



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA E AMBIENTALE

CURRICULUM: BIOTECNOLOGIE VEGETALI E ANIMALI - CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Barbujani Guido

STUDIO DEL TESSUTO LINFOIDE ASSOCIATO ALL'INTESTINO (GALT) PER APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE IN ACQUICOLTURA DI SPECIE ITTICHE

Settore Scientifico Disciplinare BIO/06

Dottorando

Dott. Bertoni Fabrizio

Tutore

Prof. Abelli Luigi

Anni 2006/2008



University of Ferrara

PhD Course in EVOLUTION AND ENVIRONMENTAL BIOLOGY

CURRICULUM: BIOTECHNOLOGIES VEGETABLES AND ANIMALS– XXI CYCLE

PhD Coordinator: Prof. Barbujani Guido

STUDY OF THE GUT ASSOCIATED–LYMPHOID TISSUE (GALT) FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS IN FISH AQUACULTURE

Scientific and disciplinary area: BIO/06

PhD student

Dr. Bertoni Fabrizio

Tutor

Prof. Abelli Luigi

Years 2006/2008

ABSTRACT

The mucosal surfaces represent a major interface between the organism and the external environment. Although evidence has accumulated for the existence of mucosal immunity mechanisms in fish, as it would be expected for animals living in a pathogen-rich aquatic environment, this field of research is still poorly explored.

The mucosae of fish skin, gills and gut are protected by both humoral and cellular mechanisms (Peleteiro & Richards, 1985; Hart et al., 1988; Rowley et al., 1988; Roberts, 1989). Leucocytes occur in all parts of the teleost digestive system, most extensively in the intestine, where lymphocytes, plasma cells, granulocytes and macrophages are present in and under the epithelium. Although large lymphoid centres are lacking, many lymphoid cells, either scattered or in small groups, were reported to be present in the epithelium and lamina propria (Zapata, 1979; Davina et al., 1980; Temkin & McMillan, 1986; Hart et al., 1988). Various studies indicated that regional differences occur in the organisation of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) at different levels of the digestive tract, possibly reflecting specialised immunological functions. Uptake and transport of antigens have been shown to occur mainly in the second gut segment of carp, *Cyprinus carpio* L. (Rombout et al., 1985, 1986; Rombout & Van den Berg, 1989), and trout, *Oncorhynchus mykiss* (Georgopoulou et al., 1986), where antigens are transported from the lumen to large intraepithelial macrophages, which can exert an antigen-presenting function (Rombout et al., 1985, 1986). These findings demonstrated the high immunological relevance of the fish GALT.

The study of GALT cellular components, their specific location, morphological and functional characteristics is crucial to understand the role of GALT within the whole fish immune system.

The main objective of this thesis was to improve the knowledge about the cell-mediated intestinal immunity in two fish species of great economic importance: the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Special attention has been devoted to cell-mediated cytotoxic response, among defence mechanisms against foreign (allogeneic or xenogeneic) or altered (e.g. virus-infected) cells. In higher vertebrates, cell-mediated cytotoxicity (CMC) is exerted by NK cells or CTLs, respectively, as the cellular parts of the innate or the adaptive immune defence. NK cell killing is triggered by invariant receptors that recognize molecular patterns on infected cell surfaces. CTLs specifically recognize and kill cells that present peptides derived from antigens synthesized intracellularly (e.g. viral proteins) with major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on the cell surface. Recognition of the MHC/peptide complex is mediated by the T cell receptor (TCR). During the last years, MHC class I-restricted effector/target cell recognition systems have been established in some fish species, but the abovementioned mechanisms have been shown in principle but not fully proven. A main problem is that cells performing CMC in fish are still poorly characterized due to the lack of appropriate tools for the specific recognition of lymphocyte populations. Cell-specific markers are indispensable for cell identification, especially of T lymphocyte subpopulations, which seem to have a key role in this type of response. The panel of available monoclonal antibodies (mAb) to fish leucocytes is still very limited: an anti-thymocyte mAb (DLT15) reacting with peripheral T cell populations of sea bass (Scapigliati et al., 1995), a mAb (WCL9) reacting with early T cells of carp (Rombout et al., 1997), a mAb against carp

intestinal T cells (WCL38) (Rombout et al., 1998) and a mAb reacting with a T cell population in channel catfish (Passer et al., 1996). In addition, a mAb (5C6) raised against channel catfish, *Ictalurus punctatus*, non-specific cytotoxic cells (NCC; Ig- lymphoid cells), apparently reacting with NK cells in a variety of vertebrate species (Evans et al., 1988; Evans and Jaso-Friedman, 1992). The existence of anti-T cells appropriate MAbs in carp and sea bass has been a main reason to study here these two fish species. Moreover, homologous sequences of *TcR β* , *CD8 α* , *CD4* and *MHCII- β* , four important genes involved in T cell function, became recently available for sea bass. These sequences were used to perform quantitative RT-PCRs and *in situ* hybridization studies. The results obtained with these molecular techniques, together with those obtained by the use of cell-specific mAbs (FACS analysis and immunohistochemistry), suggested that in sea bass and carp GALT mainly consists of T cells and likely exerts cytotoxic activity (Rombout et al., 1998; Guerra, PhD Tesis 2008). The aim of this thesis was to confirm these hypotheses with functional tests. In fish, allogeneic and xenogeneic cells represent standard model targets of cytotoxic effector cells. Specific and non-specific cytotoxicity assays and different immunisation protocols were developed for the carp and the sea bass using a Epithelioma papulosum cyprini (EPC) carp cell line, a continuous embryonic cell line from European sea bass (DLEC) and a human erythroleukemic cell line (K562) as target cells, and the release of lactate dehydrogenase (LDH) as read out system (Cytotox 96[®] kit PROMEGA). Non-specific cytotoxicity against EPC was not observed in non-immune specimens, while carp immunised i.p. with EPC clearly showed specific killing by effector cells [purified lymphocytes (90-95% by FACS) by discontinuous Percoll gradient, density 1,02-1,06] present in kidney, spleen and blood, but not in the gut. These results agree with a previous study (Companjen et al., 2006). Otherwise, non-specific cytotoxicity against K562 cells (xenogeneic) was observed in non-immune specimens, ascribed to purified lymphocytes from head kidney, spleen and PBL (negligible in lymphocytes from the intestine). Immunisation with K562 evoked a net increase in cytotoxic responses against the K562 cells, compared with PBS treated controls. The effect was registered in systemic organs (head kidney and spleen), but especially in the intestine. The anal immunisation protocol with lysed cells was the most effective in increasing the CMC against xenogeneic target cells of both systemic and mucosal organs. Taken together, these data can lead to various conclusions: 1) carp apparently lacks non-specific allogeneic cytotoxicity, 2) non-specific xenogeneic cytotoxicity is only systemic (e.g. in head kidney, spleen and PBL), 3) specific cytotoxicity can be induced in kidney and spleen cells following i.p. immunisation with allogeneic cells (EPC), 4) cell-mediated cytotoxic response against xenogeneic cells (K562) can be increased in the intestine and systemic organs by immunisation (anal or i.p.). In the sea bass, GALT immunohistochemical analysis preceded the study of CMC. For this study, a polyclonal antibody (A0452 DAKO) raised in rabbit against human CD3 ϵ was used. This pAb has been shown to react with blood leucocytes in snapper, *Pagrus auratus* (Cook et al., 2001), and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Park et al. 2005). This antibody also detects CD3 ϵ in various mammals (Jones et al., 1993) and the amphibian *Xenopus laevis* (Göbel et al. 2000), illustrating the conservation of the epitope. The demonstration of reactivity of this antibody towards CD3 ϵ in snapper and flounder has identified a candidate antibody for the detection of T cells in other teleost species. This antibody showed cross-reactivity with lymphocytes of sea bass. The localization and distribution of CD3⁺ cells in the sea bass intestinal mucosa are here shown for the first time. The comparison between the data obtained with the mAb DLT15 and those obtained with the anti-CD3 ϵ pAb showed that the majority of sea bass intra-epithelial lymphocytes (IEL) is a CD3 ϵ ⁻ population. Otherwise, most IEL of the carp

seem to be CD3ε⁺. Further studies are needed to assess the putative occurrence of T cell subpopulations in the intestinal mucosa, and to explain the observed species differences. In sea bass, lymphocytes isolated from head kidney, spleen and gut exhibited non-specific cytotoxicity against DLEC (allogeneic cell line). The highest activity was observed in intestinal lymphocytes, although significant responses were also seen in spleen and head kidney lymphocytes.

Also the non-specific cytotoxicity against K562 (xenogeneic cell line) was significant in lymphocytes purified from head kidney, spleen, blood, gut and gills. These results suggest a wide occurrence of xeno-reactive cells in sea bass organs, that in carp were localized only in systemic compartments. Following anal immunisation with K562, cell-mediated cytotoxicity against xenogeneic targets decreased significantly both in systemic and mucosal organs, compared with controls. Therefore it can be hypothesised that this decrease may be due to induction of tolerance, but further studies are needed to test this hypothesis. Such information would improve the efficacy of oral vaccination in sea bass and optimize the antigen delivery to the appropriate cellular targets.

A very promising procedure to improve the mucosal immune defence mechanisms is the dietary administration of probiotics, that appeared as an effective tool for the control of pathogen outbreaks in fish farms. Many authors have reported increased disease resistance in fish fed bacteria-supplemented diets (Bly et al., 1997; Robertson et al., 2000; Spanggaard et al., 2001; Raida et al., 2003). In this thesis we investigated the effects of the oral administration of heat-inactivated *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* and *Bacillus subtilis*, individually or combined, on immune responses, both systemically and locally in the gut, in a further marine teleost species, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.).

In a first experiment, seabream (65 g) were fed for 3 weeks different diets supplemented with 1×10^7 CFU g⁻¹ *Lactobacillus*, 1×10^7 CFU g⁻¹ *Bacillus*, or 0.5×10^7 CFU g⁻¹ *Lactobacillus* plus 0.5×10^7 CFU g⁻¹ *Bacillus*. Controls were fed non-supplemented diet. Six fish per group were sampled at the end of the trial and some humoral and cellular systemic innate immune parameters were evaluated. Feeding the mixture of the two killed bacteria species significantly increased natural complement, serum peroxidase and phagocytic activities compared with controls. In a second experiment, juvenile seabream (13 g) were fed for 3 weeks the same experimental diets and total serum IgM and numbers of gut IgM⁺ cells and acidophilic granulocytes were evaluated. All these parameters were significantly higher in the multispecies probiotic group compared to monospecies and control fed groups.

The results of the present study indicated that oral administration of heat-inactivated probiotics has stimulatory effects, both local and systemic, on the immune system of the gilthead seabream. The multispecies formulation was more effective than any of the single-bacteria experimental diets. These results suggest that, as in humans, the appropriate design of multispecies probiotics, including inactivated cells, can have synergistic positive effects on fish health.

INDICE

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

INTRODUZIONE	pag 1
Il sistema immunitario dei Teleostei	pag 1
▪ Elementi cellulari del sistema immunitario	pag 2
▪ Immunità innata ed immunità adattativa	pag 7
Citotossicità cellulo-mediata (CMC) nei pesci	pag 14
▪ La CMC specifica	pag 14
▪ La CMC non specifica	pag 15
▪ Le citochine coinvolte nella CMC	pag 16
▪ L'identificazione e caratterizzazione delle cellule coinvolte nella CMC	pag 16
▪ La CMC in vitro	pag 17
Morfo-fisiologia del sistema immunitario dei Teleostei	pag 20
Gli organi linfoidei	pag 20
▪ Rene cefalico	pag 20
▪ Milza	pag 21
▪ Timo	pag 22
▪ L'educazione timica e il fenomeno dell'apoptosi	pag 23
▪ Tessuto linfatico e associato alle mucose (MALT)	pag 26
▪ Anatomia del tratto digerente dei Teleostei in relazione al tipo di alimentazione	pag 31
Misure preventive contro le patologie infettive in acquacoltura	pag 32
▪ L'utilizzo di ceppi batterici probiotici in specie ittiche d'allevamento	pag 32
Biologia delle specie	pag 34
▪ Spigola	pag 34
▪ Orata	pag 35
▪ Carpa	pag 36

MATERIALI E METODI **pag 38**Caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie dell'intestino della spigola pag 38

- Antiseri pag 39
- Istologia pag 39
- Immunoistochimica pag 40
- Analisi d'immagine pag 40
- Analisi statistica pag 41

Sperimentazione citotossicità cellulo-mediata pag 42

- Disegno sperimentale pag 42
- Isolamento dei linfociti e valutazione della CMC pag 44
- Le cellule bersaglio pag 45
- PROMEGA CYTO TOX 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay pag 46
- Allestimento piastra ELISA per il test di citotossicità pag 47
- Calcolo dei risultati pag 48

Sperimentazione probiotici pag 49

- Disegno sperimentale pag 49
- Antisiero pag 50

Allestimento stabulario dipartimentale pag 51

RISULTATI **pag 52**Caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie nell'intestino della spigola pag 52Sperimentazione citotossicità cellulo-mediata pag 60Sperimentazione probiotici pag 69

DISCUSSIONE **pag 73**

BIBLIOGRAFIA **pag 85**

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

I pesci ossei utilizzati in acquicoltura sono un soggetto indispensabile per la ricerca in campo biologico, in quanto costituiscono un modello animale utile per studi che riguardano problematiche di biotecnologia, salute umana e ambiente.

Inoltre, lo studio del sistema immunitario delle specie di allevamento è uno dei principali obiettivi di indagine sperimentale, per ovvie ricadute fondamentali sulla prevenzione e il trattamento delle patologie e la tutela della salute delle specie allevate.

Negli ultimi decenni l'itticoltura ha avuto un incremento notevole su scala mondiale e, per far fronte a questa nuova richiesta, è pratica comune negli impianti allevare gli animali in condizioni di sovraffollamento. Esse, unitamente a fattori di stress quali temperature inadeguate, sbalzi di salinità, scarsa qualità dell'acqua, possono facilitare la diffusione rapida di patologie infettive, in particolare durante gli stadi larvali dei pesci.

A differenza di altri vertebrati, molte specie di pesci schiudono infatti ad uno stadio vitale precoce e, di conseguenza, già in questa fase devono difendersi contro una grande varietà di microrganismi che vivono nell'ambiente acquatico. Un sistema immunitario efficiente è un prerequisito fondamentale per il mantenimento della salute, sia in ambiente selvatico che di allevamento.

Il diffondersi di patologie batteriche e virali, in determinate condizioni ambientali, può portare alla distruzione di interi stock ittici. È stato ampiamente documentato che in acquicoltura i fenomeni di stress derivanti da parametri biotici e abiotici rendono le specie allevate più sensibili al diffondersi di infezioni. Per limitare l'incidenza di queste patologie negli allevamenti vengono applicati di routine trattamenti chemioterapici, di vaccinazione o di immunostimolazione.

Per quanto riguarda i chemioterapici, gli interventi sono molto costosi e potenzialmente dannosi, poiché responsabili della selezione di ceppi batterici antibiotico-resistenti. La vaccinazione orale e l'uso di immunostimolanti somministrati per immersione risultano gli approcci maggiormente sostenibili, grazie alle modalità di somministrazione poco stressanti per gli animali. Gli immunostimolanti (quali β -glucani, prodotti di origine batterica, derivati fungini e algali) in forma di integratori dietetici possono migliorare i meccanismi di difesa innati, consentendo un aumento della resistenza ai patogeni e riducendo drasticamente il tasso di mortalità, in particolar modo nelle larve e nelle post-larve, prima che la risposta immunitaria di tipo adattativo (antigene-dipendente) sia matura ed efficace.

Per evitare il ricorso all'uso di sostanze inibenti, poco compatibili con i principi di sostenibilità ambientale, nuovi spazi di ricerca e sperimentazione si sono aperti di recente allo sviluppo di formulazioni dietetiche che si basano su principi di ecologia microbica, con l'obiettivo di potenziare i meccanismi endogeni di protezione e/o, nel migliore dei casi, sostituire o integrare l'impiego di antibiotici e chemioterapici.

Nel solco di queste ricerche, parte del presente progetto di dottorato di ricerca è stato rivolto alla valutazione dell'effetto immunostimolante di una preparazione multispecie di batteri probiotici nell'orata (*Sparus aurata* L.),

specie ittica di primaria rilevanza economica nell'itticoltura Mediterranea. Particolare riguardo è stato dedicato agli effetti sulle popolazioni cellulari del tessuto linfatico associato all'intestino (GALT).

Per migliorare la progettazione e selezione di vaccini e immunostimolanti, che siano efficaci in stadi precoci di sviluppo, è necessario ampliare le conoscenze sullo sviluppo del sistema immunitario dei pesci ossei Teleostei. Innanzitutto, è fondamentale definire la cronologia di apparizione delle differenti popolazioni leucocitarie, per stabilire a quale stadio di sviluppo il sistema immunitario sia maturo, funzionale e possa rispondere positivamente ai vaccini.

Attualmente, domande basilari quali l'identificazione dei primi siti linfo-ematopoietici, l'origine delle cellule B e T e l'acquisizione delle piene capacità immuni non hanno ancora avuto una risposta definitiva (Zapata et al., 2006). A questo si aggiunge il fatto che nei pesci non sono ancora state caratterizzate con esattezza tutte le sottopopolazioni che compongono il sistema immunitario e non si è ancora stabilito con precisione come queste intervengano nei meccanismi di difesa contro i patogeni. Inoltre, i dati di letteratura hanno segnalato notevoli differenze nell'organizzazione e funzione delle componenti immunitarie fra specie diverse.

Il presente progetto di dottorato di ricerca si è principalmente rivolto ad ampliare le conoscenze relative al sistema immunitario della spigola = branzino (*Dicentrarchus labrax* L.), la specie marina più allevata nelle itticolture del bacino Mediterraneo, e della carpa (*Cyprinus carpio* L.), specie d'acqua dolce prodotta nel mondo per più di tre milioni di tonnellate l'anno. In entrambe le specie, particolare interesse ha rivestito lo studio delle popolazioni linfocitarie residenti nell'intestino (GALT), delle quali si è valutata attraverso test funzionali l'attività citotossica cellulo-mediata, potenzialmente rivolta contro cellule estranee o infettate da virus.

Una migliore conoscenza dei meccanismi cellulari e molecolari della citotossicità risulta indispensabile per comprendere ed ottimizzare le tecniche di immunostimolazione e vaccinazione nei pesci.

INTRODUZIONE

IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

I vertebrati hanno sviluppato durante il corso dell'evoluzione un sistema di difesa contro i patogeni straordinariamente complesso, articolato, rapido ed efficace. I Teleostei rappresentano il gruppo di vertebrati più numeroso presente sul nostro pianeta. Questa classe zoologica antichissima comprende circa 30000 specie diverse e risulta difficile trovare delle caratteristiche comuni a tutto il gruppo, anche nell'ambito del sistema immunitario.

I pesci ossei Teleostei hanno subito una lunghissima selezione evolutiva che ha consentito loro di colonizzare tutti gli ambienti acquatici presenti sul pianeta dando luogo ad una straordinaria radiazione adattativa. I pesci possono vivere sia nelle gelide acque dei poli sia nei caldi mari tropicali, nelle salinità elevatissime dei bacini interni come nei torrenti montani, nelle pozze fangose delle savane africane come a profondità notevolissime nelle fosse oceaniche. Le diverse specie presentano dimensioni, comportamenti ed inclinazioni sociali molto diverse tra loro.

Abitudini ed ambienti di vita così diversi espongono i pesci ad un'enorme varietà di parassiti e patogeni che esercitano una notevole pressione selettiva sul loro sistema immunitario. Quest'ultimo, grazie alla sua flessibilità, si è specializzato a tal punto da diventare uno dei probabili motivi del grande successo evolutivo dei pesci. Negli ultimi decenni, gli studi sull'immunobiologia della fauna ittica hanno subito un forte impulso. Si è compresa l'importanza che riveste il sistema immunitario di questi vertebrati dal punto di vista filogenetico e il crescente interesse economico per l'allevamento di alcune specie ha reso l'immunopatologia un settore di ricerca prioritario.

Il compito principale del sistema immunitario è quello di difendere l'organismo dall'attacco di patogeni che vengono riconosciuti grazie a particolari recettori antigenici presenti sui leucociti. Gli antigeni (Ag), detti anche immunogeni, possono essere molecole proteiche, carboidratiche o anche cellule eterologhe. Gli antigeni che suscitano una reazione immune devono essere comunque sempre elementi estranei all'ospite. Un sistema immunitario efficiente deve essere in grado di riconoscere e di non attaccare le proteine proprie (self), preservando in tal modo l'integrità dell'organismo. Al pari della risposta contro gli antigeni estranei, anche l'autotolleranza è un processo fondamentale per la sopravvivenza di un individuo, che si definisce nel periodo perinatale o subito dopo la nascita. Il compito di innescare le risposte immunitarie e, contemporaneamente, di discernere tra elementi eterologhi ed autologhi è svolto principalmente dai linfociti T e B. Per quanto riguarda i linfociti T, il riconoscimento delle proteine "self" avviene nel timo, dove i timociti immaturi entrano in contatto con gli antigeni self. In quest'organo i timociti subiscono una forte selezione e solo quelli non autoreattivi proliferano e si differenziano in cellule mature migrando poi verso le rispettive destinazioni finali. Allo stesso modo, anche i linfociti B acquisiscono la specifica competenza immunitaria prima ancora di venire a contatto con l'antigene. Sulla loro superficie compaiono dei recettori che fungono da sito di riconoscimento e processazione per l'antigene. Negli organi linfoidi primari, contrariamente a quanto accade in quelli periferici, la proliferazione dei linfociti risulta antigene-indipendente.

La “teoria istruttiva” rappresenta il primo tentativo per la spiegazione della specificità dei linfociti verso i determinati immunogenici. Secondo quest’ipotesi, ormai superata, i linfociti sarebbero multipotenti riguardo alla capacità di produrre gli anticorpi. Il contatto con l’antigene servirebbe da stampo istruendo il linfocita a produrre l’anticorpo (Ab) specifico corrispondente.

Molto più accreditata e confermata dalle evidenze sperimentali è la “teoria della selezione clonale”, elaborata da Sir Macfarlane Burnet, che sostiene che ogni cellula immunocompetente è in grado di rispondere ad un solo antigene o a pochi correlati tra loro. La cellula acquisisce questa capacità durante l’ontogenesi, prima ancora dell’incontro con l’immunogeno. La determinazione è irreversibile ed il linfocita esprime il recettore sulla superficie di membrana, senza però produrre l’anticorpo. L’antigene, penetrato nell’ospite, “seleziona” il linfocita B specifico stimolandolo e inducendone la mitosi. Si ottengono così numerosi cloni del linfocita che produrranno grandi quantità dell’anticorpo specifico. Tale sequenza d’eventi prende il nome di amplificazione delle cellule competenti specifiche o espansione clonale. Non tutti i linfociti B che riconoscono l’anticorpo proliferano e raggiungono lo stadio di maturazione finale di plasmacellula secernente anticorpi; alcuni di essi diventeranno cellule memoria. Il sistema immunitario dei Teleostei, così come quello degli altri vertebrati, risulta composto da varie tipologie di cellule linfoidi. Queste sono localizzate nei tessuti linfoidi stessi o formano aggregati cellulari che si associano alle mucose (MALT) (Roitt et al., 1993). Le diverse tipologie cellulari sono rappresentate da cellule citotossiche non specifiche e Nk-like (Evans et al., 1992; Hogan et al., 1996), monociti e macrofagi (Meseguer et al., 1991; Hardie et al., 1994; Sveinbjornsson e Seljelid, 1994), granulociti (Ainsworth, 1992; Hine, 1992; Lamas e Ellis, 1994; Veburg-van Kemenade et al., 1995), cellule B e plasmacellule (Irwin e Kaattari, 1986; Miller et al., 1994), cellule T (Lin et al., 1992; Miller et al., 1994) e trombociti (Esteban et al., 1992; Rombout et al., 1996).

Le popolazioni leucocitarie mostrano nei pesci, come negli altri vertebrati, fenomeni di cooperazione immunitaria. Le cellule della linea B sono responsabili della produzione di anticorpi, mentre i linfociti T, assieme a granulociti e macrofagi, sono responsabili della citotossicità (Rijkers et al., 1980; Lamers et al., 1985; Ratcliffe e Millar, 1988). Il timo, il rene cefalico, la milza ed il tessuto linfoide associato alle mucose rappresentano gli organi linfoidi che costituiscono il sistema immunitario dei Teleostei.

Oltre ai leucociti ed agli organi linfoidi, anche alcune proteine sono parte integrante delle difese immunitarie dei vertebrati. Tra le più importanti troviamo le citochine, le proteine del complemento, le proteine del complesso maggiore d’istocompatibilità (MHC), le immunoglobuline (Ig) ed i recettori delle cellule T (TCR).

Elementi cellulari del sistema immunitario

Gli elementi cellulari del sistema immunitario sono chiamati, nel loro insieme, leucociti o globuli bianchi; sono dotati di movimento ameboide e sono in grado di attraversare le pareti dei vasi sanguigni che ne consentono il trasporto verso il sito d’infezione. I linfociti s’infiltrano nel tessuto connettivo e negli epiteli e costituiscono il parenchima degli organi linfoidi. L’uso di tecniche specifiche, quali la separazione cellulare e lo sviluppo di cloni di sottopopolazioni linfocitarie distinte, ha permesso una caratterizzazione molecolare e funzionale di questi elementi nei Teleostei facendo emergere somiglianze ed analogie tra i leucociti dei mammiferi e quelli dei

pesci. Alcuni autori hanno proposto un'omologia funzionale tra le cellule citotossiche non-specifiche (NCC) osservate nei pesci e le natural killer (NK) dei mammiferi (Evans et al., 1984; Miller et al., 1998). Altri studi hanno confermato che la stimolazione *in vitro* dei linfociti dei pesci con agenti mitogeni, produce effetti molto simili a quelli ottenuti sui linfociti dei vertebrati superiori. Gli agenti stimolanti la mitosi utilizzati in questi esperimenti sono stati i lipo-polisaccaridi (LPS) per i linfociti B e la concanavalina-A per i linfociti T della trota (*Salmo gairdneri*). In entrambe le classi animali queste sostanze inducono la trasformazione blastica dei linfociti (aumento del volume cellulare, accumulo di ribosomi nel citoplasma ed attivazione della sintesi proteica). Questi dati confermerebbero l'esistenza di una forte analogia tra le popolazioni leucocitarie nelle due classi (Etlinger et al., 1976). Le cellule citotossiche non-specifiche (NCC) sono state analizzate dal punto di vista funzionale e sono risultate capaci di uccidere le cellule bersaglio inducendone la lisi con un meccanismo molto simile a quello delle cellule citotossiche non-specifiche dei Mammiferi (Meseguer et al., 1996). Sia le natural killer (NK) di questi ultimi che le NCC dei pesci sono attivate da linfocine (Ruiz et al., 2001), necessitano del contatto diretto con la cellula bersaglio (Evans and Cooper, 1990) e, come conseguenza di questa interazione, presentano cambiamenti ultrastrutturali nell'area di contatto (Mulero et al., 1994). Una differenza tra le NK e le NCC è emersa da studi sulla cinetica della lisi di cellule tumorali condotti nell'orata, dai quali si evince che la velocità d'azione delle NCC è inferiore a quella con cui agiscono le NK-like (Cuesta et al., 2002). Studi *in vitro* dell'attività citotossica dei leucociti derivati dal rene cefalico, dal sangue e dalla cavità peritoneale della spigola (*Dicentrarchus labrax L.*) contro cellule tumorali di Mammifero, hanno permesso di separare le cellule che attuano una risposta citotossica non-specifica in due sottopopolazioni: cellule monocita-simile e cellule linfocita-simile (Mulero et al., 1994). L'analisi ultrastrutturale ha evidenziato che le cellule monocita-simile presentano un'ampia area di contatto con la cellula target, hanno un nucleo ovale e pochi granuli nel citoplasma, mentre le cellule linfocita-simile stabiliscono pochi contatti con le cellule target, possiedono un largo nucleo e occasionali granuli citoplasmatici. Simili popolazioni di leucociti, che mostrano una citotossicità non-specifica contro cellule tumorali di Mammifero, sono state trovate in altri Teleostei, come l'orata (*Sparus aurata*) e la carpa (*Cyprinus carpio*) (Meseguer et al., 1994; Mulero et al., 1994; Nakayasu et al., 2005). Queste scoperte hanno suggerito che la risposta citotossica non-specifica nella spigola sia mediata da alcune popolazioni di leucociti che differiscono tra loro per i meccanismi di riconoscimento del target e di citolisi. Nei Teleostei tutte le NCC individuate fino ad oggi hanno mostrato la presenza sulla loro superficie di un recettore NCCRP-1 che media il contatto tra la cellula citotossica ed il suo bersaglio (Jaso-Friedmann et al., 1997). Le cellule citotossiche non-specifiche sono state studiate in maniera approfondita nel pesce gatto, dove sono state identificate usando l'anticorpo monoclonale mAb 5C6, specifico per il recettore NCCRP-1 (Evans et al., 1999). La caratterizzazione molecolare di questo recettore nell'orata ha rivelato una certa eterogeneità tra le NCC, mostrando che differenti tipologie di leucociti (linfociti, monociti/macrofagi e granulociti acidofili) possono contribuire ad una risposta citotossica non-specifica (Cuesta et al., 2005). Una capacità citotossica non-specifica è stata suggerita per i granulociti neutrofili della trota (Sasaki et al., 2002). Molti studi hanno ribadito l'importanza della fagocitosi nell'ambito dei meccanismi di difesa immunitaria nei vertebrati. È stato anche dimostrato come, in circostanze particolari, i granulociti neutrofili dei pesci possiedano attività fagocitica (MacArthur e Fletcher, 1985; O'Neill, 1985). Molti leucociti sono in grado di compiere la fagocitosi ma spesso quest'evento necessita dell'intervento di fattori solubili. È noto in letteratura scientifica, che nei pesci come nei

Mammiferi i monociti circolanti sono i precursori dei macrofagi che si trovano nel connettivo lasso. In caso di processi infiammatori in corso, i monociti migrano nel punto d'infezione attraversando le pareti dei vasi (diapedesi) per differenziarsi poi in macrofagi, non distinguibili da quelli già presenti. I loro meccanismi d'azione e spostamenti sono coadiuvati da varie sostanze tra le quali ricordiamo le opsonine e le chinine. Le prime sono anticorpi capaci di facilitare la fagocitosi dell'antigene, mentre le seconde, sono proteine che favoriscono la dilatazione dei vasi sanguigni aumentandone la permeabilità. Utilizzando l'anticorpo monoclonale specifico (Mab) WCL15 si è riusciti a stabilire la distribuzione dei macrofagi durante lo sviluppo della carpa (*Cyprinus carpio*, L.). La presenza dei primi macrofagi si riscontra nel rene cefalico e nel sacco vitellino e, in seguito, nel timo e nell'intestino. Solamente dopo la seconda settimana post-fecondazione (PF) è possibile trovare macrofagi anche nella milza. Durante le successive 6-8 settimane si assiste ad un aumento del numero di macrofagi in tutti i tessuti linfoidei ed alla loro localizzazione, nel timo, sul confine cortico-medullare e, nel rene cefalico, nella polpa bianca (Romano et al., 1998). Insieme ai monociti-macrofagi, anche i granulociti (anche chiamati leucociti polimorfonucleati) partecipano al processo infiammatorio che, nei pesci, rappresenta la risposta immunitaria dell'individuo a parassitosi, infezioni batteriche, virali o micotiche (Roberts, 1978, van Muiswinkel e Jagt, 1984). Sembra probabile che i granulociti eosinofili dei Teleostei rappresentino gli equivalenti funzionali delle "mast cells" dei vertebrati superiori. Questa popolazione leucocitaria è riscontrabile in numero molto basso nel circolo sanguigno, ma la sua presenza è molto più massiccia nelle zone maggiormente esposte ad infezioni, quali branchie ed intestino. Il rene cefalico dei Teleostei pare essere l'organo più importante per la granulopoiesi, come confermato negli studi effettuati da Meseguer et al. nel 1990 e nel 1995. Tra i markers cellulari per i monociti/macrofagi dei pesci, è stato descritto un anticorpo monoclonale (mAb 45) che reagisce in maniera specifica con un peptide di 48 kDa dei monociti di trota (Köller et al., 2001). L'antigene riconosciuto da questo mAb è espresso sulla membrana di leucociti larghi e non-granulati di trota che hanno mostato la tipica morfologia dei monociti. Non è stata rilevata nessuna reazione del mAb 45 con i granulociti, linfociti e trombociti. Più recentemente, per meglio comprendere il ruolo dei macrofagi nelle risposte immunitarie, è stato selezionato un anticorpo policlonale contro il recettore del fattore stimolante-colonie dei macrofagi (Mcsfr) nell'orata (*Sparus aurata* L.) (Mulero et al., 2008). Sono disponibili sia anticorpi monoclonali contro i granulociti neutrofili di trota (Hamdani et al., 1998) che antisieri per i granulociti del merluzzo atlantico (Rønneseth et al., 2007). Di particolare interesse è la recente scoperta che le cellule B dei pesci possono compiere fagocitosi, attribuendo un nuovo ruolo ai linfociti nell'immunità innata (Li et al., 2006). I linfociti B nei Teleostei sono deputati alla produzione e secrezione di anticorpi o immunoglobuline (Ig) multimeriche, omologhe alle Ig di tipo M dei mammiferi. Studi molecolari e biochimici hanno infatti evidenziato che le Ig dei Teleostei appartengono a una sola classe (Ig-M simile) con un singolo tipo di catena pesante (μ) (Warr, 1995). L'aumento dell'affinità anticorpale è molto limitato se paragonato a quello dei Mammiferi (Arkoosh e Kaattari 1991; Kaattari, 1992) ed è stata dimostrata l'assenza, rispetto ai Mammiferi, del caratteristico switch delle Ig a più basso peso molecolare (Kaattari, 1992). Recentemente sono stati individuati nei pesci altri isotipi di IgM, denominati IgD (Wilson et al., 1997; Stenvik et al., 2000), IgT nella trota arcobaleno (Hansen et al., 2005) e IgZ nello zebrafish (Danilova et al., 2005). Le IgM, sono considerate la sola classe di immunoglobuline universalmente presenti in tutti i Vertebrati mandibolati (Bengtén et al., 2000; Scapigliati et al., 1997). Condritti e Dipnoi che sono molto antichi dal punto di vista evolutivo, producono,

salvo qualche eccezione, tipi di IgM in forma pentamerica. Negli Actinopterigi invece, la forma è solitamente tetramerica, ma non mancano esempi di pesci che presentano immunoglobuline monomeriche o dimeriche (Litman, 1976; Warr et al., 1982). Le somiglianze tra le IgM dei mammiferi e quelle omologhe dei Teleostei sono elevate anche a livello genico. Le regioni del DNA codificanti per le catene proteiche pesanti (H) e leggere (L) che compongono le immunoglobuline sono state identificate anche nei pesci. In entrambe le classi animali questi geni mostrano riarrangiamenti ed esclusione allelica. Anche la sequenza genica codificante per la catena pesante delle IgD (chiamata regione δ), è presente nel genoma codificante per le Ig prodotte da alcuni Teleostei. Fino a pochi anni fa, invece, la produzione delle IgD era considerata una caratteristica peculiare di primati e roditori, (Wilson et al., 1997; Miller et al., 1998; Hordvik et al., 1999).

Le immunoglobuline prodotte dai linfociti B sono divise in varie classi, biochimicamente sono classificate come glicoproteine ed alcune di queste sono anticorpi circolanti (o umorali) in grado di reagire con gli antigeni. Le Ig sono molecole simmetriche dalla caratteristica forma ad "Y". Le due metà si associano tramite interazioni deboli e ponti disolfuro tra i residui di cisteina. Ciascuna catena proteica leggera (L) e pesante (H) possiede una zona costante (C), in cui la sequenza amminoacidica è uguale per tutte le Ig, ed una variabile (V). Sono proprio le regioni V_L e V_H che, costituendo le estremità libere delle braccia nella forma ad Y, conferiscono la specificità antigenica alle immunoglobuline. Le variazioni delle sequenze geniche che codificano per le innumerevoli regioni V delle Ig originano dalla sostituzione di un singolo amminoacido (mutazione puntiforme). Il differenziamento e la maturazione dei linfociti B della spigola, e di molti altri Teleostei, avvengono nel rene cefalico. Quest'organo rappresenta nei pesci, l'equivalente della "borsa di Fabrizio" negli uccelli. Si è giunti a tali conclusioni, grazie ai risultati dei numerosi esperimenti condotti utilizzando i Mabs specifici disponibili. Sempre per quanto riguarda il differenziamento dei linfociti B, ricordiamo che è di fondamentale importanza l'età ed il peso dell'individuo di cui fanno parte (Razquin et al., 1990; dos Santos et al., 2000). Le plasmacellule rappresentano lo stadio di differenziazione finale dei linfociti B indotto dall'antigene. Costituiscono, come vedremo in seguito, anche la memoria immunologica di un organismo. Le plasmacellule si differenziano morfologicamente dai linfociti non stimolati per un volume maggiore, possiedono un apparato di Golgi più sviluppato e presentano, al loro interno, un cospicuo numero di mitocondri e poliribosomi. Tutte queste peculiarità denotano un'intensa attività di sintesi proteica che, nel caso delle plasmacellule, è finalizzata alla produzione d'anticorpi (Monesi, 1982). Analogamente ai mammiferi, anche le cellule B del pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) sono dotate di un recettore specifico denominato "B cells receptor" (BCR). Questo recettore è situato sulla membrana dei linfociti ed è in grado di legare antigeni o molecole specifiche. È proprio l'interazione di queste componenti che, attivando le vie intracellulari mediate dalle protein-chinasi, induce la cellula alla proliferazione, alla produzione delle Ig o all'apoptosi (MacDougal et al., 1999). È interessante sapere che è stata dimostrata la presenza delle Ig e di molecole Ig simili sia nelle uova che negli avannotti di alcune specie di pesci e l'uptake delle Ig è stato studiato in dettaglio nelle uova dell'orata e della spigola (Picchiatti et al., 2002; 2004; 2006).

Le cellule T sono le principali effettrici della difesa immunitaria mediata da cellule che si esplica mediante il riconoscimento e la risposta al peptide associato all'antigene mediante le molecole di *MHC* di classe I e II. Differentemente dalle cellule B, le cellule T non rispondono ad antigeni solubili, acidi nucleici, polisaccaridi e lipidi (Babbitt et al., 1985). La prima evidenza dell'esistenza delle cellule T nei Teleostei risale agli anni '70,

con la dimostrazione *in vitro* della proliferazione indotta da mitogeni (Etlinger et al., 1976; Sizemore et al., 1984) e da antigeni non-self (Marsden et al., 1996), e dalle risposte nelle reazioni dei linfociti mescolati (Miller et al., 1985). Al momento, la spigola è la sola specie marina per la quale sia disponibile un anticorpo specifico per i timociti e le cellule T periferiche (DLT15). E' stato prodotto anche un anticorpo monoclonale contro le cellule T mucosali della carpa (WCL38). L'anticorpo DLT15 è capace di riconoscere l'antigene sia in cellule vive che in sezioni di tessuto e l'analisi al citofluorimetro ha permesso per la prima volta di valutare il contenuto delle cellule T in un pesce riconoscendo il 3% di leucociti periferici del sangue (PBL), il 9% dei linfociti della milza, il 4% di quelli del rene cefalico, il 75% dei timociti, il 51% dei leucociti associati al GALT e il 60% dei leucociti del tessuto linfoide associato alle branchie (Romano et al., 1997). Un importante uso di DLT15 è stato la purificazione di cellule immunoreattive dagli organi della spigola, principalmente dal sangue e dal tessuto linfoide associato all'intestino. Queste cellule sono state poi impiegate per il clonaggio del recettore delle cellule T per l'antigene (*TcR β*) (Scapigliati et al., 2000). L'anticorpo monoclonale WCL38 è stato prodotto in seguito ad immunizzazione di topi con molecole di membrana isolate da cellule linfoidi intraepiteliali dell'intestino della carpa. Analisi al citofluorimetro hanno mostrato che il WCL38 reagisce con il 50-70% delle cellule linfoidi isolate da intestino, branchie e pelle, con meno del 6% delle cellule isolate da timo, rene cefalico e milza, e con un numero trascurabile di PBL. Si è ipotizzato che i linfociti WCL38⁺ fossero cellule T, poiché non reagiscono con altri anticorpi specifici per le cellule B, con i macrofagi e con le cellule citotossiche non specifiche (Rombout et al., 1998).

Negli ultimi anni la conoscenza dei meccanismi di difesa immunitaria nei Teleostei si è approfondita grazie all'aumento dell'interesse nella scoperta e nel clonaggio di geni codificanti peptidi immunoregolatori omologhi a quelli conosciuti nei Mammiferi. Le catene α e β del *TcR* sono state clonate in diverse specie di pesci (Partula et al., 1995; Hordvik et al., 1996; De Guerra and Charlemagne, 1997; Wilson et al., 1998; Miracle et al., 2001; Wermenstam and Pilstrom, 2001; Hordvik et al., 2004; Imai et al., 2005). Nella spigola è stata identificata sia la catena β (Scapigliati et al., 2000) che quella α (accession number: AY831387), e il *TcR β* è stato clonato nell'orata (*Sparus aurata*) (Randelli et al., 2007). Nel Teleosteo *Paralichthys olivaceus* sono stati isolati ed identificati i cDNA dei geni codificanti le quattro catene del *TcR* (α , β , γ , δ) (Nam et al., 2000, 2003) e recentemente è stata clonata la catena γ del *TcR* nella carpa (*Cyprinus carpio*) (Shang et al., 2007). Più recenti sono i dati che riportano la caratterizzazione del complesso *TcR/CD3* in alcune specie di Teleostei. Nei Mammiferi questo complesso è composto dall'eterodimero del *TcR α/β* o dal *TcR γ/δ* in associazione alle catene del *CD3* (γ , δ , ϵ , ζ) e gioca un ruolo importante nel riconoscimento, nella maturazione e nell'attivazione delle cellule T (Ashwell, 1990). Attualmente è nota la sequenza delle catene γ/δ del *CD3* nel fugu (Araki et al., 2005), e nella carpa (Shang et al., 2007), la sequenza della catena ϵ in *Paralichthys olivaceus* (Park et al., 2005) e nel fugu (Araki et al., 2005). Lo studio *in vitro* delle risposte proliferative ed anticorpali contro vari antigeni timo-dipendenti ha fornito l'evidenza che molecole *MHC*-simili governano la presentazione dell'antigene e che c'è una restrizione *MHC* delle risposte immunitarie dei Teleostei (Vallejo et al., 1992). Ad oggi, le molecole di *MHC* I e II sono state identificate in diverse specie di Teleostei come la spigola (*Dicentrarchus labrax*) (Buonocore et al., 2007), la spigola striata (*Morone saxatilis*) (Walker et al., 1994), l'orata rossa (*Chrysophrys major*) (Chen et al., 2006), vari ciclidi (Figueroa et al., 2000), alcuni salmonidi

(Miller et al., 1996; Ristow et al., 1999; Stet et al., 2002) e differenti ciprinidi (Stet et al., 1998; Sultman et al., 1993; Dixon et al., 1996; Graser et al., 1996; Van Erp et al., 1996; Grimholt et al., 2003). L'ipotesi che nei Teleostei esistano sottopopolazioni di cellule T è supportata da studi di attività biologica (Fischer et al., 2006), e da dati di biologia molecolare e cellulare. I co-recettori *CD4* e *CD8* sono stati clonati in trota, fugu, carpa, salmone, orata e spigola (Hansen et al., 2000; Suetake et al., 2004; Samamoto et al., 2005; Moore et al., 2005; Randelli et al., 2006; Buonocore et al., 2006, 2008). Recentemente, nella trota sono stati identificati due differenti geni che assomigliano al *CD4* dei Mammiferi (Laing et al., 2006). Il primo codifica per quattro domini Ig, mentre l'altro (*CD4REL*) codifica per due domini Ig. È stata documentata la produzione, nel fugu, di un antisiero specifico per il $CD8\alpha$ mediante l'utilizzo della tecnica di immunizzazione a DNA (Araki et al., 2007). Una parte del lavoro compiuto in questa tesi è stato mirato all'identificazione di popolazioni di leucociti $CD3\epsilon^+$ nell'intestino e nei principali organi linfoidi della spigola.

