

# Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos de los fagocitos de dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758

M. P. Sepulcre, J. García-Castillo, P. Pelegrín, V. Mulero y J. Meseguer

Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. E-30100 Murcia, España. Correo electrónico: meseguer@um.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

En el presente estudio se han obtenido y caracterizado tres anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los fagocitos de dorada, *Sparus auratus* Linnaeus, 1758. Se discute su utilidad en la investigación básica y su aplicación en la piscicultura.

**Palabras clave:** Piscicultura, respuesta inmune.

## ABSTRACT

*Production and characterization of monoclonal antibodies specific to gilthead seabream Sparus auratus Linnaeus, 1758 phagocytes*

*In the present study, we produced and characterised three monoclonal antibodies that react with phagocytes of the gilthead seabream Sparus auratus Linnaeus, 1758. Their usefulness in basic and applied research is discussed.*

**Keywords:** Fish-farming, immune response.

## INTRODUCCIÓN

La tecnología para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) ha facilitado el estudio de la biología y desarrollo del sistema inmunitario (Scapigliati, Romano y Abelli, 1999). Las aplicaciones de los mAbs son múltiples, como, por ejemplo: 1) determinación del nivel de inmunoglobulinas (Igs) en peces sanos, en peces vacunados y en peces infectados; 2) estudios de reactividad cruzada desde un aspecto filogenético; 3) identificación de

diferentes poblaciones de linfocitos y su localización en órganos linfoides; y 4) caracterización molecular de receptores celulares.

A pesar del rápido progreso que ha tenido el conocimiento sobre el sistema inmunitario de peces teleosteos, los anticuerpos específicos disponibles que reconocen poblaciones celulares son todavía escasos y, en algunos casos, no han resultado demasiado útiles debido a su falta de especificidad. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos mAbs para poder realizar una mejor caracterización fenotí-

pica de los leucocitos de peces. En el presente estudio se describe la caracterización de tres mAbs específicos de los fagocitos de dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Se inmunizaron ratones de la cepa Balb/c, tres veces, con 10<sup>7</sup> leucocitos de exudado peritoneal de dorada. Las células del bazo de dichos ratones fueron fusionadas con células SP2/0 mediante polietilenglicol y los hibridomas resultantes seleccionados en medio HAT (hipoxantina - aminop-

terina - timidina), clonados dos veces y almacenados en nitrógeno líquido (Mulero *et al.*, 2001). Los hibridomas positivos fueron seleccionados mediante citometría de flujo. Los ensayos de fagocitosis se llevaron a cabo con la bacteria *Listonella anguillarum* (Bergeman, 1909) MacDonell & Colwell, 1986 [antes *Vibrium anguillarum*] previamente marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como han descrito Esteban *et al.* (1998). Los estudios de inmunocitoquímica para microscopía electrónica fueron realizados según la metodología convencional utilizando un anticuerpo de cabra dirigido contra la inmunoglobulina G (IgG) de ratón, conjugado con oro coloidal de 10 nm.

**RESULTADOS**

Los tres anticuerpos obtenidos (denominados D2, GR2 y G7) reaccionan específicamente con los fagocitos de riñón cefálico (RC), bazo (B), sangre (S) y exudado peritoneal (EP) (figura 1). En concreto, son capaces de marcar el 10 % de los leucocitos de bazo y de sangre, el 20-40 % de los de riñón cefálico y el 50 % de las células del exudado peritoneal (figura 2). Las células identificadas por los diferentes anticuerpos fagocitan la bacteria *Listonella anguillarum* (figura 3), confirmando que los tres anticuerpos obtenidos reaccionan con los fagocitos de dorada.

