

# Estudio de la reacción cruzada de un panel de anticuerpos monoclonales frente a citoquinas humanas y bovinas en tejidos de cetáceos

Jaber, J. R.; Pérez, J.\*; Godinho, A.; Arbelo, M.; Aguirre, M.; Zafra, R.\*; Espinosa de los Monteros, A.; Fernández, A. Unidad de Histología y Patología, Instituto de Sanidad Animal (IUSA), Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

\* Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

## Cross reactivity of anti-human and anti-bovine cytokine monoclonal antibodies with cetacean tissues

**RESUMEN:** Este estudio valora la reacción cruzada de un panel de diez anticuerpos monoclonales para citoquinas de origen bovino y humano en secciones de tejidos fijados en formol, así como de tejidos congelados procedentes de pulmón, bazo, hígado y nódulos linfáticos mesentéricos de tres especies de cetáceos: delfín moteado (*Stenella frontalis*), delfín listado (*Stenella coerulealba*) y rorcual común (*Balaenoptera physalus*). En las secciones seriadas, se utilizaron anticuerpos anti-CD3, IgG y lisozima humanos para identificar células T, células B y macrófagos/monocitos, respectivamente. Los anticuerpos frente a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  y CD25 humanas y los anticuerpos frente a IL-4 y IFN- $\gamma$  bovinos se expresaron en las muestras de tejidos congelados de nódulos linfáticos de cetáceos de forma similar a la obtenida en tejidos de las especies de origen, sin embargo, éstos no mostraron reacción en las secciones de tejido fijadas en formol.

**SUMMARY:** This study evaluates the cross-reactivity of a panel of ten monoclonal antibodies to human and bovine cytokines in formalin-fixed and snap frozen tissue sections of lung, spleen, liver and mesenteric lymph nodes of three species of cetaceans: Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*), striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). In serial sections, anti-human CD3, IgG, and lysozyme polyclonal antibodies (pAbs) were used to label T and B cells, and macrophages/monocytes respectively. The anti-human IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , CD25 and anti-bovine IL-4 and IFN- $\gamma$  mAbs yielded immunolabelling in cetacean snap frozen lymph node tissue sections similar to that obtained in the species of origin, but they did not react in formalin-fixed tissue sections. The anti-human CD3, IgG, and lysozyme pAbs reacted both in formalin-fixed and snap frozen tissue sections of the three cetacean species. Macrophages and lymphocytes were the most common cell population immunolabelled with the anti-cytokine mAbs. The results of the present study suggest that this panel of anti-cytokine mAbs may be useful to evaluate cytokine expression in snap frozen tissue samples of the species of cetacean tested.

**KEY WORDS:** Cetacean; Cross-reactivity; Cytokines; Immunohistochemistry

## Introducción

Se ha sugerido que el deterioro de la función inmunitaria produce un papel importante en el aumento de la incidencia de enfermedades infeccio-

sas en mamíferos marinos (Jepson *et al.*, 1999; Jepson *et al.*, 2005). Diversas citoquinas tienen un papel decisivo en la determinación del estado inmunitario del animal, de esta manera la integridad del sistema inmunitario

puede ser controlada por medio de la respuesta celular inducida por la citoquinas (Cullor, 1995; Murtaugh *et al.*, 1996). Así, el conocimiento de la función de las diferentes citoquinas en procesos inflamatorios puede llevar a un mayor conocimiento del sistema inmunológico en los mamíferos marinos. La observación de los efectos inmunotóxicos de diversos contaminantes a través de la valoración de producción de citoquinas, fagocitosis e

## Correspondencia

JR. Jaber, Unidad de Histología y Patología, Instituto de Sanidad Animal (IUSA), Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Transmontaña, s/n, 35416, Las Palmas, España.

Tel. 34 28 457428; Fax. 34 28 451141

E-mail: jjaber@dmor.ulpgc.es

inmunofenotipificación ha sido demostrada en los seres humanos (Svensson *et al.*, 1994; Bilrha *et al.*, 2003), así como en delfines mulares y ballenas belugas con elevada ingesta de peces afectados por diversos contaminantes (Levin *et al.*, 2004).