Immunità innata ed immunità adattativa

Le diversità strutturali e funzionali delle cellule che compongono il sistema immunitario dei Teleostei riflettono i diversi ruoli che tali cellule svolgono all'interno dei meccanismi di difesa contro i patogeni. Utilizzando le peculiarità dei leucociti, un organismo è in grado di dar luogo a due tipi d'immunità, una detta innata o non specifica ed un'altra chiamata adattativa o specifica. I pesci sono il gruppo di vertebrati più antico, ma ciò nonostante i loro meccanismi immunitari hanno rivelato numerose analogie con quelli dei mammiferi. Nei Teleostei, infatti, come nei vertebrati superiori, l'iniezione degli antigeni provoca risposte umorali e cellulari con le caratteristiche tipiche di specificità e memoria, rendendo plausibile l'impiego delle tecniche di vaccinazione negli allevamenti ittici (van Muiswinkel e Wigertjes, 1997).

Le differenze osservate tra i meccanismi immunitari dei mammiferi e dei pesci si possono sintetizzare in una minor efficacia della risposta secondaria (immunità specifica) nei Teleostei e nell'assenza, in questa classe di vertebrati, delle IgG. Tale lacuna sembra essere compensata, almeno in parte, dalla forte adattabilità e flessibilità strutturale dell'immunoglobulina più importante prodotta dai pesci, chiamata IgM. Sempre nella stessa pubblicazione (Watts et al., 2001) si è evidenziata la forte dipendenza dalla temperatura ambientale di tutti i meccanismi immunitari, in particolare della risposta specifica T-dipendente. Le basse temperature infatti, inibiscono i linfociti T poiché la composizione lipidica delle loro membrane plasmatiche non mostra adattabilità a tale fattore. Entrambi i tipi di risposta immunitaria, sia quella specifica sia l'innata, prevedono come prima fase il riconoscimento del patogeno o della sostanza estranea eventualmente penetrati nell'organismo. Il passo successivo è una reazione adatta ad eliminare i "targets" dei leucociti che agiscono sempre in stretta collaborazione.

Uno studi di Dixon e Stet (2001) ha dimostrato che la risposta immunitaria innata, oltre al ruolo di contrasto delle infezioni da patogeni (risposta primaria), svolge anche un'importante funzione nell'iniziare e dirigere la risposta immunitaria adattativa. La risposta primaria è definita immunità non specifica perché questa reazione si scatena molto rapidamente, subito dopo l'ingresso ed il riconoscimento del patogeno che è riuscito a superare le barriere muco-epiteliali, e non comporta né specificità né memoria immunologica (Lamers, 1985; Manning,

1994). Essa coinvolge vari meccanismi di difesa, quali la fagocitosi e l'attività delle NCC, le reazioni infiammatorie nonché la collaborazione di sostanze solubili come il lisozima, la transferrina, la proteina C reattiva (CRP), le lecitine, il complemento, le opsonine e gli anticorpi. Per definizione il riconoscimento del non-self da parte del sistema immunitario innato è mediato da un pattern di proteine/recettori di riconoscimento codificate dalla linea germinale che identificano patterns molecolari caratteristici dei microbi. Queste molecole includono polisaccaridi, lipopolisaccaridi (LPS), peptidoglicani, DNA batterico, RNA virale a doppio filamento ed altre molecole collettivamente chiamate patterns molecolari associati a patogeni (PAMP) che sono altamente conservate e generalmente non espresse negli organismi pluricellulari (Medzhitov et al., 2002; Elward et al., 2003). Lo sbarramento difensivo iniziale è capace di prevenire gli attacchi dei patogeni ed include le strutture più a contatto con l'ambiente esterno, quali la pelle e gli epiteli di rivestimento di branchie ed intestino. Il mantenimento della loro integrità è fondamentale sia per i processi osmoregolatori, sia per non compromettere la capacità di costituire barriere chimico-fisiche contro i parassiti e i microrganismi. Gli epiteli di rivestimento dei pesci, sono ricoperti da uno strato di muco che, secreto da cellule mucipare, ha come proprietà principale quella di fungere da antisettico (Pickering e Richards, 1980; van Muiswinkel e Jagt, 1984). Per confermare che la pelle dei pesci non è solo una barriera fisica citiamo i risultati degli studi effettuati da Sigel et al. nel 1986, che con i loro esperimenti sono riusciti ad ottenere da una linea di cellule epiteliali di carpa una sostanza simile all'interleuchina-1 (IL-1), in grado di stimolare la proliferazione dei linfociti del sangue periferico del pesce gatto.

I macrofagi nei Teleostei rappresentano le cellule fagocitarie principali che sono in grado di inglobare e distruggere sia i materiali inerti estranei all'organismo che gli antigeni. L'eliminazione di questi corpi estranei dal circolo ematico dei pesci avviene tipicamente in due fasi: durante la prima si assiste alla scomparsa di oltre il 90% del materiale particolato in circa 30 minuti; la seconda fase, invece, è molto più lenta ma più fine in quanto, sempre attraverso i macrofagi, riesce ad eliminare completamente i corpuscoli intrusi nel sangue (Avtalion, 1981; MacArtur e Fletcher, 1985). I meccanismi che consentono la fagocitosi sono simili in tutti i vertebrati ed anche nei Teleostei possiamo riconoscere la caratteristica sequenza di quattro stadi: riconoscimento dell'antigene o sostanza estranea, attacco, ingestione e digestione. Il processo consuma ossigeno e, di conseguenza, si assiste anche alla formazione di specie reattive a questo gas (ROIs) (Chung e Secombes, 1988).

L'infiammazione è un processo che colpisce il tessuto connettivo per rispondere a stimoli di natura fisica, chimica e batterica. A seguito di tali stimoli la sostanza fondamentale del connettivo depolimerizza perdendo viscosità. I capillari della zona colpita si dilatano e aumenta l'apporto di sangue, di conseguenza, si innalza la temperatura conferendo al tessuto infiammato il caratteristico rossore. La dilatazione dei capillari ne aumenta anche la permeabilità delle pareti causando la fuoriuscita di plasma e, quindi, edema. Il processo infiammatorio è iniziato dai granulociti e, solo successivamente, si può riscontrare un forte accumulo di monociti e macrofagi. Questi ultimi accorrono nella zona dove è penetrato il patogeno e proliferano aumentando considerevolmente di numero. In un'altra fase, ancora più tardiva, si ha la sostituzione delle parti necrotiche con tessuto fibroso.

È possibile rilevare, anche in questo caso, la forte somiglianza che esiste tra i meccanismi di risposta alle infiammazioni acute sviluppati dai pesci ossei e dai mammiferi (Finn e Nielsen, 1971; van Muiswinkel e Jagt, 1984). Le NCC non sono dotate di attività fagocitica e sono cellule non aderenti e di piccole dimensioni. Il loro intervento richiede il contatto diretto ed un'elevata superficie di contatto tra le membrane cellulari per espletare

la propria funzione di eliminazione della cellula bersaglio (Evans e Cooper, 1990). Una fondamentale classe di molecole coinvolte nel sistema immunitario è quella delle citochine che svolgono un ruolo centrale nei sistemi di difesa sia innato che acquisito. L'elevato grado di conservazione delle loro proprietà tra i vari gruppi animali indica come tali proteine siano fattori altamente conservati nel corso dell'evoluzione. Nei Mammiferi le cellule fagocitiche rispondono ad antigeni microbici rilevati nel sito d'infezione con la secrezione di citochine, tra le quali il TNF- α , l'interleuchina-1 (IL-1), l'IL-6, ed una chemochina CXC, e l'IL-8. Il TNF- α , l'IL-1 e l'IL-6 mostrano ridondanti e pleiotropici effetti che prevedono l'induzione della sintesi delle proteine della fase acuta (APP), l'attivazione dell'endotelio vascolare ed il potenziamento dell'extravasazione cellulare, la stimolazione dei macrofagi, la proliferazione dei fibroblasti e l'attivazione delle cellule B e T.

In questi ultimi anni il numero dei geni che codificano per le citochine dei Teleostei è notevolmente aumentato, nonostante siano disponibili, al momento, pochi dati sulla loro attività biologica (Scapigliati et al., 2006) e siano presenti anticorpi solo per due citochine: l'IL-1 e il TNF.

Le chemochine sono una famiglia di piccole proteine inducibili pro-infiammatorie che dirigono la migrazione e l'attivazione di specifici tipi cellulari mediante l'interazione con i loro recettori. Le diverse classi di chemochine vengono divise in base alla disposizione lungo la sequenza dei residui di cisteina. Nella classe delle chemochine CXC (o chemochine α), il cui prototipo è l'IL-8, le prime due cisteine del tratto N-terminale sono separate da un singolo aminoacido, mentre non è presente nessun residuo intermedio tra le due cisteine nelle chemochine della classe CC (o chemochine β). I recettori delle chemochine appartengono ad una classe ben nota di proteine transmembrana, definite anche "serpentine" o recettori multipasso, che presentano sette domini transmembrana e sono accoppiati a proteine G-intracellulari. Ci sono evidenze che mostrano che vi è una considerevole ridondanza nelle interazioni chemochina-recettore: la maggior parte dei recettori può legare più di una chemochina e viceversa. Nei pesci sono state clonate alcune chemochine e loro recettori: queste includono omologhi delle chemochine CC nella trota (CK-1) (Dixon et al., 1998), e nella carpa (Fijiki et al., 2000), il recettore delle chemochine CC, CCR7 (Daniels et al., 1999) ed i recettori delle chemochine CXC, IL-8 (Nam et al., 2000), CXCR4 (Daniels et al., 1999) e CXCR1/CXCR2 (Fijiki et al., 2000) nella carpa.

Il complemento è una parte essenziale dell'immunità innata ed è responsabile della mediazione delle risposte infiammatorie, l'opsonizzazione delle particelle e la lisi della membrana cellulare. L'attivazione del complemento può avvenire secondo tre vie: la via classica (CCP), la via alternativa (ACP), e la via delle lectine (LCP). I Teleostei possiedono un efficiente sistema del complemento (Sunyer and Tort, 1994) capace di lisare, in alcune specie di pesci, una varietà di eritrociti (di pecora, di coniglio, di cane e di capra) attraverso la via alternativa (Sunyer e Tort, 1995). Una delle proprietà più interessanti del complemento dei Teleostei è che alcuni suoi componenti (C3 e fattore B) sono presenti in isoforme multiple, prodotte da geni differenti, e che queste isoforme differiscono nella struttura e nella funzione aumentando, così, il numero dei potenziali patogeni che possono riconoscere (Zarkardis et al., 2001; Nakao et al., 2000).

Un altro parametro umorale importante del sistema innato è la transferrina che agisce come un inibitore di crescita dei batteri legando il ferro libero nel sangue, essenziale per la vita dei batteri (Langston et al., 2001). La transferrina è anche una proteina della fase acuta, richiesta durante le risposte infiammatorie per rimuovere il ferro dai tessuti danneggiati (Bayne et al., 2001), ed un attivatore dei macrofagi nei pesci (Stafford et al., 2001).

L'interferone è un altro inibitore di crescita che induce l'espressione del gene *Mx* e di altre proteine antivirali (Ellis, 2001; Leong et al., 1998). L'attività interferone-simile è stata dimostrata in alcuni pesci e recentemente i geni sia per l'interferone che per l'*Mx* sono stati clonati in diverse specie (Randelli et al., 2008).

Vari enzimi litici, che possono agire singolarmente o a cascata, sono stati individuati nei pesci e fungono da importanti elementi di difesa specialmente contro i batteri. Il lisozima, un importante fattore nella difesa immunitaria sia negli Invertebrati che nei Vertebrati, è un battericida che agisce idrolizzando il legame β -glicosidico dei peptidoglicani della parete cellulare dei batteri, sia Gram-positivi che Gram-negativi, e provocandone la lisi (Medzhitov et al., 1998). Il lisozima attiva il sistema del complemento ed i fagociti (Grinde, 1989), ed è presente nel muco, nei tessuti linfoidi, nel plasma e negli altri fluidi del corpo della maggior parte delle specie di pesci (Grinde, 1989; Yousif et al., 1994).

Le lectine sono glicoproteine importanti per la neutralizzazione delle componenti batteriche. Esse partecipano all'agglutinazione dei microrganismi ed alla precipitazione di sostanze solubili (Van Muiswinkel, 1995). Le lectine di tipo-C presentano una specificità di legame per differenti carboidrati come il mannosio, l'*N*-acetilglucosamina o il fucosio in presenza di ioni calcio (Ca^{2+}). L'interazione di tali proteine con i carboidrati determina l'opsonizzazione, la fagocitosi e l'attivazione del sistema del complemento (Arason, 1996). Le più studiate sono le lectine leganti il mannosio (MBL) che mostrano specificità per mannosio, *N*-acetilglucosamina, fucosio e glucosio. Nei Mammiferi le MBL mediano la via delle lectine del sistema del complemento in associazione con una serina proteasi (MASP) (Magor et al., 2001). Diverse tipologie di lectine sono state isolate dal siero di diverse specie di pesci; alcune mostrano affinità per i carboidrati, struttura molecolare e funzione simile a quelle dei Mammiferi (Ottinger et al., 1999; Nagai et al., 2000), mentre altre presentano una differente specificità nel legame con i carboidrati e sequenze eterologhe (Fock et al., 2000; Honda et al., 2000).

Le pentraxine (la proteina C-reattiva, CRP, e la proteina amiloide del siero, SAP) sono lectine presenti nei fluidi del corpo sia di Invertebrati che di Vertebrati e sono comunemente associate con la risposta della fase acuta (Bayne et al., 2001; Wu et al., 2003). Come mostrato dall'aumento significativo del loro livello nel siero a seguito traumi o infezioni (risposta della fase acuta), le pentraxine partecipano alla difesa di tipo innato (PRR) (Cook et al., 2003) attivando la via del complemento (Jiang et al., 1991; De Haas et al., 2000) e giocando un ruolo nel riconoscimento e nell'eliminazione delle cellule apoptotiche (Nauta et al., 2003). La CRP lega le molecole di fosforilcolina presenti nella parete cellulare dei batteri in presenza di ioni calcio, mentre la SAP mostra affinità per le molecole di fosforiletanolamina e, inoltre, si lega allo strato lipopolisaccaridico (LPS) dei Gram-negativi (Lund et al., 1999). Alcune specie di pesci sembrano avere o la pentraxina CRP (come il merluzzo e il pesce gatto) o la SAP (come il salmone e l'halibut), mentre altre specie (come la trota) hanno entrambe le pentraxine, come i Vertebrati più evoluti (Lund et al., 1998; White et al., 1981).

La risposta specifica o adattativa si attiva in quei casi in cui gli sbarramenti del sistema immunitario non sono riusciti a prevenire l'invasione dei patogeni. Il tipo di immunità che ha luogo in questa situazione risulta specifica per l'agente che l'ha provocata. L'immunità adattativa comporta memoria immunologica con conseguente aumento d'efficacia e diminuzione del tempo di latenza necessario ad attivare la risposta ad ogni successivo incontro con lo stesso antigene. Il meccanismo con il quale si esplica l'immunità specifica può essere

di due tipi: mediato da cellule e umorale. Le cellule responsabili dell'immunità umorale sono i linfociti B e T helper (Th), produttori di citochine, molecole di tipo ormonale necessarie per la crescita e la differenziazione. L'immunità cellulare consiste invece di cellule che presentano l'antigene (APC, quali macrofagi, cellule dendritiche, cellule endoteliali, fagociti mononucleati) e di linfociti Th produttori di citochine per l'attivazione dei macrofagi e di linfociti T citotossici (Tc), i quali, come suggerisce il loro nome, uccidono le cellule tumorali, infettate da virus o da altri patogeni endocellulari. L'attivazione del processo immunitario umorale è definito dall'entrata in circolo dei primi anticorpi specifici e, pertanto, tra il contatto con l'antigene e l'inizio della risposta specifica, intercorrerà un lasso di tempo relativamente lungo (periodo di latenza). I monociti-macrofagi provvedono, durante questo periodo, a processare l'antigene e, in associazione con l'MHC di classe II, a presentarlo ai linfociti. Gli anticorpi prodotti durante la risposta immunitaria di tipo umorale si legano agli antigeni specifici tramite una complementarità sterica, anche solo parziale. L'intervento dell'anticorpo provoca la modificazione della struttura superficiale dell'immunogeno rendendo più facile la sua fagocitosi da parte di macrofagi e granulociti. In altri casi, invece, la componente immunitaria si lega a siti specifici sulla cellula estranea inattivandola. La disattivazione dell'antigene può avvenire in vari modi che dipendono anche dalla sua stessa natura poiché, da questo punto di vista, l'anticorpo è pluripotente. Nel caso in cui l'immunogeno sia solubile, il legame con l'anticorpo ne provoca la precipitazione sotto forma di un aggregato insolubile. Nel caso in cui, invece, il patogeno si presenti in forma di materiale particolato si assiste alla sua agglutinazione o alla citolisi quando gli intrusi sono elementi cellulari. Per svolgere la loro attività anche i linfociti T necessitano della cooperazione con i monociti. Quest'ultima popolazione leucocitaria, probabilmente, si attiva in seguito alla fagocitosi o alla pinocitosi dell'antigene stimolante che viene quindi processato all'interno della cellula. Il monocita, così attivato, si trasforma in macrofago e riesprime l'antigene sulla superficie cellulare. La fase successiva è la presentazione dell'antigene processato alle cellule T e quest'evento sembra essere essenziale, sia nei pesci sia nei vertebrati superiori, per dare inizio ad una risposta immunitaria specifica (Manning, 1994; Veburg-van Kemenade et al., 1994). Nei Teleostei i macrofagi che hanno già processato l'Ag, sono anche in grado di secernere l'IL-1, una citochina che nei mammiferi è essenziale per promuovere la risposta dei Th attivati. Nella spigola è stata anche accertata l'espressione dei geni che codificano IL-1 β in leucociti provenienti dal sangue, dal rene cefalico, dalla milza e dal fegato. Nelle frazioni cellulari derivanti dal timo e dall'intestino, invece, non è stata rilevata la presenza d'IL-1 β (Scapigliati et al., 2001). Studi ed analisi approfondite sono riusciti ad identificare la sequenza genica di "introni" ed "esoni" che codificano per l'IL-1 β utilizzando cellule provenienti dal rene cefalico della spigola. Confrontando questa sequenza con quelle dei mammiferi e di altre specie ittiche sono emerse notevoli differenze ed il gene codificante in spigola si è rivelato molto più corto. La sequenza nucleotidica codificante l'interleuchina nei mammiferi, infatti, ha una lunghezza di 6.5-7.0 kb, mentre quella della spigola solo di 2.7 kb. Le analisi "Southern blot" suggeriscono, inoltre, la presenza di una sola copia del gene per l'IL-1 β nel genoma della spigola (Buonocore et al., 2003). È stato possibile clonare il gene codificante per questo peptide in questa specie ed includerlo in un vettore d'espressione. Il plasmide così ottenuto è stato trasformato in *Escherichia coli* e la proteina ricombinante sintetizzata dal batterio è stata purificata. Si è appurato, inoltre, che IL-1 β ricombinante è in grado di indurre l'espressione del gene codificante per questo tipo d'interleuchina nella spigola. Questi esperimenti, oltre a confermare l'estrema importanza che riveste l'IL-1 β nella regolazione delle risposte immunitarie, suggeriscono un utilizzo della proteina ricombinante

come coadiuvante nelle vaccinazioni dei pesci in impianti d'acquacoltura (Buonocore et al., 2003a). Le citochine dimostrano di rivestire un ruolo molto importante nell'attivazione delle cellule T, anche nel pesce gatto. Questo dato conferma una forte conservazione dei processi che scatenano la risposta dei linfociti in tutti i vertebrati, nonostante le notevoli distanze filogenetiche (Park et al., 2002). La risposta dei Th consiste nella produzione d'alcune sostanze, tra le quali la più importante è l'interleuchina-2 (IL-2). Questi fattori solubili sono in grado di regolare la proliferazione ed il differenziamento delle cellule B in plasmacellule che producono e secernono anticorpi. La collaborazione tra cellule T e B per la produzione d'anticorpi, come risposta alla somministrazione d'immunogeni timo-dipendenti e timo-indipendenti, è stata dimostrata con esperimenti *in vitro* (Miller e Clem, 1984; Miller et al., 1985; Clem et al., 1991; Valejo et al., 1992). Anche le linfochine prodotte dai linfociti T contribuiscono ad attivare le cellule B e queste ultime, entrando in attiva proliferazione, si differenziano o in plasmacellule o in cellule B memoria. Le plasmacellule producono e liberano gli anticorpi specifici per un determinato antigene. Tali anticorpi entrano in circolo e, legandosi selettivamente ai determinanti antigenici contro i quali sono stati prodotti, li rendono inattivi formando il complesso antigene-anticorpo. Le cellule memoria, invece, rimangono quiescenti conservando però, i recettori degli anticorpi specifici sulla superficie cellulare. In questo modo si viene a costituire una memoria immunologica e queste cellule saranno capaci di generare una risposta più rapida e più efficace nel caso di un successivo contatto con l'antigene specifico (risposta secondaria). Si assiste anche ad un incremento del numero di plasmacellule coinvolte nella risposta immunitaria secondaria, ma l'aumento d'affinità anticorpale dei pesci ossei è molto limitato se paragonato con quello dei mammiferi (Arkoosh e Kaattari, 1991; Kaattari, 1992). Da esperimenti condotti sulla trota (Chiller et al., 1969) e sulla carpa (Rijkers et al., 1980a), è stato possibile evincere altre importanti informazioni riguardanti il funzionamento del sistema immunitario e tra questi che la cinetica della risposta umorale risulta influenzata da vari fattori, come la temperatura ambientale, l'età dei pesci e il tipo, la quantità e i modi di somministrazione dell'antigene. Fluttuazioni stagionali nella produzione d'anticorpi sono osservabili anche nel Teleosteo marino ed ovoviviparo *Sebastiscus marmoratus*. Gli esemplari sono stati immunizzati con iniezioni intraperitoneali di eritrociti di pecora (SRBC), nella misura di 5 µl/g di peso corporeo, e mantenuti in vasche di acqua marina corrente ad una temperatura costante di 23°C. Le successive analisi hanno rivelato che il livello degli anticorpi prodotti era più elevato negli individui immunizzati in estate rispetto a quelli inoculati nel periodo invernale. La reattività umorale di questi pesci ha dimostrato di dipendere anche dallo stato fisiologico e dal sesso del soggetto immunizzato. Nei maschi, in effetti, la produzione d'anticorpi ha seguito un andamento stagionale, mentre tra le femmine quelle sessualmente mature hanno secreto una minor quantità di proteine immunitarie rispetto alle più giovani. Nel corso dello stesso studio è stato anche pesato il timo degli individui sottoposti all'esperimento. Tale organo nelle femmine con minor reattività verso SRBC è risultato meno pesante, con sintomi d'involuzione e si è osservata una drastica riduzione del numero dei linfociti sia nella corteccia sia nella medulla. I pesci sottoposti ad un regime di fotoperiodo lungo, comunque, hanno mostrato un leggero incremento della produzione anticorpale. I risultati, confermano che la stagione e lo stadio di maturazione sessuale dell'individuo influenzano la risposta immunitaria umorale ed anche lo stesso tessuto linfoide (Nakanishi, 1986a). Esaminando i risultati ottenuti dagli esperimenti di dos Santos et al. (2001) anche la spigola ha mostrato di essere sensibile a tali parametri. La risposta alla somministrazione diretta di *Photobacterium damsela* sulle branchie di individui a diversi stadi di sviluppo è stata di un forte accumulo di cellule secernenti anticorpi (ASC) negli organi

respiratori. Le ASC, pur essendo sempre localizzate nella regione più esposta, hanno mostrato delle notevoli variazioni nel loro numero correlate all'età e, quindi, alla taglia del soggetto. Questo esperimento ha dimostrato anche l'importanza che le branchie assumono nei Teleostei nei meccanismi della risposta immunitaria specifica.

LA CITOTOSSICITÀ CELLULO-MEDIATA (CMC) NEI PESCI

I leucociti dei pesci sono in grado di attaccare e distruggere cellule estranee o infettate da virus mediante l'attività citotossica cellulo-mediata (CMC). Questa capacità è stata documentata in numerose specie di Teleostei, tuttavia, le cellule in possesso di CMC nei pesci sono di difficile caratterizzazione per la mancanza di specifici marcatori molecolari. Per questo motivo la maggior parte dei dati sulla citotossicità cellulo-mediata nei pesci proviene da evidenze di tipo funzionale. Negli ultimi anni sono sempre più numerose le sequenze omologhe di molecole di rilevanza immunologica, così da poter dimostrare la loro presenza almeno a livello d'espressione genica. Tuttavia, rimane ancora da dimostrare se le proteine che presentano sequenze geniche omologhe a quelle dei mammiferi abbiano la stessa funzione nei pesci. La CMC è stata studiata in numerose specie di pesci, in particolare nella carpa, nel pesce gatto e nella trota, utilizzando cellule di origine allogenica o xenogenica come bersaglio. Grande rilevanza dal punto di vista fisiologico è rappresentata dalla CMC contro cellule infette di natura isogenica, che rappresenta un modello sperimentale estremamente utile per studiare i meccanismi cellulari di difesa dell'organismo contro i virus. La CMC rientra nella risposta immunitaria di tipo adattativo e richiede l'espressione di alcune molecole chiave sui linfociti che agiscono come effettori e sulle cellule bersaglio. Tra queste troviamo il recettore delle cellule T (TCR), il suo co-recettore (CD8) e il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I. Per molti anni la mancanza di compatibilità MHC di classe I tra cellule effettrici e target ha reso impossibile la creazione di saggi specifici per valutare la CMC nei pesci. Tali test di citotossicità tra cellule effettrici e bersaglio, combinati con il metodo dell'immunizzazione a DNA, sembrano essere, ad oggi, dei validi strumenti per l'indagine della risposta immunitaria contro singole proteine virali.

La CMC specifica

I linfociti T citotossici (Tc) sono responsabili della citotossicità cellulo-mediata specifica. Nei mammiferi le cellule infettate da virus espongono sulla loro superficie peptidi virali legati alle molecole dell'MHC di classe I che, in questo modo, vengono riconosciuti dai linfociti T TCR⁺ CD8⁺ (Bot et al., 1998, Pamer e Cresswell, 1998, Van Endert, 1999, Weeks et al., 1999). Il successo del legame che si viene formare fra il TCR e l'MHC di classe I e la risultante attivazione della risposta citotossica sono strettamente legate alla compatibilità del TCR sia con l'MHC I che con il peptide. Per questo motivo tale processo viene definito MHC I-restricted (Doherty e Zinkernagel, 1975). La scoperta di sequenze omologhe a quelle dei mammiferi nei pesci per MHC I (Hashimoto et al., 1999), TCR nella trota arcobaleno (Partula et al., 1995, 1996, De Guerra e Charlemagne, 1997), nel salmone atlantico (Hordvik et al., 1996, 2004), nel pesce gatto (Wilson et al., 1998), nella spigola (Scapigliati et al., 2000), nel merluzzo atlantico (Wermentam e Pilstrom, 2001), nel pufferfish (Fisher et al., 2002), nel damselfish (Kamper e McKinney, 2002), nella passera giapponese (Nam et al., 2003) e del co-recettore CD8 del TCR in trota arcobaleno (Hansen e Strassburger, 2000) e nella passera giapponese (GenBank:AB082957, AB082958) suggeriscono un possibile parallelismo nella modalità di presentazione dell'antigene tra mammiferi e pesci. In aggiunta, nella trota e nella carpa è stata documentata la scoperta di un gene omologo a quello per la $\beta 2m$ (Shum et al., 1996, Rodrigues et al., 1998) che codifica per una molecola coinvolta nella complessazione e stabilizzazione intracellulare dell'MHC I. Inoltre, sono stati sequenziati dei geni coinvolti nell'internalizzazione del segnale proveniente dall'MHC I come proteine a basso peso molecolare (LMP); in medaka (Namikawa-

Yamada et al., 1997) e zebrafish (Takami et al., 1997) e trasportatori associati all'antigene processato (TAP) nel salmone atlantico (Grimholt, 1997), nello zebrafish (Takami et al., 1997) e nella trota (Hansen et al., 1999). Durante il processo di riconoscimento antigenico il TCR viene integrato nel complesso CD3/TCR, necessario per la corretta trasduzione intracellulare del segnale. Il CD3 nei mammiferi può essere composto da due eterodimeri, ϵ/δ e γ/ϵ , e un omodimero, ζ . Omologhi del CD3 sono stati individuati anche nei pesci. La situazione risulta simile a quella riscontrata in altri vertebrati meno evoluti, dove non si ha la duplicazione $\gamma-\delta$ tipica dei mammiferi ed c'è un solo gene con omologia intermedia a queste due componenti del CD3 (Park et al., 2001, Guselnikov et al., 2003) in aggiunta alla componente CD3 ϵ (Alabyev et al., 2000). Anticorpi rivolti contro il CD3 ϵ di mammifero hanno mostrato una cross-reattività con i leucociti del sangue periferico (PBL) dello snapper (*Pagrus auratus*) marcandone approssimativamente il 20% (Cook et al., 2001), e sequenze omologhe del CD ζ (anche chiamato TCR ζ) sono state riportate per il fugu (Guselnikov et al., del 2003). Tutte le catene CD3 descritte nei pesci possiedono gli ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Gli ITAM vengono inclusi in una ampia gamma di molecole responsabili dell'attivazione della fosforilazione durante la trasduzione del segnale. Il TCR e le molecole ad esso collegate sono conosciute non solamente perché implicate nel riconoscimento degli antigeni durante la risposta immunitaria, ma anche perché molecole chiave nell'educazione e maturazione dei timociti nel timo. La maggior parte dei linfociti T sistemici nei mammiferi esprime o il corecettore CD4 o il CD8; il primo rappresenta il marcatore caratteristico delle cellule T helper (Th), il secondo di quelle T citotossiche (Tc). Le Th sono responsabili dell'attivazione delle Tc. L'esistenza delle cellule Th nei pesci non è ancora stata ben confermata, anche se sequenze nucleotidiche omologhe a quelle del CD4 dei vertebrati più evoluti è stata documentata in alcune specie di pesci (Suetake et al., 2004). L'MHC I, TCR e CD8 risultano già espresse durante gli stadi larvali suggerendo come i pesci per esprimere una CMC specifica possano essere vaccinati ancora molto precocemente. Questo sembra essere confermato anche dal fatto che larve di trota già a 14 giorni dopo la schiusa risultano capaci di rigettare allotrapianti di pelle, processo che implica l'infiltrazione dei linfociti (Tartner e Manning, 1983).

La CMC non-specifica

Nei mammiferi, le reazioni di CMC non-specifiche sono eseguite principalmente dalle cellule NK. Nonostante le cellule citotossiche non specifiche (CNC) dei pesci risultino diverse morfologicamente dai grandi linfociti granulari dei mammiferi (LGLs), si ritiene che possano essere il loro equivalente funzionale (Evans e Jaso-Friedmann, 1992). Durante la ricerca di possibili marcatori per le NCC è stata scoperta una molecola simile alla vimentina (Jaso-Friedmann e Leary, 1993). Solo più tardi è stata individuata una proteina espressa sulla superficie di membrana, denominata proteina 1 del recettore delle NCC (NCCRP-1, Jaso-Friedmann e Leary, 1997). Un gene tipo NCCRP-1 è stato clonato anche nel tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Ishimoto et al., 2004) e nell'orata (Cuesta et al., 2008). A livello genico, è stato sequenziato il probabile fattore NKEF (NK cell enhancing factor) nella trota arcobaleno (Zhang et al., 2001) e nella carpa comune (Shin et al., 2001). Solo di recente sono state scoperte, nei ciclidi, le sequenze codificanti il gruppo V delle lectine di tipo C, omologhe a quelle della famiglia NKG2/CD94 dei recettori delle cellule NK dei mammiferi (Sato et al., 2003, Kikuno et al., 2004). Nei mammiferi, i recettori NKG2 stimolano contemporaneamente l'attivazione di più recettori delle NK

(Ho et al., 2002). Non sono stati ancora ben documentati nei pesci altri geni omologhi per i recettori delle cellule NK dei vertebrati superiori, come il recettore (R) III Fc γ (CD16), il CD56, il CD158 (KIR) o il CD161c (NK1.1). Nei mammiferi Fc γ RIII è una molecola chiave nella risposta CMC anticorpo-dipendente (ADCC) rivolta contro cellule bersaglio di natura allogenica. Il Fc γ RIII lega il frammento cristallizzabile (Fc) delle IgG alloreattive che opsonizzano le cellule allogeniche inducendo la risposta citotossica anticorpo dipendente (ADCC, Sun, 2003). I dati funzionali ottenuti sui mammiferi suggeriscono l'esistenza di un FcR anche per le IgM (Fc μ R; Rabinowich et al., 1996). Nel pesce gatto un Fc μ R sembra essere espresso sulla superficie di membrana di cellule citotossiche alloreattive (Shen et al 2003).

Le citochine coinvolte nella CMC

Le più importanti citochine coinvolte nell'attivazione delle cellule citotossiche dei mammiferi sono: l'interleuchina (IL) -2, IL-6, IL-12 e gli interferoni. I T helper nei mammiferi vengono attivati dalle cellule fagocitiche presentanti l'antigene (APC) e dai linfociti B che presentano l'antigene complessato con l'MHC di classe II al TCR ed al suo co-recettore CD4. Come conseguenza dell'attivazione, i Th rilasciano IL-2 che, a sua volta, stimola i Tc CD8⁺ e i LGL (Alloche et al., 1990). Anche se non sono ancora disponibili validi strumenti per l'individuazione dell'IL-2 nei pesci, prove funzionali della presenza di IL-2 sono state fornite nella trota iridea (Blohm et al., 2003). La prima prova decisiva dell'esistenza del gene dell'IL-2 in un pesce osseo è stato pubblicato per il fugu (Bird et al., 2005). L'IL-6 viene prodotta in risposta a stimolazione dai monociti, dai fibroblasti e dalle cellule endoteliali, ma anche dai macrofagi e dai linfociti T e B (Taga e Kishimoto, 1997). In presenza di IL-2, l'IL-6 induce la differenziazione sia dei linfociti T maturi che immaturi in linfociti Tc (Smyth et al., 1990). L'IL6 omologa a quella di mammifero è stata recentemente clonata nel tigre puffer (GenBank AB178902, Bird et al., 2005). L'IL-12 stimola le cellule NK (Naume et al., 1992) e rappresenta pertanto nei mammiferi un'importante attivatore della risposta immunitaria innata cellulo-mediata. IL-12 promuove inoltre la funzione dei Th1 mentre ostacola il differenziamento dei Th2 (Kaiser et al., 2004). L'IL-12 dei mammiferi si è scoperta essere anche in grado di attivare reazioni citotossiche specifiche contro cellule bersaglio di natura alloenica (Via et al., 1994). Sequenze omologhe a quelle dell'IL-12 dei mammiferi sono oggi disponibili per tiger puffer, green spotted pufferfish e zebrafish. Da studi sull'espressione di geni funzionali in tiger puffer, è stato anche ipotizzato che l'IL-12 possa essere coinvolta nella difesa dai virus (Yoshiura et al., 2003). Anche se la quantità di dati sulle citochine dei Teleostei rimane ancora molto limitato, in particolare per quanto riguarda le interleuchine e l'IFN γ , si può supporre che queste giochino nei pesci un ruolo simile a quello che rivestono nei vertebrati superiori. Sono in corso studi mirati all'individuazione di nuove citochine in molte specie di pesci. Questi potranno fornire ulteriori informazioni per meglio comprendere i meccanismi di regolazione del sistema immunitario dei pesci e, in particolare, la risposta citotossica cellulo-mediata.

L'identificazione e caratterizzazione delle cellule coinvolte nella CMC

L'indagine dei meccanismi che stanno alla base della CMC richiede la caratterizzazione delle cellule che ne sono coinvolte. Questa può essere fatta tramite il riconoscimento diretto di proteine caratteristiche o tramite l'analisi

dell'espressione genica. Attualmente sono disponibili per i linfociti dei pesci solo pochissimi anticorpi monoclonali. Dato che, per la maggior parte delle specie, non esistono anticorpi in grado di riconoscere i linfociti T, anticorpi monoclonali specifici per altre popolazioni possono essere utilizzati per arricchire in maniera indiretta la percentuale di queste cellule. Questi anticorpi monoclonali possono essere impiegati per eliminare la componente non linfocitaria, utilizzando tecniche di separazione magnetiche o di flusso (MACS e FACS). Un'altro approccio possibile è quello di utilizzare sequenze geniche omologhe conosciute per generare specifici primers e sonde da impiegare in RT-PCR e real-time RT-PCR rispettivamente., ma anche per tecnologie di gene array. La tecnica di RT-PCR è stata ampiamente utilizzata per caratterizzare l'espressione genica di molecole coinvolte nel riconoscimento delle cellule bersaglio, come il TCR nel pesce gatto (Stuge et al., 2000, Shen et al., 2004), nella trota iridea (Estepa et al., 1999, Fischer et al., 2003), nella spigola (Scapigliati et al., 2000), del CD8 nella trota iridea (Fischer et al., 2003), dell'MHC di classe I sempre nella trota (Dijkstra et al., 2003), e dell'MHC di classe II nella carpa (Rodrigues et al., 1995). La tecnica di real-time RT-PCR offre la possibilità di compiere analisi ancora più sofisticate sull'espressione genica. Per alcune specie di pesci sono disponibili le sequenze dell'intero genoma (fugu, Aparicio et al., 2002; Medaka, Khorasani et al., 2004, e zebrafish, Furutani et al., 2004) e per altre sono in fase di completamento. Inoltre, sono disponibili delle librerie EST (expressed sequence tag) con numerosissime sequenze geniche che possono essere usate per lo studio comparativo dei geni (Rise et al., 2004). Tale approccio incrementa decisamente la possibilità di scoprire nuovi geni nei pesci. Queste informazioni sono utili, a loro volta, per sviluppare nuovi strumenti per lo studio del sistema immunitario nei pesci, ad esempio, per la costruzione di nuovi primers per l'analisi d'espressione genica o di proteine ricombinanti per la produzione di anticorpi monoclonali oppure per la realizzazione di brevi RNA a doppia elica per degradare degli mRNA bersaglio o da impiegare nella transfezione cellulare (Hannon e Rossi, 2004).