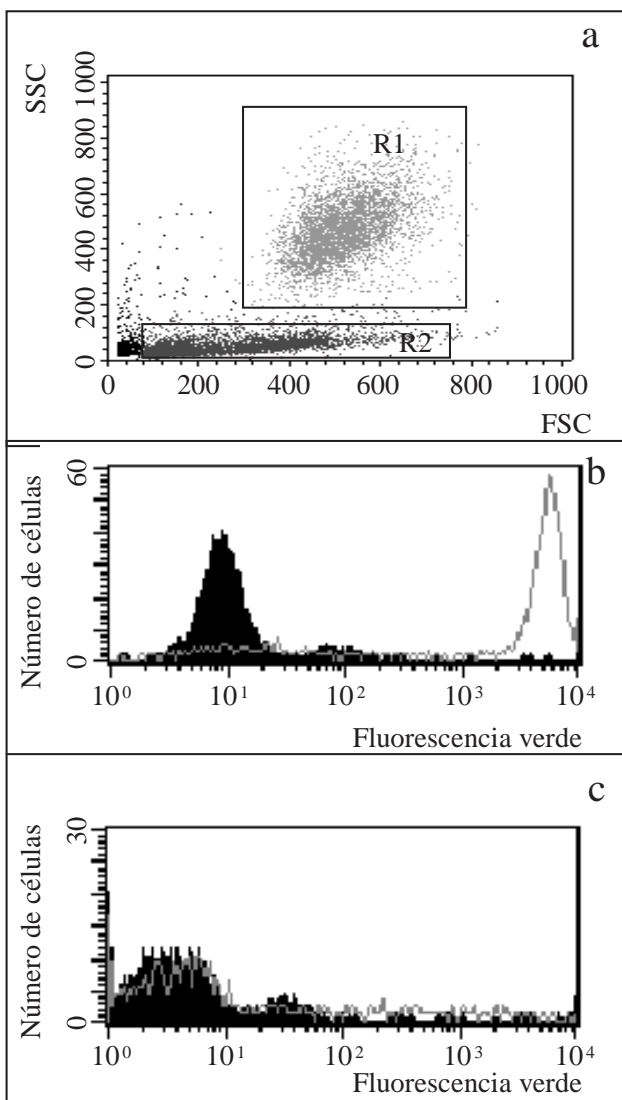


Figura 1. Análisis mediante citometría de flujo de leucocitos de riñón cefálico de dorada. (a): diagrama de puntos; (b): histograma de la región 1 (R1); (c): histograma de la región 2 (R2); (SSC): granularidad; (FSC): tamaño celular.

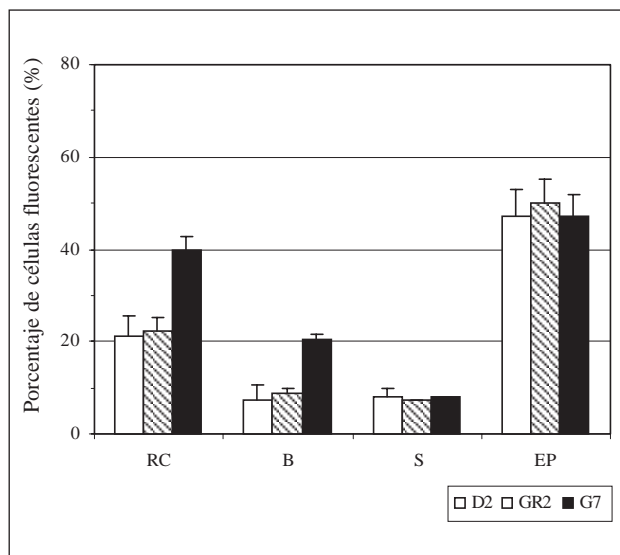


Figura 2. Porcentaje de células inmunorreactivas en riñón cefálico (RC), bazo (B), sangre (S) y exudado peritoneal (EP) marcadas por los anticuerpos D2, GR2 y G7.

Estudios de inmunocitoquímica para microscopía electrónica indican que el anticuerpo G7 reacciona específicamente con los granulocitos acidófilos de dorada (figura 4a), permitiendo la purificación mediante la utilización de bolas magnéticas (MACS) (figura 4b).