La mayoría de los estudios de identificación de citoquinas en mamíferos marinos han sido realizados en suero (Cirocco *et al.*, 1997; Funke *et al.*, 2003), pero hasta la fecha existe poca información sobre la producción y función de diferentes citoquinas en estos animales. Desafortunadamente, el número de estudios con citoquinas en mamíferos marinos es muy limitado por la falta de reactivos específicos para estas especies. Como las citoquinas han permanecido bien conservadas durante la evolución, la reacción cruzada entre distintas especies animales puede ocurrir (Pedersen *et al.*, 2002; Scheerlinck *et al.*, 1999; Dernfalk *et al.*, 2004). En los últimos años se han realizado algunos estudios de expresión y reacción cruzada de citoquinas en distintas especies de cetáceos. De esta forma, Funke *et al.* (2003) estudió la expresión de IL-6 nativa en orcas y delfines mulares; Itou *et al.* (2002) valoró el efecto de TNF- $\alpha$  recombinante de delfines sobre la actividad catabólica respiratoria de neutrófilos de delfines; Beineke *et al.* (2004) estudio la expresión de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en linfocitos controlados y linfocitos estimulados por mitógenos de marsopas sanas utilizando la técnica de la RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction). Sin embargo, no existen trabajos que evalúen la expresión de anticuerpos anti-citoquinas en diferentes tejidos de mamíferos marinos.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la reacción cruzada de un panel de 8 anticuerpos monoclonales frente a citoquinas humanas y 2 frente a citoquinas bovinas en muestras procedentes de tejidos de tres especies de cetáceos.

## Material y métodos

### 1) Animales y obtención de muestras

Este estudio fue realizado con tres delfines moteados (*Stenella frontalis*), dos delfines listados (*Stenella coerulealba*) y un rorcual común (*Balaenoptera physalus*), la mayor parte de éstos varados vivos en la costa de las Islas Canarias (España). De las necropsias de estos seis animales se recogieron muestras de pulmones, bazo, hígado, ileon y nódulos linfáticos mesenterios. Una parte de las muestras fue rápidamente congelada en OTC (Miles, Elkhart, IN, USA), inmersa en 2-metilbutano (Merk, Darmstadt, Germany) y congeladas en nitrógeno líquido para su conservación a -80 °C. Posteriormente, con un criostato se realizaron cortes seriados de 7 $\mu$ m de grosor, que fueron fijados en acetona durante 10 minutos y guardados de nuevo a -80 °C hasta su utilización. Otra parte de las muestras fue fijada en formol tamponado al 10%, deshidratadas por medio de un gradiente de alcoholes, y lavadas con xilol hasta su inclusión en parafina, utilizando técnicas rutinarias. Los bloques de parafina fueron cortados a 4 $\mu$ m para su tinción con haematoxilina-eosina.

### 2) Inmunohistoquímica

Tanto para los tejidos congelados como para las muestras fijadas en formol se siguió el método de la avidina-biotina-peroxidasa (Jaber *et al.*, 2003a). En el caso de los tejidos ultracongelados, la actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada por incubación de los cortes en una solución de fenil-hidrazina al 0,05% (Sigma, St Louis, MO, USA) en tampón tris salino (TBS) pH 7.2, mientras que en aquellas fijadas en formol, dicha reacción fue bloqueada tras incubación con metanol al 0,03 % en tampón fosfato salino. En las muestras fijadas en formol se utilizaron tres tipos de tratamiento: 1) incubación en pronasa al 0,01 % (Sigma) a temperatura ambiente durante 10 minutos. 2) incubación en tripsina al 0,25 % (Fluka, Buchs, Suiza) con cloruro de calcio al 0,02 % durante 20 minutos a 37 °C. 3) incubación en ácido cítrico al 0,01 M y tratamiento en microondas a 100 °C. Todas las secciones fueran posteriormente incubadas en suero normal de cabra al 5% (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4°C

**Tabla 1.** Detalle de los anticuerpos primarios usados en este estudio.

Especificidad	Especies de origen	Método de tratamiento	Dilución	Fuente <sup>b</sup>
IL-1 $\alpha$ (mAC)	Humano	- <sup>a</sup>	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
IL-1 $\beta$ (mAC)	Humano	-	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
IL-2 (mAC)	Humano	-	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
IL-4 (mAC)	Bovino	-	1:100	Serotec <sup>®</sup>
IL-6(mAC)	Humano	-	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
IL-8 (mAC)	Humano	-	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
IL-10 (mAC)	Humano	-	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
TNF- $\alpha$ (mAC)	Humano	-	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
IFN- $\gamma$ (mAC)	Bovino	-	1:100	Serotec <sup>®</sup>
CD25 (mAC)	Humano	-	1:100	Inmunotools <sup>®</sup>
CD3 (mAC)	Humano	Pronasa	1:100	Dako <sup>®</sup>
IgG (mAC)	Humano	Pronasa	1:100	Dako <sup>®</sup>
Lysozyme (pAc)	Humano	Pronasa	1:100	Dako <sup>®</sup>