La CMC in vitro

L'omologia di sequenze tra geni noti nei mammiferi e geni non ancora caratterizzati nei pesci implica omologie funzionali. Queste però devono essere confermate attraverso studi funzionali. Esistono diversi metodi, sia *in vitro* che *in vivo*, che possono essere utilizzati per studiare la CMC nei pesci. I metodi *in vivo* comprendono il rigetto di trapianti e la reazione del trapianto contro l'ospite (GVHR). La CMC *in vitro*, invece, può essere analizzata utilizzando cellule bersaglio eterologhe (xenogeniche o allogeniche), ma anche cellule autologhe o singeniche infette. Sistemi *in vitro* per testare la CMC attraverso l'utilizzo, in combinazione, di cellule bersaglio di natura xeno e allogena sono stati utilizzati in diverse specie di pesci, tra le quali il pesce gatto, la carpa e la trota. Come riportato per i vertebrati più evoluti, le cellule responsabili della CMC nei pesci sono rappresentate dalle cellule NK-simili, dalle citotossiche specifiche e non, ma anche dai granulociti neutrofili. Questi ultimi infatti hanno mostrato citotossicità non specifica nei confronti di cellule bersaglio di natura xenogenica nella trota (Sasaki et al., 2002) e in ginbuna sono risultati anche capaci di uccidere, *in vitro*, cellule di natura isogenica, se presenti in alte concentrazioni (Fisher et al., 1998). Le cellule citotossiche non specifiche (NCC) (Evans et al., 1990) e le cellule NK-simili (Yoshida et al., 1995) sono state ampiamente descritte nel pesce gatto, ma anche in altre specie di pesci (Secombes, 1996). Le NCC isolate dagli organi linfoidei del pesce gatto sono differenti dalle cellule NK-simili che sono state trovate nel PBL. Le NCC esprimono la proteina di superficie

NCCRP, coinvolta nella citotossicità non-specifica (Jaso-Friedmann et al., 1997). Il NCCRP-1, che può essere riconosciuto e attivato da un anticorpo monoclonale (mab) precedentemente sviluppato per le NCC (5C6, Evans et al., 1988), risulta assente nelle cellule NK-simili del pesce gatto (Shen et al., 2004). Queste ultime, se prelevate fresche dal PBL, si sono dimostrate capaci di uccidere sia cellule di natura allogenica (Yoshida et al., 1995) che cellule infettate da virus (Hogan et al., 1996). Sempre in questa specie, sono state prodotte diverse linee continue di cellule citotossiche derivate dal PBL. Questi cloni di cellule citotossiche alloreattive sono stati identificati come cellule citotossiche non-specifiche o cellule citotossiche NK-simili, mentre altri hanno mostrato citotossicità allogenica specifica e l'espressione di geni per il TCR (Stuge et al., 2000., Shen et al., 2004). Alcuni dei questi cloni di cellule citotossiche alloreattive TCR⁺ sono risultate capaci di uccidere le cellule bersaglio mediante un meccanismo di secrezione di perforine/granzimi fornendo, così, un'ulteriore prova dell'esistenza di linfociti Tc nei Teleostei (Zhou et al., 2001). Nel pesce gatto i cloni di cellule NK-simili TCR⁻ sono sembrati esprimere quantità variabili di un putativo Fc μ R (come mostrato dal legame con le IgM), una molecola simile a LFA-1 e un probabile antigene specifico delle cellule T. I cloni che esprimono il putativo Fc μ R hanno mostrato una citotossicità più alta contro bersagli allogenici se incubati in presenza di anticorpi allospecifici (Shen et al., 2003, 2004). Grazie a questi studi compiuti sulle cellule NK-simili del pesce gatto si può concludere che questa popolazione di cellule effettrici citotossiche risulta eterogenea per quanto riguarda la specificità delle cellule bersaglio e rispetto al pattern d'espressione degli antigeni di superficie. La CMC specifica contro cellule bersaglio di origine allogenica è stata documentata anche nella carpa (Fischer et al., 1998, Hasegawa et al., 1998) e nella trota arcobaleno (Fisher et al., 2003). In quest'ultima, dove non sono disponibili ad oggi linee continue di cellule citotossiche, le cellule con capacità citotossica possono essere purificate dai leucociti togliendo, mediante tecniche di separazione, le popolazioni cellulari per le quali esiste un anticorpo specifico ed eseguendo, poi, test funzionali e d'espressione. Non sono ancora disponibili per i pesci anticorpi che consentano la purificazione dei linfociti Tc. La percentuale di cellule della linea T può essere aumentata solo indirettamente eliminando, mediante separazione immunomagnetica, le altre sottopopolazioni (cellule B, monociti, granulociti e trombociti). Nella trota arcobaleno è stato dimostrato come la popolazione linfocitaria arricchita con questo metodo risulti capace di distruggere cellule bersaglio di natura allogenica, cosa che invece non sono capaci di fare le altre popolazioni estratte con la stessa tecnica (cellule B, monociti, granulociti, trombociti) (Fisher et al., 2003). Questa popolazione selezionata immunomagneticamente è stata poi analizzata con tecniche di RT-PCR per studiare l'espressione di trascritti per molecole di rilevanza immunologica, come le IgM (regione costante della catena pesante CH), il TCR e il CD8. La frazione linfocitaria IgM⁻ è stata l'unica popolazione del PBL a presentare l'espressione di geni per TCR e CD8. Inoltre, l'espressione del CD8 in questa frazione di cellule è stata incrementata a seguito di immunizzazioni ripetute con cellule bersaglio allogeniche omologhe. Questo sembrerebbe dimostrare nella trota come questa componente citotossica alloreattiva (linfociti IgM⁻) sia costituita da cellule della linea T. Si può, quindi, ragionevolmente concludere che nei pesci sono presenti sia cellule citotossiche specifiche che non-specifiche. Tuttavia, risultano ancora carenti strumenti adatti alla caratterizzazione dettagliata e approfondita dei meccanismi che stanno alla base della CMC. Per fare questo sarà, quindi, necessario individuare nuovi test, sia *in vitro* che *in vivo*, da aggiungere a quelli già utilizzati per il pesce gatto, la carpa e la trota arcobaleno. Inoltre, sarà necessario, per tutte le specie scientificamente rilevanti, produrre nuovi anticorpi che permettano una discriminazione chiara delle cellule del sistema immunitario, in

accordo con la nomenclatura CD dei mammiferi. In questa tesi di dottorato si è cercato di acquisire nuove ed importanti informazioni sulla CMC specifica e non, utilizzando come bersaglio linee cellulari di natura sia allogenica che xenogenica in due specie rilevanti dal punto di vista sia scientifico che alimentare, quali la carpa (*Ciprinus carpio L.*) e la spigola (*Dicentrarcus labrax L.*). Particolare attenzione è stata rivolta alla valutazione della risposta CMC della popolazione linfocitaria, arricchita mediante gradiente discontinuo di Percoll (densità 1.06), estratta dall'intestino di queste due specie. Inoltre, è stata valutata la risposta CMC a seguito d'immunizzazione e successivo richiamo con cellule sia di natura allogenica che xenogenica.

MORFO-FISIOLOGIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

GLI ORGANI LINFOIDI

La maggior parte delle conoscenze relative al sistema immunitario dei Teleostei deriva da studi condotti su specie di acque temperate, sia dolci (soprattutto Ictaluridi, Salmonidi e Ciprinidi) che marine (Perciformi, Pleuronettiformi e Sparidi). L'organizzazione del sistema immunitario dei pesci ossei mostra specificità analoghe a quelle degli altri vertebrati, quali la presenza di tessuti linfomieloidi con presenza di linfociti, trombociti, macrofagi, granulociti, eritrociti, e risposte immunitarie di tipo specifico e aspecifico (Ellis, 1997). Nei Teleostei gli organi linfopoietici sono rappresentati da timo, rene, milza e dal tessuto linfoide associato alle mucose di intestino (GALT), branchie e pelle (Fänge, 1982; Rombout et al., 1993). A differenza dei mammiferi, nei pesci ossei i compartimenti linfoide e mieloide sono interconnessi nella milza e nel rene e mancano midollo osseo e linfonodi. I maggiori organi ematopoietici sono rappresentati dalla milza, dal rene cefalico (pronefro) e da quello del tronco (opistonefro). Questi ultimi sembrano essere probabili siti del differenziamento di eritrociti, monociti, granulociti e linfociti B (Ellis, 1977; Zapata, 1979; Bielek, 1981; Botham e Manning, 1981; Romano et al., 1997b, 1999a,b). La milza sembra essere il principale organo trombo poietico, deputato alla produzione di trombociti, cellule leucopoietiche con funzione analoga a quella delle piastrine dei mammiferi (Rombout et al., 1996; Romano et al., 1997b).

Rene cefalico

Nei pesci delle acque temperate la porzione cefalica del rene rappresenta un importante organo linfoide in età adulta; mentre assolve ad una funzione escrettrice limitatamente ai primi stadi larvali. In fasi più avanzate dello sviluppo il primo rene escretore (Prorene) viene sostituito, nella sua funzione, prima dal mesonefro larvale e, successivamente, dall'opistonefro dell'individuo adulto (Manning, 1994). Il rene è provvisto di un sistema vascolare "portale" a bassa pressione, per cui il sangue irroro lentamente l'organo grazie ad un sistema di capillari sinusoidi; l'impalcatura stromale è costituita da cellule reticolari e fagociti e, nello stroma emopoietico, sono presenti numerosi eritroblasti e leucoblasti. Nella sua struttura il rene somiglia al midollo osseo dei tetrapodi tanto da far ipotizzare l'espletamento di un ruolo analogo (Zapata, 1979). L'analisi morfologica (Zapata et al., 1996) ed immunocitochimica (Koumans Van Diepen 1993; Romano et al., 1997b) del rene cefalico durante l'ontogenesi ha fornito indicazione che esso possa rappresentare un organo linfoide primario per i linfociti B. Utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro immunoglobuline e cellule B di carpa è stata studiata la comparsa e la distribuzione dei linfociti B durante l'ontogenesi. Lo studio immunocitochimico ha evidenziato che nel rene cefalico si ha un aumento progressivo dei linfociti B a partire dalla seconda settimana post-fecondazione (p.f.), mentre nella milza e nel sangue dopo 4-6 settimane (p.f.), e che nell'intestino e nel timo i linfociti B sono presenti in numero piuttosto ridotto. Oltre ad avere la funzione di organo linfoide, il rene nei pesci svolge anche un ruolo importante nell'eritropoiesi. Il rene cefalico può essere considerato il primo organo che contiene tessuto emopoietico, sebbene eritrociti siano stati localizzati, prima dello sviluppo di questo organo, nel sacco vitellino che potrebbe rappresentare il primo organo a limitata eritropoiesi (Ellis, 1982). Il rene cefalico dei pesci svolge anche funzione endocrina. Molti autori hanno evidenziato che i tessuti interrenale e cromaffine

sono variamente distribuiti nel rene e si è giunti alla conclusione che nei Teleostei l'omologo della regione corticale della ghiandola surrenale dei mammiferi potrebbe essere il cosiddetto tessuto interrenale (Chester Jones e Phillips, 1960; Nandi e Bern, 1960; Ouguri, 1960; Phillips e Bellamy, 1963; Bern e Nandi, 1964; Botte et al., 1964; Banerji e Ghosh, 1965; Nandi, 1965) mentre l'omologo della regione medullare dei mammiferi è identificabile con il tessuto cromaffine (Ouguri, 1960; Van Euler e Fange, 1961; Nandi, 1962, 1965; Van Euler, 1963;).

Il rene presenta aggregati di cellule contenenti pigmento che costituiscono i centri melano-macrofagi (Roberts, 1975). Queste cellule appartengono al sistema fagocitico mononucleare, tipico dei Teleostei più evoluti (Ellis, 1980) e il loro numero e diametro aumentano generalmente con l'età (Fishelson, 1995). La maggior parte del pigmento in essi presente è rappresentato da melanina, ma sono presenti anche lipofucsina ed emosiderina (Agius, 1985). I centri melano-macrofagi sembrano essere strutture eterogenee, contenenti detriti sub-cellulari derivati dalla demolizione di cellule fagocitate, generalmente eritrociti. La loro funzione probabilmente è quella di eliminare materiale indesiderato o depositi metabolici, come il ferro e la melanina e, in particolare, di svolgere un ruolo protettivo contro l'azione dei radicali liberi (Fullop e Mc Millan, 1984). Inoltre, per i CMM è stato suggerito un importante ruolo nella cattura degli antigeni (Ellis, 1980).

Milza

Nei pesci la milza è uno fra gli organi più variabili per sede, dimensioni e forma. Generalmente si differenzia dal mesenchima mesodermico attorno alla vena sub-intestinale che la vascolarizza e dalla quale si separa solo successivamente. Nei Teleostei la milza è provvista di una capsula connettivale che invia in profondità dei setti divisorii (trabecole) e si presenta come un organo costituito da "polpa bianca" e "polpa rossa" contenente particolari formazioni vascolari dette "ellissoidi" ed avente essenzialmente una funzione emopoietica. Ricerche effettuate da Zapata (1982) sul tessuto splenico di *R.rutilus* e *G.gobio* rivelano che, come in altri Teleostei, lo stroma è costituito da una trama reticolare formata da cellule epiteliali connesse tra loro (Jordan e Spiedel, 1924; Yoffey, 1929; Sailendri e Muthukkaruppan, 1975) in cui eritrociti e leucociti sono frammisti. Le cellule epiteliali possono anche circondare le arterie, i centri melano-macrofagi (Jordan e Spiedel, 1924; Sailendri e Muthukkaruppan, 1975; Ferguson, 1976) oppure essere diffuse all'interno della polpa bianca (Yoffey, 1929; Robertson e Wexler, 1960). Tuttavia, in alcune specie di Teleostei non è presente una netta distinzione tra polpa rossa e polpa bianca e, conseguentemente, la risposta proliferativa all'antigene ha spesso luogo in zone diffuse dell'organo. (Botham e Manning, 1981; Grace e Manning, 1980). In generale, quindi, si può affermare che nel tessuto splenico di alcune specie di Teleostei è evidente la distinzione fra le due componenti tissutali: la "polpa bianca", costituita dai noduli linfatici (zona linfopoietica), e la "polpa rossa", notevolmente vascolarizzata e molto ricca di elementi ematici (zona eritropoietica). I capillari terminali, detti ellissoidi, sono costituiti da un sottile strato di cellule endoteliali circondate da una guaina di fibre connettivali e cellule reticolari. Nei pressi degli ellissoidi si osservano, frequentemente, dei centri melano-macrofagi di grandi dimensioni, con un contenuto di ferro maggiore che nel rene cefalico, la cui funzione sembrerebbe quella di rimuovere gli eritrociti lisati in condizioni normali e patologiche (Crosby, 1957; Roberts, 1975, 1978). La distruzione degli eritrociti e la conseguente liberazione di ferro dall'emoglobina potrebbero essere la causa principale dell'elevato accumulo di

quest'elemento sotto forma di ferritina ed emosiderina nei centri melano-macrofagi della milza (Grover, 1968; Yu et al., 1971; Agius, 1979). Il catabolismo tissutale potrebbe essere il principale responsabile della presenza di pigmento all'interno di questi centri (Roberts, 1975, 1978; Agius e Roberts, 1981). Uno studio quantitativo ed istochimico effettuato da Micale e Perdichizzi (1990) nella milza del Teleosteo *Diplodus annularis* rivela che, oltre a fattori esterni, anche fattori interni all'animale, come il ciclo sessuale, potrebbero influire sul numero di centri melano-macrofagi nella milza. Studi condotti durante lo sviluppo, in carpa (Rombout et al., 1996; Romano et al., 1997b), hanno evidenziato nelle aree a polpa bianca della milza numerosi trombociti, più che in altri organi. Tali elementi compaiono nella milza già a due settimane dalla fecondazione, cioè prima che in qualsiasi altro organo. Quindi, la milza sembra essere deputata prevalentemente alla trombo poiesi, oltre ad essere sede dei linfociti T e B (Scapigliati et al., 1995a, 1995b; Romano et al., 1997b). La letteratura conferma la presenza di cellule B nella milza di alcune specie, come la spigola (Scapigliati et al., 1995, 2003; Romano et al., 1997), e diversi lavori riportano l'espressione nella milza di markers specifici per la cellule T, come le catene α e β del *TcR* (Wermentam e Pilström, 2001) e del *CD4* (Laing et al., 2006).

Timo

Il ruolo principale del timo nei Vertebrati più evoluti è di fornire un appropriato microambiente in cui possano maturare le cellule T. Nei Mammiferi le molecole *MHC* di classe I e II mediano l'acquisizione di un repertorio di cellule T partecipando alla selezione timica positiva e negativa dei linfociti *CD8* e *CD4* (Ladi et al., 2006). Nei Teleostei il timo si sviluppa nella lamina propria del tratto-gastrointestinale, nella tasca localizzata alla base degli archi branchiali, e, successivamente, migra nel sottostante mesenchima durante l'ontogenesi. Nella maggior parte dei Teleostei il timo è localizzato vicino alla cavità branchiale, strettamente associato con l'epitelio faringeo (Zapata et al., 1996). L'anatomia del timo è altamente variabile nelle diverse specie di Teleostei (Bowden et al., 2005). Una zonazione timica è stata osservata nella spigola (Abelli et al., 1994), nel rombo (Fournier-Betz et al., 2000), in zebrafish (Danilova et al., 2004), nella trota (Fischer et al., 2005), in carpa (Huttenhuis et al., 2005) e nel salmone (Koppang et al., 2003) nel quale è possibile distinguere una regione timica esterna (cortex) ed una interna (medulla) e, spesso, una giunzione cortico-medullare. Sono state descritte anche differenze tra individui della stessa specie, probabilmente in dipendenza dall'età. Inoltre, è stato osservato nel timo della spigola e della carpa il processo di apoptosi, ad indicare lo svolgersi della selezione negativa delle cellule T nei pesci. Tale processo non è stato osservato durante lo sviluppo iniziale, mentre cellule apoptotiche sono state osservate sia nella cortex che nella medulla (Abelli et al., 1998; Romano et al., 1999). Il timo dei pesci è composto soprattutto da cellule Ig^- (Scapigliati et al., 1995), inserite all'interno di un network di cellule epiteliali reticolari e, generalmente, con un organizzazione cortico-medullare (Romano et al., 1997, 1999). Le differenze nell'istologia del timo tra le specie di pesci sembra essere dovuta a tre ragioni (Romano et al., 1999a): la prima concerne l'estensione e la localizzazione della regione corticale e medullare, la seconda e la terza derivano rispettivamente dalla presenza di differenti tipi di cellule epiteliali e dalla presenza/assenza di cellule epiteliali limitanti (LECs) che delimitano l'organo dall'epitelio faringeo. Sebbene la presenza di un network epiteliale timico sia stata definitivamente stabilita, manca ancora una classificazione univoca degli elementi epiteliali e dei loro possibili ruoli. Nella spigola, l'esistenza di sottopopolazioni epiteliali

è stata dimostrata attraverso la presenza di tonofilamenti nel citoplasma, con osservazioni ultrastrutturali in carpa tramite l'impiego di un anticorpo policlonale anti-cheratina (Froehly e Deshaux, 1986) e attraverso reazioni istoenzimatiche (Castillo et al., 1990). Attraverso uno studio istologico ed ultrastrutturale sul timo del sarago (*Diplodus puntazzo* L.) è stata mostrata l'esistenza di un'eterogeneità di sottopopolazioni epiteliali in analogia con quanto era già stato dimostrato tramite immunoistochimica nell'uomo e nel pollo (Wijngaert et al., 1984; Romano et al. 1996). Tali sottopopolazioni cellulari sono state classificate in base alla diversa localizzazione e alle diverse caratteristiche citologiche in: cellule epiteliali limitanti (LECs), localizzate nella zona subcapsulare, perivascolare e trabecolare; cellule epiteliali reticolari (RECs), situate nella regione corticale e medullare; cellule timiche nutrici-simile, situate nel confine cortico-medullare; cellule cistiche, situate nel compartimento medullare; corpuscoli di Hassal, situati nella regione medullare. La precisa origine delle cellule epiteliali rimane una questione aperta, ma sembra essere chiaro che giocano un ruolo importante nel creare un ambiente idoneo alla differenziazione dei linfociti T (Romano et al., 1998), come avviene nei Mammiferi (Ritter e Crispe, 1992) e negli uccelli (Kendall, 1991). Per far questo le cellule epiteliali devono esprimere tutta una serie di molecole, prime tra tutte quelle del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*MHC*), necessarie al differenziamento delle cellule T: l'interazione del *TcR* con l'*MHC* ha, infatti, il ruolo di salvare i cloni di cellule T da inevitabile apoptosi dovuta al processo di selezione positiva (Jameson et al., 1994; Turka et al., 1991). Attualmente molte informazioni riguardo le funzioni del timo nei Teleostei sono state acquisite grazie all'identificazione di proteine e di markers genetici (Trede et al., 2001; Hansen et al., 1998). È ora possibile confermare gli studi morfologici mediante l'uso di tecniche molecolari, usando primers e sonde per alcuni geni, quali i geni attivanti la ricombinazione, *rag1* (Hansen-Kaattari, 1995; Greenhalgh-Steiner, 1995) e *rag2* (Hansen-Kaattari, 1996), il recettore per le cellule T, *TcR* (Partula et al., 1995; 1996; Wilson et al., 1998), le molecole di *MHC* di classe I (Shum et al., 1999) e II (Glamann, 1995). Questi geni sono legati alla funzione immunitaria del timo, così come un altro gene di notevole interesse, il gene *ikaros*, generalmente richiesto per lo sviluppo delle cellule linfoidi ed espresso persino prima della comparsa del timo (Willet et al., 2001). Studi più recenti hanno permesso di identificare altri geni coinvolti nello sviluppo timico, come il gene *foxn1* che è il fattore di trascrizione espresso nelle cellule epiteliali prima dell'entrata nel timo dei progenitori linfoidi (Schorpp et al., 2002). Tuttavia, sebbene siano stati fatti dei progressi nella comprensione del microambiente timico, nulla è noto nei Teleostei riguardo l'origine dei progenitori linfoidi che colonizzano il timo e il processo di selezione timica dei linfociti. L'espressione delle molecole di *MHC* di classe I e II nel timo suggerisce la loro funzione nella selezione dei linfociti T. Nei Mammiferi è noto che i progenitori delle cellule T entrano nel timo a livello della giunzione cortico-medullare e possono differenziarsi, nella linea dei timociti, in cellule natural killer (NK) e in cellule dendritiche (Sacedón et al., 2003). Lo sviluppo delle cellule T subisce un processo di selezione timica e determina due scelte: la morte o la sopravvivenza (selezione positiva); i due diversi destini sono determinati dal recettore delle cellule T (*TCR*) (Kisielow et al., 1995).

L'educazione timica e il fenomeno dell'apoptosi

Sono stati esaminati, precedentemente, alcuni dei meccanismi che consentono il riarrangiamento genico e la variabilità e specificità delle catene proteiche che costituiscono i recettori antigenici. Il “serbatoio” di TCR che viene a costituirsi potrebbe, tuttavia, contenere dei recettori autoreattivi, in grado, cioè, di riconoscere come antigeni estranei proteine che fanno parte dell’organismo. Pertanto, il sistema immunitario deve essere capace di garantire l’autotolleranza verso gli antigeni propri riconoscendoli ed evitando l’aggressione contro le cellule dell’individuo del quale fanno parte. Il meccanismo che consente l’autotolleranza non è determinato per via genetica, bensì è acquisito durante lo sviluppo a seguito di complessi processi di selezione negativa sugli elementi cellulari del sistema immunitario. Queste selezioni avvengono nel timo, dove sono presenti timociti immaturi e dove, attraverso meccanismi che operano a diversi livelli ed a vari stadi della maturazione leucocitaria, si può assistere all’eliminazione degli elementi pericolosi (Cohen, 1991; Golstein et al., 1991). La cernita si manifesta attraverso la delezione di cloni di cellule T, potenzialmente autoreattive, tramite la loro disattivazione funzionale (anergia) o, ancora, con la generazione di elementi citologici che agiscono da regolatori-soppressori nei confronti dei timociti. In effetti, i linfociti timici maturi sono il risultato della proliferazione di cellule selezionate positivamente, e non autoreattive, e sono distinguibili in due diverse popolazioni. La prima è definita dalle cellule T CD4, in grado di riconoscere gli antigeni presentati nell’ambito del MHC di classe II. La seconda popolazione è quella dei linfociti T CD8, capaci di interagire con gli antigeni esposti nel contesto di molecole di MHC classe I. I rapporti che si stabiliscono tra i TCR e le molecole di MHC sono fondamentali per stabilire quali tra i timociti immaturi possono continuare lo sviluppo e diventare cellule T e quali, invece, vadano eliminati. In questo processo di “riconoscimento” è di fondamentale importanza l’intervento delle cellule presentanti l’antigene (APC) che, elaborando e concentrando gli immunogeni, coadiuvano i meccanismi dei recettori.

Anche in quest’ambito le indagini più esaurienti riguardano la classe dei mammiferi, nei quali il riconoscimento delle proteine autologhe è definito durante il periodo perinatale o neonatale e il timo è attivamente coinvolto nei meccanismi di selezione linfocitaria. Quest’ultima affermazione è valida anche per i vertebrati inferiori, infatti, nel timo si trovano i timociti immaturi e proprio in quest’organo si concretizza una drastica riduzione del loro numero durante i giorni immediatamente successivi alla nascita dell’individuo o alla schiusa dell’uovo. La diminuzione del numero dei timociti non è imputabile a fenomeni migratori poiché le cellule intraprenderanno tale strada solo alla fine del loro processo di maturazione e di differenziamento. La colonizzazione degli organi linfoidi secondari da parte dei timociti maturi avverrà solo quando questi, avendo subito la selezione timica ed avendo acquisito la specifica competenza immunitaria, saranno diventati linfociti T a tutti gli effetti. Nel timo, la causa della riduzione della popolazione linfocitaria è imputabile al fenomeno di selezione negativa. Tale processo elimina la maggior parte dei timociti (circa il 95%) e solo i rimanenti arriveranno al completo differenziamento, costituendo tutta la gamma di linfociti T circolanti dell’organismo (Kendall, 1990; Ritter e Crispe, 1992). La comparsa dei tipici sintomi apoptotici nei timociti morenti indica che il timo partecipa attivamente ai processi di selezione linfocitaria. Questo tipo di morte cellulare è il più importante dei meccanismi intratimici di selezione negativa e necessita, per innescarsi, di fattori esterni alla cellula apoptotica stessa. L’apoptosi, è un processo che consente ad un organismo, nel corso del suo sviluppo, di poter controllare la proliferazione e le dimensioni di una popolazione cellulare. Tramite la morte cellulare programmata è possibile eliminare elementi autologhi o eterologhi potenzialmente pericolosi (Steller, 1995). La morte di una cellula, può

avvenire attraverso due diversi processi: la necrosi o l'apoptosi. Nel primo caso si assiste a morte patologica dovuta ad un serio danno genetico o strutturale subito dalla cellula, o ad un'offesa improvvisa (ischemia e ipertemia), o ancora a "shock" fisico-chimico. La membrana della cellula necrotica perde la capacità di mantenere l'omeostasi e si lisa a causa del conseguente rigonfiamento. Il citoplasma, non più contenuto dal plasmalemma, si riversa nel tessuto circostante provocando, inevitabilmente, una risposta localizzata di tipo infiammatorio. L'apoptosi, invece, è un processo di morte cellulare programmata che tende ad evitare conseguenze dannose per il tessuto nel quale si verifica. La cellula apoptotica subisce una condensazione e, in alcuni casi, si osserva frammentazione del citoplasma condensato. I frammenti cellulari sono noti anche con il nome di corpi apoptotici e sono rapidamente fagocitati senza innescare altri meccanismi di reazione immunitaria quali edema, infiammazione e irritazione del tessuto. Nella cellula sottoposta a PCD si assiste, anche, alla frammentazione del filamento di DNA. La causa di questo fenomeno va ricercata nell'attivazione delle endonucleasi interne alla stessa cellula sottoposta ad apoptosi. La DNAsi I gioca, probabilmente, un ruolo primario nella comparsa di questo "ladder" nucleosomale ed è ben osservabile quando si effettuano esperimenti d'elettroforesi su gel di agarosio del DNA. Nel corso della PCD il filamento degli acidi nucleici della cellula apoptotica è scisso in frammenti mono ed oligo-nucleosomali di circa 200 bp, o multipli (Wyllie, 1980).

Un organismo può ricorrere all'apoptosi anche in casi diversi dalla selezione negativa, come, ad esempio, durante il rimodellamento dei tessuti embrionali (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Arends e Wyllie, 1991). Il programma di morte cellulare può venire attivato da fattori esterni quali danni provocati da radiazioni ionizzanti, infezioni virali e mancanza di fattori essenziali per la sopravvivenza della cellula (Thompson, 1995). Si ritiene che il suicidio cellulare avvenga per "default", cioè l'assenza di segnali esterni di sopravvivenza attiva il processo di apoptosi codificato geneticamente. I dati provenienti da studi condotti sulla carpa indicano che anche lo stress fisico è un fattore in grado di indurre apoptosi: gli individui sottoposti ad intensa manipolazione mostrano una minore resistenza alle infezioni del batterio *Trypanoplasma borreli* rispetto ai pesci di controllo. La minor efficacia della risposta immunitaria è da imputare alla comparsa di sintomi apoptotici nei leucociti del circolo periferico e del rene cefalico. L'attento esame dei dati degli esperimenti in questione rivela che alcuni fattori sierici elaborati nei soggetti sottoposti a condizioni di vita stressanti sono responsabili dell'induzione della PCD dei leucociti. Nel dettaglio, i fattori secreti dagli animali in condizioni di stress appartengono alla categoria delle catecolammine e sono epinefrina e norepinefrina. Mammiferi e Teleostei presentano, sulla membrana d'alcune popolazioni leucocitarie, un recettore adrenergico (AR) che legandosi ai fattori sierici si attiva e provoca profonde modificazioni delle funzioni cellulari (Finkenbine et al., 2002; Saeij et al., 2003). Gli studi di Evans e collaboratori (2001) sulla tilapia (*Tilapia mossambica*) e sul pesce gatto hanno riscontrato che la risposta delle NCC ad un'infezione acuta causa il rilascio di fattori che impediscono l'avvio dei processi di PCD. Tali fattori sono in grado di attivare le cellule citotossiche non specifiche proteggendole dall'innescare dei processi apoptotici. Anche le NCC, data la loro capacità di essere potenzialmente autoreattive, possono andare incontro a processi apoptotici. Altri esperimenti condotti sempre su tilapia e pesce gatto, hanno dimostrato che alcuni fattori citosolici, come il FasL, sono in grado di fungere da regolatori per il processo di morte programmata (Bishop et al., 2002). La capacità d'espressione della proteina FasL è stata indagata nei leucociti di orata utilizzando il FACS, l'immunoblotting, tecniche d'immuno-istochimiche e un Mab specifico. Sono state testate cellule provenienti dal rene cefalico, dal timo, dalla milza, dal sangue e dall'essudato peritoneale del pesce. I risultati

ottenuti hanno evidenziato l'esistenza del fattore citosolico FasL nei linfociti, nei monociti-macrofagi e nei granulociti acidofili di questo Teleosteo (Cuesta et al., 2003). Nel timo il ricorso all'apoptosi non è limitato ai soli leucociti che possiedono un potenziale autoreattivo. In alcuni casi i timociti immaturi possono presentare gravi danni genetici o disfunzioni metaboliche che li rendono incapaci di svolgere la loro attività. Queste cellule danneggiate vengono riconosciute, attivando processi apoptotici a carico dei leucociti non idonei (Fowlkes e Pardoll, 1989; von Boehemer et al., 1989; Mc Donald e Lees, 1990). Evidenze sperimentali confermano che il mancato processo di selezione può indurre la comparsa di cellule autoreattive nel timo, inoltre, si suppone che possa essere alla base di alcuni fenomeni di carcinogenesi.

Le informazioni più dettagliate sui processi di selezione intratimica dei linfociti si hanno da studi effettuati sui mammiferi che hanno rivelato come tale processo si svolga in due fasi. Durante la prima avviene la selezione positiva dei timociti, in grado, attraverso il recettore TCR ed i rispettivi corecettori CD8 e CD4, di riconoscere e di legarsi all'MHC di classe I e II rispettivamente (restrizione da MHC). Nella seconda fase vengono eliminati tutti i linfociti che si dimostrano autoreattivi quando vengono a contatto con antigeni self processati ed esposti sull'MHC (tolleranza al self). In queste cellule viene indotta la PCD (Pullen et al., 1989) o l'anergia (Boyd et al., 1993). L'educazione che avviene nel timo dei mammiferi è un processo di tipo antigene-indipendente: non è necessario che i linfociti T incontrino l'immunogeno specifico per sviluppare la capacità di reagire contro lo stesso. I TCR, infatti, si formano attraverso riarrangiamenti occasionali dei geni che li codificano, durante l'ontogenesi dei linfociti T, prima che gli stessi entrino in contatto con un qualsiasi antigene.

Tessuto linfatico e associato alle mucose (MALT)

Le superfici mucosali della pelle, delle branchie e dell'intestino dei pesci sono protette con meccanismi umorali e cellulo-mediati (Peleteiro e Richards, 1985; Hart et al., 1988). Il muco ricopre in modo continuo la cute, le branchie e l'intestino costituendo una barriera che inibisce la colonizzazione del tegumento da parte di microrganismi. La produzione di muco risulta accentuata in seguito all'instaurarsi di un processo flogistico o ad un semplice fenomeno irritativo o di tipo chimico-fisico. La funzione più importante del muco è quella di protezione dell'interno dell'organismo dall'invasione di batteri e funghi o dalla penetrazione di particelle o altro materiale estraneo sospeso nell'acqua (Pickering e Richards, 1980).

Fino a qualche tempo fa le informazioni relative al muco dei pesci erano scarse e spesso trasferite per analogia dai mammiferi. Attualmente si sa che il muco può contenere lectine, pentraxine, lisozima, proteine del complemento, peptidi antibatterici e IgM agglutinanti (Alexander e Ingram, 1992; Rombout et al., 1993; Aranishi e Nakane, 1997). La cute dei Teleostei è costituita, dall'esterno verso gli strati più profondi, dall'epidermide, dal derma e dall'ipoderma. Annessi alla cute sono organi accessori come recettori sensoriali, scaglie, ghiandole mucose e organi luminescenti. L'epidermide, a sua volta, si divide in due strati: uno superficiale, di tipo stratificato, e uno più profondo, lo strato delle cellule basali o delle cellule germinali, composto da cellule indifferenziate. Le cellule mucose, presenti su tutto il corpo, prendono origine negli strati intermedi dell'epidermide e, solo successivamente, raggiungono la superficie della cute aumentando di dimensioni. Il loro secreto contiene principalmente glicoproteine. Nelle forme larvali di alcuni pesci, fino allo stadio di avannotto, è stata osservata la presenza di una discreta quantità di tripsina e di lisozima a livello dell'epidermide. Questi

enzimi rivestono notevole importanza nei primi stadi di vita del pesce, quando le altre difese immunitarie sono ancora inadeguate. Fra l'epidermide e lo stato muscolare ci sono alcuni strati di cellule pigmentate che conferiscono colore all'animale. Nel derma sottostante, costituito prevalentemente da tessuto connettivo, si trovano le scaglie. L'integrità dell'epidermide è fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio osmotico e la difesa dai microrganismi. Il processo riparativo delle ferite cutanee risulta estremamente rapido grazie alla migrazione di cellule che, dallo strato malpighiano alla periferia della lesione, vanno a coprire il tessuto di granulazione chiudendo superiormente la ferita.

Le branchie sono costituite dall'arco branchiale, la struttura portante, dalle lamelle primarie (filamenti) e dalle lamelle secondarie (lamelle) innestate sulle precedenti. L'arco branchiale è ricoperto da un tessuto epidermico tipico dei Teleostei sotto il quale si trova abbondante tessuto linfatico comprendente linfociti e, in molte specie, grosse cellule contenenti granuli acidofili. Le lamelle primarie sono ricoperte da un'epidermide di tipo mucoide contenente, nelle specie eurialine, le cosiddette "cellule del cloruro" che controllano l'osmoregolazione; sono, inoltre, presenti linfociti, cellule fagocitarie e grossi granulociti acidofili. Le branchie costituiscono un importante ingresso per molti microrganismi pertanto sono soggette ad una forte produzione di muco. I processi infiammatori a livello branchiale determinano spesso iperplasia epiteliale con fusione di lamelle vicine. Alcuni studi hanno dimostrato la presenza nelle branchie di un sistema immunitario altamente sviluppato (Haugarvoll et al., 2008). Nella trota è stato rilevato che l'epitelio delle branchie è direttamente coinvolto nell'uptake degli antigeni (Castello et al., 1998). Recentemente l'identificazione dei trascritti genici per l'*Mx*, il recettore Toll-like 9 e il T cell receptor in alcune specie di Teleostei hanno fornito indicazione della presenza nelle branchie di risposte immunitarie innate e specifiche (Jensen et al., 2002; Takano et al., 2004, 2007). Alcuni autori (Koppang et al., 1998 a,b) hanno riportato che il livello dei trascritti per le molecole di *MHC* nelle branchie del salmone atlantico (*Salmo salar L.*) è significativamente più elevato di quello rilevato in altri tessuti linfoidi, come la milza. Inoltre, nel salmone atlantico è stata immunolocalizzata la molecola di *MHCII* e l'analisi RT-PCR ha evidenziato la presenza di trascritti per il *TcRa*, suggerendo la presenza di cellule della linea T nelle branchie (Haugarvoll et al., 2008).

Il tessuto linfatico associato all'intestino (GALT) è stato descritto sia nei pesci cartilaginei che nei pesci ossei (6) nei quali non sembra formare aggregati di cellule linfoidi, come le placche di Peyer caratteristiche dei vertebrati più evoluti. Dal punto di vista istologico il tessuto intestinale risulta composto di tre strati: la sierosa, la muscolare e la mucosa. Quest'ultima è formata da un epitelio separato da una membrana basale dal sottostante tessuto connettivo che prende il nome di lamina propria. L'epitelio sembra essere direttamente coinvolto, oltre che nelle funzioni digestive, di assorbimento e secretorie, anche nei processi immunitari umorali e cellulo-mediati (Sanderson e Walzer, 1994; Tlaskalova-Hogenova et al., 1995). Sebbene il tratto digerente dei pesci sia privo di placche di Peyer, ~~presente~~ vari leucociti, sparsi o aggregati, in particolare nell'intestino dove linfociti, granulociti, macrofagi e plasmacellule sono infiltrati nell'epitelio e nella lamina propria della mucosa (Bullock, 1963; Pontius and Ambrosius, 1972; Zapata, 1979; Davina et al., 1980; Temkin and McMillan, 1986; Hart et al., 1988; Abelli et al., 1997; Picchietti et al., 1997). Tuttavia, i dati disponibili rivelano anche una grande variabilità interspecifica (Fournier-Betz et al., 2000).

Le cellule immunitarie presenti nell'intestino dei pesci sono direttamente coinvolte nelle patologie intestinali, nella presentazione degli antigeni e nella produzione di immunoglobuline, quindi rappresentano un bersaglio

interessante per terapie e vaccinazioni orali (Hèbert et al., 2002). La diversità ecologica e biologica, le differenze nelle abitudini alimentari e nella fisiologia hanno indotto una notevole diversificazione nella morfologia del sistema digerente dei pesci, come dimostra la grande flessibilità adattativa del tratto digerente in risposta ai cambiamenti nella composizione della dieta (Buddington e Hilton 1987). Le specie erbivore, detritivore, onnivore e carnivore si differenziano una dall'altra per la presenza/assenza di stomaco, per la lunghezza dell'intestino (da una a più di 20 volte la lunghezza corporea), per la presenza e il numero delle appendici piloriche, delle valvole e involuzioni intestinali (Evans, 1998). Nel caso particolare della spigola, specie predatrice, il tratto digerente risulta formato dall'esofago, dallo stomaco, alcuni ciechi pilorici e dall'intestino. L'intestino presenta una curva e si può distinguere in intestino anteriore, medio e posteriore a partire dal restringimento dello stomaco verso l'ano. In altre specie, come la carpa, con abitudini erbivore la lunghezza dell'intestino risulta molto maggiore, presenta due curve e può essere diviso fino a quattro segmenti senza presentare né stomaco né ciechi pilorici (Fontane, 1981). I salmonidi, invece, possiedono un intestino molto corto che si presenta come un semplice tubo e lo stomaco è circondato da centinaia di ciechi pilorici.

Nell'intestino della carpa sono stati individuati grandi macrofagi intraepiteliali, principalmente nel segmento posteriore considerato un importante sito immunologico dei Teleostei (Rombout et al., 1985). Nel secondo segmento si trovano macrofagi più grandi e numerosi (Rombout et al., 1989a). Gli enterociti possono trasportare gli antigeni dal lume alle cellule linfatiche e ai macrofagi del tessuto mucosale (carpa: Rombout et al., 1985; Rombout and Van den Berg, 1989; trota: Georgopolou et al., 1986; tilapia: Doggett and Harris, 1991). Cellule specializzate nella captazione degli antigeni dal lume intestinale (Kato e Owen, 1994; Neutra and Kraehenbuhl, 1994), quali le cellule M descritte nei Mammiferi, non sono state rintracciate nei pesci. Studi sull'immunologia del tratto digerente dei pesci Teleostei hanno visto l'uso di antigeni solubili (es. ferritina e HGG) e particolati (es. *Vibrio anguillarum*). In alcuni esperimenti l'antigene è stato somministrato per via orale, in altri per intubazione anale. La seconda via ha il vantaggio di portare l'antigene direttamente a contatto con il secondo segmento dell'intestino senza subire degradazione nel tratto superiore del tubo digerente. Nella carpa e nella trota è stato dimostrato che gli antigeni, raggiunto il secondo segmento, vengono trasportati dagli enterociti a grandi macrofagi intraepiteliali (Rombout and Van den Berg, 1989; Rombout et al., 1989a) che hanno funzioni di fagocitosi (Secombs and Fletcher, 1992), di presentazione di antigeni (Vallejo et al., 1992), di produzione di citochine (Secombs, 1991) e di altri fattori immunomodulatori quali leucotrieni e lipoxine (Secombs and Fletcher, 1992). Anche i macrofagi intestinali della spigola hanno le caratteristiche ultrastrutturali di cellule fagocitiche (grossi lisosomi secondari, corpi multivescicolari e corpi residui) (Picchietti et al., 1997), dimostrate grazie alla stimolazione con batteri (*Aeromonas salmonicida*) e agenti patogeni fungini (*Candida albicans*) (Bennani et al., 1995).

Il GALT dei Teleostei è stato indagato mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali contro le immunoglobuline (Ig) (carpa: Rombout et al., 1993; spigola: Abelli et al., 1997) e le cellule T (Scapigliati et al., 1995; Joosten et al., 1997). Da questi esperimenti è emerso che le putative cellule T costituiscono la maggior parte della popolazione leucocitaria mucosale ed è stato ipotizzato che il GALT dei Teleostei abbia un sistema di difesa principalmente di tipo cellulo-mediato (Picchietti et al., 1997), nonostante siano state localizzate numerose cellule linfoidi Ig-positivo nella lamina propria vicino a cellule T e granulociti (Rombout et al., 1993; Abelli et al., 1997; Romano et al., 1997).

L'espressione dei geni codificanti per il *TcRa* nell'intestino del pesce zebra è stata utilizzata per analizzare la distribuzione delle cellule T. Le cellule *TcRa*-positive sono state localizzate tra le cellule epiteliali e nella lamina propria dei villi (Danilova et al., 2004), mentre le cellule B sono presenti, in aggregati, nella lamina propria (Danilova et al., 2002). Ricerche condotte sul merluzzo (*Gadus morhua*, L.) da Wermenstam e Pilstrom (2001), invece, hanno dimostrato che non è possibile ritrovare un numero rilevante di linfociti T nell'intestino di questo pesce impiegando probes per il *TcRβ*. Nell'intestino della spigola l'uso di una sonda *TcR* (Romano et al., 2003) ha evidenziato la presenza di rare cellule *TcRβ*-positive nella lamina propria intestinale, suggerendo l'ipotesi della predominanza dei linfociti *TcRγ/δ* nella mucosa, come nei Mammiferi.