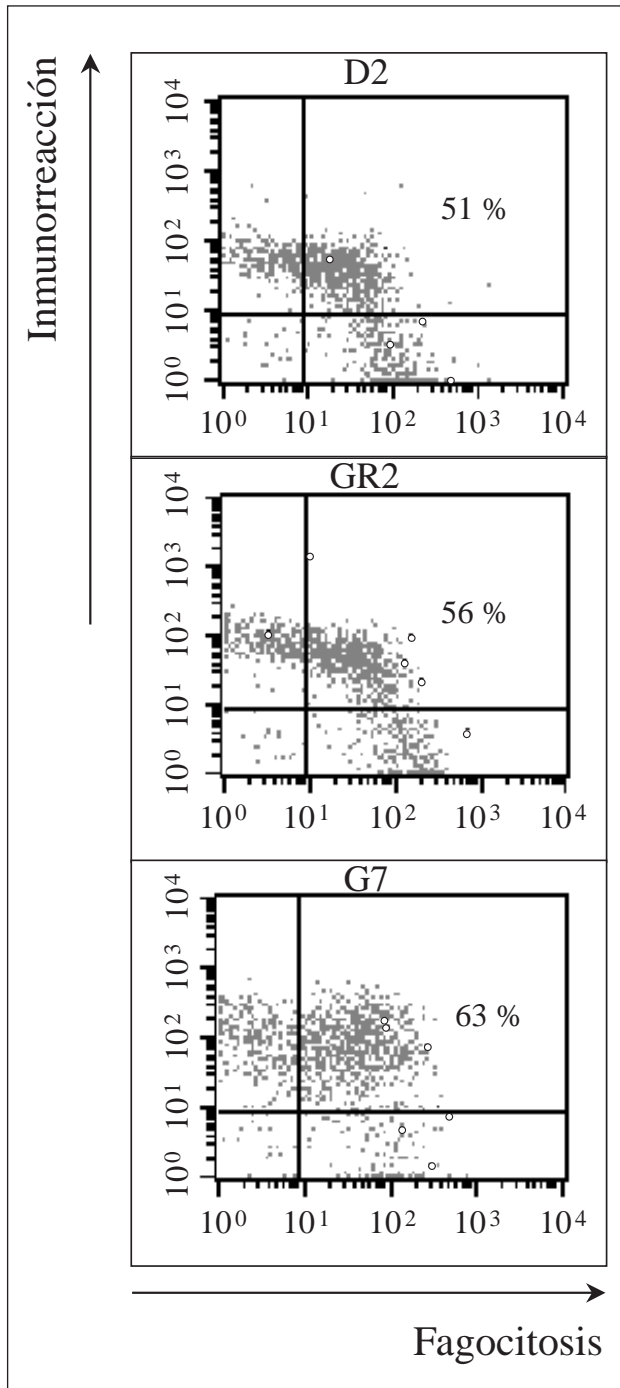


Figura 3. Diagrama de puntos representativos de los leucocitos de riñón cefálico de la región R1 marcadas por los tres anticuerpos (D2, GR2 y G7) según las variables FL1 (○, fagocitosis) y FL2 (■, inmunorreacción).

