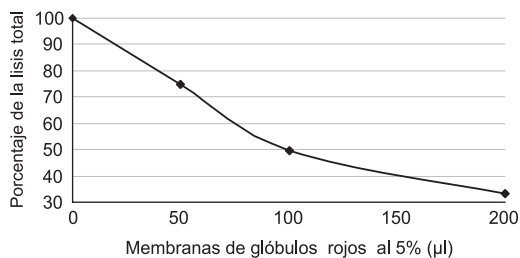
Los ensayos realizados en este trabajo tuvieron la finalidad de investigar la presencia de mecanismos de defensa inespecífica presentes en el suero de *Chelonoidis chilensis*. Para ello, se midió la actividad lítica contra glóbulos rojos de mamíferos correspondiente a la actividad espontánea de la vía Alternativa del Complemento. También se probó la capacidad bacteriolítica, para el caso contra una bacteria gram(+), *Micrococcus luteus*. Se vió claramente la actividad hemolítica del suero de tortuga comprobándose con un título interesante. Cuando analizamos los ensayos donde utilizamos el zimósán, el cual anula al factor C3 del sistema del Complemento uniéndose a él y formando el complejo C3-zimósán, se demostró una inhibición de esta actividad. Asimismo, cuando el suero fue tratado con agentes quelantes como EDTA y EGTA, los resultados observados demostraron que, si bien el EDTA anula la hemólisis, el EGTA no interfiere con dicha actividad. Esto se debe a que este agente se une fuertemente al  $\text{Ca}^{2+}$  y deja al ión  $\text{Mg}^{2+}$  libre. Siendo la vía Alternativa dependiente de magnesio pero no de calcio, este ensayo demuestra que la hemólisis observada se debe a esta vía. La vía Clásica necesita de los dos iones simultáneamente. La capacidad hemaglutinante del suero de tortuga demuestra que éste tiene anticuerpos contra antígenos de las membranas de los eritrocitos, lo cual confirmaría que aquellos podrían tener alguna similitud con antígenos (marcadores) presentes en microorganismos que son patógenos para estos vertebrados. Esto es apoyado por el hecho aquí encontrado que la presencia de membranas de eritrocitos en los ensayos disminuye la actividad lítica, lo que

ocurriría al retener parte de los componentes del Complemento limitando su actividad. Es interesante que la actividad se mantuviera hasta una dilución de 1/16, que no coincide con la titulación de la capacidad de aglutinación del suero.

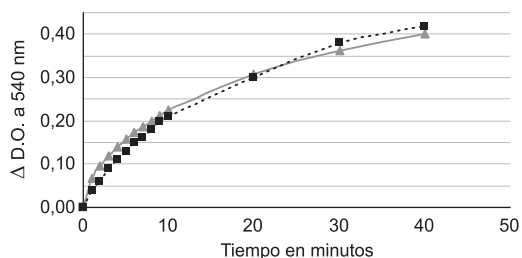
Por otra parte, la demostración de la presencia de actividad lítica sobre los microco-



**Figura 2.** Ensayo de la actividad hemolítica del suero de tortuga en función del tiempo. Valores obtenidos de un pool de muestras, ver texto.



**Figura 3.** Ensayo de hemólisis con suero pretratado con diferentes cantidades de membranas de eritrocitos. Valores obtenidos de un pool de muestras, ver texto.



**Figura 4.** Actividad bacteriolítica del suero de tortuga tratado con EDTA. La línea con triángulos representa la bacteriolisis sin EDTA y la línea con cuadrados representa dicha lisis con EDTA. Valores obtenidos de un pool de muestras, ver texto.

cos en el suero de tortuga demuestra la presencia de lisozima, ajena a la actividad del Complemento. Esta enzima tiene un efecto claro y su actividad se ve afectada por la presencia de quitina, lo que ya había sido señalado por algunos autores (Laible y Germaine, 1985). El EDTA produce la inhibición del Sistema de Complemento pero no de la lisozima, por lo tanto, la actividad lítica que se evidencia puede corresponder a esta enzima.

La presencia de lisozima en la sangre de los vertebrados es un hecho ya comprobado en otros grupos de quelonios (Chijiwa *et al.*, 2006). Consideramos que lo aquí expuesto es un dato nuevo para la especie estudiada. No obstante estimamos que lo observado no sería un hecho aislado, sino que es altamente probable la coexistencia de los dos sistemas en la sangre de los quelonios, circunstancia a la cual no se le ha prestado atención hasta el momento.

En conclusión, hemos comprobado que el suero de tortuga posee capacidad hemolítica contra glóbulos rojos de mamíferos y actividad lítica contra los micrococos. Consideramos que la primera se activa por la vía Alternativa del Complemento y formaría parte de un mecanismo de detección de marcadores de membranas presentes en microorganismos que les son patógenos. Por otra parte la lisozima constituye un mecanismo de defensa que otros estudios han demostrado ser evolutivamente muy antiguo.