<sup>a</sup> -: sin tratamiento

<sup>b</sup> -: Serotec (Oxford, IK)

Inmunotools<sup>®</sup> (Friesoythe, Germany)

Dako<sup>®</sup> (Glostrup, Denmark)

mAC: anticuerpo monoclonal

pAc: anticuerpo policlonal

durante toda la noche en cámara húmeda. Los detalles de los anticuerpos primarios utilizados, las diluciones, tratamientos de elección y origen del anticuerpo son resumidos en la Tabla 1. Al día siguiente se aplicó un suero de inmunoglobina biotinilada de cabra anti-ratón (Dako) a 1:50 durante 30 minutos en las secciones incubadas con los anticuerpos monoclonales (Amc) anti- IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , CD25 e IFN- $\gamma$ .

En cortes seriados de nódulo linfático mesentérico y bazo se aplicaron los anticuerpos policlonales (Apc) anti-CD3, IgG y lisozima para detectar células T, células B y macrófagos/monocitos, respectivamente. Estos Apcs ya habían presentado reacción cruzada en tejidos de cetáceos según se muestra en los trabajos realizados por Jaber *et al.*, 2003b. Estos cortes fueron incubados durante 30 minutos con un suero de inmunoglobulina biotinilado de cabra anti-conejo (Dako) diluido al 1:200. A todos los cortes se les aplicó como suero terciario el complejo ABC (Vector) diluido al 1:50 durante 1 hora. Seguidamente, se revelaron los cortes con 3'-tetrahidrocloreuro de diaminobenzidina (Sigma) diluido en TBS al 0,035% con 0,1% de peróxido de hidrogeno durante 1

minuto, aclarados en agua corriente y contrateñidos moderadamente con hematoxilina de Mayer, para después, en el caso de las muestras de tejidos ultracongelados ser montados con immumont (Shandon, Pittsburgh, PA, USA), mientras que aquellas fijadas en formol fueron montadas con DPX. Como controles positivos de los anticuerpos primarios se utilizaron cortes de nódulos linfáticos bovinos y humanos, mientras que aquellas secciones en las cuales el anticuerpo primario fue sustituido por PBS fueron utilizados como controles negativos.

### 3) Recuento celular y análisis estadístico

Las células inmunorreactivas para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , CD25 e IFN- $\gamma$  fueron contadas en 20 campos seleccionados al azar, de 0,6 mm<sup>2</sup> de magnificación, utilizando microfotografías digitalizadas. El recuento celular fue expresado como sigue: -, negativo; +, 1-5 células/0,6 mm<sup>2</sup>; ++, 6-25 células/0,6 mm<sup>2</sup>; +++ 26-50 células/0,6 mm<sup>2</sup>; ++++ > 50 células/0,6 mm<sup>2</sup>. Las células inmunorreactivas fueron identificadas por el uso de los Apcs (CD3, IgG y lisozima), así como por su tamaño y características morfológicas.

## Resultados

### 1) Histopatología

En los pulmones se observó un infiltrado moderado de células linfoides en los septos interalveolares y un moderado aumento de los macrófagos alveolares. En algunos casos, se observó una fibrosis moderada focal que afectaba a los septos interalveolares. El hígado presentó un ligero infiltrado linfoplasmocitario en los espacio porta. En el bazo no se identificaron cambios histológicos, mientras que los nódulos linfáticos mesentéricos mostraban un moderado aumento de tamaño por hiperplasia de los folículos linfoides y de las áreas paracorticales. En un delfín moteado se observó linfadenitis supurativa moderada. Otro de los delfines moteados mostró una gastritis ulcerativa asociada a infestación severa por *Anisakis sp.*