Nell'intestino dei pesci sono state identificate diverse popolazioni di granulociti, neutrofili, eosinofili e basofili (Zapata, 1979; Temkin and McMillan, 1986; Rombout et al., 1989a), alcune delle quali sono coinvolte nelle reazioni infiammatorie in risposta a parassitosi, infezioni batteriche, virali o micotiche (Roberts, 1978; van Muiswinkel e Jagt, 1984). I neutrofili mediano le risposte infiammatorie acute (Hine, 1992), migrano nel sito d'infiammazione, hanno attività fagocitica (Ainsworth, 1992; Steinhagen and Jendrysek, 1994) e mostrano burst respiratorio e attività microbica (Verburg-van Kemenade et al., 1989). Le cellule granulari eosinofile (EGC), studiate nel tessuto intestinale dei salmonidi, pare svolgano un ruolo nei meccanismi di infiammazione e di difesa dell'ospite (Lamas et al., 1984; Bruno et al., 1985). Degranolazione e migrazione delle EGC intestinali sono state osservate in risposta a iniezioni da varie sostanze di origine batterica (Vallejo and Ellis, 1989; Lamas et al., 1991) e alcuni studi propongono che queste cellule siano coinvolte nel rilascio di istamina durante le risposte infiammatorie nella trota arcobaleno, quindi analoghe alle "mast cells" dei Mammiferi (Ellis, 1985; Vallejo e Ellis, 1989; Powell et al., 1991, 1993; Reite e Evensen, 1994; Reite, 1996). I granulociti basofili dei pesci somigliano nelle caratteristiche istologiche ai mastociti dei Mammiferi, ma non è ancora chiaro se tali cellule abbiano anche una funzione analoga nel rilascio di eparina ed istamina durante la degranolazione (Koumas-van Diepen et al., 1994a). Studi ontogenici al microscopio elettronico hanno rivelato che i linfociti compaiono nel tessuto mucosale associato all'intestino (GALT) dello zebrafish molto precocemente, a 8 giorni p.f. La natura di queste cellule non è ancora stata stabilita, ma si ritiene che nei Teleostei i linfociti intraepiteliali siano cellule T, mentre le cellule linfoidi che occupano la lamina propria siano in parte cellule B (Schroder et al., 1998; Danilova e Steiner, 2002; Rombout et al., 1993b; Abelli et al., 1997; Fournier-Betz et al., 2000). Danilova e Steiner (2002) hanno evidenziato, tramite l'ibridazione *in situ*, alcune cellule *TcRa* positive nell'esofago e nell'intestino di pesci zebra di 9 giorni p.f. Al contrario, Trede e colleghi (1990) non sono riusciti a trovare cellule T periferiche in pesci zebra prima delle 3 settimane di vita.

In carpa, è stato prodotto un anticorpo monoclonale (WCL38) che interagisce soprattutto con le cellule linfoidi della mucosa Ig^- (cellule putative T). Questo Ab reagisce con la maggior parte (circa il 60%) delle cellule linfoidi isolate dalle branchie, dall'intestino e dalla pelle di adulto e molto poco con quelle estratte dalla milza (2,1%) e dal timo (5,9%) (Rombout et al., 1998). Cellule $WCL38^+$ sono state individuate nell'epitelio dell'intestino a partire dal terzo giorno p.f. e ne è stato osservato un notevole aumento nell'intestino e nelle branchie nelle prime 5 settimane di sviluppo (Rombout et al., 2005). Il fatto che queste cellule compaiano negli organi mucosali prima che il timo sia popolato da timociti, e che siano molto abbondanti negli organi

mucosali a stadi così precoci dello sviluppo a portato gli autori ad ipotizzare una possibile origine extratimica di queste cellule (Rombout et al. 1998).

Per quanto concerne la trota, si ipotizza che le cellule che mostrano l'espressione di *rag* e di *TdT* nell'intestino siano omologhe delle cellule T TCR $\gamma\delta$ IEL (linfociti intraepiteliali) che si sviluppano al di fuori del timo (Hansen et al., 1997). È possibile che queste cellule, in stadi adulti, siano cellule "T" con funzione regolatrice del sistema immunitario acquisito, ma la loro funzione nel primo mese p.f. non è ancora chiara.

Nella spigola è stato utilizzato il Mab DLT15 per uno studio di immuno-istochimica: la comparsa delle cellule T e B nei diversi organi linfoidi di spigola è riportata in tabella 1. Le prime cellule T sono state individuate nell'intestino a 28 giorni p.f. (Picchietti et al., 1997). Questi risultati sono in accordo con le osservazioni precedenti (Abelli et al.1993), di conseguenza, è stato ipotizzato che l'intestino possa essere una sede alternativa di differenziamento per i linfociti T (Picchietti et al., 1997), come suggerito per i Mammiferi. Il confronto dei dati con quelli ottenuti in carpa risulta difficile a causa della notevole differenza nella velocità di sviluppo dovuta in parte alla differenza di temperatura, ma anche al fatto che non è ancora disponibile un set di markers per le cellule T di carpa. In entrambe le specie, comunque, le cellule T sono state evidenziate nell'intestino e nel timo prima che nella milza e nel rene.

Tabella 1: Comparsa (in giorni dopo la schiusa) delle cellule T e B nella spigola (16°C) e nella carpa (25°C); dati basati su studi di immunoistochimica (Rambouth et al., 2006).

Tissue	T cells (DLT15) sea bass	B cells (DLIg3) sea bass	Ig ⁻ lymphoid cells carp	B cells (WCI12) carp
Thymus	28 ± 2	90 ± 5	4 ^a	negligible
Head kidney	35 ± 5	45 ± 5	7 ^a	14
Spleen	45 ± 3	45 ± 3	7 ^a	14
Intestine	28 ± 2	90 ± 5	3 ^b	35

The sea bass data are based on ± 100 sections/organ, and in carp on immuno-histochemistry and flow cytometry.

^a Based on WCL9 (cortical thymocytes in adult carp).

^b Based on WCL38 (putative mucosal T cells).

Anatomia del tratto digerente dei Telostei in relazione al tipo di alimentazione

- Pesci con alimentazione a base di plancton: bocca piccola - denti mancanti o piccoli - filtro branchiale molto fine - intestino corto, senza stomaco e appendici piloriche.
- Pesci predatori: bocca grande - denti forti, appuntiti, presenti sia nelle mascelle che nella volta buccale - stomaco - appendici piloriche e intestino corto.
- Pesci con alimentazione a base di madrepora: mascelle corte e robuste trasformate a becco, tranciante - senza stomaco - intestino lungo - filtro branchiale grossolano e poco efficace.
- Pesci rovistatori di fango: bocca protrattile con bottoni gustativi che si estendono anche sui barbigli - denti mascellari microscopici - denti faringei ben sviluppati - filtro branchiale efficace - intestino più o meno lungo a seconda della presenza o meno delle appendici piloriche.
- Pesci erbivori: denti incisivi e faringei piccoli - filtri branchiali brevi - senza stomaco - intestino molto lungo.

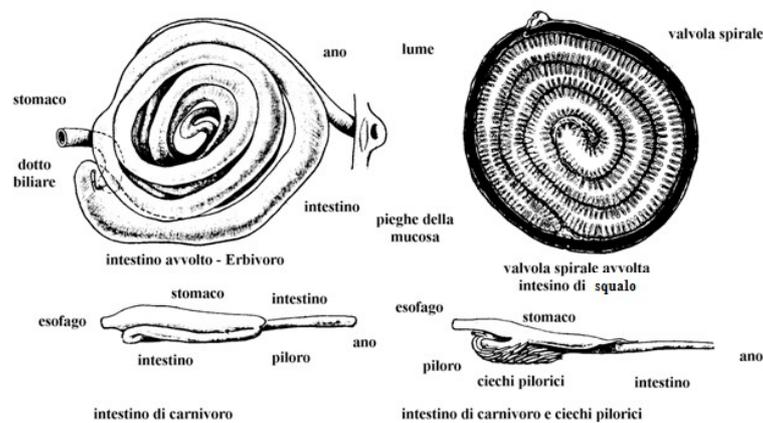


Figura 1: Variazioni dell'intestino in relazione al regime alimentare.

MISURE PREVENTIVE CONTRO LE PATOLOGIE INFETTIVE IN ACQUACOLTURA

Contrariamente ai vertebrati più evoluti la maggior parte delle specie di pesci vivono come organismi liberi già dalle prime fasi dello sviluppo embrionale. Vivendo in un ambiente acquatico devono possedere meccanismi di difesa per proteggersi dall'esposizione ad una grande varietà di microrganismi. È dato ampiamente accettato che nei pesci l'immunità acquisita non sia ancora funzionale al momento della schiusa. Di conseguenza, durante un periodo relativamente lungo della loro vita i pesci dipendono esclusivamente dal sistema immunitario innato e, se anche è stato dimostrato che questo meccanismo di difesa comincia a svilupparsi già in stadi embrionali molto precoci, le larve risultano particolarmente vulnerabili fino alla maturazione di un sistema immunitario completo. Negli ultimi 15 anni, inoltre, la produzione di pesci d'allevamento è più che raddoppiata spingendo gli allevatori ad incrementare la densità di animali nelle vasche, fatto che, inevitabilmente, comporta l'incremento dell'incidenza di patologie infettive, causa di considerevoli perdite di pesce allevato, specialmente delle larve e di individui in fase giovanile. I problemi nelle larve sono causati solitamente da batteri opportunistici che fanno parte della flora ambientale. La profilassi basata sull'isolamento sanitario è difficile da realizzare, in special modo in allevamenti in campo aperto. La terapia antibiotica era una strategia frequentemente usata nell'allevamento intensivo delle larve per mantenere elevati i tassi di produzione, ma che in molti casi poteva provocare un aumento della resistenza microbica, l'accumulo di residui nei tessuti e immuno-soppressione. Per ridurre i problemi ambientali e migliorare la qualità del prodotto il Parlamento Europeo ha, quindi, stabilito di bandire i chemioterapici in acquacoltura. La vaccinazione, anche se efficace in molti casi, richiede tempo, denaro e la protezione è spesso specifica per l'agente patogeno. Inoltre, l'immunità acquisita non è attiva nei pesci vaccinati prima di una certa età. Al contrario, la somministrazione di probiotici attiva il sistema immunitario in modo aspecifico incrementando, in maniera significativa, i parametri di immunità innata e adattativa (incremento leucocitario mucosale) e fornendo, così, resistenza contro una grande varietà di agenti patogeni; inoltre, tale immunità è attiva già negli stadi giovanili senza indurre un'evidente risposta infiammatoria. In particolare, la somministrazione dei ceppi batterici probiotici attraverso i mangimi costituisce un sistema sostenibile per la semplicità di utilizzo e la velocità di esecuzione e non causa stress nei pesci. Inoltre, la colonizzazione precoce dell'intestino con preparazioni batteriche benefiche può risultare una valida strategia per migliorare i processi di produzione.

L'utilizzo di ceppi batterici probiotici in specie ittiche d'allevamento

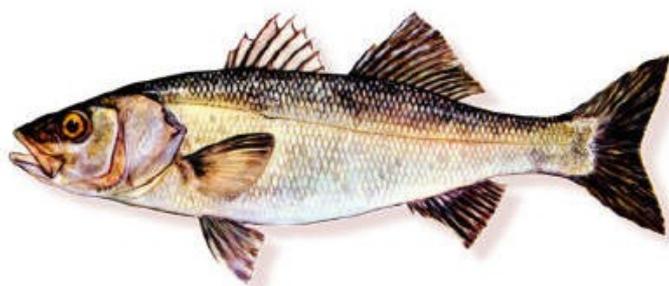
Vengono definiti probiotici quelle preparazioni di cellule batteriche in grado di migliorare la salute e il benessere dell'ospite (Fuller, 1989), probabilmente agendo attraverso diversi meccanismi d'azione (Duggan et al., 2002). L'uso di questi batteri benefici è materia di studio sia nell'uomo (Shiffrin e Blum, 2001) che negli animali allevati (Ewaschuk et al., 2004) con lo scopo di incrementarne l'utilizzo come valido strumento di protezione dalle infezioni. Inoltre, gli effetti benefici delle formulazioni probiotiche utilizzate per la salute umana possono essere potenziati combinando in una singola preparazione più ceppi o specie batteriche. È stato dimostrato come

le diverse specie o ceppi batterici utilizzati in queste formulazioni siano in grado di indurre più effetti benefici sulla salute dell'ospite agendo in maniera sinergica, tuttavia, i meccanismi che stanno alla base di tale fenomeno rimangono ancora da chiarire (Timmerman et al., 2004). Delle complicazioni potrebbero insorgere se i batteri utilizzati per le somministrazioni orali negli allevamenti ittici venissero introdotti vivi nell'ambiente. Per questo motivo è stato considerato l'utilizzo di batteri inattivati e, quindi, incapaci di interagire per lungo tempo con l'ambiente acquatico. Inoltre, alcuni autori hanno ridefinito il termine probiotico come supplemento microbico, non necessariamente vivo, in grado di indurre effetti benefici sulla salute dell'ospite (Naidu et al., 1999, Salminen et al., 1999).

Si può ragionevolmente ipotizzare che una formulazione con batteri non vitali possa non essere così efficace quanto quella che utilizza gli stessi batteri vivi, o che essa possa indurre una risposta diversa nell'ospite; pertanto, per affrontare tali questioni saranno necessari ulteriori studi. La somministrazione di ceppi probiotici unitamente alla dieta è sembrato uno strumento estremamente promettente per il controllo di focolai di patogeni negli allevamenti ittici. Molti autori hanno, infatti, documentato l'incremento della capacità di difendersi dai patogeni nei pesci alimentati con cibo arricchito con probiotici (Bly et al., 1997, Robertson et al., 2000, Spangard et al., 2001, Raida et al., 2003). Una maggiore protezione sembra essere raggiunta, tra le altre cose, attraverso la stimolazione della risposta immunitaria innata. Nei pesci, i probiotici agiscono modulando il sistema immunitario a livello sistemico (Irianto e Austin., 2002, Villamil et al., 2002, Nikoskelainen et al., 2003, Panigrahi et al., 2004, Salina et al., 2005, Diaz-Rosales et al., 2006) e pochi studi attualmente disponibili confermano una stimolazione anche delle difese immunitarie nell'intestino (Picchietti et al., 2007, Balcazar et al., 2006, Kim e Austin, 2006). La maggior parte degli studi sull'utilizzo di probiotici in acquacoltura sono stati incentrati sulla valutazione degli effetti della somministrazione di un unico batterio in una o più dosi, mentre la valutazione comparativa delle formulazioni probiotiche multi-ceppo e multispecifiche nei pesci è carente. Tra le questioni da risolvere c'è quella di dimostrare se la stimolazione del sistema immunitario indotta dalla somministrazione di formulazioni con due o più batteri risulti differente da quella promossa da una preparazione che ne utilizza uno soltanto. In tal senso è già stato dimostrato il potenziamento, a livello sistemico, dei parametri dell'immunità innata nell'orata (*Sparus aurata* L.) a seguito di somministrazione di ceppi probiotici vivi, *Lactobacillus delbrückii* ssp. *lactis* e *Bacillus subtilis*, impiegati singolarmente o come preparazione multispecie (Salina et al., 2005). Con lo scopo di approfondire le conoscenze a tal riguardo, nella presente tesi ho analizzato gli effetti della somministrazione (singola o combinata) di *Lactobacillus delbrückii* ssp. *lactis* e *Bacillus subtilis*, inattivati col calore, sul sistema immunitario dell'orata. Sono anche state fatte delle considerazioni sull'utilizzo in acquicoltura di formulazioni monospecie o multispecie e sull'impiego di ceppi vivi o inattivati.

BIOLOGIA DELLE SPECIE

Classe: Actinopterygii	SPIGOLA
Ord. PERCIFORMES	
Fam. Moronidae	
Gen. <i>Dicentrarchus</i>	

*Dicentrarchus labrax*

(Linneo, 1758)

Questo genere veniva generalmente incluso nella famiglia dei Serranidae. Comprende due specie, la spigola comune (*D. labrax*) e la spigola macchiata (*D. punctatus*). Le spigole hanno due pinne dorsali invece di una: la prima formata da raggi spinosi, la seconda di raggi molli (primo spinoso). Il corpo è oblungo, fianchi lievemente compressi, scaglie piccole. Presenti due pinne dorsali vicine, ma nettamente separate. La caudale, robusta, è incavata al centro, ma non forcuta. La testa è lunga con profilo lievemente discendente. Occhio medio. Bocca ampia con mandibola appena prominente. I denti sono molto piccoli e sottili e sono disposti sulle mascelle, sul vomere, sui palatini e sulla lingua. Due spine volte all'indietro sono nettamente visibili sull'opercolo, mentre il preopercolo ha il bordo posteriore dentellato e delle spinette sul bordo inferiore. Prevale la tinta argentea. Il dorso è grigio nerastro o piombo, il ventre bianco. Alcuni esemplari hanno riflessi giallo verdastro, specie sulle pinne e altri più scuri in cui il grigio piombo copre gran parte dei fianchi. Le differenze di colorazione sono in genere dovute ai diversi habitat. È un pesce robusto, vorace, che predilige le acque salmastre e che rimonta le acque dolci. È specie più gregaria da giovane e in acque tranquille. Gli esemplari grossi vanno più isolati o a coppie. Nelle acque costiere si spinge fino a bassissime profondità, specialmente nei periodi di mare mosso. Si nasconde nelle spaccature tra le rocce, insieme a cefali e saraghi. Si riproduce nei mesi invernali da gennaio a marzo. Le uova sono galleggianti e gli stadi larvali e giovanili si trovano nel plancton da febbraio a giugno. Sono voraci e prevalentemente carnivori. Preferisce piccoli gamberi e cefalopodi. Si cattura con le lenze, con gli sciabichelli, col tramaglio. Si alleva nelle valli salmastre, nelle lagune e in mare. Può superare il metro di lunghezza e il peso di 12 kg. È presente in tutto il Mediterraneo.

Classe: Actinopterygii	ORATA
Ord. PERCIFORMES	
Fam. Sparidae	
Gen. <i>Sparus</i>	

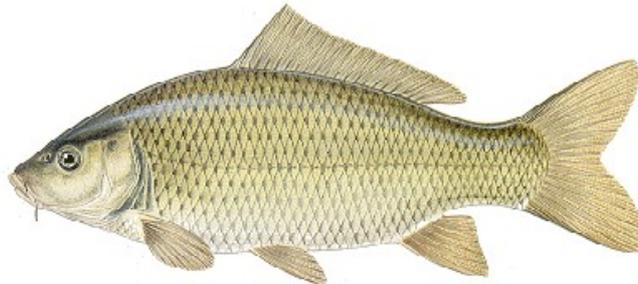


Sparus aurata

(Linneo, 1758)

Due specie sole si trovano nel Mediterraneo di cui una è molto comune (*Sparus auratus*) e l'altra molto rara (*Sparus chrysoblephus caeruleostictus*). Il corpo è ovale, compresso con testa corta e massiccia con bocca terminale inferiore (labbra spesse). Il profilo è tondeggiante con muso ottuso. Gote munite di squame. La mascella superiore è lievemente più avanti della mandibola e porta anteriormente due o tre paia di denti conici, seguiti da quattro a cinque file di denti molariformi tondeggianti. Nella mandibola vi è lo stesso numero di denti conici e robusti, seguiti soltanto da tre o quattro serie di molari. Vi è una sola dorsale con undici raggi spinosi che si possono ripiegare e nascondere in un solco del dorso. La colorazione presenta la caratteristica fascia dorata sul muso che unisce i due occhi e quella nera all'origine della linea laterale. Un'altra macchia scarlatta è al margine dell'opercolo. Quella del corpo varia più o meno secondo la grandezza dell'esemplare. Nella pinna dorsale, che è azzurrastra, può esserci una fascia longitudinale scura. È un pesce costiero e vive in mare soprattutto nelle praterie litorali fino ad una profondità che non supera i 30 metri. In primavera entra negli stagni costieri salmastri, in cui resta per tutta l'estate. In autunno ritorna in mare per riprodursi. Ha abitudini gregarie e i branchi sono formati da individui di diverse taglie, guidati dall'esemplare più grosso. È un pesce sensibile alle basse temperature. Quelli che entrano nelle lagune venete se ai primi freddi non riescono a tornare al mare, o si infilano nel fango delle zone più profonde oppure muoiono. Si riproducono nei mesi da ottobre a dicembre. Questa specie è ermafrodita. Si nutre essenzialmente di molluschi ed anche di crostacei. La pesca delle oratelle si fa nelle lagune salmastre e negli stagni costieri, nei lavorieri o con le reti di circuizione e sciabichelli. In mare si pesca con i tramagli, con i palangresi galleggianti ed con la rete a strascico nelle zone sabbiose vicino a terra. Può raggiungere i 70 cm e un peso oltre i cinque chili. È comune in tutto il Mediterraneo.

Classe: Actinopterygii	CARPA
Ord. CIPRINIFORMES	
Fam. Cyprinidae	
Gen. <i>Cyprinus</i>	



Cyprinus carpio

(Linneo, 1758)

Il genere *Cyprinus* comprende la sola specie *C. carpio*. La carpa è indigena in parte dell'Europa orientale e nell'Asia ma, essendo allevata da secoli, si è diffusa e acclimatata nelle aree temperate di tutti i continenti, tanto da essere attualmente uno dei pesci d'acqua dolce maggiormente diffusi. La carpa è un pesce dal corpo piuttosto tozzo, molto sviluppato in altezza, soprattutto nei soggetti provenienti da allevamento. La testa e la caratteristica bocca a soffiutto risultano piuttosto piccole rispetto alle dimensioni del corpo. Il corpo è rivestito da robuste squame circolari, che possono mancare in alcuni esemplari della cosiddetta varietà "cuoio", o essere presenti solo in piccoli gruppi nel fenotipo "a specchi". La colorazione è bruno verdastro sui fianchi mentre giallognola o addirittura bianca sul ventre. Le pinne sono bruno-grigiastre e talvolta presentano sfumature rossastre. Il dimorfismo sessuale è presente soltanto nella stagione degli amori, quando sul capo e sulle pinne pettorali dei maschi compaiono caratteristici tubercoli nuziali. Normalmente la specie è lunga 40-50 cm ma eccezionalmente può raggiungere anche i 130 cm con un peso di 30 Kg (Muus e Dahlstrom, 1967). Solitamente le femmine sono di taglia superiore ai maschi. La carpa predilige le acque stagnanti, calde e profonde, con fondali fangosi e ricchi di vegetazione. Si trova pertanto nel tratto inferiore dei fiumi, nei laghi, negli stagni e talvolta anche nelle risaie, essendo in grado di sopportare basse concentrazioni di ossigeno. Solitamente le popolazioni tendono ad essere localizzate e, soprattutto nella fase giovanile, gli individui preferiscono la vita di gruppo. La specie è assai longeva e può raggiungere anche i 30 anni di età. Si è visto che le femmine raggiungono età più avanzate rispetto ai maschi, tanto che alcuni Autori ipotizzano fenomeni di inversione sessuale, che porterebbero alla comparsa di organi sessuali femminili nei maschi di una certa età e che potrebbero spiegare il rapporto sessi sbilanciato a favore delle femmine nei soggetti più anziani. In realtà non esistono conferme precise di questo fenomeno (Gandolfi et al., 1991). Tra il secondo e il quarto anno di età la carpa è in grado di riprodursi e nei mesi tardo primaverili le femmine, molto feconde, depongono migliaia di uova (100.000-200.000 uova per Kg di peso

corporeo) nei pressi delle rive su tappeti di vegetazione sommersa. È sul fondo che ricerca attivamente, aiutata dai quattro barbigli che sporgono dalla bocca, i piccoli invertebrati di cui si nutre, integrandoli spesso con frammenti di piante acquatiche e detriti vegetali.

MATERIALI E METODI

CARATTERIZZAZIONE DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE DELL'INTESTINO DELLA SPIGOLA

Per le analisi immunostochimiche atte ad individuare e caratterizzare le popolazioni CD3e⁺, DLT15⁺ e DLIg3⁺ nell'intestino, sono state usate spigole di 230 giorni e del peso di circa 12 grammi. I pesci sono stati ospitati presso l'allevamento ittico "Valle Del Lovo" di Carlinò (Udine) in vasche di vetroresina circolari alimentate con acqua corrente (ricambio 500 l/h; salinità 20-28 ‰; temperatura media attorno ai 21 °C con ovvie fluttuazioni stagionali) e alimentati con mangime secco commerciale (Skretting, Perla Plus) all'1,5-2% del peso vivo/giorno. Gli animali sono stati uccisi con una dose letale di fenossietanolo (SIGMA-ALDRICH), fissati in toto in Bouin a 4°C per 24 ore e poi trasferiti in etanolo 80%. Gli intestini sono quindi stati prelevati, disidratati, inclusi in Paraplast (FLUKA) e tagliati in sezioni seriali dello spessore di 7 µm. I campioni così ottenuti sono stati poi utilizzati per l'istologia e l'immunostochimica.

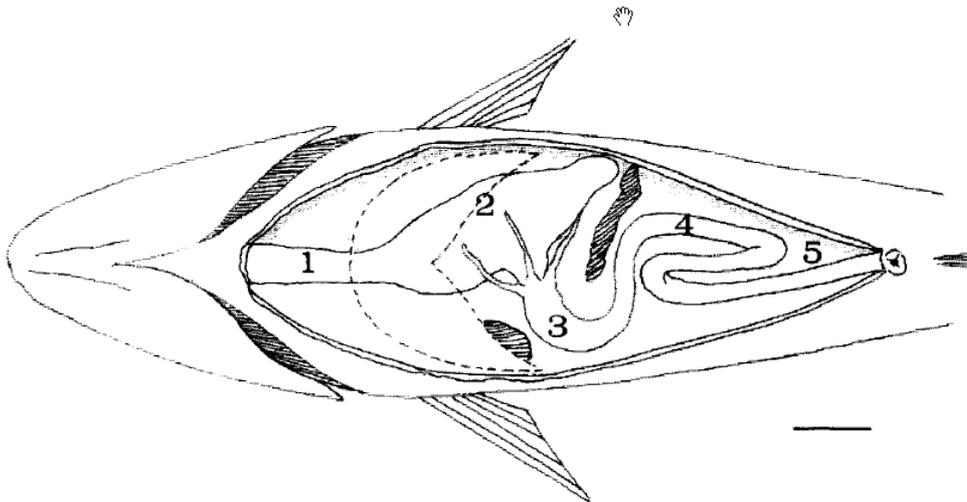


Figura 1: Schema dell'apparato digerente della spigola (*Dicentrarchus labrax L.*) (visione ventrale). Le aree campionate per l'istologia e l'immunostochimica sono numerate come segue: 1-2, porzioni anteriore e cecale dello stomaco, 3-5, tratto anteriore, medio e posteriore dell'intestino. La linea tratteggiata mostra la posizione occupata dal fegato, mentre la cistifellea e la milza sono state colorate con linee nere trasversali. Barra=1cm.

Antisieri

Gli anticorpi DLT15 e DLig3, sono stati prodotti e caratterizzati presso i laboratori di Zoologia e di Anatomia comparata del Dip. di Scienze Ambientali dell'Università della Tuscia -VT- (Scapigliati et al., 1995; 1996).

L'anticorpo monoclonale (Mab) **DLT15** è stato ottenuto immunizzando topi Balb/c con timociti di spigole di un anno di età fissati in paraformaldeide. Gli ibridomi di coltura sono stati selezionati mediante IIF e analisi al FACS di cellule vive e fissate. L'ibridoma che ha presentato la migliore colorazione è stato clonato per diluizioni limite, nuovamente sottoposto a screening e chiamato DLT15. Il controllo dell'isotipo IgG ne ha determinato l'appartenenza alla sottoclasse IgG₃.

Il Mab **DLig3** è stato ottenuto immunizzando topi con immunoglobuline sieriche di spigola preventivamente purificate tramite cromatografia d'affinità su colonna di proteina A-sefariosio. Gli ibridomi di coltura sono stati selezionati mediante dot-blot, IIF ed immunistochemica su sezioni di tessuti fissati in Bouin. L'ibridoma che ha mostrato la colorazione più forte è stato clonato per diluizione limite, selezionato di nuovo tramite dot-blot e chiamato DLig3. L'analisi in Western blot ha mostrato che DLig3 riconosce debolmente la catena leggera delle IgM di spigola. L'isotipizzazione del Mab ha mostrato che DLig3 appartiene alla sottoclasse delle IgG₁.

L'anticorpo policlonale di coniglio **anti-CD3ε** (A0452 DAKO) è stato prodotto contro il peptide sintetico umano CD3 (156-168 aminoacidi della catena epsilon del CD3). L'anticorpo reagisce con la porzione intracitoplasmatica dell'antigene CD3ε espresso dalle cellule della linea T. Il CD3 si compone di cinque catene polipeptidiche (gamma, delta, epsilon, zeta ed eta) con pesi molecolari che vanno da 16 a 28 kDa. L'antigene CD3 nei mammiferi, è rilevabile nei primissimi stadi del differenziamento dei timociti e probabilmente la sua espressione rappresenta uno delle prime tappe del differenziamento delle cellule della linea T. Nei timociti corticali umani l'antigene presenta una localizzazione prevalentemente intracitoplasmatica. Compare solo successivamente (in fase di timocita midollare) sulla superficie delle cellule T. Molti studi hanno dimostrato che il CD3 risulta essere un marcatore specifico per le cellule T. Non è conosciuta nessuna altra tipologia cellulare che esprima l'antigene CD3, eccezion fatta per le cellule del Purkinje del cervelletto. È stata documentata la cross-reattività dell'anticorpo in molte specie fra le quali numerosi mammiferi (cane, gatto, cavallo, maiale, capra, topo) ma anche teleostei tra i quali (trota, carpa, spigola, salmone, fugu, passera giapponese).

Istologia

I tessuti sono stati fissati in liquido di Bouin per 7 ore a 4° C, trasferiti in etanolo 80%, disidratati in serie crescente di alcool e fissati in Paraplast (Fluka, Buchs, Switzerland). Sezioni consecutive (5-7 µm) sono state colorate con Ematossilina/Eosina, May-Grünwald/Giemsa secondo Pappenheim e Tricromica di Mallory per l'istologia generale, con Feulgen per il DNA nucleare, con Verde Metile-Pironina secondo Unna-Pappenheim per analisi differenziale di DNA e RNA. La colorazione dell'RNA è stata controllata preincubando sezioni adiacenti per 1 ora a 65° C con RNAsi (0,001% in acqua distillata, pH 6.8). Altre sezioni sono state trattate con Alcian blue (pH 2) o PAS per colorare i mucopolissaccaridi acidi e i carboidrati, rispettivamente. Quest'ultima colorazione è stata verificata mediante preincubazione di sezioni adiacenti per 25 min a 37° C con α-amilasi prima della PAS o omettendo l'ossidazione con acido periodico.

Immunoistochimica

L'immunoistochimica è stata effettuata come descritto da Abelli et al. (1996a). Sezioni consecutive di 7 µm sono state incubate per 18 ore a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi: DLT15 (anticorpo monoclonale di topo diluito 1:10 in PBS contenente 5% di siero normale di cavallo, 5% di siero normale di spigola e 0,1% di sodio azide); DLlg3 (anticorpo monoclonale di topo utilizzato puro); antiCD3ε (anticorpo policlonale di coniglio diluito 1:10 in PBS contenente 5% di siero normale di capra, 5% di siero normale di spigola e 0,1% di sodio azide) e Pab OR1 (anticorpo policlonale di coniglio diluito 1:1000 in PBS contenente 5% di siero normale di capra e 0,1% di sodio azide). Il controllo negativo è stato effettuato omettendo gli anticorpi primari, o sostituendo gli stessi con siero normale di topo (o coniglio). Dopo sciacqui in PBS le sezioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con siero di cavallo (o capra) biotinilato anti Ig-G di topo (o coniglio) (Vector Labs., Burlingame USA), diluiti 1:1000 con PBS contenente sodiazide 0,1% e BSA 1%. Successivamente sottoposte ad un nuovo periodo di incubazione di 1 ora con il complesso ABC (Vectastain Elite, Vector) con le soluzioni di avidina e perossidasi di rafano biotinilate diluite 1:1000 in TBS 0.05, pH 7,6. Dopo sciacqui in TBS, sono state incubate per 5 minuti in Tris 0.05 M contenente Nickel ammonio solfato 0,4%, diamminobenzidina 0.02% e H₂O₂ 0.015%. Dopo lavaggio in Tris, le sezioni sono state disidratate, montate ed esaminate al microscopio ottico.

Analisi d'immagine

In ciascun campione, serie multiple di sezioni consecutive sono state immunomarcate con i differenti anticorpi o colorate con la colorazione istologica di May-Grünwald/Giemsa per riconoscere i granulociti eosinofili. La conta delle cellule immunoreattive e di quelle evidenziate dalla colorazione istologica (solo nucleate, superficie cellulare compresa fra 4 e 100 µm²) è stata effettuata da un operatore ignaro del trattamento su aree di tessuto di 1 mm². Il numero di cellule positive è stato calcolato facendo la media tra il numero di cellule osservate in ciascun esemplare. Le misure dei diametri cellulari (asse maggiore) sono state raccolte su cinque esemplari e poi aggregate.

Le immagini sono state acquisite per mezzo di un sistema di analisi computerizzato. Esso include un microscopio da ricerca Nikon Eclipse E600 equipaggiato con videocamera digitale DS-5M con possibilità di acquisizione live, unità di controllo DS-L1 interfacciata da PC. Il pacchetto software comprende il Programma Lucia G 4.81 (Laboratory Imaging Ltd., Praha, Hostivar); l'immagine acquisita può essere elaborata ed analizzata con le funzioni di seguito elencate.

Operazioni Morfologiche

Le immagini possono essere processate da filtri di tipo avanzato ed è possibile effettuare il controllo dei contrasti e dei valori della distribuzione del colore (RGB). È possibile effettuare il confronto tra immagini archiviate e dal vivo.

Misure

Le misure possono essere effettuate in modalità manuale e/o automatica. Nel caso della modalità automatica si immettono soglie che consentono di identificare e valutare in automatico le strutture da quantificare. La soglia

può essere elaborata mediante operazioni binarie di editing e fattori di restrizione. Le misure offerte sia nella modalità automatica che manuale sono le seguenti: Aree, Perimetri, Lunghezze, Min e Max di Feret, DOI Fattori di forma. Sono offerte anche misure densitometriche. Sull'immagine è possibile lavorare su ROI personalizzate. I dati delle misure (sia manuali che automatiche) vengono memorizzate in files che il sistema può rielaborare statisticamente o può memorizzare su files da gestire con altri programmi.

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati espressi come media \pm deviazione standard. Per le analisi statistiche è stato utilizzato il pacchetto software GraphPad Prism 3.0. Per determinare l'effetto del trattamento si è usata l'analisi ANOVA ad una via seguita dal test di comparazione multipla di Dunnett o Tukey (quando possibile), per mettere in evidenza differenze esistenti rispetto al controllo o fra ogni singolo gruppo. In tutti gli esperimenti le differenze sono state considerate significative quando $P < 0,05$.

SPERIMENTAZIONE CITOTOSSICITA' CELLULO-MEDIATA

La sperimentazione mirata all'indagine della citotossicità cellulo-mediata (CMC) nella carpa comune (*Cyprinus carpio L.*) e nella spigola (*Dicentrarchus labrax L.*) ha permesso per la prima volta di valutarne l'entità utilizzando linfociti prelevati dagli organi linfoidi come effettori e cellule allo e xenogeniche come bersagli. Per acquisire maggiori informazioni possibili sono state effettuate anche delle immunizzazioni con queste cellule eterologhe. Gli esperimenti compiuti con pesci non immunizzati, hanno mirato a valutare la risposta CMC non-specifica, mentre quelli con pesci immunizzati, l'eventuale incremento di citotossicità dovuto alla comparsa di CMC specifica. Sono state utilizzate cellule di natura allogenica (DLEC per la spigola, linea continua embrionale; EPC per la carpa, linea cellulare di Epithelioma *papulosum* cyprini) e xenogenica (K562 per entrambe le specie, cellule di una linea leucemica umana) con lo scopo di discriminare rispettivamente la CMC MHC-restricted da quella MHC non-restricted. Le cellule allogeniche presentano infatti sulla loro superficie di membrana antigeni non-self mediante l'MHC di classe I che in questo modo possono essere riconosciuti dai recettori dei linfociti T citotossici (TCR $\alpha\beta$ CD8⁺ responsabili della CMC specifica). Le cellule xenogeniche K562 non esprimono invece sulla loro superficie cellulare MHC di classe I e vengono per questo usate nei mammiferi come target d'élite per valutare la risposta CMC delle NK (NCC e NK-like dei pesci responsabili della risposta non-specifica). La mancanza o la non compatibilità dell'MHC di classe I con i recettori delle NK (KIR) sembra essere nei mammiferi responsabile dell'attivazione della risposta citotossica.

Disegno sperimentale

La sperimentazione sulla carpa è stata interamente svolta durante il periodo di stage presso l'Università di Wageningen in Olanda, tra ottobre 2006 e marzo 2007. Quella sulla spigola si è attuata in parte durante lo stesso soggiorno olandese in parte all'Università degli Studi di Ferrara, una volta allestito lo stabulario dipartimentale. Le carpe di 6-12 mesi, linea R3R8 del peso di circa 250 grammi sono state allevate nell'impianto "De Haar vissen", tenute ad una temperatura costante di $23 \pm 0,5$ °C in vasche a ricircolo con acqua dolce filtrata e sterilizzata mediante UV e alimentate con cibo in pellet (Trouvit, Trouw nederland BV, Putten, The Netherlands) con razione giornaliera pari al 2% del peso vivo. Prima di iniziare ogni trattamento le carpe sono state anestetizzate con tricaina-metano-sulfonato (MS-222; allo 0,03%; Crescent Research Chemicals, Phoenix, AZ, U.S.A.). Le spigole sono state allevate nello stesso impianto in vasche a ricircolo d'acqua salata proveniente dal mare, filtrata e sterilizzata mediante trattamento UV. Le condizioni di temperatura e di fotoperiodo (12 ore di luce, 12 di buio) sono state le medesime che per le carpe. Gli animali utilizzati per la sperimentazione avevano un'età di circa un anno e peso tra i 250 e i 350 grammi e sono stati alimentati con cibo in pellet (INVE, Belgium) con razione giornaliera pari al 2% del peso corporeo. Le spigole necessarie per la sperimentazione in Italia sono state invece prelevate in due volte (25 esemplari ciascuna) dall'allevamento Ittico sperimentale della regione Veneto Agricoltura "Bonello" di Porto Tolle (RO) ed acclimatate per almeno tre settimane nello stabulario dipartimentale dell'Università degli Studi di Ferrara, sezione Anatomia Comparata. Gli esperimenti sono stati compiuti tra ottobre 2008 e gennaio 2009. Il fotoperiodo è stato quello naturale e la temperatura dell'acqua non è stata influenzata artificialmente, oscillando quindi tra i 13 e i 18°C. I pesci avevano un'età di circa un anno e

peso attorno ai 200 grammi ($201,5 \pm 55,1$ g, $N=50$). Sono stati alimentati con cibo in pellet (INVE, Belgium) con razione giornaliera pari al 2% del peso corporeo fino a quando non hanno iniziato il naturale periodo di digiuno invernale (da metà novembre a fine gennaio). Prima di ogni trattamento le spigole sono state anestetizzate con fenossietanolo (SIGMA-ALDRICH).

Le informazioni riguardanti la risposta CMC della carpa contro il target allogenico (EPC) prima e a seguito d'immunizzazione sono state prodotte da un gruppo di ricercatori olandesi dell'Università di Wageningen e in parte già state pubblicate (Companjen et al., 2006). Gli esperimenti per valutare la risposta CMC nella carpa contro target di natura xenogenica (K562) sono stati parte del lavoro di questa tesi. Il protocollo d'immunizzazione è stato ripreso da un lavoro pubblicato da Sato e Somamoto (2005), nel quale se ne dimostrava l'efficacia nell'indurre una risposta citotossica specifica contro target allogenico in organi quali rene e milza. La sperimentazione ha previsto l'allestimento di tre gruppi sperimentali di quattro individui ciascuno. Per ogni gruppo si sono effettuate le seguenti immunizzazioni: (I) iniezione intraperitoneale di una sospensione di 5×10^6 cellule in 0,2 ml di PBS sterile; (II) somministrazione anale di una sospensione di 5×10^6 cellule in 0,2 ml di PBS sterile tramite un tubicino da catetere (lunghezza 7 cm, diametro 1 mm) attaccato ad una siringa da 1 ml; (III) immunizzazione anale con lo stesso numero di cellule e via di somministrazione ma, utilizzando un lisato cellulare ottenuto mediante trattamento termico (15 minuti a -80 °C e 20 minuti a 37 °C); (IV) immunizzazione anale e intraperitoneale con 0,2 ml di PBS sterile per i controlli. L'avvenuta lisi cellulare a seguito del trattamento termico è stata confermata al microscopio ottico prima di procedere con la somministrazione. Per impedire che la sostanza immunogena venisse espulsa dall'intestino immediatamente dopo la somministrazione le siringe sono state riempite con della vaselina che, introdotta per un cm nella parte terminale dell'intestino ha svolto la funzione di tappo temporaneo, rimosso spontaneamente dall'animale dopo qualche ora. Per il riconoscimento dei pesci all'interno di ogni gruppo e quindi del tipo di immunizzazione effettuata, si è deciso di tagliare un piccolo lembo della pinna caudale o dorsale. Il protocollo ha previsto per ogni animale di ogni gruppo un richiamo dopo 10 giorni esattamente uguale per dose e via di somministrazione alla prima immunizzazione. Trascorsi 4 giorni dal richiamo si è proceduto al prelievo degli organi e alla valutazione della risposta CMC contro le cellule utilizzate come immunogeno. Negli esemplari immunizzati si sono prelevati per il saggio di citotossicità il rene cefalico, la milza e l'intestino. Tutti gli esemplari di uno stesso gruppo sono stati analizzati nella stessa giornata. Per valutare la risposta CMC non-specifica contro le K562 dei linfociti estratti anche da organi quali timo, branchie e sangue periferico oltre a rene cefalico, milza e intestino sono state sacrificate 5 carpe appartenenti allo stesso stock di quelle dei gruppi sperimentali. La citotossicità di queste ultime è risultata sovrapponibile a quella degli individui di controllo dei tre gruppi sperimentali, indicando che lo stress indotto dalla tecnica di somministrazione non ha modificato i valori di CMC.

Per valutare la risposta CMC nella spigola contro target xenogenico (K562) è stato volutamente mantenuto lo stesso protocollo sperimentale usato per la carpa. Questo è stato fatto per fare emergere delle potenziali differenze tra le due specie e perchè ad oggi non esiste per la spigola un protocollo d'immunizzazione che preveda la somministrazione di immunogeni per via anale. Si è deciso però di eliminare l'immunizzazione anale con cellule vive perchè si è visto nella carpa risultare meno efficace di quella anale con il lisato cellulare. Tutti gli individui dello stesso gruppo sperimentale hanno subito la stessa immunizzazione evitando quindi il taglio delle pinne per il riconoscimento degli animali. Anche nel caso della spigola sono stati sacrificati 5 esemplari per

valutare la risposta CMC non-specifica dei linfociti del timo, delle branchie e del sangue periferico, oltre a quelli del rene cefalico, della milza e dell'intestino già misurata nei controlli dei gruppi sperimentali.