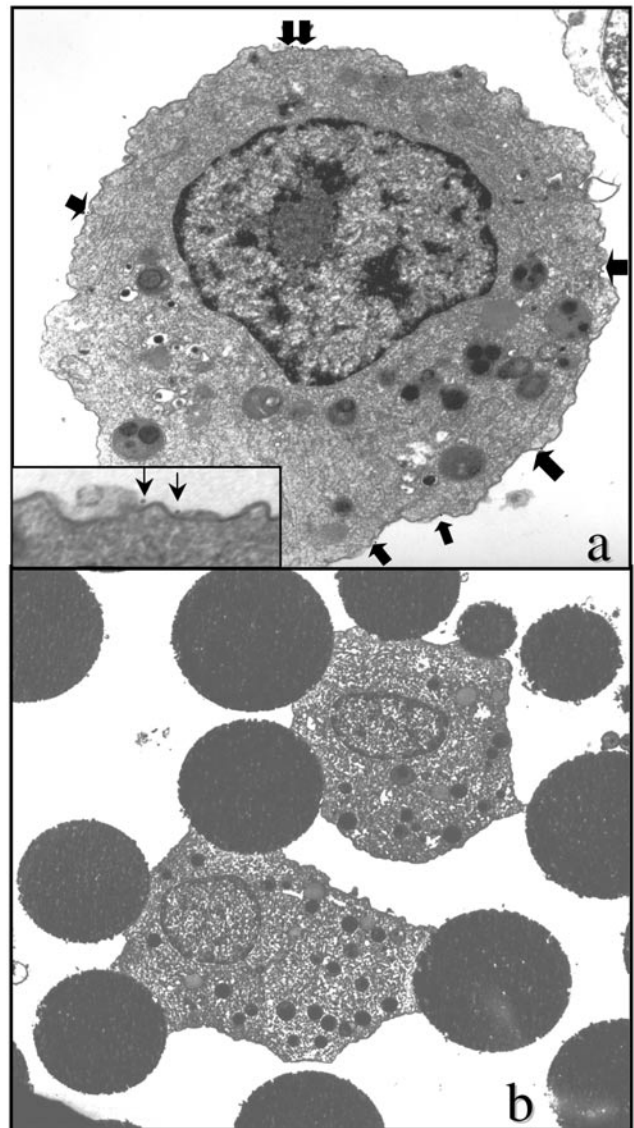


Figura 4. (a): Micrografías electrónicas que muestran un granulocito acidófilo inmunorreactivo para el anticuerpo G7 (G7+) [ $\times 16\,000$ ], recuadro [ $\times 40\,000$ ]; (b): dos granulocitos acidófilos purificados mediante MACS (bolas magnéticas) [ $\times 5\,600$ ].

### DISCUSIÓN

En este estudio se describe la producción de tres mAbs específicos de los fagocitos de dorada. Los anticuerpos son útiles en ensayos de citometría de flujo y de inmunocitoquímica, por lo que suponen una herramienta esencial para profundizar en el conocimiento de las funciones desempeñadas por los fagocitos en la respuesta inmunitaria de los peces y podrían ser utilizados en el diagnóstico de enfermedades que conlleven una alteración de la fórmula leucocitaria.

El anticuerpo denominado G7 es de gran interés, ya que reacciona específicamente con los granulocitos acidófilos de dorada, lo que permitirá conocer las funciones desempeñadas por tales células en la respuesta inmunitaria de dorada. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el acidófilo de dorada es el granulocito más abundante en sangre (López-Ruiz, Esteban y Meseguer, 1992) y exudado peritoneal (Meseguer *et al.*, 1993), pero su papel *in vivo* permanece desconocido. En el presente estudio se demuestra que esta célula muestra *in vitro* gran capacidad fagocítica frente a la bacteria *L. anguillarum*. Es la primera vez que se demuestra una actividad fagocítica tan importante para los acidófilos de vertebrados.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los profesores A. E. Toranzo y J. L. Barja la cesión de la bacteria. Este estudio ha sido realizado gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto

PB98-0387 y una beca de formación de personal investigador) y a una beca concedida por la Fundación Séneca del Centro de Coordinación de la Investigación de la Región de Murcia.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Esteban, M. A., V. Mulero, J. Muñoz y J. Meseguer. 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 293: 133-141.
- López-Ruiz, A., M. A. Esteban y J. Meseguer. 1992. Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Anat. Rec.* 234: 161-171.
- Meseguer, J., M. A. Esteban, J. Muñoz y A. López-Ruiz. 1993. Ultrastructure of the peritoneal exudate cells of seawater teleosts, seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tissue Res.* 273: 301-307.
- Mulero, V., P. Pelegrín, M. P. Sepulcre, J. Muñoz y J. Meseguer. 2001. A fish cell surface receptor defined by a mAb mediates leukocyte aggregation and deactivation. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 77-85.
- Scapigliati, G., N. Romano y L. Abelli. 1999. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture* 172: 3-28.