### 2) Inmunohistoquímica

Los resultados inmunohistoquímicos están resumidos en la Tabla 2. En las tres especies de cetáceos, los Apcs anti-CD3, IgG y lisozima reaccionaron tanto en las muestras fijadas en formol como en aquellas procedentes de muestras congeladas. El Apc anti-CD3 presentaba mayor expresión en los linfocitos localiza-

**Tabla 2.** Inmunohistoquímica para los anticuerpos monoclonales en tejidos de cetáceos.

Especie	Anticuerpos monoclonales										
	Tejido	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	CD25
<b>Sf (3)</b>	Pulmón	+++*	++	++	++	+++	+	-	++	-	+
	Bazo	+	+	++	++	++	++	+	++	+	+
	LN	++++	+++	+++	+++	++++	++	++	+++	+	+
	Hígado	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Sc (2)</b>	Pulmón	++	++	+++	++	++	+++	+	+	-	-
	Bazo	++	+++	+++	+++	++	+++	+	+	+	+
<b>Bp (1)</b>	Bazo	+	+	++	++	++++	+	+	+	++	++
	LN	++	++	++	++	++++	++	+	+	++	+
	Ileon	++	++	+++	+++	++++	++	+	+	++	+

Sf: Delfín moteado (*Stenella frontalis*)

Sc: Delfín listado (*Stenella coeureolealba*)

Bp: Rorcual común (*Balaenoptera physalus*)

LN: nódulos linfáticos

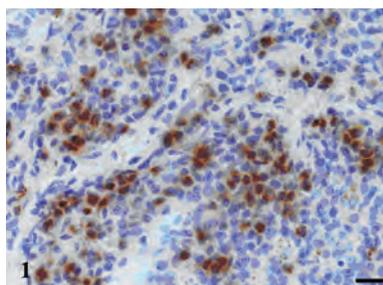
\* : Número de células por 0.6 mm<sup>2</sup>: -, negativo; +, 1-5; ++, 6-25; +++, 26-50; +++++, > 50.

dos en áreas paracorticales, que en aquellos presentes en la medula de los nódulos linfáticos, mientras este número era variable en aquellos linfocitos presentes en los cordones y senos esplénicos, así como en las áreas interfoliculares de las placas de Peyer. En los septos interalveolares y espacios porta el número de linfocitos inmunorreactivos fue reducido. El Apc anti-IgG marcó numerosas células plasmáticas de los cordones y senos medulares de los nódulos linfáticos, mientras que en el caso de los linfocitos esta expresión fue más reducida en los folículos linfoides y áreas interfoliculares. La expresión también fue reducida en los cordones y senos venosos esplénicos y en la lámina propia del ileon, mientras que en los espacios porta y septos interalveolares apenas se detectaban células plasmáticas inmunorreactivas. Numerosos macrófagos localizados en la médula de los nódulos linfáticos, así como en los senos y cordones esplénicos, lamina propia del ileon, septos interalveolares y células de Kupffer, así como algunos macrófagos intersticiales de los espacio porta, presentaron fuerte inmunoreactividad en el citoplasma granular con el Apc anti-lisozima. Los Acms anti-IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$  y CD25 mostraron reacción cruzada con muestras de tejidos de cetáceos ultracongelados, pero éstos no reaccionaron con aquellos que procedían de tejidos fijados en formol. Estos resultados fueron similares en todos los animales de las especies examinadas.

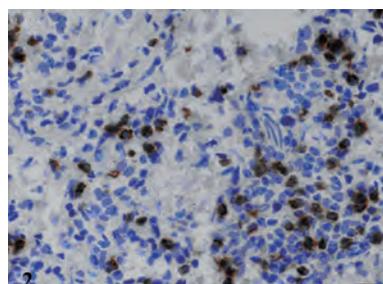
A) *Nódulos linfáticos mesentéricos*

La inmunorreacción obtenida con los Acms anti-IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$  y CD25 presentó un patrón similar en secciones procedentes de nódulos linfáticos de bovinos, humanos y cetáceos, mientras que ésta no era observada en los controles negativos de todas las especies.

Los anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 (Fig. 1) y IL-4 (Fig. 2) mostraron

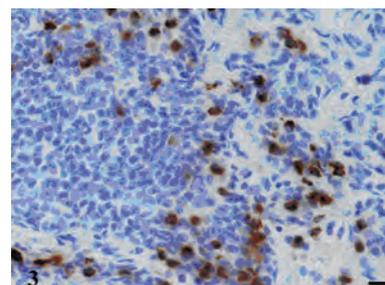


▲ Figura 1. Delfín moteado. Nódulo linfático mesentérico, IL-2. Inmunorreacción en células redondas de los cordones medulares. Método ABC, contratinción con hematoxilina de Mayer. Barra = 20  $\mu$ m.