Contro target allogeneico (DLEC) è stata valutata solamente la risposta CMC non-specifica dei linfociti di tre esemplari estratti da rene cefalico, milza e intestino. Non è stato possibile effettuare le immunizzazioni con le cellule di natura allogeneica perchè non si è riusciti ad averne in numero sufficiente (crescita molto lenta) e perchè è sembrato opportuno rivedere dosi e tempi di somministrazione una volta analizzati i risultati dell'immunizzazione con il target xenogenico (K562).

Isolamento dei linfociti e valutazione della CMC

Gli animali sono stati dissanguati subito dopo essere stati uccisi con una dose letale di anestetico. Il sangue prelevato è stato versato in un tubo da centrifuga, diluito con medium di coltura RPMI-1640 (GIBCO) addizionato con 10 UI/ml di eparina (SIGMA-ALDRICH) e centrifugato per 10 minuti a 1800 rpm. Importante precisare che l'RPMI-1640 commerciale ha un'osmolarità di 280 mOs/Kg e quindi compatibile con quella del plasma della carpa (pesce d'acqua dolce) ma non con quella della spigola (pesce di mare). Per le cellule di quest'ultima è stato necessario quindi aggiungere all'RPMI-1640 del PBS 10X sterile fino ad ottenere una osmolarità di 350-360 mOs/Kg.

Sono stati prelevati gli organi d'interesse per la sperimentazione: timo destro e sinistro, rene cefalico, milza, branchie e intestino. Quest'ultimo, comprendente il tratto anteriore, medio e posteriore, è stato messo in un disco Petri e lavato ripetutamente con medium di coltura a 4°C per eliminare l'eccesso di muco e i residui di cibo. L'intestino è stato poi tagliato ulteriormente in segmenti di due tre cm e aperto con taglio longitudinale con l'aiuto di una forbice da dissezione. I linfociti sono stati isolati dalla mucosa intestinale senza trattamenti chimici o enzimatici ma, grattando meccanicamente il tessuto con un rascietto per colture cellulari. In questo modo si sono riuscite a prelevare la maggior parte delle cellule della mucosa intestinale mantenendone molto elevata la vitalità (Salinas et al., 2007). Gli organi prelevati sono quindi stati fatti passare attraverso in un cestello sterile con porosità 100 µm (BD FALCON, Bedford, MA) schiacciando il tessuto con l'aiuto dello stantuffo di una siringa e lavando spesso il cestello con del medium di coltura. La sospensione così ottenuta è stata portata ad un volume di 40 ml con medium-eparina e centrifugata per 10 minuti a 2800 rpm. Dal pellet di cellule formatosi dopo la centrifugazione del sangue è stato prelevato lo strato biancastro sopra agli eritrociti e quest'ultimo risospeso in un volume di 2 ml di medium. Anche il pellet ottenuto dalla centrifugazione della sospensione di cellule estratte dagli organi è stato risospeso in 2 ml di medium. A questo punto, i linfociti sono stati purificati mediante gradiente discontinuo di Percoll. Il gradiente è stato realizzato aggiungendo (molto delicatamente mediante una pipetta Pasteur) ai 2 ml di sospensione cellulare, soluzioni standard di Percoll a densità crescente. Per gli esperimenti sono stati aggiunti ai 2 ml di sospensione cellulare 4 ml di soluzione di Percoll con densità 1,02g/ml e 4 ml di soluzione 1,06 g/ml in un tubo da centrifuga da 14 ml. Il tutto è stato poi centrifugato per 30 minuti a 2000 rpm a 4°C. Le cellule nell'interfase 1,02-1,06 g/ml, costituite per più del 90% da linfociti (valutazione morfologica al FACS), sono state raccolte e lavate per rimuovere il Percoll residuo (due centrifugazioni di 10 minuti ciascuna a 2000 rpm a 4 °C). Dopo l'ultimo lavaggio i linfociti sono stati risospesi in 1 ml di RPMI, contati in una camera di Burkert e portati ad una concentrazione di 1×10^7 cellule/ml per essere

utilizzati come effettori nel saggio di citotossicità. Le cellule bersaglio sono state invece portate ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/ml. Le K562, che sono cellule in sospensione, sono state semplicemente prelevate assieme al medium dalla fiasca di cultura, centrifugate, risospese in 1 ml di RPMI, contate e diluite. Le DLEC e le EPC, che sono invece cellule aderenti, sono state lavate in PBS, incubate per 20 minuti in PBS contenente 0,025% di tripsina (SIGMA-ALDRICH) e 0,1% EDTA (MERK, Darmstadt, Germany) quindi l'enzima è stato inattivato aggiungendo una soluzione al 20% FCS in PBS. Le cellule ora in sospensione sono state lavate per due volte in RPMI (2000 rpm 4 minuti a 4°C), contate e portate alla concentrazione finale di 1×10^6 cellule/ml.

A questo punto cellule effettrici e target sono state mischiate nei giusti rapporti nei pozzetti di piastre ELISA da 96 e messe in incubatore per 4 ore alla stessa temperatura nella quale si trovavano i pesci nelle vasche. Trascorse le quali, la risposta citotossica è stata valutata misurando il rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) dalle cellule target lisate usando il KIT PROMEGA CYTOTOX 96® (PROMEGA, Madison, WI) seguendo le istruzioni del produttore.

Le cellule bersaglio

Per le diverse sperimentazioni sono state coltivate e utilizzate le seguenti tipologie cellulari: K562, EPC, DLEC che descriverò in breve.

K562 o **K-562**: Mieloblasti leucemici, stabiliti da effusione pleurale di una donna di 53 anni con leucemia mieloide cronica (MCL) in crisi blastica e contenenti il cromosoma Philadelphia con un gene di fusione BCR-ABL b3-a2. Crescono in sospensione, in mezzo RPMI-1640 (BRL Gibco, Life Technologies, Rockville, MD, USA) 90%, FBS 10%, 100 UI/ml penicillina e 100 µg/ml streptomina, 25 mM HEPES, fino ad una densità massima di $1-1.5 \times 10^6$ cellule/ml, a 37°C, con CO₂ 5%. Questa linea cellulare è frequentemente usata come bersaglio altamente sensibile per i saggi sull'attività citotossica non-specifica delle NK, in quanto non esprime molecole dell'MHC di classe I e questo impedisce che venga inibita l'attività citotossica delle NK mediata dall'interazione MHC classe I/KIR. Le K562 rappresentano la prima linea umana mieloblastica leucemica (stabilita nel 1970) e per questo vengono spesso usate come linea cellulare di riferimento (Lozzio et al., 1975, Andersson et al., 1979).

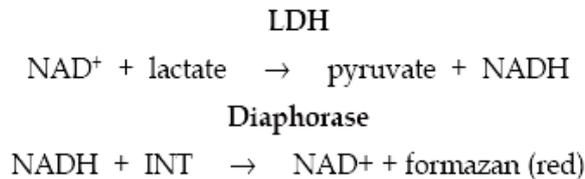
EPC (Epithelioma papulosum cyprini) linea cellulare derivata dall'epidermide della carpa comune (Fijan et al., 1983). Le cellule sono state cresciute come coltura aderente nello stesso medium ricostituito usato per le K562 (vedi sopra) in incubatori mantenuti a temperatura costante di 26°C, CO₂ 5%, umidità 95%.

DLEC: rappresenta la prima linea cellulare aderente continua embrionale sviluppata in un pesce (*Dicentrarchus labrax L.*) (Buonocore et al., 2006). È stata ottenuta mettendo in coltura per 8 settimane (in RPMI-1640 con 5% FCS e 10% di supernatante dell'omogenato embrionale) le cellule derivate dall'omogeneizzazione di 1000 embrioni di 12 ore di vita. Dopo questo periodo le cellule sono state messe in terreno Liebovitz's L15 (SIGMA-ALDRICH) addizionato con 10% FCS e 2M NaCl, 355 mOsm/Kg dove hanno iniziato a proliferare. Le cellule così ottenute sono state coltivate fino al cinquantesimo passaggio a 18 °C (temperatura ottimale per gli embrioni) senza aver mostrato evidenti cambi nella morfologia, risultata simile a quella dei fibroblasti. Le DLEC

utilizzate per gli esperimenti sulla CMC contro target allogenico nella spigola mi sono state gentilmente fornite dal Prof. Giuseppe Scapigliati dell'Università della Tuscia di Viterbo.

PROMEGA CYTO TOX 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay

Il CytoTox 96® è un saggio di citotossicità colorimetrico alternativo a quello che utilizza il Cr⁵¹ radioattivo. Questo test misura la quantità di lattato deidrogenasi (LDH), uno enzima presente stabilmente nel citoplasma, che viene liberata in seguito a lisi cellulare. La quantificazione dell'LDH presente nel supernatante viene fatta mediante un test della durata di 30 minuti che utilizza due enzimi accoppiati e che ha come risultato la conversione di un sale di tetrazolio incolore (INT) in un sale di formazano rosso cupo. L'intensità di colorazione che si genera è direttamente proporzionale al numero di cellule lisate. I dati d'assorbanza, per l'unghezza d'onda nel campo del visibile (492 nm), vengono misurati con un lettore di micropiastre standard (MULTISKAN EX THERMO) . Metodi per la quantificazione dell'LDH che utilizzano i sali di tetrazolio congiuntamente all'enzima diaphorase o ad un altro accettore d'elettroni sono stati comunemente utilizzati per molti anni (Nachlas et al., 1960). E' stato documentato come l'uso di questa tecnica per la misurazione della citotossicità naturale abbia prodotto risultati identici (tolto l'errore sperimentale) a quelli ottenuti in parallelo con il test di rilascio del Cr⁵¹ (Korzeniewski e Callewaert., 1983; Decker e Lohmann-Matthes., 1988). Il saggio può essere usato per misurare l'integrità delle membrane nei test di citotossicità cellulo-mediata, o per valutare la lisi di cellule bersaglio indotta da batteri, virus, proteine, prodotti chimici, ecc.

Schema della reazione:***Allestimento piastra ELISA per il test di citotossicità***

Per eseguire correttamente il CytoTox 96® devono essere valutati attentamente tutti i seguenti parametri.

Rilascio spontaneo di LDH da parte delle cellule effettrici: l'LDH è presente in quasi tutte le cellule dell'organismo (sia dei mammiferi che dei pesci) e quindi anche nei linfociti. Shock termici e osmotici come anche stress meccanici indotti dalla tecnica d'estrazione possono danneggiare le membrane di alcune cellule che morendo, liberano l'enzima nel medium. Per evitare che LDH liberato da queste cellule venga erroneamente interpretato come CMC, devono essere allestiti pozzetti in triplicato o quadruplicato per ogni concentrazione dell'effettore, in modo da valutarne l'entità. In questi pozzetti verranno quindi aggiunte solamente le cellule effettrici, diluite nello stesso volume di medium dei pozzetti sperimentali.

Rilascio spontaneo di LDH da parte delle cellule bersaglio: in modo esattamente analogo a quanto detto sopra per il rilascio spontaneo di LDH da parte delle effettrici, non deve essere erroneamente interpretata come citotossicità il rilascio dell'enzima nel medium dovuto alla mortalità naturale o indotta dalla manipolazione sperimentale delle cellule bersaglio. Anche in questo caso devono essere allestiti dei pozzetti in triplicato o quadruplicato per valutare questo parametro. Le cellule bersaglio vengono quindi aggiunte nella giusta concentrazione in ogni pozzetto e diluite nello stesso volume di medium dei pozzetti sperimentali.

Pozzetti sperimentali: vengono messe, nelle proporzioni stabilite, sia le cellule effettrici che le cellule bersaglio e diluite in almeno 100 µl di medium di coltura per pozzetto. Normalmente i rapporti tra effettrici/traget sono di 12.5:1, 25:1, 50:1. Il numero di cellule bersaglio è mantenuto sempre costante e uguale a 10000 cellule per pozzetto. Nel caso di rapporto 50:1 in ogni pozzetto ci dovranno essere 500000 cellule effettrici e 10000 cellule bersaglio. Per ogni differente rapporto effettrici/target si allestiscono pozzetti in triplicato o quadruplicato.

Rilascio massimo di LDH delle cellule bersaglio: si provoca con un sapone la lisi di tutte le cellule bersaglio per determinare il 100% del rilascio di LDH. Per fare questo le target vengono aggiunte nel pozzetto nel numero di 10000 cellule, poi portate con del medium di coltura allo stesso volume dei pozzetti sperimentali e quindi si aggiungono 10 µl di soluzione di lisi (10x) per ogni 100 µl di medium (anche in questo caso viene fatto in triplicato o quadruplicato). La soluzione di lisi è composta da Triton® X-100 allo 0,8% in PBS ed è sufficiente per lisare tutte le cellule bersaglio in un tempo di 45 minuti.

Background del medium di coltura: la misura di questo parametro serve per correggere il possibile aumento del valore di assorbanza dovuto alla presenza nel medium di rosso fenolo o di LDH che può essere contenuta nei

FCS con cui vengono addizionati i terreni. In questo caso si devono allestire tre o quattro pozzetti nei quali dovrà essere aggiunto solamente il terreno di coltura.

Controllo per la correzione del volume: viene raccomandato per correggere l'incremento di volume causato dall'aggiunta della soluzione di lisi ai pozzetti per la valutazione del rilascio massimo di LDH delle cellule bersaglio. Questa variazione di volume ha effetti sulla diluizione del rosso fenolo e della LDH eventualmente presente nel FCS contenuto nel medium. Per valutare questo deve essere preparato un pozzetto dove allo stesso volume del medium dei pozzetti sperimentali viene aggiunta la soluzione di lisi e fatto sempre in triplicato o quadruplicato.

Calcolo dei risultati

Per ottenere il valore in percentuale della citotossicità devono essere eseguite le seguenti operazioni:

- 1) Si deve sottrarre la media dei valori di assorbanza del *background del medium di coltura* dai valori di assorbanza dei *pozzetti sperimentali* e da quelli del *rilascio spontaneo di LDH* sia delle *cellule effettrici* che delle *cellule bersaglio*.
- 2) Si deve sottrarre la media dei valori di assorbanza dei pozzetti del controllo della correzione del volume ai valori di assorbanza ottenuti nei pozzetti per la valutazione del rilascio massimo di LDH delle cellule bersaglio.
- 3) Si devono inserire i valori corretti, ottenuti nei passaggi 1 e 2, nella formula scritta sotto per valutare la percentuale di citotossicità per ogni rapporto effettore/target utilizzato.

$$\text{Citotossicità \%} = \frac{\text{Valore Sperimentale} - \text{Rilascio spontaneo effettrici} - \text{Rilascio spontaneo target}}{\text{Rilascio massimo del target} - \text{Rilascio spontaneo del target}} \times 100$$

SPERIMENTAZIONE PROBIOTICI

Nella sperimentazione per valutare l'effetto immunostimolante indotto a livello intestinale dalla somministrazione di una preparazione multispecie di batteri probiotici, sono stati utilizzati giovani esemplari di orata (*Sparus aurata* L.). Trenta soggetti del peso medio di 8 grammi sono stati prelevati da Alevines del Mediterraneo (Puerto de Sagunto, Castellón, Spagna) e trasferiti nell'allevamento dell'IRTA (Sant Carles de La Rápita, Terragona, Spagna). I pesci sono stati separati casualmente in quattro acquari cilindrici, fatti acclimatare per tre settimane prima di iniziare gli esperimenti (peso medio 13 grammi) durante le quali sono stati alimentati con cibo commerciale in pellet (PROACQUA, VALENCIA, Spagna). Le vasche a ricircolo d'acqua marina con flusso di 1500 l/h sono state mantenute ad una temperatura di 20 °C e fotoperiodo con 12 ore di luce e 12 ore di buio. Gli intestini di 5 esemplari sono stati analizzati prima di iniziare le diverse diete sperimentali sacrificandoli con una dose letale di benzocaina (Sigma-Aldrich). Durante tutta la durata della sperimentazione non è stata osservata mortalità o presenza di malattie.

Disegno sperimentale

Due ceppi di batteri liofilizzati sono stati acquistati dalla "Colección Española de Cultivos Tipo" (CECT, Valencia, Spagna). *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* (CECT 287) e *Bacillus subtilis* (CECT 35) sono stati coltivati nei laboratori di Man Rogosa e Nutrient Broth (Laboratorios Conda, Madrid, Spagna), rispettivamente. Le sospensioni batteriche sono state portate ad una concentrazione di 1×10^9 CFU ml⁻¹ in accordo con le rispettive curve di crescita. Sono state quindi inattivate con il calore tenendole ad una temperatura di 60 °C per 1 ora, lavate tre volte in PBS e utilizzate come supplemento alla dieta. Le diete sperimentali contenenti *Lactobacillus* inattivato col calore, *Bacillus* inattivato con la stessa tecnica o entrambi i batteri inattivati, sono state preparate in laboratorio. In breve, il pellet commerciale è stato schiacciato, miscelato con acqua di rubinetto (nella quale sono state aggiunte le sospensioni batteriche nella concentrazione desiderata) e pellettato nuovamente. I pellet così ottenuti sono stati lasciati ad asciugare e conservati a 4 °C fino al momento dell'utilizzo. Quattro differenti diete sono state somministrate a quattro gruppi di pesci: (I) dieta con cibo in pellet commerciale non integrata (gruppo di controllo); (II) dieta integrata con *Lactobacillus* (1×10^7 CFU g⁻¹) inattivato col calore; (III) dieta integrata con *Bacillus* (1×10^7 CFU g⁻¹) inattivato con il calore; (IV) dieta integrata sia con *Lactobacillus* ($0,5 \times 10^7$ CFU g⁻¹) che con *Bacillus* ($0,5 \times 10^7$ CFU g⁻¹). I pesci sono stati nutriti per 3 settimane somministrando una dose giornaliera pari all'1% del peso corporeo. Il regime alimentare è stato scelto in accordo con uno studio precedente condotto nella stessa specie, nel quale i potenziali ceppi probiotici sono stati somministrati per via orale (Díaz-Rosales et al., 2006). Le proprietà organolettiche e di galleggibilità del pellet integrato con le sospensioni batteriche non sono risultate differenti da quelle del pellet commerciale utilizzato per il gruppo di controllo. Tutti i pellet sono stati somministrati manualmente per controllare che venissero ingeriti immediatamente dalle orate ed evitare che avanzasse del cibo sul fondo delle vasche. La biomassa dei pesci in ogni acquario è stata misurata prima di effettuare gli esperimenti, alla fine della prima e della seconda settimana di trattamento, in modo da correggere di conseguenza la razione di cibo giornaliera. Gli intestini di 5 esemplari per ogni gruppo sono stati prelevati dopo tre settimane dall'inizio della somministrazione

delle diete, fissati overnight a 4°C in paraformaldeide al 4%, quindi disidratati a freddo in serie crescente di alcool e inclusi in Paraplast (FLUKA). Si è proceduto poi al taglio e alle analisi istologiche e immunohistochimiche come descritto in precedenza.

Antisiero

Per quantificare il numero di cellule Ig⁺ negli intestini posteriori delle orate è stato utilizzato l'anticorpo Pab OR1. L'anticorpo policlonale **Pab OR1** è stato ottenuto purificando le immunoglobuline (Ig) dal siero di esemplari adulti di orata mediante cromatografia d'affinità su proteina A-sefariosio, quindi emulsionate con adiuvante completo di Freund (Serva, Heidelberg, Germany) e somministrate (50 µg/250 µl i.p.) come antigene di immunizzazione a due conigli. Al 14° giorno è stata effettuata una seconda somministrazione con identiche modalità. Sono seguite somministrazioni con adiuvante incompleto di Freund (al 28° giorno) e senza adiuvante (al 42° giorno). In questi ultimi due casi, l'antigene di immunizzazione è stato somministrato 25 µg i.p. e 25 µg s.c. nella regione dorsale. A conclusione del protocollo di immunizzazione (56° giorno), è stato effettuato il salasso dei conigli in anestesia profonda. Il titolo dei Pab OR1 è stato determinato mediante dosaggio ELISA indiretto.

ALLESTIMENTO STABULARIO DIPARTIMENTALE

Composto da sette vasche rettangolari in plastica scura dalla capienza di 250 litri, attrezzate ciascuna con filtro esterno Eheim con capacità filtrante di 800-1200 l/h. Il filtro è stato realizzato con due strati di spugna sintetica e lana di Perlon (filtraggio meccanico) e, da uno strato di materiale ceramico (filtraggio biologico) indispensabile per l'attaccamento dei batteri denitrificanti, composto da più di due Kg di "cannolicchi" ad altissima porosità (HYDOR). L'acqua marina è stata ricostituita artificialmente mediante l'uso del sale marino CORALMARINE REEFSALT (GROTEC, Germany) aggiunto all'acqua potabile fino ad ottenere una densità di 1.022 g/cm³ controllata con densimetro galleggiante a bulbo ogni due/tre giorni. Sono state ottimizzate inoltre le concentrazioni degli ioni calcio e magnesio utilizzando degli appositi Kit ed è stato tenuto sotto controllo il livello dei nitriti valutandone la concentrazione ogni quattro/cinque giorni. Le vasche sono state riempite con acqua potabile che è stata lasciata scolorare per due settimane, mantenendo sempre attiva l'ossigenazione con un compressore elettrico. L'acqua è stata poi ricostituita aggiungendo il sale marino e lasciata riposare per qualche giorno, quindi sono stati aggiunti i batteri per permettere la colonizzazione del filtro. Sono state utilizzate diverse formulazioni batteriche commerciali per acquari sia d'acqua dolce che marina (Bacterium E, AQUILI; Cycle Batteri Superfast, ASKOLL) somministrate rispettando le dosi e i tempi indicati dal produttore. Per tre volte nelle vasche è stata aggiunta dell'acqua prelevata direttamente dal mare e trasportata a Ferrara mantenendola ossigenata da un motorino a batteria. Questo è stato fatto per cercare di ricreare nelle vasche un ambiente il più possibilmente simile a quello naturale per flora batterica e carica virale. In ogni acquario sono stati aggiunti infine dei blocchi di marmo o travertino e almeno un paio di Kg di sabbia corallina grossolana per tamponare il pH delle vasche marine che tende solitamente ad acidificare. Il pH degli acquari è stato misurato ogni tre/quattro giorni e mantenuto attorno agli 8° pH. Per migliorare il benessere nelle vasche delle spigole e rendere più uniforme l'ossigenazione, sono state posizionate direttamente sul fondo delle pompe con portata 1200-1400 l/h. Gli acquari così allestiti sono stati lasciati riposare almeno un mese per permettere la perfetta maturazione dei filtri. Infine hanno accolto i pesci che sono stati introdotti in numero di quattro per vasca raggiungendo una densità di circa 3,5 grammi di biomassa/litro.

RISULTATI

CARATTERIZZAZIONE DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE NELL'INTESTINO DELLA SPIGOLA

Le mucose di pelle, branchie e intestino dei pesci sono protette da meccanismi di difesa sia umorali che cellulari. I leucociti sono solitamente abbondanti lungo tutto il tratto digerente, ma il loro numero sembra aumentare decisamente nell'intestino dove linfociti, plasmacellule, granulociti e macrofagi si trovano sia sub che intraepiteliali. Sebbene manchino dei veri e propri aggregati linfoidi (come ad esempio le placche del Peyer nei Mammiferi) è stata documentata nell'intestino di molte specie di pesci la presenza di numerosi leucociti sparsi o aggregati in piccoli gruppi sia nell'epitelio che nella lamina propria che costituiscono quello che viene chiamato tessuto linfoide associato all'intestino (GALT). Alcuni studi hanno anche indicato delle differenze nei rapporti tra le diverse sottopopolazioni linfocitarie presenti nei diversi tratti intestinali. Questo sembrerebbe indicare delle specializzazioni locali delle difese immunitarie e la presenza delle sottopopolazioni più adatte nei siti dove risultano più efficaci, in particolar modo per le cellule con capacità citotossica che necessitano del contatto diretto con il patogeno per neutralizzarlo. Mentre per i Mammiferi è stato dimostrato che il GALT svolge una funzione primordiale di linfopoiesi e ospita precursori con la potenzialità di differenziarsi in cellule T mucosali, nei pesci non si hanno ancora informazioni precise su origine, selezione e localizzazione delle cellule T intestinali.

In questa tesi di dottorato è stata individuata e analizzata per la prima volta nell'intestino di esemplari giovanili di spigola la presenza di cellule CD3e⁺. I dati che ne sono emersi sono stati confrontati con quelli ottenuti su sezioni adiacenti con DLT15 per valutare la possibilità di discriminare con questi anticorpi due sottopopolazioni diverse all'interno della stessa linea T.

Dal punto di vista istologico la mucosa intestinale della spigola giovanile (*Dicentrarchus labrax L.*), presenta uno strato epiteliale (E) esposto all'ambiente esterno attraverso il lume intestinale (*) e una lamina propria (LP) a cui fa seguito un doppio strato di fibre muscolari separate tra di loro dal plesso mienterico. Tra le cellule epiteliali (figura 1 a, b, e) e nella lamina propria si trovano molti linfociti (freccie in figura 1 b). I linfociti intraepiteliali sono localizzati principalmente in posizione basolaterale e hanno una forma variabile (quasi regolare, allungata, con corti processi citoplasmatici) (figura 1 c) e presentano un nucleo eterocromatico e un sottile strato di citoplasma (figura 1 d). I linfociti nella lamina propria hanno un'ultrastruttura simile a quella dei linfociti intraepiteliali, ma la loro forma è più regolare (rotonda/ovoidale) e alcuni linfociti aderiscono alla lamina basale.

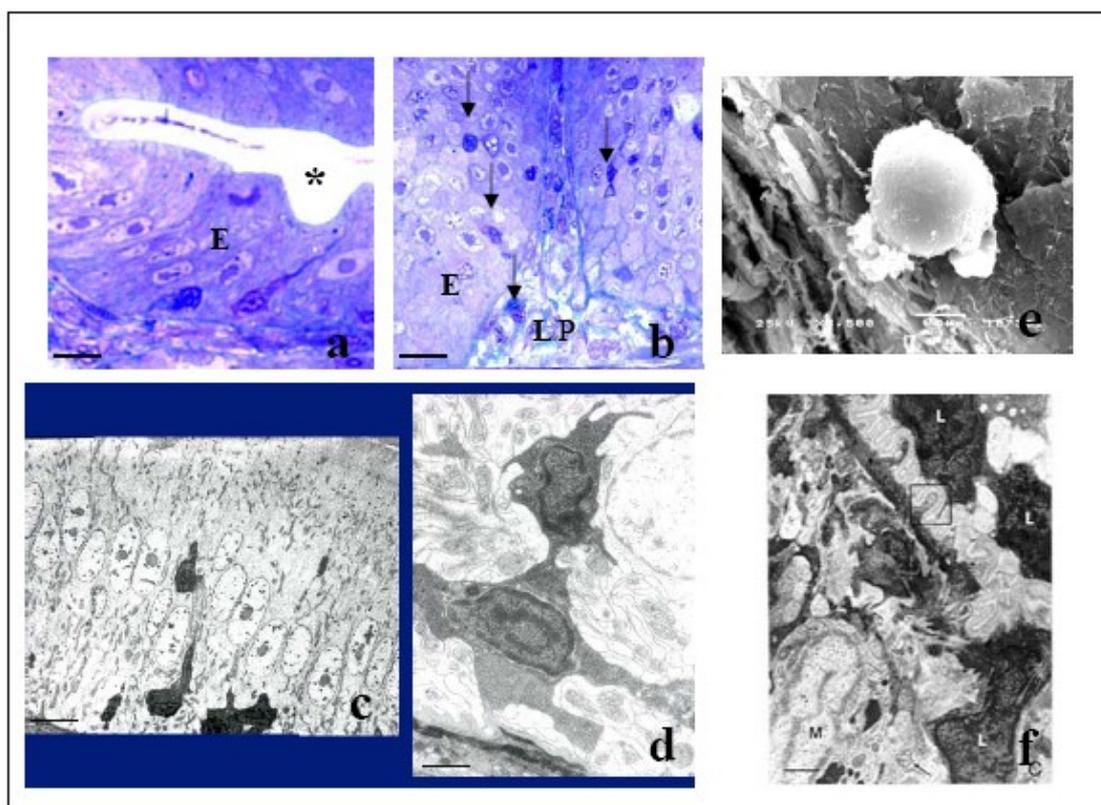


Figura 1: Linfociti del GALT nell'intestino di spigola giovanile.

(a-b): La mucosa intestinale della spigola presenta uno strato epiteliale (E) esposto all'ambiente esterno attraverso il lume intestinale (*) e una lamina propria (LP). Tra le cellule epiteliali e nella lamina propria si trovano molti linfociti (freccie). Barra=5 μ m. (c-d): I linfociti intraepiteliali sono localizzati principalmente in posizione basolaterale e, in alcuni casi, sopra i nuclei degli enterociti hanno una forma variabile e presentano un nucleo eterocromatico e un sottile strato di citoplasma. Barra=6-1 μ m. (e): L'immagine al SEM mostra un linfocita infiltrato nell'epitelio. Barra=5 μ m. (f): I linfociti nella lamina propria hanno una forma piú regolare (rotonda/ovoidale) dei linfociti intraepiteliali e alcuni di essi aderiscono alla lamina basale. Barra=1 μ m.

L'immunohistochimica ha permesso la localizzazione delle cellule marcate dagli anticorpi DLT15, CD3 ϵ e DLlg3, rispettivamente, e di studiarne la distribuzione nei diversi tratti dell'intestino. Cellule linfoidi isolate sono state trovate a tutti i livelli del tubo digerente, in particolar modo nella mucosa (epitelio e lamina propria) e nella sottomucosa. Il numero di cellule positive nei vari segmenti intestinali è mostrato nelle tabelle 1 e 2.

Tabella 1: Densità relative (N°/10000 μm^2) delle cellule DLT15⁺ CD3 ϵ ⁺ e DLlg3⁺ nella mucosa intestinale della spigola.

Anteriore	Tratti dell'intestino			MAb
	Medio	Posteriore		
DLT15	32,8 \pm 3,1 ^a	54,5 \pm 9,3 ^b	62,3 \pm 8,2 ^c	
CD3 ϵ	20,8 \pm 1,3 ^d	22,7 \pm 3,9 ^e	26,3 \pm 2,4 ^e	
DLlg3	1,5 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2	8,3 \pm 1,2 ^f	

I numeri sono il risultato della media \pm deviazione standard dei valori ottenuti analizzando tre animali.

^aSignificativamente diverso da tutti gli altri valori (P<0,001).

^bSignificativamente diverso da tutti gli altri (P<0,001) a parte DLT15 nel tratto posteriore.

^cSignificativamente diverso da tutti gli altri (P<0,001) a parte DLT15 nel tratto medio.

^dSignificativamente diverso da DLlg 3 nel tratto anteriore e medio (P<0,01).

^eSignificativamente diverso da DLlg 3 anteriore e medio (P<0,001) posteriore (P<0,05).

^fSignificativamente diverso da DLlg 3 anteriore e medio (P<0,001).

Tabella 2: Densità relative (N°/10000 μm^2) delle cellule DLT15⁺ e CD3 ϵ ⁺ nella mucosa dei tre segmenti dell'intestino della spigola separate in epitelio (E) e lamina propria (LP).

MAb	Anteriore		Medio		Posteriore	
	E	LP	E	LP	E	LP
DLT15	115,7 \pm 27,1 ^b	30,1 \pm 4,8	112,3 \pm 17,3 ^c	30,4 \pm 3,9	168,1 \pm 21,8 ^a	62,3 \pm 3,1 ^d
CD3 ϵ	0,8 \pm 0,5	20,2 \pm 0,9	0,6 \pm 0,3	22,1 \pm 3,7	1,0 \pm 0,7	25,3 \pm 1,7

I numeri sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando tre animali.

^aSignificativamente diverso da tutti gli altri valori (P<0,001).

^bSignificativamente diverso da tutti gli altri valori (P<0,001), ma non da DLT15 nell'epitelio dell'intestino medio.

^cSignificativamente diverso da tutti gli altri valori (P<0,001), ma non da DLT15 nell'epitelio dell'intestino anteriore.

^dSignificativamente diverso da CD3 ϵ nell'epitelio dell'intestino anteriore, medio e posteriore (P<0,05).

L'intestino anteriore presenta un diametro maggiore rispetto alle parti che seguono. La mucosa forma grandi villi che riempiono quasi totalmente il lume e ospita numerose cellule linfoidi sparse e alcuni granulociti. L'epitelio è di tipo colonnare semplice, con un voluminoso orletto a spazzola e numerose cellule mucipare. Le cellule DLT15-immunoreattive sono risultate molto numerose nel compartimento intraepiteliale (localizzate principalmente nell'epitelio basolaterale), meno abbondanti nella lamina propria, e molto scarse nella sottomucosa e tra gli strati muscolari. Le cellule CD3ε⁺ sono apparse quasi esclusivamente localizzate nella lamina propria, molto rare nell'epitelio, nella sottomucosa e tra le fibre muscolari. Le cellule che presentano immunoglobuline (DLIg3⁺) sono invece risultate infrequenti nella mucosa e molto scarse nella sottomucosa e tra le fibre muscolari. La mucosa dell'intestino medio presenta villi meno numerosi e la lamina propria è costellata da numerose cellule che risultano per la maggior parte linfociti, qualche raro granulocito basofilo e alcuni eosinofili anche intraepiteliali. Le cellule DLT15⁺ (diametro $3,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$, range 2,73-3,9 μm , N = 100) sono risultate molto abbondanti nell'epitelio basolaterale e significativamente meno numerose nella lamina propria (figura 2 B). La loro presenza è sembrata molto scarsa nella sottomucosa e quasi assente dalla tunica muscolare. Le cellule CD3ε-immunoreattive (diametro $3,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$, range 2,73-4,5 μm , N = 100) sono state osservate quasi esclusivamente nella lamina propria della mucosa (figura 2 A). Le DLIg3⁺ (diametro di $5,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$, range 3,4-7 5 μm , N = 100) sono risultate infrequenti nella mucosa e molto scarse nella sottomucosa. Il segmento posteriore dell'intestino si presenta come lineare, la mucosa appare più sottile ampiamente ripiegata e l'epitelio contiene un gran numero di cellule mucipare. La mucosa ospita molte cellule linfoidi e pochi granulociti eosinofili. Le cellule DLT15-immunoreattive (diametro di $4,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$, range 2,7 -5,4 μm , N = 100) sono apparse molto numerose nell'area basolaterale dell'epitelio e nella lamina propria (figura 2 B, D e F), mentre poco numerose quelle presenti nella sottomucosa. Come per gli altri tratti intestinali le cellule CD3ε⁺ (diametro di $4,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$, range 2,3 -5,9 μm , N = 100) sono risultate localizzate quasi esclusivamente nella lamina propria, molto scarse quelle intraepiteliali e praticamente assenti nella sottomucosa (figura 2 A, C ed E). Le cellule DLIg3-immunoreattive (diametro di $4,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$, range 3,2-5,5 μm , N = 100) sono state rilevate, in numero significativo anche se non abbondanti, sia infiltrate nell'epitelio che nella lamina propria. Le pochissime cellule positive nella sottomucosa sono state osservate solamente all'interno di vasi sanguigni. Differenze significative non sono emerse tra i diametri cellulari delle cellule marcate dai tre anticorpi in tutti e tre i tratti dell'intestino e la marcatura è sembrata essere in tutti e tre i casi di tipo citoplasmatico (figura 2 E per l'anticorpo CD3ε e 2 F per DLT15).

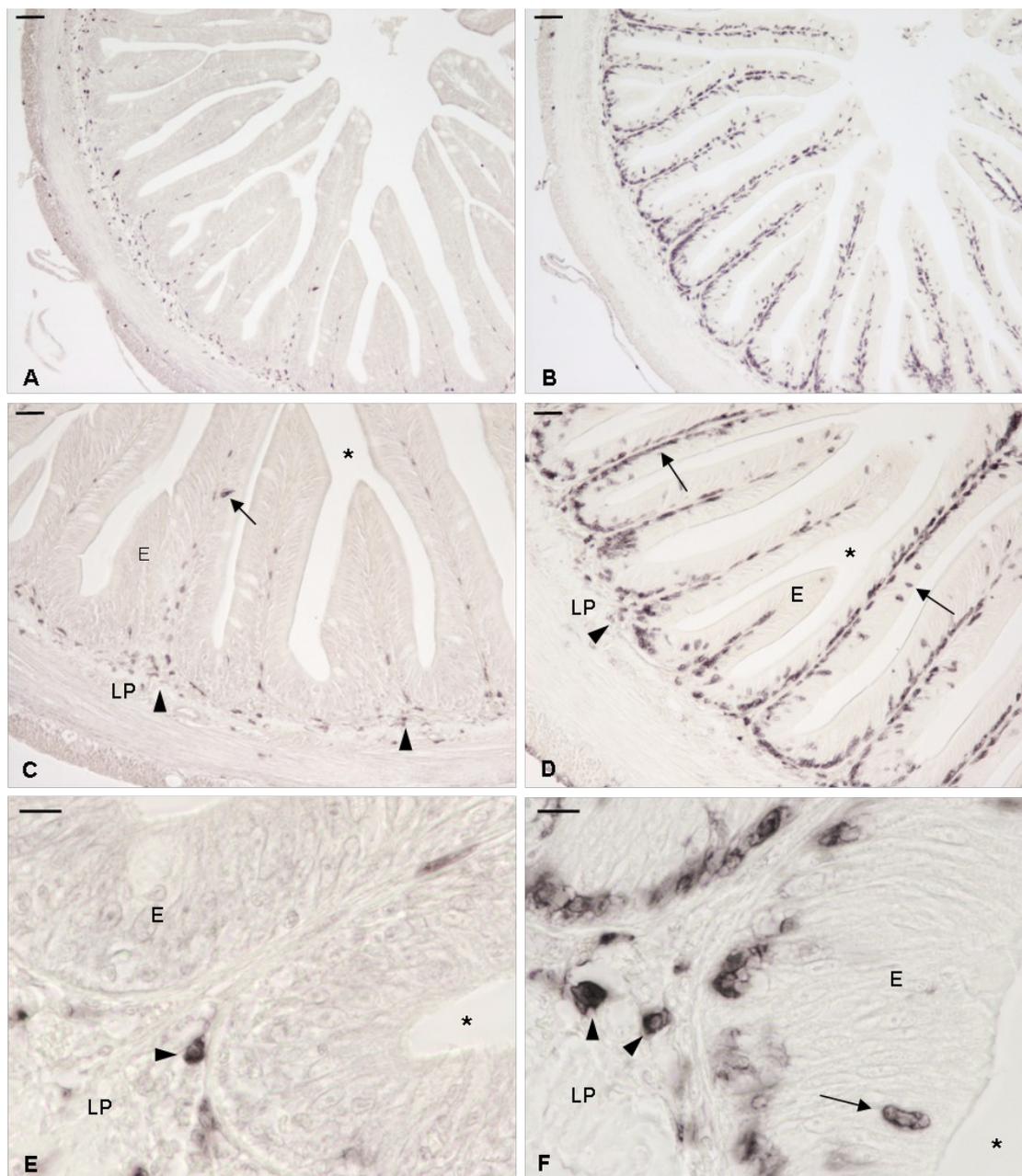


Figura 2: **A:** Visione generale della localizzazione di cellule $CD3\epsilon^+$ nell'intestino posteriore di spigola giovanile e ingrandimento corrispondente (**C**). Le cellule immunoreattive sono localizzate quasi esclusivamente nella lamina propria (teste di freccia), rare nel compartimento intraepiteliale (freccia). **B:** Sezione adiacente a quella di **A** con ingrandimento (**D**) che mostrano come le cellule $DLT15^+$ abbiano prevalente localizzazione intraepiteliale (freccie) mentre siano meno numerose nella lamina propria (teste di freccia). **E** ed **F:** Visione ad alto ingrandimento di cellule $CD3\epsilon^+$ e $DLT15^+$ rispettivamente, che evidenzia in entrambi i casi una marcatura citoplasmatica (le teste di freccia indicano cellule positive in lamina propria, la freccia un linfocita intraepiteliale). LP: Lamina propria. E: epitelio. *: lume intestinale. Barre=50 μ m in **A** e **B**; 25 μ m in **C** e **D**. Colorazione immunoistochimica (ABC-perossidasi intensificata con Nichel).

Se consideriamo la mucosa nell'insieme, le cellule marcate da DLT15 e DLlg3 hanno mostrato un gradiente crescente antero-posteriore, ma non le CD3 ϵ ⁺ (tabella 1 e grafico 1). Infatti, le cellule DLT15⁺ nel tratto medio e posteriore dell'intestino sono risultate significativamente più numerose di quelle nell'anteriore (P<0,001) e le cellule DLlg3⁺ del tratto posteriore rispetto a quelle di anteriore e medio (P<0,001). Le cellule DLT15⁺ sono apparse essere significativamente più numerose delle cellule marcate con gli altri due anticorpi in tutti i segmenti intestinali (P<0,001), mentre quelle CD3⁺ lo sono risultate nei confronti di quelle DLlg3⁺ (P<0,05).

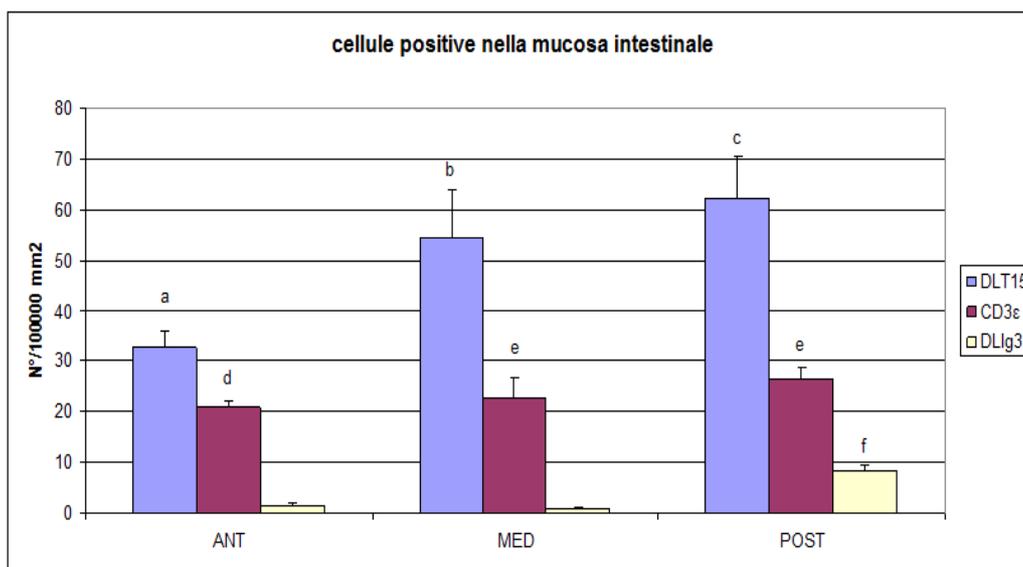


Grafico 1: Analisi quantitativa delle cellule DLT15⁺, CD3 ϵ ⁺, DLlg3⁺ nei vari tratti dell'intestino della spigola.