#### AGRADECIMIENTOS

A los árbitros anónimos por sus sugerencias. Al Sr. José Yapur por la colaboración en la obtención de las muestras. Al Dr. Gustavo Scrocchi por los datos proporcionados. Al Sr. Gerónimo Fernández por su colaboración técnica. Este trabajo ha recibido el apoyo de la Fundación Miguel Lillo y del CIUNT, a través del Proyecto 26-G415, de la Universidad Nacional de Tucumán.

#### LITERATURA CITADA

- Alsens, J., Avila, D., Huemer, H. P., Esperanza, I., Becherer, J. D., Kinoshita, T., Wang, W., Oppermann, S. y Lambris, J. D. 1992. Phylogeny of the third component of complement C3: analysis of the conservation of human CR1, CR2, H, and B binding sites, concanavalin binding sites, and thiolester bond in the C3 from different species. *Developmental and Comparative Immunology*, 16: 63-76.
- Anderson, N. E., Rydengard, V., Nyberg, P., Nistche, D. P., Morgelin, M., Malmsten, M., Bjorck, L. y Schmidtchen, A. 2004. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 16879-16884.
- Araki, T., Yamamoto, T. y Torikata, T. 1998. Reptile lysozyme: the complete amino acid sequence of soft-shelled turtle lysozyme and its activity. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 62: 316-324.
- Berangere, T. y Regis, R. 2003. Biological properties of sulfated fucans: the potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system. *Glycobiology*, 13: 296-316.
- Caliezi, C., Wuillemin, W. A., Zeeleder, S., Redondo, M., Eisele, B. y Hack, C. E. 2000. C1-Esterase Inhibitor: An anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacological Review*, 52(1): 91-112.
- Chattopadhyay, S., Sinha, N. K., Banerjee, S., Roy, D., Chattopadhyay, D. y Roy, S. 2006. Small cationic protein from a marine turtle has beta-defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity. *Proteins*, 64: 524-531.
- Chaudhuri, T. K., Das, K. P. y Sinha, N. K. 1993. Surface hydrophobicity of a low molecular weight basic trypsin subtilisin inhibitor from marine turtle eggwhite. *Journal of Biochemistry*, 113: 729-733.
- Chijiwa, Y., Kawamura, S., Torikata, T. y Araki, T. 2006. Amino acid sequence and activity of green turtle (*Chelonia mydas*) lysozyme. *Protein Journal*, 25: 336-344.
- Day, R. D., Segars, A. L., Arendt, M. D., Lee, A. M. y Peden-Adams, M. M. 2007. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environment Health Perspectives*, 115: 1421-1428.
- 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.
- Gayen, S. K., Som, S., Sinha, N. K. y Sen, A. 1977. Lysozyme in egg whites of tortoises and turtle.

- Purification and properties of egg white lysozyme of *Trionyx gangeticus* Cuvier. Archives of Biochemistry and Biophysics, 183: 432-442.
- Keller, J. M., McClellan-Green, P. D., Kucklick, J. R., Keil, D. E. y Peden-Adams, M. M. 2006. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. Environment Health Perspectives, 114(1): 70-76.
- Laible, N. J. y Germaine, G. R. 1985. Bacteriolitic activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sangis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. Infection and Immunity, 48: 720-728.
- Masaru, N. 2001. Evolution of the complement system. Current Opinion in Immunology, 13: 69-73.
- Regueiro, J. R. y López Larrea, C. 1998. Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune. Editorial Panamericana, España, pp. 27-33.
- Siritapetawee, J., Thammasirak, S., Robinson, R. C. y Yuvaniyama, J. 2009. The 1.9 Å X-ray structure of egg-white lysozyme from taiwanese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis* Wiegmann) exhibits structural differences from the standard chicken-type lysozyme. Journal of Biochemistry, 145: 193-198.
- Skujins, J. J., Portgieter, H. J. y Alexander, M. 1965. Dissolution of fungal cell walls by a *Streptomyces chitinasa* and  $\alpha$ -(1-3) glucanase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 111: 358-364.
- Suner, O. y Tort, L. L. 1994. The Complement of the teleost fish *Sparus aurata*. Annals of the New York Academy of Science, 712: 371-373.
- Tompkins, G. R., O'Neil, C., Cafarella, T. G. y Germaine, G. R. 1991. Inhibition of bactericidal and bacteriolytic activities of poly-d-lysine and lysozyme by chitotriose and ferric iron. Infection and Immunity, 59: 655-664.
- Weir, D. M (ed). 1973. Handbook of Immunology. Immunochemistry. Editorial Blackwell Scientific Publications, Vol. 1, Oxford, Gran Bretaña.