▲ Figura 2. Delfín moteado. Nódulo linfático mesentérico, IL-4. Inmunorreacción en linfocitos y macrófagos de cordones medulares. Método ABC, contratinción con hematoxilina de Mayer. Barra = 20  $\mu$ m.

una fuerte (delfín moteado) o moderada (rorcual común) expresión en linfocitos y macrófagos, principalmente localizados en los senos y cordones medulares, así como en zonas paracorticales. El Amc anti-IL-4 marcó también células tipo dendríticas en áreas paracorticales y folículos linfoides. El Amc anti-IL-6 presentó una fuerte reactividad en numerosos linfocitos de senos, cordones medulares y áreas paracorticales en ambas especies. El Amc anti-IL-8 mAc presentó una fuerte inmunoreactividad en los gránulos citoplasmáticos de un número moderado de macrófagos de las áreas paracorticales, cordones y senos medulares. El Amc anti-IL-10 (Fig. 3) mAc marcó un número variable de linfocitos en las áreas paracorticales, cordones medulares y senos linfáticos. En el rorcual común, solo unos pocos linfocitos y macrófagos localizados en los cordones medulares y áreas paracorticales fueron IL<sup>10+</sup>. Los gránulos citoplasmáticos de numero-



▲ Figura 3. Delfín moteado. Nódulo linfático mesentérico, IL-10. Inmunorreacción en algunos linfocitos y macrófagos de cordones medulares y áreas paracorticales. Método ABC, contratinción con hematoxilina de Mayer. Barra = 20  $\mu$ m.

ros linfocitos y macrófagos presentaron una fuerte inmunoreactividad para el TNF- $\alpha$  en las áreas paracorticales, cordones y senos medulares, y en menor número de linfocitos de los folículos linfoides de delfines moteados; en el rorcual común solo aparecían ocasionales linfocitos y macrófagos marcados con este anticuerpo en los cordones medulares y áreas paracorticales. Con los Amcs IFN- $\gamma$  y CD25 se obtuvieron resultados similares a los del TNF- $\alpha$ .

b) *Pulmones*

Los Amcs IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 e IL6 presentaron fuerte reactividad en numerosos macrófagos intravasculares y linfocitos de los septos interalveolares. El Amc anti-IL-8 se expresó ocasionalmente (delfín moteado) o en número abundante (delfín listado) en macrófagos intravasculares. Por otro lado, el Amc anti-IL-10 en delfín moteado, reaccionó ocasionalmente con linfocitos y macrófagos de los septos interalveolares. El anti-TNF- $\alpha$  marcó un número de bajo a moderado de linfocitos y macrófagos de los septos interalveolares en los delfines listado y moteado, respectivamente.

C) *Hígado*

Los Amcs anti-IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se expresaron ocasionalmente en linfocitos y macrófagos de los espacio porta. La IL-1 $\alpha$  también se expresó en los hepatocitos. Los Amcs IL-2 e IL-8

marcaron linfocitos y macrófagos aislados, respectivamente, procedentes del infiltrado inflamatorio periportal. Sin embargo, el anti-IL-4 mAc marcó células mononucleares circulantes aisladas. Los Amcs IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no mostraron reacción alguna con el tejido hepático de las tres especies de cetáceos estudiadas.

#### D) Bazo

Los Amcs IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  demostraron una fuerte inmunoreactividad en un número variable de macrófagos de los senos venosos y cordones esplénicos. Los Amcs IL-2 e IL-4 marcaron numerosos linfocitos y macrófagos de las vainas periarteriales, senos venosos y cordones esplénicos. El Amc IL-6 reaccionó con numerosos linfocitos de las vainas periarteriales, senos venosos y cordones esplénicos, particularmente en el rorcual común. El Amc anti-IL-8 (Fig. 4) mostró intensa inmunorreacción citoplasmática y granular en un número variable de macrófagos localizados en cordones y senos esplénicos. El Amc para IL-10 marcó de moderado (delfín moteado) a bajo (delfín listado y rorcual común) número de linfocitos y macrófagos de los cordones esplénicos y senos venosos.