Per valutare la possibilità che gli anticorpi DLT15 e CD3 ϵ fossero in grado di riconoscere sottopopolazioni diverse della stessa linea T è stata analizzata, dal punto di vista quantitativo, l'abbondanza di queste cellule dividendo la mucosa in compartimento epiteliale e lamina propria (tabella 2, grafici 2 e 3). Il numero di cellule DLT15⁺ è risultato significativamente diverso in tutti i tratti dell'intestino tra il comparto epiteliale e la lamina propria (P<0,001) e, nonostante sia evidente nella mucosa intestinale un gradiente crescente antero posteriore, l'unica differenza significativa è stata rilevata nell'epitelio dell'intestino posteriore rispetto agli epiteli dei tratti precedenti (P<0,001) (grafico 2). Le cellule CD3 ϵ ⁺ sono sembrate, invece, una popolazione quasi esclusivamente presente nella lamina propria dell'intestino, infatti, la differenza con le pochissime cellule presenti nell'epitelio è risultata molto significativa (P<0,001). Importante constatare come nella lamina propria di tutti i tratti intestinali le cellule DLT15⁺ siano risultate più numerose delle cellule CD3 ϵ ⁺, senza, comunque, raggiungere una significatività statistica (grafico 3).

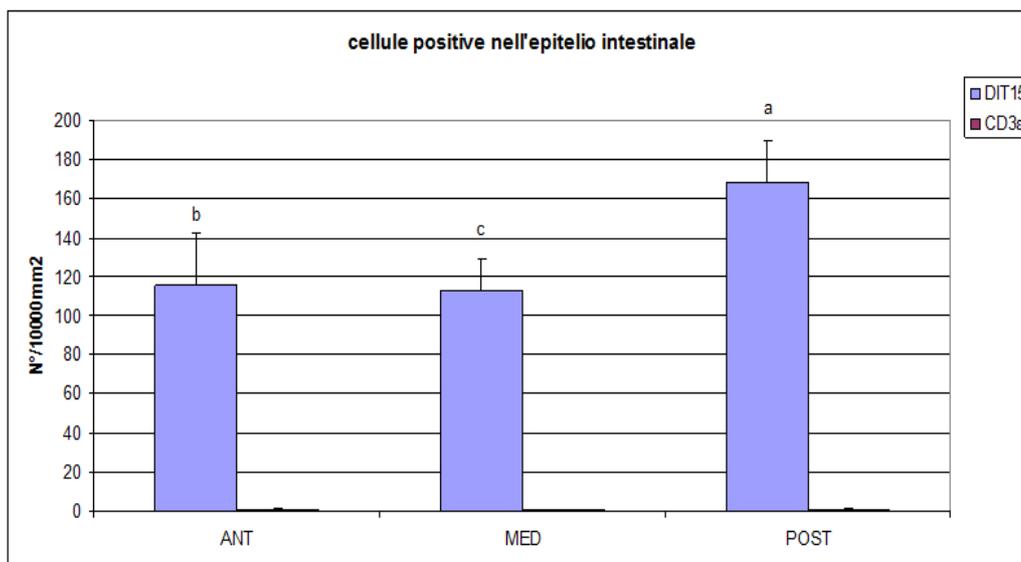


Grafico 2: Analisi quantitativa delle cellule DLT15⁺, CD3ε⁺ nell'epitelio dei diversi tratti dell'intestino della spigola.

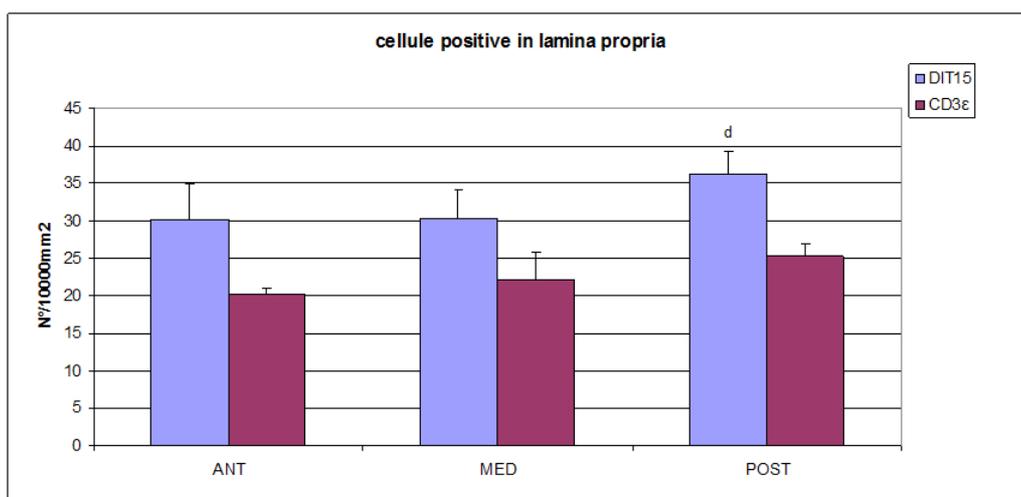


Grafico 3: Analisi quantitativa delle cellule DLT15⁺, CD3ε⁺ nella lamina propria dei diversi tratti dell'intestino della spigola.

Un confronto sulla localizzazione di queste cellule ha, però, evidenziato come le CD3ε-immunoreattive risultino maggiormente diffuse nella lamina propria, occupandone tutta la superficie, non formando quasi mai aggregati e mantenendo una certa distanza spaziale tra loro (figura 3 A). Le cellule DLT15-immunoreattive sono sembrate invece concentrarsi in prossimità delle lacune sanguigne subito al di sotto dei villi intestinali e molto raramente occupano la zona di lamina propria in prossimità della tonaca muscolare (figura 3 B).

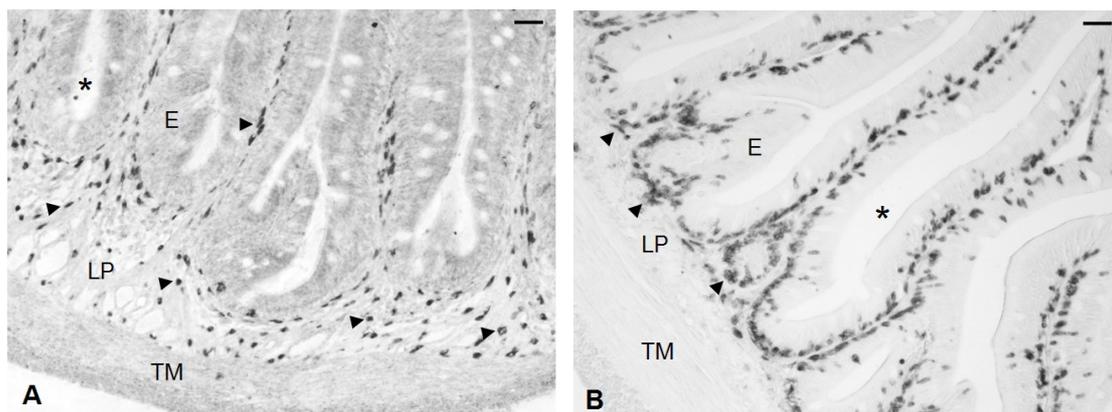


Figura 3: **A:** Localizzazione di cellule $CD3\varepsilon^+$ nella lamina propria dell'intestino medio di spigola. Le cellule immunoreattive sono diffuse in tutta la lamina propria (teste di freccia). **B:** Numerose cellule $DLT15^+$ situate in prossimità delle lacune sanguigne subito al di sotto dei villi intestinali (teste di freccia), assenti in prossimità della tonaca muscolare. LP: Lamina propria. E: epitelio. TM: Tunica muscolare. *: lume intestinale. Barre=25µm. Colorazione immunoistochimica (ABC-perossidasi intensificata con Nichel).

SPERIMENTAZIONE CITOTOSSICITÀ CELLULO-MEDIATA

La citotossicità cellulo-mediata gioca un ruolo fondamentale nel riconoscimento e nell'eliminazione dei patogeni intra e extracellulari. Nei mammiferi sono state ben documentate due tipologie di risposta citotossica, quella specifica e quella non specifica (Russel and Ley., 2002). Nei pesci le informazioni sull'argomento fino a dieci anni fa risultavano estremamente limitate. L'interesse verso questo tipo di risposta immunitaria nei Teleostei è, tuttavia, cresciuto notevolmente negli ultimi anni, spinto dal fatto che delle buone conoscenze di base sui meccanismi e sulle cellule che ne sono coinvolte risulta di fondamentale importanza per sviluppare tecnologie atte a migliorare le difese immunitarie delle specie ittiche allevate. Si sono così acquisite negli ultimi anni in diverse specie di pesci utili informazioni sulla risposta citotossica cellulo-mediata (CMC) e sulle cellule che ne sono responsabili. Da questi studi è emerso che esistono delle differenze molto marcate tra una specie e l'altra e che di conseguenza anche i protocolli di immunizzazione devono rispecchiare le caratteristiche peculiari del sistema immunitario della specie in esame. Questo per evitare di correre il rischio di indurre tolleranza verso il patogeno contro il quale si vorrebbe fornire protezione o di incrementare i rischi d'infezione causando anergia o morte delle stesse cellule impegnate nei meccanismi di difesa con dosi e modalità di somministrazione dell'antigene non corrette.

In questa tesi di dottorato si è cercato di ampliare le conoscenze di base relative alle risposte citotossiche specifiche e non in due specie di grande rilevanza per l'acquicoltura mondiale: la carpa (*Cyprinus carpio L.*), pesce d'acqua dolce che vive in acque stagnanti ricche di vegetazione e principalmente erbivora, e la spigola (*Dicentrarchus labrax L.*), vorace predatore dei nostri mari. Particolare attenzione è stata rivolta alla risposta citotossica dei linfociti intestinali. L'intestino risulta infatti di particolare interesse perché esposto direttamente all'attacco di patogeni introdotti con il cibo o provenienti dall'ambiente esterno, è il bersaglio principale di vaccinazioni orali, probiotici e immunostimolanti, e sembra essere anche nei pesci sede linfopoietica extratimica di cellule della linea T. Proprio questa popolazione cellulare potrebbe essere coinvolta nella citotossicità cellulo-mediata conferendo all'intestino delle caratteristiche peculiari.

La risposta citotossica cellulo mediata (CMC) della carpa contro target di natura alloigenica (EPC) è stata studiata da un gruppo di ricercatori olandesi dell'università di Wageningen. Sono stati riportati di seguito (figura 4) i risultati da loro ottenuti con un protocollo d'immunizzazione simile a quello utilizzato per la sperimentazione di questa tesi, che integrano i dati ottenuti in questa tesi con il target xenogenico (linea K562).

Il gruppo di carpe di controllo a cui è stato inoculato solamente del PBS, non ha evidenziato citotossicità contro le cellule alloigeniche EPC (citotossicità al di sotto del 5% è stata considerata non significativa) (figura 4 a). I linfociti estratti dal sangue periferico (PBL), dal rene (KL) e dalla milza (SL) del gruppo immunizzato analmente con le EPC non hanno mostrato attività citotossica, mentre quelli estratti dall'intestino (IEL) hanno evidenziato solo una debole risposta (figura 4 b). Il gruppo sottoposto a immunizzazione e richiamo i.p. ha presentato, invece, un'apprezzabile citotossicità specifica dei linfociti di rene, milza e sangue periferico e bassa in quelli dell'intestino (figura 4 c). L'analisi statistica ANOVA ad una via ha indicato come efficace nell'indurre una citotossicità specifica solamente quest'ultimo trattamento ($P < 0,05$).

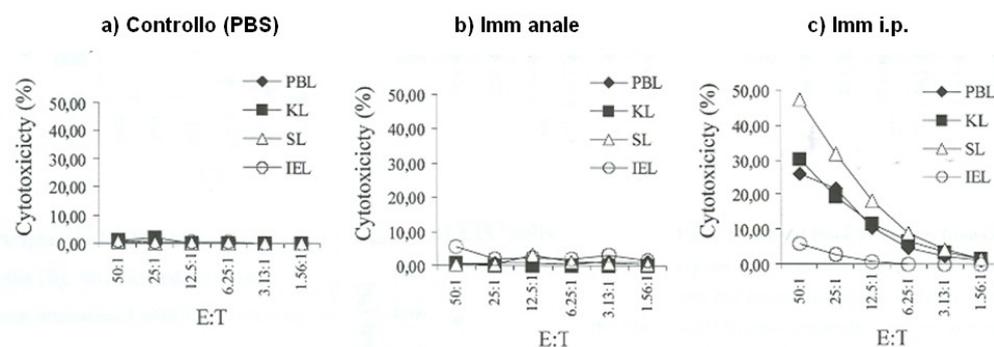


Figura 4: Citotossicità cellulo-mediata (CMC) in carpa ottenuta contro target allogeneo (EPC). **a)** Immunizzazione e richiamo sia intraperitoneale (i.p.) che anale con PBS (controllo). **b)** Immunizzazione e richiamo anale con EPC. **c)** Immunizzazione e richiamo i.p. con EPC. I dati sono la media dei risultati ottenuti su tre pesci per ogni gruppo, senza indicare la deviazione standard. PBL: linfociti del sangue periferico. KL: linfociti del rene. SL: linfociti della milza. IEL: linfociti della mucosa intestinale. E:T: rapporto cellule effettrici/target. L'analisi ANOVA ad una via ha indicato come efficace nell'indurre una risposta citotossica specifica solamente il trattamento del gruppo c ($P < 0,05$).

La sperimentazione sulla carpa affrontata in questa tesi di dottorato ha permesso di valutare la risposta CMC utilizzando come bersaglio una linea leucemica umana (linea K562) che ha la caratteristica di non esprimere le molecole dell'MHC di classe I e II. I linfociti estratti da rene, milza e dal sangue hanno evidenziato una buona citotossicità non-specifica, risultata invece, non significativa in timo, branchie e intestino (grafico.4).

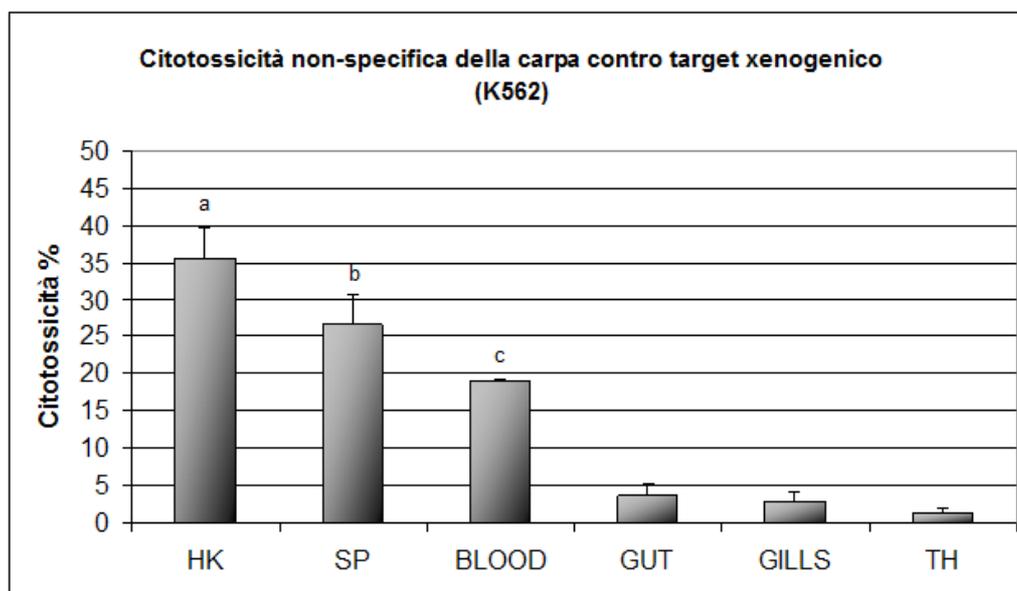


Grafico 4: Citotossicità cellulo-mediata non-specifica contro target xenogenico (linea K562 umana) dei linfociti estratti dai principali organi linfoidi della carpa. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando sei animali. **HK:** rene cefalico. **SP:** milza. **BLOOD:** sangue periferico. **GUT:** intestino. **GILLS:** branchie. **TH:** timo. **50:1:** rapporto cellule effettrici/bersaglio. ^aSignificativamente diverso da tutti gli altri organi ($P < 0,001$).

^bSignificativamente diverso dal sangue ($P<0,05$) e da tutti gli altri organi ($P<0,001$).

^cSignificativamente diverso dalla milza ($P<0,05$) e da tutti gli altri organi ($P<0,001$).

Gli esperimenti di immunizzazione hanno dimostrato come si possa indurre nella carpa una risposta CMC specifica contro target xenogenico (K562). Tutti e tre i gruppi immunizzati hanno evidenziato un incremento della CMC nel rene cefalico e nella milza rispetto al controllo (indicato in percentuale nel grafico 5). L'unico incremento statisticamente significativo è risultato, però, quello del gruppo 3 ($P<0,01$), indicando come la somministrazione anale di lisato cellulare di K562 possa risultare efficace nell'indurre CMC specifica in organi sistemici quali rene cefalico e milza.

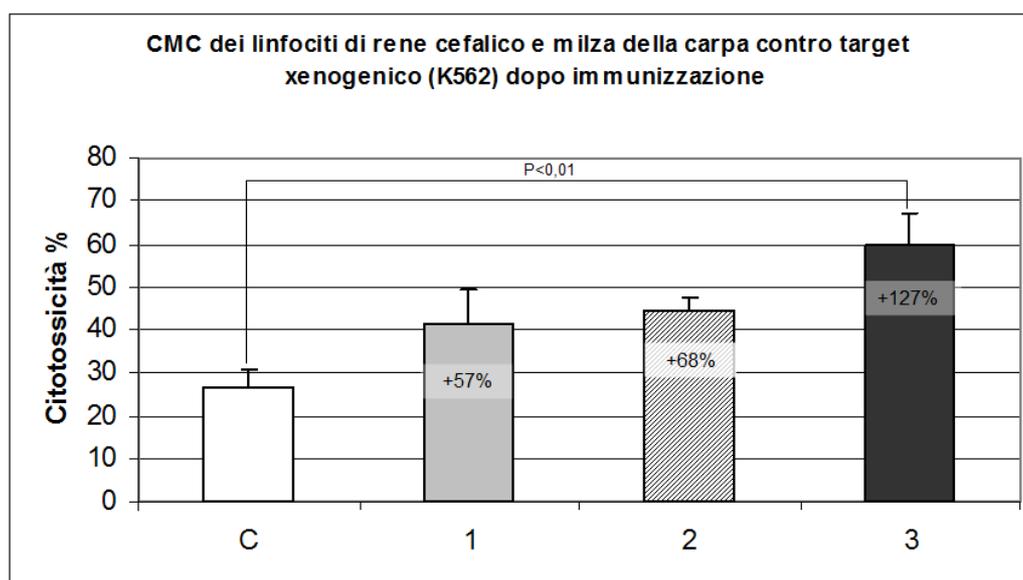


Grafico 5: Citotossicità cellulo-mediata (CMC) dei linfociti estratti da rene e milza contro target xenogenico (linea K562 umana) a seguito di immunizzazione. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando quattro animali. **C** (controllo): Immunizzazione anale e i.p. con PBS. **1:** Immunizzazione e richiamo i.p. **2:** Immunizzazione e richiamo anale con cellule intere. **3:** Immunizzazione e richiamo anale con lisato cellulare. **50:1:** rapporto cellule effettrici/bersaglio.

A livello intestinale tutti e tre i gruppi immunizzati hanno mostrato un incremento significativo di CMC rispetto al gruppo di controllo (grafico 6). Anche in questo caso, il protocollo di immunizzazione a cui è stato sottoposto il gruppo 3 si è dimostrato il più efficace nell'indurre una risposta citotossica specifica contro il target xenogenico, risultando significativo sia rispetto al controllo ($P<0,001$) che rispetto al gruppo 1 ($P<0,01$). Il gruppo 1 ha mostrato un aumento significativo di CMC rispetto al controllo ($P<0,01$), ma in maniera minore rispetto al gruppo 2 e 3 ($P<0,001$) che hanno previsto l'immunizzazione per via anale.

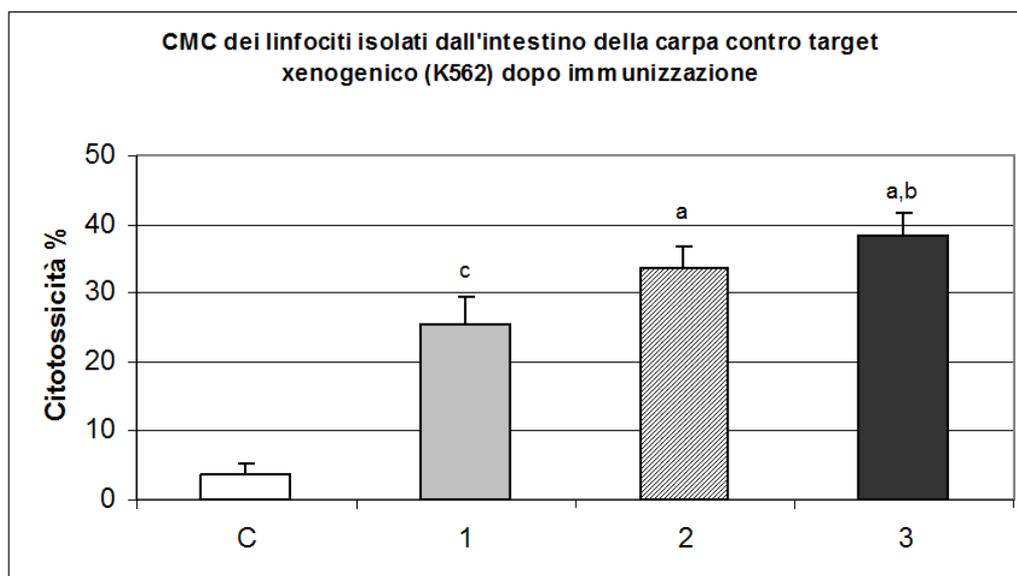


Grafico 6: Citotossicità cellulo-mediata (CMC) dei linfociti estratti dall'intestino della carpa contro target xenogenico (linea K562 umana) a seguito di immunizzazione. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando quattro animali. **C** (controllo): Immunizzazione anale e i.p. con PBS. **1:** Immunizzazione e richiamo i.p. **2:** Immunizzazione e richiamo anale con cellule intere. **3:** Immunizzazione e richiamo anale con lisato cellulare. **50:1:** rapporto cellule effettrici/bersaglio.

^aSignificativamente diverso da C ($P < 0,001$).

^bSignificativamente diverso da 1 ($P < 0,05$).

^cSignificativamente diverso da C ($P < 0,01$).

Prima di affrontare la sperimentazione sulla spigola è stato necessario verificare che le cellule utilizzate nel test di citotossicità non soffrissero sbalzi di osmolarità o un incremento della concentrazione di NaCl rispetto al loro normale terreno di coltura. Questo è stato necessario per le cellule eritoleucemiche umane (K562), fatte crescere in terreno con osmolarità di 300 mOsm e che, per le 4 ore d'incubazione con le cellule effettrici di spigola, sono state tenute in terreno a 355 mOsm addizionato con 42 mM di NaCl. L'analisi quantitativa dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), trascorse le 4 ore di incubazione necessarie per il test di citotossicità, non ha evidenziato un incremento dovuto alle possibile presenza di cellule lisate in terreni di coltura con osmolarità superiore a quella di controllo (grafico 7). È stato valutato anche con analisi al FACS e ioduro di propidio (PI) un possibile incremento della permeabilità delle cellule K562, indice di un possibile stress osmotico, senza rilevare differenza rispetto al controllo (figura 5 a, b e c).

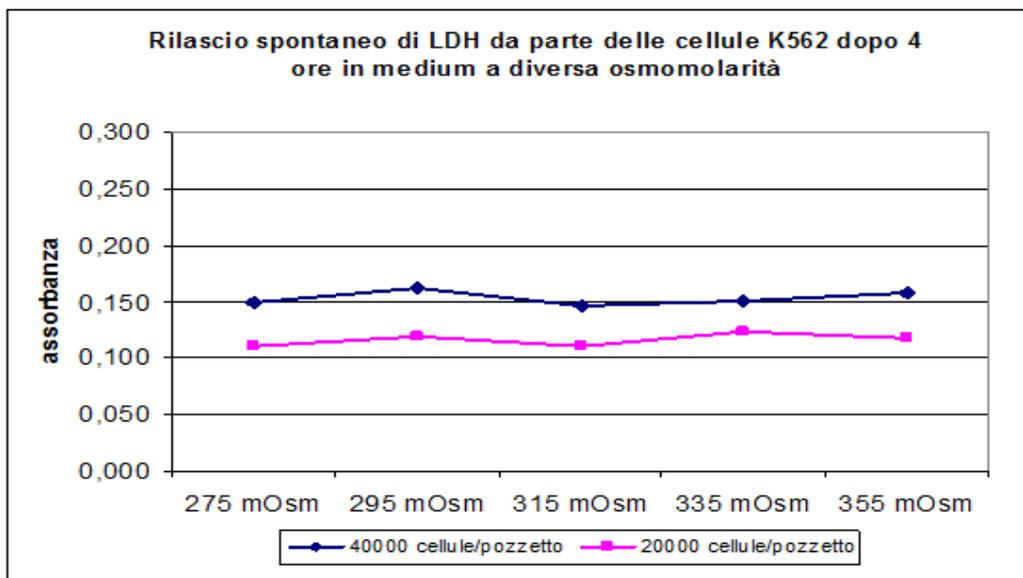


Grafico 7: Misura del rilascio spontaneo di LDH da parte delle K562 dopo 4 ore di incubazione in terreno di coltura (RPMI-1640, 10 UI/ml eparina + 42mM NaCl) a diverse osmolarità.

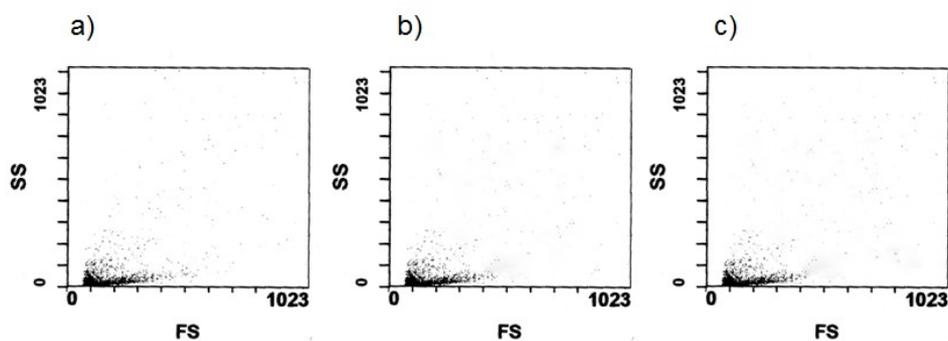


Figura 5: Analisi al FACS per valutare mortalità e permeabilizzazione K562 sottoposte a possibile stress osmotico. a) 1×10^6 /ml K562 tenute per 4 ore in terreno normale di coltura 300 mOsm (controllo). b) 1×10^6 /ml K562 tenute per 4 ore in terreno a 355 mOsm + 42 mM NaCl. c) 1×10^6 /ml K562 tenute per 4 ore in terreno a 355 mOsm + 42 mM NaCl e 2 μ g/ml ioduro di propidio. Le differenze rispetto al controllo sono risultate trascurabili (inferiori al 2%).

La sperimentazione mirata a valutare la risposta CMC non-specifica dei linfociti estratti da rene cefalico, milza e mucosa intestinale della spigola ha evidenziato buoni livelli di citotossicità contro le cellule allogene bersaglio DLEC (linea continua embrionale di spigola) (grafici 8 e 9). La risposta citotossica non-specifica dei linfociti dell'intestino è risultata più elevata di quella dei linfociti di rene e milza (+75%) sebbene questa differenza non sia risultata statisticamente significativa.

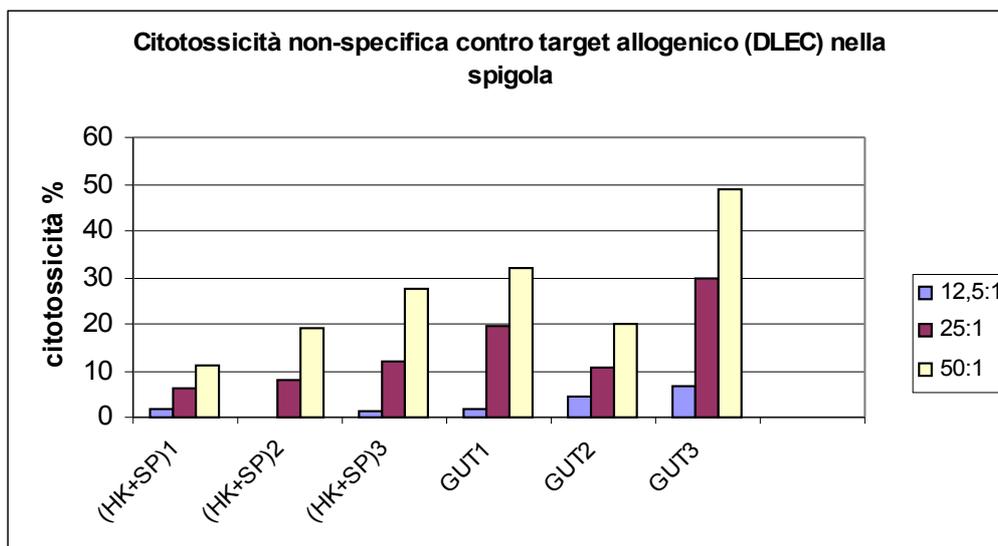


Grafico 8: Citotossicità cellulo mediata non specifica (CMC) nella spigola contro target allogeneico (DLEC) I dati ottenuti su tre animali mostrano la crescita lineare della citotossicità all'aumentare del rapporto tra effettrici e bersagli. I numeri (1, 2, 3) indicano l'animale. HK+SP: citotossicità dei linfociti estratti dal rene cefalico e dalla milza e poi uniti. GUT: linfociti prelevati dall'intestino.

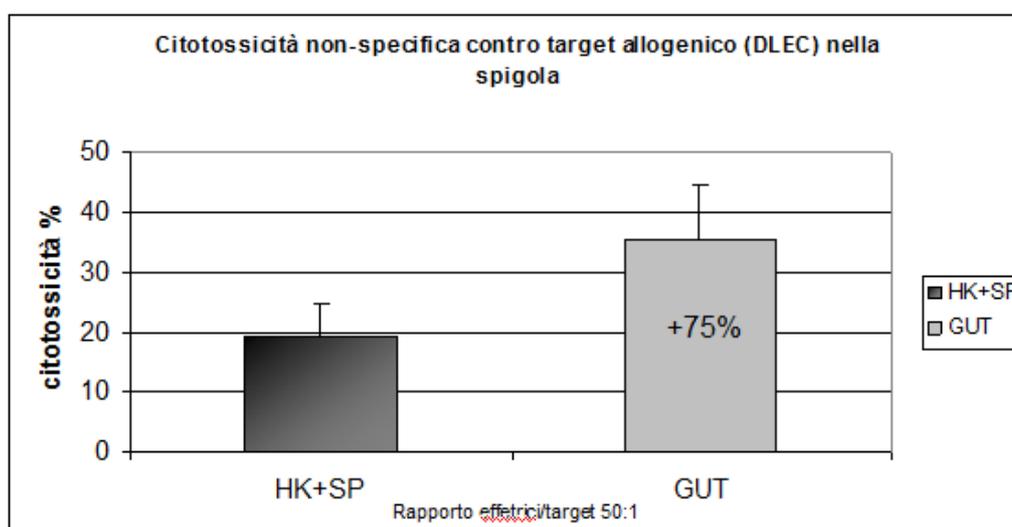


Grafico 9: Citotossicità cellulo mediata non specifica (CMC) nella spigola contro target allogeneico (DLEC). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando tre animali. Rapporto cellule effettrici/traget 50:1. HK+SP: linfociti estratti da rene cefalico e da milza. GUT: linfociti estratti dall'intestino. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative (one way T-test=0,1037).

La risposta CMC non-specifica dei linfociti estratti dai principali organi linfoidi della spigola contro target xenogenico (K562) è risultata elevata in quasi tutti gli organi analizzati, a parte nel timo dove è sembrata trascurabile (grafico 10). I livelli più alti si sono rilevati nell'intestino e nel rene cefalico. Da notare come la CMC nell'intestino sia risultata significativamente più alta di quella della branchie ($P < 0,01$).

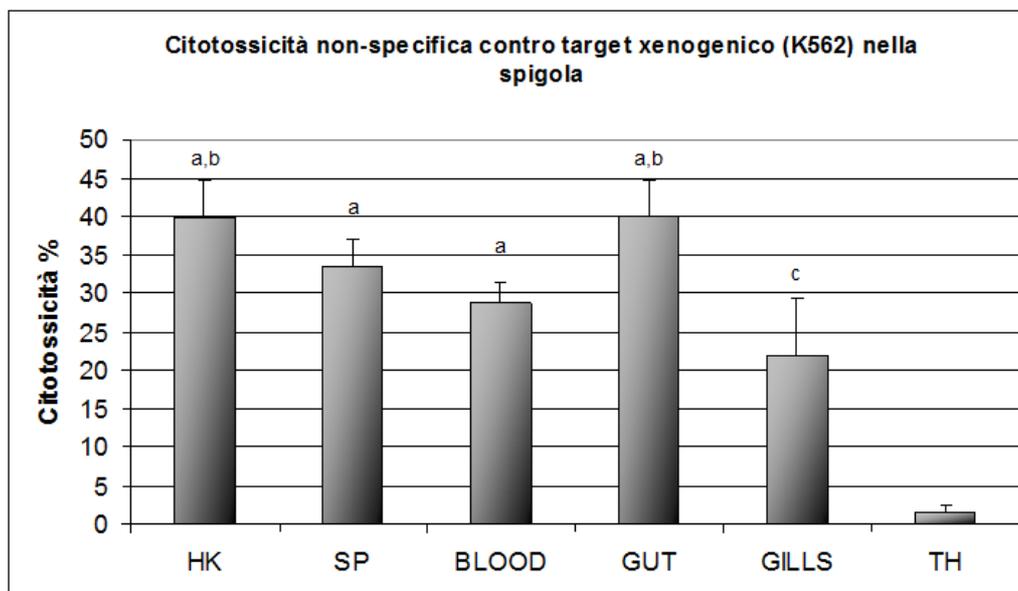


Grafico 10: Citotossicità cellulo-mediata non-specifica contro target xenogenico (linea K562 umana) dei linfociti estratti dai principali organi linfoidi della spigola. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando cinque animali. **HK:** rene cefalico. **SP:** milza. **BLOOD:** sangue periferico. **GUT:** intestino. **GILLS:** branchie. **TH:** timo. **50:1:** rapporto cellule effettrici/bersaglio.

^aSignificativamente diverso dal timo ($P < 0,001$).

^bSignificativamente diverso dalle branchie ($P < 0,01$).

^cSignificativamente diverso dal timo ($P < 0,01$).

Gli esperimenti di immunizzazione nella spigola con cellule K562, invece di avere come effetto un incremento della CMC come osservato nella carpa, hanno avuto come risultato una drastica diminuzione di citotossicità nei linfociti estratti da rene cefalico e dalla milza (grafico 11). In entrambi i gruppi immunizzati, sia i.p. (IP) che analmente (AN), si ha avuto una diminuzione della CMC molto significativa rispetto al controllo ($P < 0,001$).

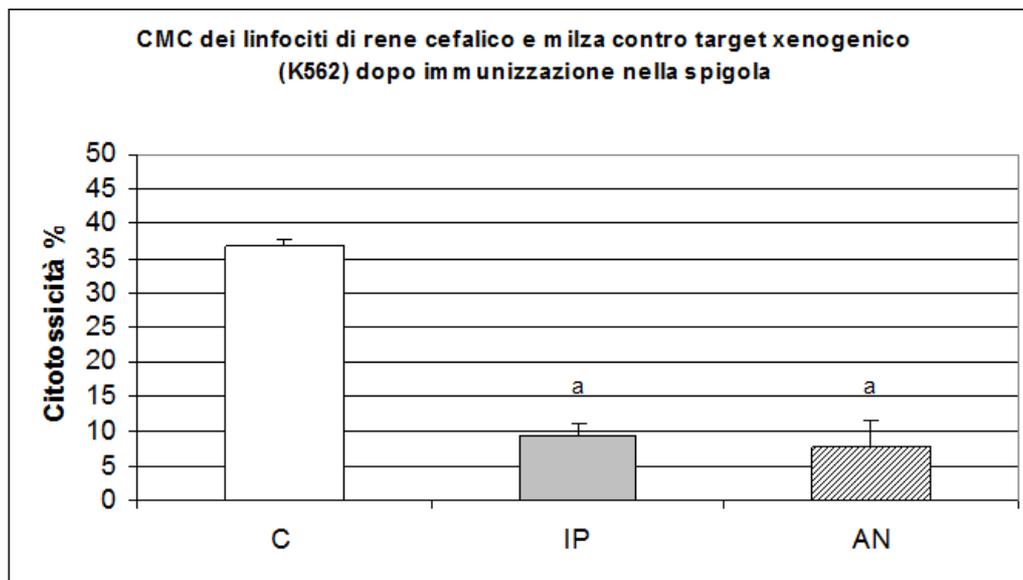


Grafico 11: Citotossicità cellulo-mediata (CMC) dei linfociti estratti da rene e milza contro target xenogenico (linea K562 umana) a seguito di immunizzazione. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando sei animali. C (controllo): Immunizzazione anale e i.p. con PBS. IP: Immunizzazione e richiamo i.p. con K562. AN: Immunizzazione e richiamo anale con lisato cellulare di K562. **50:1:** rapporto cellule effettrici/bersaglio.

^aSignificativamente diverso da C ($P < 0,001$).

A livello intestinale l'immunizzazione con K562 sembra aver avuto esiti diversi da quelli osservati sulla CMC dei linfociti estratti da rene cefalico e milza. In questo caso si è avuta una drastica diminuzione di citotossicità rispetto al controllo solo nel gruppo immunizzato analmente con lisato cellulare ($P < 0,001$) mentre l'immunizzazione i.p. non ha alterato la risposta citotossica dei linfociti intestinali che è risultata molto simile a quella del gruppo di controllo (grafico 12). Interessante notare come l'immunizzazione anale abbia abbassato la CMC, sia in organi come rene e milza sia nell'intestino, a livelli al di sotto del 10%.

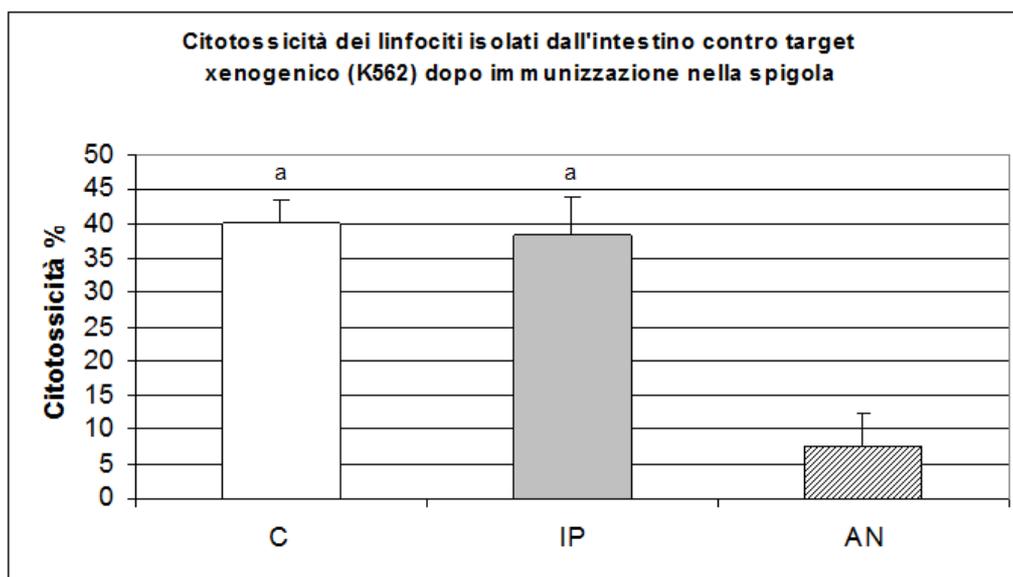


Grafico 12: Citotossicità cellulo-mediata (CMC) dei linfociti estratti dall'intestino contro target xenogenico (linea K562 umana) a seguito di immunizzazione. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei risultati ottenuti analizzando sei animali. C (controllo): Immunizzazione anale e i.p. con PBS. IP: Immunizzazione e richiamo i.p. con K562. AN: Immunizzazione e richiamo anale con lisato cellulare di K562. **50:1:** rapporto cellule effettrici/bersaglio. ^aSignificativamente diverso da AN ($P < 0,001$).

SPERIMENTAZIONE PROBIOTICI

In diversi lavori è stato documentato come la somministrazione di ceppi batterici probiotici sia in grado di attivare il sistema immunitario dei pesci in modo non specifico, incrementando in maniera significativa i parametri di immunità innata e adattativa. Questo effetto benefico può essere indotto già negli stadi giovanili senza provocare un'evidente risposta infiammatoria. Nell'uomo è documentato come gli effetti benefici delle formulazioni probiotiche possano essere potenziati combinando in una singola preparazione più ceppi o specie batteriche. Le informazioni attualmente disponibili nei pesci indicano che i probiotici agiscono modulando il sistema immunitario a livello sistemico, mentre si conosce pochissimo sulle loro potenzialità di stimolare le difese immunitarie nell'intestino, sito di grande rilevanza immunologica. Con lo scopo di approfondire le conoscenze a tal riguardo, in questa tesi si sono analizzati gli effetti della somministrazione (singola o combinata) di *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* e *Bacillus subtilis* inattivati col calore sul sistema immunitario dell'orata. Particolare attenzione è stata rivolta nel valutare la distribuzione nella mucosa dell'intestino posteriore di due popolazioni leucocitarie; i granulociti eosinofili, per valutare un potenziale effetto positivo sull'immunità innata e le cellule che producono immunoglobuline, per dimostrare una modulazione anche del sistema immunitario di tipo adattativo.