En los macrófagos de los senos venosos y cordones esplénicos se observó una fuerte inmunoreactividad citoplasmática y granular para el anti-TNF- $\alpha$  (Fig. 5). Los anticuerpos para CD25 (Fig. 6) y para IFN- $\gamma$  (Fig. 7) presentaron una reacción intensa en los gránulos citoplasmáticos en moderado (rorcual común) o bajo (delfines listado y moteado) número de linfocitos y macrófagos de las vainas periarteriales, cordones esplénicos y senos venosos.

#### E) Ileon

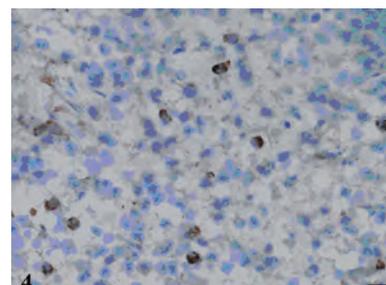
Las placas de Peyer fueron valoradas únicamente en el rorcual común. El número de células marcadas y patrón de intensidad de la reacción con los diferentes anticuerpos fue similar al encontrado en los nódulos linfáticos.

## Discusión

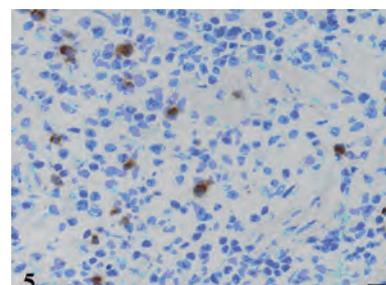
Los anticuerpos policlonales CD3, IgG y lisozima mostraron reacción cruzada en secciones de tejidos, tanto congelados como en formalina, procedentes de delfines moteados y del rorcual común, presentando un patrón de inmunotinción y una distribución celular similar a la descrita en el delfín común (Jaber *et al.*, 2003a), delfín listado (Jaber *et al.*, 2003b), así como en muestras procedentes de tejidos humanos (Rose *et al.*, 1994) y de otras especies (Ramos-Vara *et al.*, 1994). Por lo tanto, estos 3 anticuerpos son adecuados como marcadores de células T (CD3), células B IgG+ (IgG), y monocitos y macrófagos (lisozima) en tejidos fijados con formalina de estas dos especies de cetáceos.

Por otro lado, los anticuerpos monoclonales anti-IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , CD25 humanas y anti-IL-4 e IFN- $\gamma$  bovinos producían una inmunotipificación en muestras procedentes de nódulos linfáticos de cetáceos similar a la obtenida en las especies de origen. Estos resultados sugieren que estos anticuerpos presentan reacción cruzada con las citoquinas de cetáceos y por lo tanto son adecuados para estudios inmunohistoquímicos en tejidos congelados de diferentes especies de cetáceos. Estos resultados son de interés por el reducido número de anticuerpos para citoquinas empleados en cetáceos, que generalmente han sido usados para detectar citoquinas en suero (Cirocco *et al.*, 1997; Funke *et al.*, 2003; Beineke *et al.*, 2004), y la poca información sobre la expresión de citoquinas en tejidos de estas especies. La reacción cruzada de anticuerpos humanos para citoquinas ya había sido referida en otras especies animales, como el cerdo (Salguero *et al.*, 2002; Sánchez-Cordón *et al.*, 2005), ratón (Buendía *et al.*, 2004), perro (Catchpole *et al.*, 2002) y oveja (Rahman *et al.*, 2004).

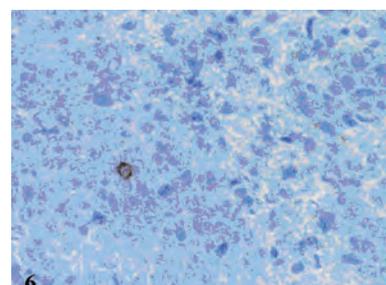
La expresión de citoquinas varió en intensidad y número de células



▲ Figura 4. Delfín moteado. Bazo, IL-8. Inmunorreacción en macrófagos de cordones esplénicos. Método ABC, contratinción con hematoxilina de Mayer. Barra = 20  $\mu$ m.



▲ Figura 5. Delfín moteado. Bazo, TNF- $\alpha$ . Se observa fuerte reacción citoplasmática de algunos macrófagos de cordones esplénicos. Método ABC, contratinción con hematoxilina de Mayer. Barra = 20  $\mu$ m.



▲ Figura 6. Rorcual común, Bazo, CD25. Reactividad citoplasmática en una célula linfóide de cordones esplénicos. Método ABC, contratinción con hematoxilina de Mayer. Barra = 20  $\mu$ m.

marcadas en los distintos órganos valorados. La elevada expresión de IL-4, IL-6, IL-10 en los tejidos estudiados sugiere una respuesta inmunitaria tipo Th2 en todos los animales testados. En contraste, la expresión de CD25 e IFN- $\gamma$  fue muy baja en los delfines, pero elevada en el rorcual común. Similares resultados a los presentados en los delfines han sido observados en vacas parasitadas con

nematodos gastrointestinales (Gasbarre *et al.*, 2001; Claerebout *et al.*, 2005), sin embargo solo uno de los delfines moteados mostró una parasitación severa por *Anisakis* sp. Con toda esta información sería de gran interés llevar a cabo estudios toxicológicos e inmunológicos para comparar la expresión de diferentes citoquinas y los niveles de sustancias contaminantes desde que algunos de éstos como el hexaclorobenceno (HCB) induce marcada reacción de IFN- $\gamma$  (Daniel *et al.*, 2001).

En conclusión, los anticuerpos monoclonales anti-IL-1 $\alpha$ , IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , CD-25 humanas y anti-IL-4 e IFN- $\gamma$  bovinos son adecuados para estudios inmunohistoquímicos en secciones de tejidos fijados por congelación de distintas especies de cetáceos. Esto es de gran interés porque estos anticuerpos podrían ser utilizados para valorar su estado inmunitario, testando la expresión de citoquinas en diversos procesos patológicos, tal como infecciones bacterianas, víricas, parasitarias o aquellos producidos por sustancias tóxicas.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado con fondos procedentes de la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias (Pi 2003/023) y de la Junta de Andalucía (Plan Andaluz de Investigación AGR-0137).

### Bibliografía

- 1.- Beineke, A., Siebert, U., van Elk, N., Baumgartner, W., 2004. Development of a lymphocyte-transformation-assay for peripheral blood lymphocytes of the harbor porpoise and detection of cytokines using the reverse-transcription polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 98, 59-68.
- 2.- Bilrha, H., Roy, R., Moreau, B., Belles-Isles, M., Dewailly, E., Ayotte, P., 2003. In vitro activation of cord blood mononuclear cells and cytokine production in a remote coastal population exposed to organochlorines and methyl mercury. *Environ. Health Perspect.* 111, 1952-1957.
- 3.- Buendia, A. J., Martinez, C. M., Ortega, N., Del Rio, L., Caro, M. R., Gallego, M. C., Sanchez, J., Navarro, J. A., Cuello, F., Salinas, J., 2004. Natural killer (NK) cells play a critical role in the early innate immune response to *Chlamydomphila abortus* infection in mice. *J. Comp. Pathol.* 130, 48-57.
- 4.- Catchpole, B., Gould, S.M., Kellett-Gregory, L.M., Dobson, J.M., 2002. Immunosuppressive cytokines in the regional lymph nodes of a dog suffering from an oral malignant melanoma. *J. Small Anim. Pract.* 43, 464-467.
- 5.- Cirocco, R. E., Bigger, C., Renart, M., Bossart, G., 1997. Cytokine analysis in Atlantic bottlenose dolphins. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 190.
- 6.- Claerebout, E., Vercauteren, I., Geldhof, P., Olbrechts, A., Zarlenga, D.S., Goddeeris, B.M., Vercruyse, J., 2005. Cytokine responses in immunized and non-immunized calves after *Ostertagia ostertagi* infection. *Parasite Immunol.* 27, 325-331.
- 7.- Cullor, J. S., 1995. Cytokines. Soluble factors of the immune responses. In: *Immunology and Immunopathology of Domestic Animals*. Gershwin, L. J., Krakowka, S., Olsen, R. G. (eds). Mosby-Year Book, Inc, St. Louis, Missouri, 2nd, pp. 40-46.
- 8.- Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Suesal, C., Conrard, C., Opelz, G. 2001. Associations of blood levels of PCB, HCHS, and HCB with numbers of lymphocyte subpopulations, in vitro lymphocyte response, plasma cytokine levels, and immunoglobulin autoantibodies. *Environ Health Perspect.* 109, 173-178.
- 9.- Day, M.J. 1996. Expression of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha by macrophages in canine lymph nodes with mineral-associated lymphadenopathy, granulomatous lymphadenitis or reactive hyperplasia. *J Comp Pathol.* 114, 31-42.
- 10.-Dernfalk, J., Waller, K. P., Johannisson, A., 2004. Commercially available antibodies to human tumour necrosis factor-alpha tested for cross-reactivity with ovine and bovine tumour necrosis factor-alpha using flow cytometric assays. *Acta Vet. Scand.* 45, 99-107.
- 11.-Funke, C., King, D. P., McBain, J. F., Adelung, D., Stott, J. L., 2003. Expression and functional characterization of killer whale (*Orcinus orca*) interleukin-6 (IL-6) and development of a competitive immunoassay. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93, 69-79.
- 12.-Gasbarre, L.C., Leighton, E.A., Sonstegard, T. 2001. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol.* 98, 51-64.
- 13.-Itou, T., Shoji, Y., Shiraishi, R., Sugisawa, H., Endo, T., Inoue, Y., Sakai, T., 2002. Priming of dolphin neutrophil respiratory burst by recombinant tumor necrosis factor alpha. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 675-679.
- 14.-Jaber, J. R., Pérez, J., Arbelo, M., Herráez, P., Espinosa de los Monteros, A., Guisado, F., Fernández, T., Fernández, A., 2003a. Immunophenotypic characterization of the hepatic inflammatory cell infiltrates in common dolphins. *J. Comp. Pathol.* 129, 226-230.
- 15.-Jaber, J. R., Fernández, A., Herráez, P., Espinosa de los Monteros, A., Ramírez, G. A., García, P. M., Fernández, T., Arbelo, M., Pérez, J., 2003b. Cross-reactivity of human and bovine antibodies in striped dol-