Dal punto di vista istologico, la mucosa del tratto posteriore dell'intestino dell'orata si è presentata ricca di pieghe con numerosi linfociti e granulociti acidofili (AGs) infiltrati nell'epitelio e nella lamina propria (LP) della mucosa, sia nel gruppo di controllo che nei trattati. I granulociti acidofili (diametro cellulare $6,4 \pm 1,4 \mu\text{m}$, range 3,5-11,3 μm , N=100) sono stati osservati sia nell'epitelio che nella LP e sono risultati significativamente più numerosi in tutti i gruppi trattati con ceppi probiotici (*Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* da solo: +32%; *Bacillus subtilis* da solo: +49%; *L. del. lactis* e *B. subtilis* combinati: +130%, $P < 0,01$ test di Dunnett) rispetto al gruppo di controllo (tabella 3; grafico 13). L'analisi ANOVA ad una via ha confermato l'effetto significativo del trattamento ($P < 0,02$). La somministrazione di probiotici ha indotto un incremento dei AGs sia in lamina propria che nell'epitelio (figura 6 A, B).

Tabella 3: Densità relative (N° di cellule/mm²) delle popolazioni leucocitarie nella mucosa intestinale dell'orata alimentata con quattro diverse diete sperimentali: controllo; 1x10⁷ CFU g⁻¹ *Lactobacillus delbrückii* ssp. *lactis* inattivato con il calore; 1x10⁷ CFU g⁻¹ *Bacillus subtilis* inattivato con il calore; 0,5x10⁷ CFU g⁻¹ *L. delbrückii* ssp. *lactis* e 0,5x10⁷ CFU g⁻¹ *Bacillus subtilis*, sempre inattivati con il calore.

Gruppi sperimentali	Granulociti acidofili	Cellule Ig ⁺
Controllo	391 ± 61	13 ± 5
<i>Lactobacillus del. lactis</i>	517 ± 72	11 ± 2
<i>Bacillus subtilis</i>	584 ± 72	23 ± 6
<i>Lactobacillus del. lactis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	899 ± 157 ^a	50 ± 9 ^{a,b,c}

I risultati numerici sono stati espressi come media ± deviazione standard della media (N=5 per gruppo) e sono stati analizzati con test statistico ANOVA ad una via e test di comparazione multipla di Dunnett o test di Tukey, dove opportuno.

^aSignificativamente diverso rispetto al controllo (p<0,01, test di Dunnett).

^bSignificativamente diverso rispetto al controllo e al gruppo *Lactobacillus del. lactis* (p<0,01).

^cSignificativamente diverso rispetto al gruppo *Bacillus subtilis* (p<0,05, test di Tukey).

L'antisiero policlonale Pab OR1 ha marcato una frazione di leucociti mucosali (diametro cellulare 7,6 ± 1,3 µm, range 4,7-10,8 µm, N=100) sia nell'epitelio che nella LP. Le cellule Ig⁺ sono risultate più numerose nel gruppo alimentato con *B. subtilis* da solo (+77%) e in quello con la formulazione probiotica multispecie (+285%) rispetto al gruppo di controllo, mentre si è osservata una debole diminuzione nel gruppo alimentato con *L. del. lactis* da solo (-15% rispetto al controllo) (tabella 3). Anche in questo caso l'analisi ANOVA ad una via ha confermato l'efficacia del trattamento (p<0,01). Inoltre, il gruppo alimentato con la dieta combinata dei due ceppi probiotici è risultato significativamente diverso da tutti gli altri gruppi (tabella 3, grafico 14). Come per gli AGs, la somministrazione di probiotici ha indotto un aumento delle cellule Ig⁺ sia nell'epitelio che nella LP (figura 6 C, E). La maggior parte delle cellule Pab OR1 ha evidenziato un'immunoreattività citoplasmatica (figura 6 E).

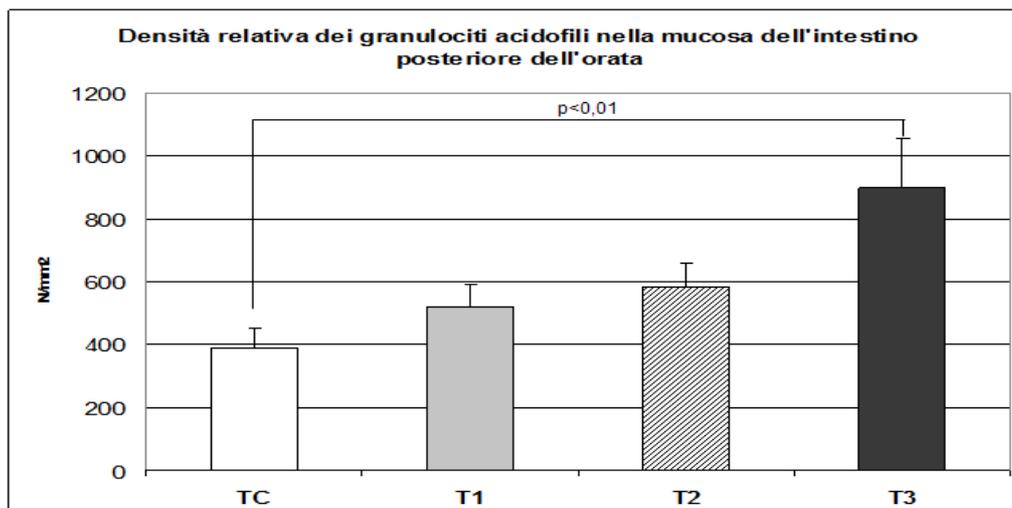


Grafico 13: Densità relative dei granulociti acidofili nella mucosa dell'intestino posteriore dell'orata in gruppi ai quali sono state somministrate quattro differenti diete sperimentali. TC, gruppo di controllo; T1, gruppo alimentato con 1×10^7 CFU g⁻¹ *Lactobacillus del. lactis* inattivato con il calore; T2, gruppo alimentato con 1×10^7 CFU g⁻¹ *Bacillus subtilis* inattivato con il calore; T3, gruppo alimentato con $0,5 \times 10^7$ CFU g⁻¹ *L. delbrückii* ssp. *lactis* e $0,5 \times 10^7$ CFU g⁻¹ *Bacillus subtilis*, sempre inattivati con il calore.

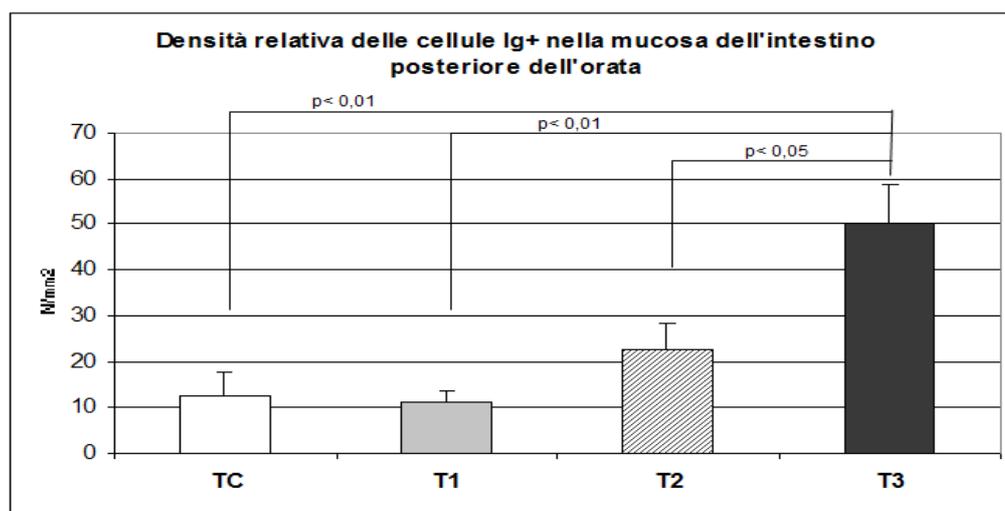


Grafico 14: Densità relative delle cellule Ig⁺ nella mucosa dell'intestino posteriore dell'orata nei gruppi ai quali sono state somministrate quattro differenti diete sperimentali. I gruppi sono gli stessi del grafico 4 (vedi sopra).

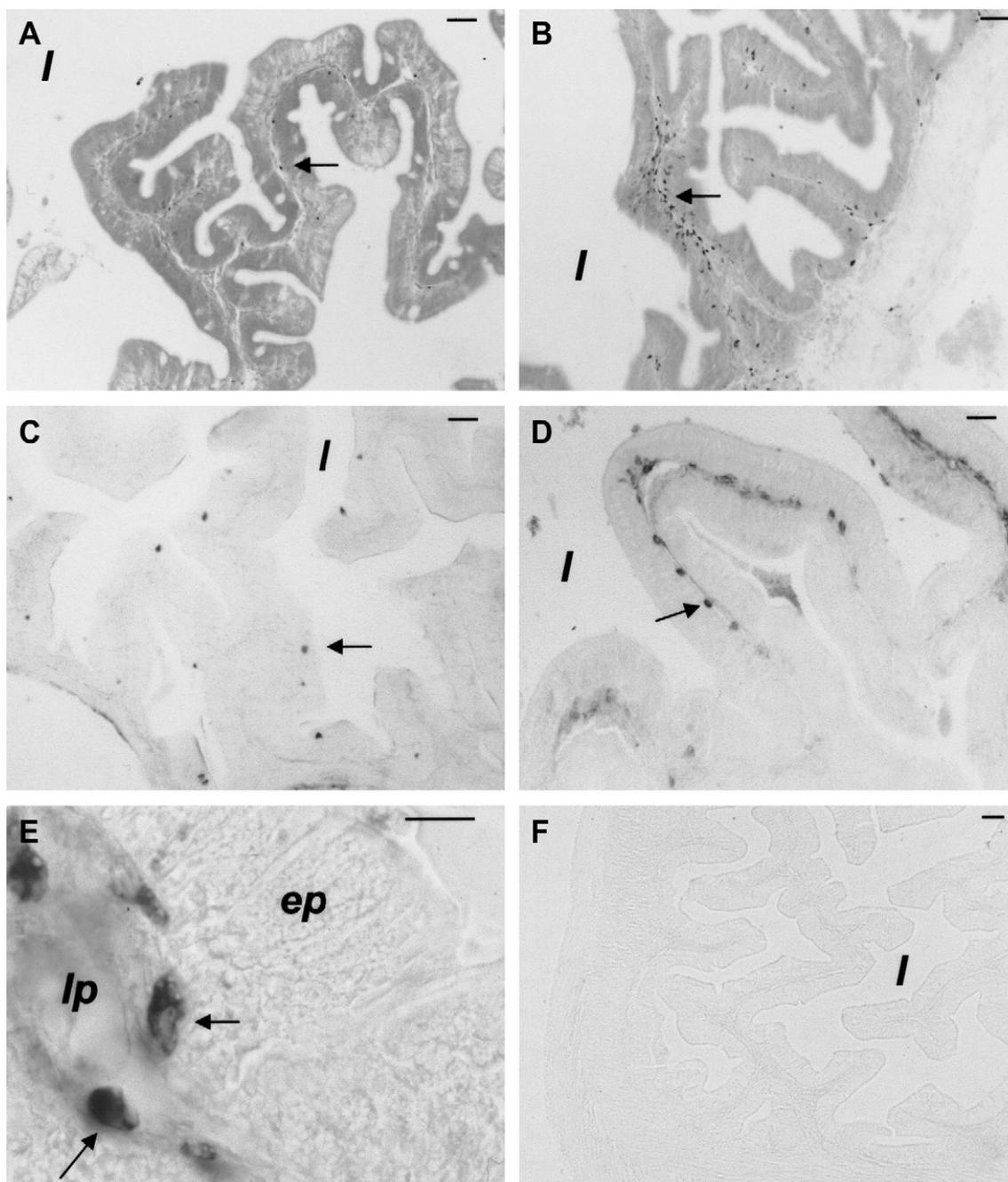


Figura 6: Istologia (colorazione di May-Grünwald/Giemsa) e immunohistochemica di popolazioni leucocitarie nell'intestino posteriore dopo tre settimane di trattamento con probiotici. La mucosa del pesce di controllo (A) ospita granulociti eosinofili (freccie) che crescono notevolmente di numero sia nell'epitelio che nella lamina propria nei gruppi alimentati con *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus delbrückii spp. lactis* (B). Altrettanto, l'intestino del pesce di controllo (C) presenta delle cellule Pab OR1-immunoreattive sparse (freccie) che aumentano di numero sia nell'epitelio che nella lamina propria della mucosa dei gruppi alimentati con *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus delbrückii spp. lactis* (D). (E) Localizzazione citoplasmatica degli immunoprecipitati nelle cellule Ig⁺ (freccie). Controllo negativo di una reazione immunohistochemica (F). Barre = 30µm in (A), (B), (C), (D), (F); 10µm in (E). Abbreviazioni: ep, epitelio; lp, lamina propria. Colorazione immunohistochemica (ABC-perossidasi intensificata con Nichel).

DISCUSSIONE

L'interazione reciproca e continua tra organismo e ambiente è una caratteristica fondamentale della vita di ogni individuo. L'interfaccia che si viene a stabilire deve risultare selettivamente permeabile formando, al tempo stesso, una barriera di difesa efficace contro le minacce ambientali rappresentate dai patogeni (Roitt et al., 1993). Il tratto gastrointestinale è una delle superfici più ampie di contatto tra l'organismo e l'ambiente esterno e di conseguenza assume una grande rilevanza dal punto di vista immunitario (Bernard et al. 2006). La capacità dell'intestino di contribuire alla linfopoiesi è conosciuta ormai da molti anni. Nei vertebrati più antichi dal punto di vista evolutivo il tratto gastrointestinale ha preceduto il timo come principale organo di differenziamento linfocitario (Cheroutre, 2004). Negli organismi pluricellulari più antichi, le prime cellule ad aver assunto una funzione di difesa sono state quelle con capacità fagocitica, deputate all'assorbimento del cibo, che hanno probabilmente dovuto sviluppare meccanismi protettivi basati sul riconoscimento delle cellule proprie (self) dell'organismo per impedire l'autoreattività. Il primo meccanismo di protezione dell'organismo doveva essere quindi di tipo non-specifico, molto simile a quello esercitato da cellule di tipo natural killer (NK). L'aumento della complessità degli organismi, i drastici cambiamenti ambientali, la costante evoluzione dei patogeni e dei loro meccanismi per sfuggire al riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario, sono stati probabilmente i principali motivi che hanno portato alla comparsa di recettori antigene-specifici nei vertebrati più evoluti e quindi alla comparsa di una citotossicità specifica cellulo-mediata (Lambolez et al., 2007).

Il sistema immunitario permette agli organismi che lo possiedono non solo di difendersi dalle minacce ambientali ma anche di gestire minacce generate all'interno dell'organismo stesso, quali cellule autoimmuni, tumorali o infettate da virus. La sua straordinaria capacità di sviluppare meccanismi sempre più efficaci per combattere i patogeni è pari solo alla capacità di questi ultimi di evolvere nuovi sistemi per sfuggire al riconoscimento da parte delle cellule immunitarie. È l'ambiente che plasma il sistema immunitario di un organismo e questo risulta quanto mai vero per i pesci che rappresentano il gruppo di vertebrati più diversificato (maggior numero di specie) sul nostro pianeta e che hanno colonizzato tutti gli ambienti acquatici con una straordinaria radiazione evolutiva. Abitudini ed ambienti di vita estremamente diversi hanno esercitato una notevole pressione selettiva sul sistema immunitario delle diverse specie.

In questa tesi di dottorato si è cercato di generare nuove informazioni utili per approfondire la conoscenza del complesso e molto articolato mondo dell'immunità dei pesci. In particolare, lo studio della citotossicità cellulo-mediata e delle popolazioni che intervengono nei suoi complessi, ma indispensabili, meccanismi è reso ancora più difficile dalla mancanza di appropriati marcatori molecolari che permettano la tipizzazione delle cellule coinvolte. Le informazioni disponibili sulla citotossicità cellulo-mediata nei pesci provengono da evidenze di tipo funzionale e rimangono comunque molto limitate. Il metodo più comune d'indagine è quello di cercare di confermare nei pesci funzioni analoghe per molecole e cellule omologhe a quelle dei vertebrati superiori per le quali sono disponibili marcatori specifici. Questo tipo di approccio, che spesso risulta l'unico percorribile, non è esente da rischi perché

non bisogna dimenticare che i pesci hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione adattamenti immunitari propri e diversi da quelli degli altri vertebrati. Esempi di questo sono forniti dalle caratteristiche dei recettori per gli antigeni. Studi biomolecolari hanno evidenziato che i pesci ossei Teleostei possiedono solo immunoglobuline (Ig) multimeriche (IgM-like), con un singolo tipo di catena pesante (μ) (Warr, 1995), omologhe alle Ig di tipo M dei mammiferi. L'aumento dell'affinità anticorpale è molto limitato se paragonato a quello dei Mammiferi (Arkoosh e Kaattari 1991; Kaattari, 1992) ed è stata inoltre dimostrata l'assenza, rispetto ai Mammiferi, del caratteristico switch delle Ig a più basso peso molecolare (Kaattari, 1992). La mancanza di numerose classi immunoglobuliniche dei mammiferi (IgA, IgE, IgG) è però compensata da una presenza variegata di isoforme delle catene pesanti e leggere delle Ig, caratteristiche e peculiari in diverse specie, quali IgD-like nel pesce gatto americano (Wilson et al., 1997; Stenvik et al., 2000), IgT nella trota arcobaleno (Hansen et al., 2005) IgZ nello zebrafish (Danilova et al., 2005) e TrbeL1,2 e 3 in un pesce antartico (Coscia et al., 2008). Altra importante differenza rispetto ai mammiferi è stata dimostrata da Bernard et al (2006) analizzando in dettaglio il repertorio della subunità TCR β nei linfociti intraepiteliali (IEL) della trota arcobaleno. I trascritti per il TCR β sono risultati molto diversi tra loro e con un repertorio policlonale, in forte contrasto con la limitata diversità e il repertorio oligoclonale dei IEL descritti negli uccelli e nei Mammiferi. Le differenze rispetto ai Mammiferi possono far comprendere le difficoltà alle quali si va incontro quando si affronta il difficile e complesso meccanismo della risposta immunitaria nei Teleostei. Un approccio indispensabile sembra inoltre essere quello di analizzare le differenze esistenti tra le diverse specie ittiche, data la variabilità marcata riscontrata anche all'interno di raggruppamenti sistematici affini.

In questa tesi di dottorato si è cercato di ampliare le conoscenze di base relative alle risposte citotossiche cellulo-mediate in due specie ittiche di grande rilevanza per l'acquicoltura mondiale: la carpa (*Cyprinus carpio* L.), specie d'acqua dolce, erbivora, che vive in acque stagnanti ricche di vegetazione e la spigola= branzino (*Dicentrarchus labrax* L.), specie marina, carnivora.

Lo studio della risposta citotossica è di fondamentale importanza per la comprensione dei meccanismi di difesa contro le cellule estranee (non-self) o infettate da virus. Particolare attenzione è stata rivolta alla risposta citotossica dei linfociti intestinali, poiché quest'apparato è esposto direttamente all'attacco di patogeni introdotti con il cibo o provenienti dall'ambiente esterno, è il bersaglio principale di vaccinazioni orali, azione di probiotici e immunostimolanti, e sembra essere anche nei pesci sede linfopoietica extra-timica di cellule della linea T (Picchiatti et al., 1997; Rombout et al., 2005). Proprio quest'ultima popolazione cellulare potrebbe essere ipoteticamente coinvolta nella citotossicità cellulo-mediata, conferendo all'intestino delle caratteristiche peculiari. L'identificazione dei leucociti intestinali, in particolare dei linfociti T, appare quindi fondamentale per comprendere il loro coinvolgimento nella citotossicità cellulo-mediata a livello mucosale. Attualmente sono disponibili solamente due anticorpi monoclonali in grado di riconoscere putativi linfociti T nei pesci: il mAb DLT15 nella spigola (Scapigliati et al., 1995; Abelli et al., 1997) e il mAb WCL38 nella carpa (Rombout et al., 1998). Quindi il nostro studio si è concentrato su queste due specie di Teleostei, poiché i dati fino ad oggi ottenuti mediante tecniche immunoistochimiche, ibridazione *in situ* e analisi d'espressione genica hanno permesso solo di fare delle ipotesi sulla natura dei leucociti mucosali e sulla loro capacità citotossica.

Si è deciso di studiare la citotossicità cellulo-mediata (CMC) dei linfociti, purificandoli dagli altri leucociti, perché si è voluto analizzare il loro ruolo specifico e perché essi rappresentano la popolazione di gran lunga più abbondante a livello della mucosa intestinale di queste due specie. Una CMC non-specifica è di fatti esercitata anche da parte di altre popolazioni leucocitarie: i granulociti eosinofili nella spigola (Cammarata et al., 2000), i granulociti neutrofili nella trota (Sasaki et al., 2002) e nella carpa (Fisher et al., 1998). La percentuale di linfociti purificati nelle sospensioni utilizzate per i test di citotossicità è stata sempre >90% (valutazione citofluorimetrica).

Prima di discutere i risultati delle sperimentazioni condotte nella carpa e nella spigola è opportuno parlare brevemente delle cellule che mediano la CMC. I linfociti T citotossici (Tc) sono responsabili della CMC specifica. Nei Mammiferi, le cellule infettate da virus espongono sulla loro superficie peptidi virali legati alle molecole dell'MHC di classe I che vengono riconosciuti in questo modo dai linfociti T TCR⁺CD8⁺ (Bot et al., 1998; Pamer e Cresswell, 1998; Van Endert, 1999; Weeks et al., 1999). Il successo del legame che si viene a formare fra TCR e MHCI, che determina la possibile attivazione della risposta citotossica, è strettamente legato alla compatibilità del TCR sia con MHCI sia con il peptide antigenico. Per questo motivo questo processo viene definito MHCI-ristretto (Doherty e Zinkernagel, 1975). La scoperta nei pesci di sequenze omologhe a quelle dei mammiferi per *MHCI*, *TCR* e *CD8* sono ampiamente documentate in letteratura e suggeriscono il parallelismo nelle modalità di presentazione dell'antigene tra Mammiferi e pesci. Il linfocita Tc, una volta attivato, prima di iniziare a proliferare e differenziarsi in Tc maturo necessita di un co-segnale d'attivazione rappresentato dall'interleuchina 2 (IL-2) secreta dai linfociti T helper (Th). I Th possono essere attivati dalle cellule fagocitiche che presentano l'antigene (APC), e dai linfociti B, che presentano al TCR e al suo co-recettore CD4 l'antigene esposto sull'MHC di classe II. Come conseguenza dell'attivazione, i Th rilasciano IL-2 che andrà a legarsi al recettore corrispondente sul linfocita Tc attivato che quindi potrà iniziare la sua attività citotossica specifica (Alloche et al., 1990). Sebbene esistano prove di tipo funzionale, le cellule Th nei pesci non hanno ancora avuto una identificazione certa, anche se in alcune specie sono state clonate sequenze nucleotidiche omologhe al *CD4* dei vertebrati più evoluti (Suetake et al., 2004; Buonocore et al., 2008). Anche relativamente alla presenza della citochina IL-2 nei pesci, i dati disponibili non sono ancora definitivi, basandosi esclusivamente sulla individuazione di una attività IL-2 simile in trota iridea (Blohm et al., 2003) e del gene codificante in Fugu (Bird et al., 2005).

Le cellule NK sono responsabili della CMC non-specifica nei Mammiferi. Morfologicamente esse appaiono come grandi linfociti granulari e, a differenza dei linfociti Tc, riconoscono come pericolose le cellule che non esprimono sulla loro superficie di membrana MHC di classe I (questo avviene per alcune cellule tumorali o infettate da virus). La corretta interazione tra i recettori KIR espressi sulla membrana nelle NK e le molecole MHC di classe I ne impedisce l'attivazione. L'equivalente funzionale di queste cellule nei pesci sembra essere rappresentato dalle cellule citotossiche non-specifiche (NCC) (Evans e Jaso-Friedmann, 1992). Queste cellule sembrano avere una caratteristica proteina di membrana, chiamata recettore delle cellule NCC di tipo uno (NCCRP-1, Jaso-Friedmann e Leary, 1997). Il gene codificante per l'NCCRP-1 è stato clonato in tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Ishimoto et al., 2004) e orata (Cuesta et al., 2008). Oltre alle cellule NCC, sono state identificate nel pesce gatto americano cellule denominate NK-simili (Yoshida et al., 1995). Queste ultime sono state isolate dal sangue periferico, non esprimono la proteina di

superficie NCCRP-1 e si sono dimostrate capaci di uccidere cellule sia di natura allogenica (Yoshida et al., 1995) sia infettate da virus (Hogan et al., 1996).

Un'altra sottopopolazione linfocitaria con capacità CMC non-specifica è rappresentata dai linfociti T con fenotipo TCR $\gamma\delta$ CD8⁺. La funzione e l'origine di queste cellule è ancora molto discussa anche nei Mammiferi. Questa sottopopolazione T costituisce quasi il 60% dei linfociti intraepiteliali (IEL) del topo, può rappresentare la prima linea di risposta cellulare dell'organismo contro i patogeni che agiscono sugli epiteli di rivestimento, e può avere origine extratimica (Boismenu, 2000). I linfociti TCR $\gamma\delta$ presentano molte caratteristiche comuni alle NK: oltre ad esercitare una CMC non-specifica, secernono citochine simili e presentano sulla membrana molte molecole analoghe (Lanier, 1995). Inoltre, le cellule TCR $\gamma\delta$ sembrano in grado di riconoscere proteine antigeniche sia processate che non (superantigeni) e ciò comporta che l'attivazione non sia dipendente dall'associazione dell'antigene con le molecole dell'MHCI e II (Tanaka, 1995). Questo ha fatto ipotizzare che il TCR $\gamma\delta$ agisca come recettore altamente variabile (più simile funzionalmente ad una Ig che non al TCR $\alpha\beta$) (Lanier, 1995). Nei Mammiferi, sono state indicate per queste cellule molte funzioni, tra le quali un ruolo sicuramente importante nell'omeostasi di tutte le superfici rivestite da epitelio (mucose e cute), oltre alla risposta contro gli agenti patogeni (Yoshikai, 1999). Una buona parte dei IEL ha infatti attività citotossica, in particolar modo in presenza di IL-2 (Sydora et al., 1993; Moretta et al., 1991). Ad oggi è molto difficile dimostrare nei pesci la presenza di cellule omologhe ai linfociti CD3⁺ CD8⁺ TCR $\gamma\delta$ dei mammiferi, per la mancanza di opportuni marcatori molecolari (anticorpi monoclonali o probes genici). Alcuni lavori scientifici hanno dimostrato però l'espressione di geni codificanti il TCR $\gamma\delta$ in una razza (Rast et al. 1997) e nella passera giapponese (Nam et al., 2003) e recentemente il TCR $\gamma\delta$ è stato clonato e caratterizzato nella carpa comune, assieme al CD3 $\gamma\delta$ (Shang et al., 2008). Quest'ultimo studio indicherebbe l'esistenza di tali cellule nella carpa, sostenuta dall'analisi di espressione genica mediante RT-PCR e da studi di ibridazione *in situ*.

Nel 2006, quando è iniziato il lavoro di questa tesi, valutazioni funzionali della CMC nella carpa e sulla presenza e localizzazione delle cellule potenzialmente coinvolte erano molto scarse. Gli unici dati funzionali disponibili indicavano la possibilità di indurre una CMC specifica contro target allogenico (EPC) a livello sistemico, a seguito di immunizzazione anale (Sato et al., 2005). In questo lavoro non era stata presa in considerazione la risposta citotossica a livello mucosale. Riguardo l'identificazione fenotipica di linfociti con potenziale attività citotossica, le uniche informazioni disponibili derivavano da studi in carpa con il mAb WCL38. L'analisi citofluorimetrica ha dimostrato la reattività dell'anticorpo con il 50-70% delle cellule linfoidi estratte da intestino, branchie e pelle (mucose), con <6% delle cellule linfoidi purificate da timo, rene cefalico e milza, e una percentuale trascurabile di PBL (Rombout et al., 1997). Le cellule WCL38⁺ della mucosa intestinale sono risultate abbondanti intraepiteliali e meno numerose nella lamina propria. L'immuno-elettromicroscopia ha dettagliato la citologia di grandi linfociti granulari per le cellule positive rinvenute in branchie e pelle. L'anticorpo ha dimostrato reattività per una molecola dimerica di membrana, formata da due subunità (38 kDa). Gli autori (Rombout et al., 1997) hanno indicato le cellule WCL38⁺ come putativi linfociti T, perché Ig⁻ e localizzate prevalentemente negli epiteli delle mucose, in modo analogo ai linfociti T CD8⁺ dei vertebrati superiori (Lefrancois e Puddington., 1995). Hanno inoltre ipotizzato che queste cellule non fossero cellule citotossiche non-specifiche, perché negli epiteli della carpa sono

state individuate pochissime cellule 5C6⁺ (<2%) a differenza del rene cefalico e della milza dove sono state osservate in discreta percentuale (2-16% e 2-11%, rispettivamente). Il 5C6 è un anticorpo che, con buona probabilità, riconosce il recettore NCCRP (Jaso-Friedmann et al., 1997) delle NCC del pesce gatto (Evans et al., 1988) ed ha mostrato cross-reattività anche nella carpa. Tuttavia, un lavoro più recente ha dimostrato l'esistenza in un'altra specie (pesce gatto americano) di altre popolazioni cellulari (NK-like) dotate di capacità citotossica non-specifica, che non esprimono NCCRP, e risiedono nel sangue periferico (Shen et al., 2004). Quindi la potenziale attività citotossica delle cellule WCL38⁺ della carpa richiede uno studio più approfondito.

L'abbondanza delle cellule WCL38⁺ negli epiteli delle mucose e la loro scarsità in timo, rene cefalico e sangue ha indotto a ipotizzare che queste cellule potessero rappresentare l'equivalente funzionale dei linfociti TCR $\gamma\delta$ CD8⁺ dei Mammiferi (Rombout et al., 1998). Prima di effettuare le immunizzazioni con le cellule di natura allogenica (EPC, Epithelioma papulosum cyprini; linea cellulare aderente derivata dall'epidermide della carpa), è stato verificato che esse continuassero ad esprimere molecole dell'MHC di classe I, anche a seguito del trattamento di tripsinizzazione necessario per staccarle dal fondo delle piastre di coltura. La verifica è stata compiuta con due anticorpi in grado di riconoscere le 4 subunità dell'MHC di classe I ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 2$). Non sono state notate differenze tra cellule sottoposte a tripsinizzazione e cellule non trattate. I dati analizzati e riportati in seguito sulla CMC si riferiscono ad un rapporto cellule effettrici/target di 50:1 (considerato il più rappresentativo). Il valore di citotossicità assoluta, (misurata con test colorimetrico basato sulla quantificazione della lattato deidrogenasi (LDH)), indica la percentuale di cellule bersaglio lisate dalle effettrici durante le 4 ore di incubazione previste dal saggio di citotossicità (Cytotox96[®] PROMEGA). Una citotossicità assoluta inferiore al 5% è stata ritenuta non-significativa. Per determinare l'effetto del trattamento si è usata l'analisi ANOVA ad una via seguita dal test di comparazione multipla di Dunnett o Tukey (quando possibile), per mettere in evidenza differenze esistenti rispetto al controllo o fra ogni singolo gruppo sperimentale.

Nella carpa, la CMC non-specifica contro target allogenico (EPC) è risultata trascurabile nei linfociti estratti da sangue, rene, milza e intestino, indicando l'assenza di cellule allo-reattive (Companjen et al., 2006; Companjen et al., dati non pubblicati). Di contro, la CMC non-specifica contro target xenogenico (K562, linea eritroleucemica umana che non esprime MHC di classe I) è risultata trascurabile nei linfociti intestinali (molto limitata anche in branchie e timo), ma ha raggiunto valori significativi nel rene (36%), nella milza (27%) e nel sangue (19%), dimostrando la presenza in questi organi di cellule xenoreattive. Definire la natura di queste cellule citotossiche risulta molto difficile proprio per la mancanza di marcatori specifici nella carpa per le NCC, le cellule NK-like e i linfociti TCR $\gamma\delta$. Quello che possiamo sicuramente dedurre è che solo negli organi sistemici della carpa sono presenti cellule citotossiche non-specifiche che non sono in grado di riconoscere cellule allogeniche (MHC-I compatibili e che esprimono molte altre molecole comuni alle altre cellule dell'organismo). Questi linfociti purificati sono invece risultati reattivi contro cellule xenogeniche umane (K562), che non presentano MHCI e esprimono sulla loro superficie molte altre molecole non presenti nella carpa. Questo indurrebbe a pensare ad un meccanismo di riconoscimento NK-simile, o comunque non ristretto al MHCI. Le immunizzazioni con le cellule allogeniche (EPC) hanno evidenziato la difficoltà nell'indurre una risposta CMC specifica nell'intestino, sia dopo somministrazione

dell'antigene allogenico per via anale sia intraperitoneale (in entrambi i casi la citotossicità si è attestata attorno al 6-7%). Di contro, l'immunizzazione con target allogenico (EPC) ha indotto alti livelli di citotossicità assoluta nel comparto sistemico (milza 48%, rene 32%, sangue periferico 28%), solamente però a seguito di somministrazione i.p. degli antigeni (Companjen et al., dati non pubblicati). E' da notare quindi l'inefficacia mostrata dal protocollo di immunizzazione per via anale.

L'attività CMC specifica indotta da immunizzazione i.p. (pressoché assente senza precedente stimolazione antigenica) potrebbe essere spiegata ipotizzando un meccanismo classico di attivazione dei linfociti Tc (TCR $\alpha\beta$ CD8+) che prevede il coinvolgimento di APC e Th. Non può essere escluso che l'introduzione di EPC vitali nell'intestino potrebbe aver portato ad una eliminazione prematura delle cellule, impedendo di fatto l'induzione dell'effetto atteso, quindi il protocollo impiegato per l'immunizzazione per via anale potrebbe richiedere ulteriori perfezionamenti.

Gli esperimenti di immunizzazione contro target xenogenico (K562) hanno indicato, per la prima volta, la possibilità di indurre una risposta CMC nell'intestino della carpa. Il protocollo di immunizzazione che ha dato i risultati migliori è stato quello di somministrazione anale con le cellule K562 lisate. Con questo metodo si è riusciti ad ottenere un'elevata risposta citotossica sia da parte dei linfociti intestinali (39% citotossicità assoluta, +1200% rispetto al controllo non-immunizzato, $P < 0,001$) sia dei linfociti da rene e milza (60% citotossicità assoluta, +127% rispetto al controllo, $P < 0,01$). Anche la somministrazione i.p. delle K562 ha aumentato i livelli di citotossicità, in maniera statisticamente significativa nell'intestino (25% citotossicità assoluta, +733% rispetto al controllo, $P < 0,01$), ma non significativamente in rene e milza (41% citotossicità assoluta, +57% rispetto al controllo). Alla luce di questi risultati si evince che il protocollo di immunizzazione che permette agli xenoantigeni di arrivare direttamente a contatto con la mucosa intestinale risulta più efficace nell'incrementare la risposta CMC, rispetto all'immunizzazione i.p., sia a livello sistemico che mucosale.

Risulta particolarmente difficile l'attribuzione ad una distinta sottopopolazione linfocitaria dell'attività CMC contro target xenogenico qui osservata. Non si è parlato volutamente di incremento di citotossicità specifica perchè le cellule K562 non esprimono MHC di classe I e la CMC specifica è un meccanismo considerato MHCI-ristretto. La CMC xenogenica indotta dall'immunizzazione anale può essere riassunta in un incremento significativo della risposta in rene e milza ($P < 0,01$) e nell'intestino ($P < 0,001$) rispetto al controllo non immunizzato. L'incremento a livello sistemico potrebbe dipendere dalla proliferazione clonale delle cellule presenti in rene e milza, già responsabili della risposta CMC non-specifica rilevata nei controlli non immunizzati. Tuttavia questa ipotesi si dimostrerebbe poco applicabile per giustificare i risultati ottenuti nell'intestino, dove una popolazione linfocitaria con capacità citotossica non sembra essere presente nei controlli. Un'altra ipotesi possibile è quella dell'attivazione di cellule citotossiche non-specifiche attraverso un meccanismo analogo a quello conosciuto nei Mammiferi come risposta CMC anticorpo-dipendente (ADCC) (Pudifin et al., 1971; Van Boxel et al., 1972., Kedar et al., 1974). Nei Mammiferi i recettori della famiglia Fc γ R sono di importanza fondamentale nella risposta CMC anticorpo-dipendente (ADCC). Il Fc γ RIII presente anche sui linfociti lega il frammento cristallizzabile (Fc) delle IgG che viene in questo modo armato, quindi capace di riconoscere le cellule estranee in maniera specifica (Su et al., 2002; Szalai et

al., 2005; Sapinoro et al., 2008). I dati funzionali ottenuti sui mammiferi suggeriscono l'esistenza di un FcR anche per le IgM (Fc μ R; Rabinowich et al., 1996). Nel pesce gatto un Fc μ R sembra essere espresso sulla superficie di membrana delle cellule NK-like (Shen et al 2003). Per verificare questa ipotesi saranno necessari ulteriori studi mirati a valutare il titolo anticorpale specifico contro le cellule bersaglio nei pesci sottoposti ai diversi protocolli d'immunizzazione.

E' interessante notare come anche l'immunizzazione anale con cellule intere abbia indotto almeno a livello intestinale una risposta citotossica significativa (34% citotossicità assoluta, +1033% rispetto al controllo $P < 0,001$), probabilmente spiegabile con il fatto che le K562 sono andate incontro a lisi, trovandosi in un ambiente non adatto, piu' velocemente di quanto non abbiano fatto le EPC di carpa. I frammenti proteici prodotti sarebbero quindi stati internalizzati dagli enterociti e processati dalle APC per "educare" le popolazioni citotossiche locali. Uno dei risultati piu' interessanti ottenuti in questa sperimentazione sulla carpa è stato quello di dimostrare come la presentazione di xenoantigeni direttamente a contatto con la mucosa intestinale induca una risposta CMC specifica per quell'antigene, non solo a livello locale, ma anche a livello sistemico. Fatto spiegabile se si considera la possibilità che gli antigeni, le cellule che li presentano o le stesse cellule citotossiche attivate si spostino da un organo all'altro. I risultati ottenuti confermano la grande efficacia della somministrazione di antigeni per via anale nell'incrementare la CMC e di conseguenza migliorare le difese dell'organismo. Essa però, risulta una tecnica di vaccinazione impraticabile negli allevamenti ittici perchè troppo costosa in termini di tempo, materiali e mano d'opera. Effetti analoghi si potrebbero avere però con protocolli di immunizzazione che prevedano la somministrazione degli antigeni per via orale. Quest'ultima permette di vaccinare contemporaneamente un gran numero di esemplari ed è stato dimostrato essere meno stressante rispetto alle immunizzazioni per immersione o i.p. (Ellis et al., 1995). Per rendere la tecnica di vaccinazione orale più sicura ed efficace saranno necessarie nuove conoscenze sul fenomeno poco studiato nei pesci della tolleranza (Joosten et al., 1997) e per ottimizzare tecniche di incapsulazione degli antigeni che permettano a questi ultimi di non essere degradati prima di raggiungere l'intestino.

Non è stato possibile analizzando i risultati ottenuti in questa tesi definire con precisione la natura dei IEL della carpa. Dal punto di vista funzionale queste cellule sembrano non possedere CMC non-specifica nei confronti di cellule xenogeniche e nemmeno allogeniche. Questo dato confermerebbe la bassissima presenza di cellule positive per l'anticorpo 5C6 (specifico per le NCC del pesce gatto e cross-reattivo nella carpa) nella mucosa intestinale. I linfociti intestinali rispondono però all'immunizzazione, sia i.p. sia anale, con xenoantigeni, raggiungendo alti livelli di citotossicità (25% e 39%, rispettivamente). Analisi al FACS hanno rivelato come i IEL della carpa siano in buona parte sia WCL38⁺ (60%) sia CD3 ϵ ⁺ (70%) (Rombout et al., dati non ancora pubblicati), confermando l'appartenenza di queste cellule alla linea T. Ulteriori studi saranno necessari per definire con maggior chiarezza i IEL della carpa ed è consigliabile ripetere gli esperimenti di immunizzazione con le cellule allogeniche, utilizzando per le immunizzazioni anali il lisato cellulare invece delle cellule vive.

Lo studio della CMC nella spigola contro allo- e xeno-antigeni è stato preceduto da un'analisi qualitativa e quantitativa delle popolazioni linfocitarie presenti a livello intestinale, utilizzando marcatori molecolari disponibili in questa specie. L'intento è stato quello di acquisire nuove conoscenze di base sul tessuto linfoide associato alla

mucosa dell'intestino (GALT). Per questo tipo di indagine sono stati utilizzati due anticorpi monoclonali murini, DLT15 e DLlg3, in grado di riconoscere rispettivamente putativi linfociti T e cellule Ig⁺. I risultati sono poi stati confrontati con quelli ottenuti mediante l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti CD3ε umano (A0452 DAKO) usato per la prima volta nella spigola. Questo anticorpo ha dimostrato una buona cross-reattività in alcune specie di pesci (passera giapponese, fugu, salmone) (Park et al., 2005; Kyosuke et al., 2005; Bakke- Mckellep et al., 2007), quando è stato utilizzato come marker dei linfociti T in mancanza di anticorpi specifici. Il CD3 è un co-recettore che viene integrato nel complesso CD3/TCR durante il processo di riconoscimento antigenico ed è necessario per la corretta trasduzione intracellulare del segnale. Nei pesci sono conosciuti due soli geni codificanti per le subunità del CD3 (che nei Mammiferi sono ε, γ, δ e ζ), uno con omologia intermedia tra γ e δ, chiamato di conseguenza γ/δ (Park et al., 2001, Guselnikov et al., 2003), e uno codificante la subunità CD3ε (Alabyev et al., 2000). Queste due subunità formano un solo eterodimero (tre nei mammiferi ε/γ, ε/δ e ζ), quindi di conseguenza dovrebbe essere espresso da tutti i linfociti TCR⁺. Analizzando i risultati ottenuti in questa tesi si è visto che nella mucosa dell'intestino della spigola la popolazione predominante in tutto il tratto digerente risulta essere quella DLT15⁺, che ha mostrato un gradiente crescente antero-posteriore (aumento verso l'ano) e una localizzazione preferenziale nell'epitelio rispetto alla lamina propria della mucosa (P<0,001), confermando dati precedentemente ottenuti (Abelli et al., 1997). L'anticorpo anti-CD3ε ha marcato un numero significativamente minore di cellule rispetto a DLT15 in tutto l'intestino (P<0,001), non ha evidenziato alcun gradiente antero-posteriore e delineato una distribuzione quasi esclusiva delle cellule immunoreattive nella lamina propria della mucosa. La presenza di cellule Ig⁺ reattive a DLlg3 è apparsa limitata in tutti i tratti intestinali, mostrando comunque un incremento procedendo verso il segmento posteriore. Questi risultati forniscono, per la prima volta, l'evidenza che i IEL della spigola siano una popolazione DLT15⁺ CD3ε.