- phin paraffin wax-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 65-72.
- 16.-Jepson, P.D., Bennett, P.M., Allchin, C. R., Law, R.J., Kuiken, T., Baker, J.R., Rogan, E., Kirkwood, J.K., 1999. Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Sci. Total Environ.* 243-244, 339-348.
- 17.-Jepson, P.D., Bennett, P.M., Deaville, R., Allchin, C.R., Baker, J.R., Law, R.J., 2005. Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 238-248.
- 18.-Levin, M., Morsey, B., Mori, C., Guise, S., 2004. Specific non-coplanar PCB-mediated modulation of bottlenose dolphin and beluga whale phagocytosis upon in vitro exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 67, 1517-1535.
- 19.-Murtaugh, M. P., Baarsch, M. J., Zhou, Y., Scamurra, R. W., Lin, G., 1996. Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 45-55.
- 20.-Pedersen, L.G., Castelruiz, Y., Jacobsen, S., Aasted, B., 2002. Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species. *Vet Immunol Immunopathol.* 88, 111-122.
- 21.-Rahman, A.N., Snibson, K.J., Lee, C.S., Meeusen, E.N., 2004. Effects of implantation and early pregnancy on the expression of cytokines and vascular surfaces molecules in the sheep endometrium. *J. Reprod. Immunol.* 64, 45-58.
- 22.-Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., Lopez, E., Prats, N., Brevik, L., 1994. Reactivity of polyclonal human CD3 antiserum in lymphoid tissues of cattle, sheep, goats, rats and mice. *Am. J. Vet. Res.* 55, 63-66.
- 23.-Rose, D.S., Maddox, P.H., Brown, D.C., 1994. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J. Clin. Pathol.* 47, 1010-1014.
- 24.-Salguero, F.J., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M.J., Sánchez-Cordón, P. J., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C., 2002. Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 11-22.
- 25.-Sánchez-Cordón, P.J., Núñez, A., Salguero, F.J., Pedrera, M., Fernández de Marco, M., Gómez-Villamandos, J.C., 2005. Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: role of macrophages and cytokines. *Vet. Pathol.* 42, 477-488.
- 26.-Scheerlinck, J.P., 1999. Functional and structural comparison of cytokines in different species. *Vet Immunol Immunopathol.* 72, 39-44.
- 27.-Svensson, B.G., Hallberg, T., Nilsson, A., Schutz, A., Hagmar, L., 1994. Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 65, 351-358.