Differentemente, nella lamina propria di tutti i tratti intestinali il numero di cellule CD3ε⁺, pur se minore, non è risultato significativamente diverso da quello delle cellule DLT15⁺ in base all'analisi statistica. Anche l'osservazione dettagliata al microscopio non ha evidenziato grosse differenze sia morfologiche che di localizzazione delle cellule marcate da questi due anticorpi nella lamina propria, anche se le cellule CD3ε⁺ sono sembrate più uniformemente distribuite rispetto alle cellule DLT15⁺, localizzate invece prevalentemente attorno alle lacune sanguigne di questo tessuto. Stando ai risultati osservati, la popolazione dei IEL nella spigola, la più abbondante nel GALT, non sembra esprimere CD3ε e, di conseguenza, potrebbe non esprimere il TCR. Nella carpa, dati ottenuti con l'analisi al FACS (Rombout, dati non pubblicati) sembrerebbero indicare invece che la maggior parte dei linfociti estratti dalla mucosa intestinale risulti CD3ε⁺. E' opportuno però tenere in dovuta considerazione il fatto che in fugu sono state individuate due isoforme per il CD3ε, chiamate CD3ε1 e 2 (Araki et al., 2005). L'anticorpo anti CD3ε umano potrebbe quindi riconoscere solamente una di queste isoforme nella spigola. A questo si aggiunge anche il fatto che studi di biologia dello sviluppo hanno dimostrato la presenza precoce di cellule DLT15⁺ nell'intestino delle larve di spigola, suggerendo che l'intestino possa rappresentare una sede alternativa di differenziamento per i linfociti T (Picchietti et al., 1997). Questi linfociti T potrebbero quindi, proprio per la loro origine extratimica presentare dei recettori con caratteristiche peculiari. Studi molto recenti effettuati mediante

analisi Q-PCR e ibridazione *in situ* compiuti sugli intestini di esemplari giovanili di spigola hanno permesso di quantificare i livelli d'espressione e la localizzazione dei trascritti per geni rilevanti dal punto di vista immunologico come *TCR β* , *CD8 α* , *CD4* e *MHCII- β* (Guerra 2009, Tesi di dottorato). I risultati ottenuti hanno evidenziato un aumento significativo dell'espressione del *CD8 α* nell'intestino posteriore rispetto al segmento mediano ($P < 0,05$) e la localizzazione di numerose cellule *CD8 α ⁺* isolate o aggregate nell'intestino posteriore. Questi dati, associati ai bassi livelli di espressione di *CD4* e *MHCII- β* nello stesso tratto dell'intestino hanno suggerito che il GALT della spigola sia costituito principalmente da linfociti T con probabile funzione citotossica.

Parte del lavoro di questa tesi di dottorato è stato proprio quello di fornire le evidenze funzionali per confermare o smentire tale ipotesi. I linfociti estratti dalla spigola hanno evidenziato significativi livelli di CMC non-specifica contro le cellule allogeniche (DLEC, linea continua embrionale di spigola) usate come bersaglio. La citotossicità si è attestata attorno al 20% nei linfociti estratti da rene cefalico e milza e al 35% nell'intestino, indicando in quest'ultimo comparto mucosale una CMC non-specifica distintamente superiore rispetto ai compartimenti sistemici (rene e milza), pur non raggiungendo significatività statistica. Questo risultato indica comunque chiaramente che, a differenza della carpa, la spigola possiede popolazioni cellulari con capacità CMC contro alloantigeni che utilizzano sistemi di riconoscimento MHC-I non-ristretti. Tali cellule potrebbero essere NCC o cellule omologhe ai linfociti *TCR $\gamma\delta$ ⁺ CD8 $\alpha\alpha$* o *TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8 $\alpha\alpha$* documentati nell'intestino del topo (Rocha et al., 1992, Lambolez et al., 2007). Le ultime teorie sull'origine delle cellule T del GALT dei Mammiferi indicherebbero due sorgenti principali: il timo e il GALT stesso, suggerendo una stretta relazione evolutiva tra questi due organi. Queste cellule *CD8 $\alpha\alpha$ ⁺* sarebbero il risultato di un meccanismo di selezione attuato nell'intestino (Lambolez et al., 2007). Tali considerazioni nel nostro caso risultano per ora speculative, date le poche informazioni sul fenotipo e meccanismi di sviluppo e selezione dei linfociti nell'intestino dei Teleostei, e vista la scarsità di informazioni disponibili anche nei Mammiferi riguardo a questo complesso argomento.

Gli esperimenti atti a misurare la CMC non-specifica dei linfociti della spigola contro target xenogenico (K562) hanno evidenziato, anche in questo caso, livelli significativamente alti. I risultati hanno indicato una percentuale di citotossicità del 40% in rene e intestino, del 34% nella milza, del 28% nel sangue periferico, del 22% nelle branchie e trascurabile nel timo. Confrontando i livelli di CMC non-specifica contro target xenogenico riscontrati in carpa e spigola, in quest'ultima risultano evidenti livelli significativamente più alti nelle branchie e nell'intestino ($P < 0,001$), ma non nel sangue e nel timo. I dati indicano la presenza nella spigola, sia a livello sistemico che mucosale, di popolazioni citotossiche xeno-reattive, che nella carpa sono presenti solo a livello sistemico. Alla luce di questi dati possiamo affermare che l'intestino della spigola è potenzialmente in grado di rispondere in maniera efficace, in virtù delle popolazioni citotossiche che vi ci risiedono, contro le infezioni provocate da patogeni sia intra- che extra-cellulari.

Le immunizzazioni contro target xenogenico (cellule K562) non solo non hanno indotto un incremento della CMC imputabile alla comparsa di CMC specifica rispetto ai controlli non immunizzati, ma hanno mostrato livelli molto più bassi rispetto a questi ultimi. La somministrazione di xenoantigeni per via anale ha ridotto significativamente la risposta citotossica dei linfociti di rene e milza (-380%, $P < 0,001$ in confronto con il controllo non immunizzato) e

dell'intestino (-433%, $P < 0,001$ rispetto al controllo), mentre l'immunizzazione per via i.p. ha ridotto significativamente la CMC nel rene e nella milza (-300%, $P < 0,001$ rispetto al controllo) lasciando praticamente invariata quella intestinale che è rimasta attorno al 40% (citotossicità assoluta). Questi dati risultano estremamente interessanti perchè farebbero ipotizzare l'induzione di una tolleranza cellulare nella spigola provocata dalla somministrazione di xenoantigeni. Bisogna tenere presente che il protocollo di immunizzazione utilizzato è stato ottimizzato per la carpa (Sato et al., 2005) che come abbiamo dimostrato presenta molte importanti differenze con la spigola in particolare per quanto riguarda la risposta CMC non-specifica. Il dosaggio eccessivo di xenoantigeni probabilmente è responsabile di questo effetto di "tolleranza", in che modo questo lo abbia indotto risulta molto difficile da ipotizzare. Nei Mammiferi è ampiamente documentato come il manifestarsi di fenomeni di tolleranza dipenda da molti fattori che includono il dosaggio e la natura dell'antigene, fattori genetici e l'età del ricevente, e il numero e la tempistica delle immunizzazioni (Strobel e Mowat, 1998). Molto poco si conosce riguardo al tale fenomeno nei Telostei e questa sarebbe, se confermata, una delle poche evidenze di induzione di tolleranza cellulare contro xenoantigeni in un pesce. E' stato dimostrato nella carpa che ripetute somministrazioni per via orale di ferritina causano una riduzione del titolo anticorpale specifico durante il periodo di trattamento (Rombout et al., 1989). Un altro lavoro sempre nella carpa ha evidenziato mediante l'utilizzo questa volta non solo di ferritina, ma anche di ovalbumina e una glicoproteina ricombinante di membrana del virus della setticemia emorragica, come l'induzione del fenomeno della tolleranza sia strettamente legata alla natura della proteina utilizzata (Joosten et al., 1997). Nella trota tale fenomeno è stato documentato a seguito di contemporanea somministrazione per via orale e i.p. di gammaglobulina umana (Davidson et al., 1994). Attualmente esiste un unico lavoro che ha messo in evidenza nella carpa come ripetute immunizzazioni per via anale con alloantigeni (EPC) possano causare una riduzione dell'attività CMC specifica. Di contro però, alti livelli di CMC specifica sono stati riottenuti in questi pesci immunizzati a seguito di una successiva somministrazione i.p con gli stessi antigeni (Sato e Okamoto, 2007). Nei pesci, come nei Vertebrati superiori, il manifestarsi di tolleranza viene confermato quando la somministrazione ripetuta di antigeni per via orale o anale induce una soppressione della risposta anche a seguito di una successiva immunizzazione per via i.p. (Pignatelli et al., 1994; Joosten et al., 1995; Nakamura et al., 1998; Maurice et al., 2004). Basandoci su questo criterio sembrerebbe che nel caso specifico della Carpa le ripetute somministrazioni anali non avrebbero indotto un effetto di tolleranza anche inducendo una progressiva riduzione della CMC rilevata. E' evidente che ulteriori conferme sperimentali sono necessarie per acquisire ulteriori informazioni su questo importante fenomeno sia nella carpa che nella spigola. Questo risulta di fondamentale importanza per migliorare l'efficacia delle vaccinazioni orali in questi pesci.

Altra considerazione importante che emerge è quella di aver dimostrato, sia nella sperimentazione in carpa che in quella in spigola, che la somministrazione diretta degli antigeni xenogenici a livello della mucosa intestinale riesce a modulare la risposta immunitaria sia a livello sistemico che locale. Si è rimarcata quindi l'importanza del GALT nel modulare la risposta immunitaria di tutto l'organismo e indirettamente, la rilevanza e le potenzialità della vaccinazione orale, mettendone in luce anche i possibili rischi. Protocolli di immunizzazione che non tengano in dovuta considerazione le differenze fisiologiche, anatomiche e, soprattutto, a livello immunitario esistenti tra le

diverse specie di Teleostei possono correre il rischio di indurre tolleranza verso il patogeno contro il quale si vorrebbe fornire protezione o di incrementare i rischi d'infezione causando anergia o morte delle stesse cellule impegnate nei meccanismi di difesa. Per evitare questo è di fondamentale importanza acquisire sempre nuove informazioni nelle singole specie e cercare la caratterizzazione fenotipica e funzionale più precisa possibile delle popolazioni che collaborano nel formare il complesso meccanismo dell'immunità.

Un lavoro recente, non ancora pubblicato, ha mostrato come la somministrazione dietetica di ceppi batterici probiotici in larve di spigola, abbia indotto nell'intestino un incremento del numero di cellule T e dei granulociti eosinofili rispetto ai gruppi di controllo, mantenendo bassi i livelli di trascrizione per geni chiave nel processo pro-infiammatorio (Picchiotti et al., in press). L'individuazione del protocollo ottimale è stata possibile solo grazie a studi precedenti sull'ontogenesi e caratterizzazione delle popolazioni del GALT delle larve di spigola.

L'interesse crescente nell'utilizzo di ceppi batterici probiotici da attuarsi come profilassi negli allevamenti ittici ha determinato la necessità di approfondire le conoscenze sui possibili effetti dell'interazione tra queste formulazioni e il GALT. La maggior parte degli studi sull'utilizzo di batteri benefici negli allevamenti ittici è stato mirato ad incrementare la resistenza degli animali contro le patologie infettive, solitamente a seguito di trattamento con una singola specie batterica (Bly et al., 1997; Robertson et al., 2000; Spaanggard et al., 2001; Chang and Liu, 2002). Molto poco si conosce sulla possibilità di ottenere degli effetti benefici in maniera sinergica utilizzando formulazioni che prevedano più specie o ceppi batterici nei pesci. Il meccanismo con il quale i probiotici riescano ad aiutare l'ospite ad ottenere un'incremento dimostrato nei livelli di protezione rimangono ancora per la maggior parte sconosciuti (Timmerman et al., 2004; Salinas et al., 2005). In questa sperimentazione si è dimostrato come la somministrazione congiunta di due specie batteriche inattivate riesca ad indurre un incremento delle difese cellulari a livello intestinale. Si è evidenziato inoltre come le formulazioni multispecie di batteri inattivati riescano ad indurre effetti benefici maggiori sul sistema immunitario dell'ospite rispetto a formulazioni che utilizzano una sola specie batterica alla stessa concentrazione, in accordo con un precedente studio sull'orata che ha utilizzato formulazioni di batteri vitali (Salinas et al., 2005). I risultati ottenuti dimostrano che formulazioni probiotiche multiceppo o multispecie adeguatamente studiate riescono ad indurre nell'ospite effetti benefici maggiori rispetto a formulazioni monospecifiche, come già dimostrato per i Mammiferi (Timmerman et al., 2004). Gli effetti della somministrazione dei ceppi probiotici sulla risposta immunitaria a livello intestinale dell'orata è stata valutata con tecniche istologiche e immunoistochimiche. La dieta che è risultata più efficace nell'indurre un'aumento sia della popolazione di granulociti eosinofili (AGs) che di cellule IgM⁺ nella mucosa intestinale è stata la somministrazione congiunta di *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* e *Bacillus subtilis* entrambi inattivati col calore, rispetto al controllo (P<0,01). Questi dati sono risultati in accordo con quelli di un precedente lavoro che ha indicato un incremento a livello intestinale di cellule IgM⁺ e AGs in larve di orata alimentate con formulazioni probiotiche multispecie (Picchiotti et al., 2007). L'antisiero policlonale utilizzato (Pab OR1) ha riconosciuto una frazione di linfociti mucosali che esprimono Ig citoplasmatiche. La contemporanea mancanza di cellule con esclusiva marcatura IgM di membrana ci ha indotto a reputare queste cellule come putative pre-B (Castillo et al., 1993). Inoltre, la dimensione delle cellule IgM⁺ (in media 7,6 µm) è risultata più piccola rispetto a quella dei macrofagi intestinali (Picchiotti et al., 2007), che

potrebbero legare a loro volta le Ig. Le osservazioni sia qualitative (caratteristiche citologiche e localizzazione delle cellule IgM⁺) che quantitative (l'aumento di numero delle cellule Ig⁺ indotta dai probiotici) sono risultate in accordo con il lavoro già menzionato (Picchietti et al., 2007). L'analisi quantitativa ha dimostrato un aumento del numero di AGs sia nell'epitelio che nella lamina propria dell'intestino. Sebbene il richiamo di AGs verso il sito d'infiammazione sia un meccanismo comune anche nei Teleostei, per confermare che il trattamento con probiotici non abbia indotto infiammazione è stata valutata l'integrità della mucosa intestinale. Nessuna differenza è stata rilevata tra trattati e controlli. La maggior presenza di cellule con capacità fagocitica negli intestini delle orate alimentate con probiotici indicherebbe, oltre ad una migliore difesa locale contro i patogeni, anche un numero maggiore di cellule in grado di processare e presentare gli antigeni; capacità che è stata ipotizzata proprio per gli AGs in questa specie (Cuesta et al., 2006). Saranno necessari ulteriori studi, anche funzionali per ottenere maggiori informazioni sulle popolazioni leucocitarie dell'intestino a seguito del trattamento con probiotici.

Altro obiettivo della stessa sperimentazione è stato quello di valutare gli effetti della somministrazione dei due ceppi batterici probiotici, forniti singolarmente o in un'unica formulazione, anche a livello sistemico. L'attività emolitica del complemento si è dimostrata significativamente più alta nel siero delle orate sottoposte a somministrazione combinata di entrambi i batteri, rispetto agli altri gruppi sperimentali. L'incremento dell'attività del complemento a seguito di trattamento con batteri probiotici è stato documentato in numerose specie di pesci (Panigrahi et al., 2004). Nel siero, sono risultati più alti anche i valori dell'enzima perossidasi nei pesci trattati con la formulazione multi-specie, mentre il contenuto di perossidasi nei leucociti non è sembrato essere influenzato dalle diverse diete sperimentali, in accordo con dati già pubblicati (Diaz-Rosales et al., 2006). In letteratura è stato ben documentato l'incremento dell'attività fagocitica dei leucociti del rene cefalico indotto dalla somministrazione di batteri vitali (Spanggaard et al., 2001; Irianto e Austin; 2002; Villamil et al 2002; Nikoskelainen et al., 2003; Panigrahi et al., 2004; Salinas et al., 2005) e inattivati (Diaz –Rosales et al., 2006; Irianto e Austin., 2003). Anche questa sperimentazione nell'orate ha confermato tale incremento nel gruppo a cui sono stati somministrati entrambi i batteri probiotici inattivati con il calore. Infine sono state quantificate le IgM totali nel siero che sono risultate anche in questo caso significativamente più numerose nel gruppo trattato con formulazione combinata dei due batteri rispetto al controllo, in accordo con dati ottenuti in uno studio precedente (Cuesta et al., 2004).

Alla luce dei risultati conseguiti si può affermare che la somministrazione orale di ceppi probiotici inattivati con il calore ha agito sul sistema immunitario dell'orate inducendo effetti benefici, sia locali (GALT) che sistemici. La formulazione multispecifica è risultata molto più efficace di entrambe le diete che prevedevano la somministrazione di una sola specie batterica. Queste evidenze hanno dimostrato che, come avviene nell'uomo, l'impiego di appropriate formulazioni probiotiche multispecifiche, anche inattivate, possa indurre effetti benefici anche sulla salute dei pesci. Questo maggiore benessere può tradursi, in concreto, con una migliore capacità del organismo di rispondere all'attacco di patogeni, una riduzione della mortalità di larve e post-larve e una maggior velocità di crescita (Gildberg et al; 1997; Gram et al., 1999; Raida et al., 2003; Carnevali et al., 2004., Picchietti et al., 2006).

BIBLIOGRAFIA

- Abelli L, Baldassini M R, Mastrolia L, Scapigliati G. Immunodetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a Teleost, *Dicentrarchus labrax*. Cellular Immunology 1999; 191:152-160.
- Abelli L, Baldassini MR, Meschini R, Mastrolia L. Apoptosis of thymocytes in developing sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish Shellfish Immunol. 1998; 8:13-24.
- Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L and Scapigliati G. Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish and Shellfish Immunol. 1997; 7:235-246.
- Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L, and Scapigliati G. Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish and Shellfish Immunology 1996; 6:493-505.
- Abelli L, Romano N, Mastrolia L. Histology of developing thymus in sea bass *Dicentrarchus labrax*. In: Argano R. et al. editors. Contributions to Animal Biology. Halocynthia Association Press Italy, 1994; p.9-15.
- Ainsworth A J. Fish granulocytes: morphology, distribution and function. Ann. Rev. Fish Dis. 1992; 2:123.
- Alabyev BY, Guselnikov SV, Najakshin AM, Mechetina LV, Taranin AV. CD3epsilon homologues in the chondrosteian fish *Acipenser ruthenus*. Immunogenetics 2000;51(12):1012-20.
- Al-Adhami MA and Kunz YW. Hemopoietic centers in the developing angelfish *Pterophyllum scalare* (Curier and Valenciennes). Wilhelm Roux's Arch. 1976; 179:393-401.
- Al-Adhami MA and Kunz YW. Ontogenesis haematopoietic sites in *Brachydanio rerio* (Hamilton- Buchanan). Dev. Growth Diff. 1977; 19:171-9.
- Alexander JB, Ingram GA. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish. Dis. 1992; 2:249-79.
- Allouche M, Sahraoui Y, Augery-Bourget Y, Perrakis M, Jasmin C, Georgoulis V. Interleukin 2 receptors. Leuk Res 1990;14(8):699-703 [Review].
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ. 1990 Best local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-10.
- Amatruda JF, Zon LI. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. Dev. Biol. 1999; 216:1-15.
- Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K562-A human erythroleukemic cell line. 1979; Int. J. Cancer; 23: 143-147.
- Aoki T, Hirono I. Immune relevant genes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Comp. Biochem. Physiol. 2006; 1(1):115-21.
- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. Science 2002;297(5585):1301-10.
- Araki K, Akatsua K, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. Characterization of CD8+ leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8 α . Dev. Comp. Immunol. 2008; 32:850-858.
- Araki K, Suetake H, Kikuchi K and Suzuki Y, Characterization and expression analysis of CD3 ϵ and CD3 γ/δ in fugu, *Takifugu rubripes*. Immunogenetics 2005; 57:158-163.
- Aranishi F, Nakane M. Epidermal proteases of the Japanese eel. Fish Physiol. Biochem. 1997; 16:471-8.
- Arkoosh MR and Kaattari SL Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. Dev. Comp. Immunol. 1991; 15:279-93
- Arstila T, et al. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the toracic duct lymph. J. Exp. Med. 2000; 191:823-834.
- Ashwell JD, Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor, Annu Rev Immunol 8 1990, pp. 139-167.
- Avilés-Trigueros M and Quesada JA. Presence of interdigitating cells in thymus of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleost). J. of Morphology 1995; 224:199-203.
- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. Nature 1985; 317:359-61.
- Balcazar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Girones O, Muzquiz JL. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases 2006;29:335-43.
- Bayne CJ, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish. Dev. Comp. Immunol. 2001; 25:725-43.

- Benanni N, Schmid-Alliana A, and Lafaurie M. Evaluation of phagocytic activity in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 1995; 5:273-246.
- Bengtén E., Wilson M., Miller N., Clem LW., Pilstrom L., Warr GW. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Curr Top Microbiol. Immunol.* 2000; 248:189-219
- Bennet CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, et al. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* 2001; 98:643-51.
- Benz C, Heinzl K, Bleul CC. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34(12):3652-3663.
- Bernard D, Six A, Rigottier-Gois L, Messiaen S, Chilmoneczyk S, Quillet E, Boudinot P, and Benmansour A. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and Systemic T cell in a teleost fish. *The Journal of Immunology* 2006; 176:3942-3949.
- Bildfell RJ, Markham RJF, Johnson GR. Purification and partial characterization of rainbow trout egg lectin. *J Aquat Anim Health.* 1992; 4:97-105.
- Bird S, Zou J, Savan R, Kono T, Sakai M, Woo J, et al. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Dev Comp Immunol.*, Available online 19 February 2005.
- Bird S, Zou J, Tomoya K, Sakai M, Dijkstra H, Secombes CJ Characterisation and expression analysis of interleukin-2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by syntenic. *Immunogenetics* 2005;56(12):909-23.
- Blackman M, Kappler J, Marrack P. The role of T cell receptor in positive and in negative selection of developing T cell. *Science* 1990; 248:1335-41.
- Bland P. MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol Today* 1988; 9:174-8.
- Blohm U, Siegl E, Köllner B. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sIgM-leucocytes secrete an interleukin-2 like growth factor after mitogenic stimulation in vitro. *Fish Shellfish Immunol* 2003;14(5):449-65.
- Bly JE, Grimm AS, Morris IG. Transfer of passive immunity from mother to young in a teleost fish: haemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986; 84:309-13.
- Bly JE, Quiniou SMA, Lawson LA, Clem LW. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases* 1997;20:35-40.
- Boismenu R. Function of intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Immunol Res* 2000;21 (2-3):123-7.
- Bot A, Casares S, Bot S, von Boehmer H, Bona C. Cellular mechanisms involved in protection against influenza virus infection in transgenic mice expressing a TCR receptor specific for class II hemagglutinin peptide in CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1998;160:4500-7.
- Botham J W and Manning M J. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J. Fish Biol.* 1981; 19:403-414.
- Bowden TJ, Cook P, Rombout JHWM. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:413-427.
- Breuil G, Vassiloglou B, Pepin JF, Romestand B. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* 1997; 7:29-43.
- Brown LL, Cox WT, Levine RP. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* 1997; 29:213-8.
- Bruno DW, Hastings TS, Ellis AE, and Wootten R, . Outbreak of cold water vibriosis in Atlantic salmon in Scotland. *Bulletin of the European Association of fish Pathologists.* 1985; 5:62-63.
- Buddington RK, Hilton JW. Intestinal adaptations of rainbow trout to changes in dietary carbohydrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1987;253:G489-G496.
- Bullock WC . Intestinal Histology of some salmonid fishes with particular to the histopathology of acanthocephalan infection. *J. Morphol.* 1963; 112:23-44.
- Buonocore F, Libertini A, Prugnoli D, Mazzini M, Scapigliati G. Production and characterization of a continuous embryonic cell line from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). 2006; *Mar Biotechnol* (NY);8(1):80-5.
- Buonocore F, Randelli E, Bird S, Secombes CJ, Costantini S, Facchiano A, Mazzini M, Scapigliati G. The CD8 α from sea bass (*Dicentrarchus labrax*): cloning expression and 3D modelling. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 4:637-646.
- Buonocore F, Randelli E, Casani D, Costantini S, Facchiano A, Scapigliati G, Stet R. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II β chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *Fish Shellfish Immunol.* 2007; 23:853-866.

- Buonocore F, Randelli E, Casani D, Guerra L, Picchiatti S, Costantini S, Facchiano AM, Zou J, Secombes CJ, Scapigliati G. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization and structural analysis. *Mol Immunol.* 2008 Jun;45(11):3168-77.
- Buonocore F., Randelli E., Casani D., Guerra L., Picchiatti S., Costantini S., Facchiano A.M., Zou J., Secombes C. J, Scapigliati G. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterisation and structural analysis. *Molecular Immunology* 2008; 45 (11):3168-3177.
- Cammarata M, Vazzana M, Cervello M, Arizza V, Parrinello N. Spontaneous cytotoxic activity of eosinophilic granule cells separated from the normal peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 2000 Feb;10(2):143-54
- Carnevali O, Zamponi MC, Sulpizio R, Rollo A, Nardi M, Orpianesi C, et al. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International* 2004;12:377e86.
- Carroll MC, Prodeus AP. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:36-40.
- Castillo A, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Alvarez F, Zapata A, Villena AJ. Enzyme and immunohistochemical study of the thymic stroma in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson 1990; 15:153-66.
- Castillo A, Sanchez C, Dominguez J, Kaattari SL, Villena AJ. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 1993; 17:419-24.
- Cecchini S, Terova G, Caricato G, Saroglia M. Lysosome activity in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spawned by broodstocks fed with vitamin C enriched diets. *Bull Eur. Assoc. Fish Pathol.* 2000; 20:120-4.
- Cenini P. The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of zoology.* 1984; 204:509-20.
- Chang C-I, Liu W-Y. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* 2002;25:311-15.
- Chantanachookhin C, Seikai T and Tanaka M. Comparative study on the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Acquaculture* 1991; 99:143-156.
- Chen S-L, Zhang Y-X, Xu M-Y, Ji X-S, Yu G-C, Dong C-F. Molecular polymorphism and expression analysis of MHC class II B gene from red sea bream (*Chrysophrys major*). *Dev Comp Immunol* 2006; 30:407-18.
- Cheroutre H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:217-46. Review
- Cheroutre H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22:217-246.
- Chien YH, Iwashima M, Wettstein DA et al. T cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 1987; 330:722-7.
- Chien, YH, Jores, R, Crowley, MP., Recognition by γ/δ T cells. *Annu. 55 Rev. Immunol.* 1996; 14:511-532
- Companjen A, Heinhuis B, Aspers K, Rombouth J. In vivo evoked specific cell mediated cytotoxicity in carp (*Cyprinus carpio* L.) uses mainly a perforin/granzyme-like pathway. *Fish & Shellfish Immunology.* 2006; 20:113-117.
- Connors SA, Trout J, Ekker M, Mullins MC. The role of tolloid/mini fin in dorsoventral pattern formation of the zebrafish embryo. *Development* 1999; 126:3110-30.
- Cook MT, Hayball PJ, Birdseye L, Bagley C, Nowak BF, Hayball JD. Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:579-88.
- Cook MT, Morrison RN, Wilkinson R, Nowak BF, Hayball PJ, Hayball JD. A screen of mammalian antibodies on snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) peripheral blood leukocytes reveals cross reactivity of an anti-human CD3 antibody with a population of mIg(-) cells. *Dev Comp Immunol.* 2001 Sep;25(7):553-9.
- Cooper EL. Immune response: evolution. In: *Nature encyclopedia of life sciences.* London: Nature Publishing Group; 2000.
- Coscia MR, Giacomelli S, De Santi C, Variabile S, Oreste U.. Immunoglobulin light chain isotypes in the teleost *Trematomus bernacchii*. *Mol Immunol.* 2008., Jun;45(11):3096-106
- Crowhurst MO, Layton JE, Lieschke GJ. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *Int J. Dev. Biol.* 2000; 46:483-492.
- Cuesta A, Esteban MA and Meseguer J. Natural cytotoxic cells of gilthead seabream: maximum percentage of lysis. *Fish Shellfish Immunol.* 2002; 12:111-118.

- Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J. Molecular characterization of the nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity. *Dev Comp Immunol.* 2005;29(7):637-50.
- Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004;101:203-10.
- Cuesta A., Esteban MA., Meseguer J. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular Immunology* 2006; 43:1275-1285.
- Daniels G.D., Zou J., Charlemagne J., Partula S., Cunningam C., Secombes C.J.. Cloning of two chemokine receptor homologs (CXCR4 and CC-R7) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65(5):684-690
- Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Szteiner LA. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* 2005; 6:295-302.
- Danilova N, Hohman VS, Sacher F, Ota T, Willett CE, Steiner LA. T cells and thymus in developing zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 2004; 28:755-67.
- Danilova N, Steiner LA. B cells develop in the zebrafish pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13711-6.
- Das G., Janeway CA Jr. Developmental of CD8alpha/alpha and CD8alpha/beta T cells in major histocompatibility complex class I deficient mice. *J. Exp. Med.* 1999; 190:881-884.
- Davidson GA, Ellis AE, Secombes CJ. A preliminary investigation into the phenomenon of oral tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1972. *Fish & Shellfish Immunology* 1994;4:141e51.
- Davina JHM, Rijkers GT, Rombout J, Timmermans L, Van Muiswinkel WB. Lymphoid and non lymphoid cells in the intestine of cyprinid fish. In: *Development and differentiation of the vertebrate lymphocytes.* Horton JD Ed, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980; pp.129-140.
- De Guerra A Charlemagne J. Genomic organisation of the TcR β -chain diversity (D β) and joining (J β) segments in the rainbow trout: presence of many repeated sequences. *Mol. Immunol.* 1997; 34, 653-662.
- De Haas CJC, van Leeuwen EMM, van Bommel T, Verhoef J, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Serum amyloid P component bound to Gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infect Immun.* 2000; 68:1753-9.
- Decker T and lohmann-Matthes ML. a quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. 1988; *J. Immunol. Meth*; 115:61-9
- Detrich 3rd HW, Kieran MW, Chan FY, Barone LM, Yee K, Rundstadler JA, et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10713-7.
- Diaz-Rosales P, Salinas I, Rodríguez A, Cuesta A, Chabrillo'n M, Balebona MC, et al. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology* 2006;20:482-92.
- Dick A, Hild M, Bauer H, Imai Y, Maifeld H, Schier AF et al. Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 2000; 127:343-354.
- Dijkstra JM, Kóliner B, Aoyagi K, Sawamoto Y, Kuroda A, Ototake M, et al. The rainbow trout classical MHC class I molecule Onmy-UBA*501 is expressed in similar cell types as mammalian classical MHC class I molecules. *Fish Shellfish Immunol* 2003;14(1):1-23.
- Dijkstra JM, Somamoto T, Moore L, Hordvik I, Ototake M, Fischer U. Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. *Mol. Immunol.* 2006; 43(5):410-9.
- Dixon B, Nagelkerke LAJ, Sibbing FA, Egberts E, Stet RJM. Evolution of MHC class II b chain- encoding genes in the Lake Tana barbell species flock (*Barbus intermedius* complex). *Immunogenetics* 1996; 44:419-31.
- Dixon B, Stet RJM. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleostean fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:683-699.
- Dixon B., Shum B., Adams E.J., Magor K.E., Hedrick R.P., Muir D.G., Parham P. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Rev.* 1998; 166(1-2):341-348
- Dogget TA and Harris JE. Morphology of the gut associated lymphoid tissue of *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption. *Fish Shellfish Immunol.* 1991; 1:213-227.
- Dogget TA and Harris JE. The ontogeny of gut-associated lymphoid tissue in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of fish biology* 1987; 31:23-27.

- Doherty PC, Zinkernagel RM. H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* 1975;141:502-7.
- Donate C, Roher N, Balasch JC, Ribas L, Goetz FW, Planas JV, Tort L, MacKenzie S. CD83 expression in sea bream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol.* 2007; 23:877-885
- Dos Santos NM, Romano N, de Sousa M, Ellis AE, Rombout JH. Ontogeny of the B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:583-596.
- Du Pasquier L, Flajnik M. Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development. *Dev. Immunol.* 1990; 1:85-95.
- Du Pasquier L. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2001; 129:1-15.
- Duggan G, Gannon J, Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;75:789-808
- Elbe A, Stingl G. Dendritic cells as stimulator cells of MHC class I-restricted immune responses. *Adv Exp. Med. Biol.* 1995; 378:341-5.
- Ellingsen T, Strand C, Monsen E, Bogwald J and Dalmo RA. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarchichas minor* Olafsen). *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 18: 351-358.
- Ellis AE and De Sousa m. Phylogeny of the lymphoid system. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Eur. J. Immunol.* 1974; 4:338-343.
- Ellis AE. Eosinophilic granular cells (EGC) and histamine response to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 1985; 9:251-260.
- Ellis AE. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:827-39.
- Ellis AE. Non specific defence mechanisms in fish and their rule in disease processes. *Dev in Biological standardization* 1981; 49:337-52.
- Ellis AE. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity . *Development Immunobiology* 1977; 225-31
- Ellis AE. recent development in oral vaccine delivery systems. *Fish Pathology* 1995. 30:293-300.
- Elward K, Gasque P. "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol. Immunol.* 2003; 40:85-94.
- Ericsson A, Svensson M, AryaA, Agace WW. CCL25/cCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2004; 34:2720-2729.
- Esteban MA and Meseguer J. Factors influencing phagocytic response of macrophages from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): an ultrastructural and quantitative study. *Anatomical record* 1997; 248:533-41.
- Esteban MA, Meseguer J, Garcia Ayala A, Agulleiro B. Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 1989; 52: 407.
- Estepa A, Alvarez F, Ezquerro A, Coll JM. Viral-antigen dependence and T-cell receptor expression in leucocytes from rhabdovirus immunized trout. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;68(1):73-89.
- Etlinger HM, Hodgins HO, Chiller JM. Evolution of the lymphoid system. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.* 1976; 116:1547-53.
- Evans DH. The physiology of fishes. 2nd ed: CRC Press; 1998.p.43-64.
- Evans DL and Cooper EL. Natural killer cells in ectothermic vertebrates. *Biol. Science.* 1990; 40:745-749.
- Evans DL and Jaso-Friedman L. Non specific cells as effectors of immunity in fish. *Annual review of fish disease* 1992; 2:109-121.
- Evans DL, Harris DT, Staton DL, Jaso-Friedmann L. Pathways of signal transduction in teleost nonspecific cytotoxic cells. *Dev Comp Immunol* 1990;14(3):295-304.
- Evans DL, Jaso-Friedmann L, Smith Jr EE, St John A, Koren HS, Harris DT. Identification of a putative antigen receptor on fish non-specific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1988;141(1):324-32.
- Evans DL, Jaso-Friedmann L. Non-specific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Ann Rev Fish Dis* 1992;109-21.
- Ewaschuk JB, Naylor JM, Chirino-Trejo M, Zello GA. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2004;68:249-53.

- Fairchild PJ and Waldmann H. Extrathymic signals regulate the onset of T cell repertoire selection. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30(7):1948-56.
- Fange R. A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 1982; 2: 23.
- Fearon DT. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 1997;388:323-4.
- Figueroa F, Mayer WE, Sultmann H, O'hUigin C, Tichy H, Satta Y, et al. MHC class II B gene evolution in East African cichlid fishes. *Immunogenetics* 2000; 51:556-75.
- Fijan N, Sulimanovic D, Bearzotti M et al. Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 1983; 134: 207-220
- Fischer C, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Crnogorac-Jurcevic T, Weissenbach J, Bernot A. Conservation of the T-cell receptor alpha/delta linkage in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis*. *Genomics* 2002;79(2):241-8,
- Fischer U, Dijkstra J M, Kollner B, Kiryu I, Koppang E O, Horvik I, Sawamoto Y, Ototake M. The ontogeny of MHC I class I expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish & Shellfish Immunol.* 2005; 18:49-60.
- Fischer U, Ototake M, Nakanishi T. In vitro cell-mediated cytotoxicity against allogeneic erythrocytes in gibel carp and goldfish using a non-radioactive assay. *Dev Comp Immunol* 1998;22:195-206.
- Fischer U, Ototake M, Nakanishi T. Killing of isogeneic erythrocytes by neutrophils in gibel carp (*Carassius auratus langsdorffii*). *Fish Shellfish Immunol* 1998;8:531-44.
- Fischer U, Utke K, Ototake M, Dijkstra JM, Kollner B. Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:323-37.
- Fishelson L. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei). *Journal of morphology.* 1995; 228:175-190.
- Fletcher TC, Grant P T. Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem J.* 1969 ; 115: 65-9
- Fletcher TC, Secombes CJ. Immunology of fish. In: *Nature encyclopedia of life sciences.* London: Nature Publishing Group;1999.
- Fletcher TC, White A, Baldo BA. C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lump sucker *Ciclopterus lumpus* L. during the breeding season. *Comp Biochem Physiol B.* 1981; 57:353-7.
- Fock WL, Chen CL, Lam TJ, Sin YM. Isolation and characterization of a serum lectin from blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish Shellfish Immunol.* 2000;10:489-504.
- Fontaine M. Nutrition des poissons. Paris: Editions du CNRS, 1981. p. 1-20.
- Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F, LeVen A. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:187-202.
- Frohely M F, DesChaux P A. Presence of tonofilaments thymic serum factors (FTS) in thymic epithelial cells of a fresh water fish (*Cyprinus carpio*) and sea water fish (*Dicentrarchus labrax*). *Thymus* 1986; 8:235-244.
- Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T.. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta high affinity immunoglobulin E Fc receptor α subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:229-242
- Fujimoto Y, Tu L, Miller AS, Bock C, Fujimoto M, Doyle C, et al. CD83 expression influences CD4 β T cell development in the thymus. *Cell.* 2002; 108(6):755-67.
- Fujino Y, Ono S and Nagai A. Studies on the uptake of rabbit's immunoglobulin into columnar epithelial cells in the gut of the trout *Salmo gairdneri*. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 1987; 53: 367-370.
- Fujiura Y, et al. Development of CD8 alpha alpha⁺ intestinal intraepithelial T cells in beta 2 microglobulin and/or TAP1 deficient mice. *J Immunol.* 1996;156:2710-2715.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 1989;66:365-78.
- Fullop G M I, Mc Millan D B. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. *Journal of morphology* 1984; 179:175-95.
- Furutani-Seiki M, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yoda H, et al. A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 2004;121(7-8):647-58.
- Gallagher PF, Miller JFAP.). Immunoglobulin gene expression is a normal differentiation event in embryonic thymocytes. *Eur. Immunol.* 1988; 18:183-6.
- Georgopoulou V and Venier JM. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Dev. Comp. Immunol.* 1986; 10: 529-573.
- Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E, Ringø E. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 1997;352:270e85.
- Glamann J. Complete coding sequence of rainbow trout Mhc II beta chain. *Scand. J. Immunol.* 1995; 41:365-72.

- Glimcher LH, Kara CJ. Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Ann. Rev. Immunol.* 1992; 10:13-49.
- Göbel TW, Meier EL, Du Pasquier L. Biochemical analysis of the *Xenopus laevis* TCR/CD3 complex supports the "stepwise evolution" model. *Eur J Immunol.* 2000 Oct;30(10):2775-81
- Grace M F and Manning M J. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dev. Comp. Immunol.* 1980; 4:255-264.
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen T. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 e a possible probiotic treatment of fish. *Applied Environmental Microbiology* 1999;65:969e73.
- Graser R, O'hUigin C, Vincek V, Meyer A, Klein J. Transspecies polymorphism of class II MHC loci in danio fishes. *Immunogenetics* 1996; 44:36-48.
- Gravenor I, Horton T L, Ritchie P, Flint E, Horton J D. Ontogeny and thymus- dependence of T cell surface antigens in *Xenopus*: flow cytometric studies on monoclonal antibody-stained thymus and spleen. *Dev. and Comp. Immunol.* 1995; 19:507-523.
- Gray DHD, Ueno T, Chidgey AP, Malin M, Goldberg GL, Takahama Y, Boyd R. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Op Immunol.* 2005; 17:137-143.
- Greenhalgh P, Steiner LA. Recombination activating gene 1 (Rag1) in zebrafish and shark. *Immunogenetics* 1995; 41:54-5.
- Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, Midtlyng P, Kjoeglum S, Storset A, et al. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics* 2003; 55:210-9.
- Grimholt U. Transport-associated proteins in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 1997;46(3):213-21.
- Grinde B, Lie Ø, Poppe T, Salte R. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture.* 1988; 68:299-304.
- Grinde B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J. Fish. Dis.* 1989; 12:95-104.
- Gronqvist RN, Espelid S. Immunoglobulin producing cells in the spotted wlfish (*Anarchichas minor* Olafsen): localization in adults and during juvenile development. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27: 569-78.
- Gross GG, Schwartz VL, Stevens C, Ebert EC, Blumberg RS, Balk SP. Distribution of dominant T cell receptor beta chains in human intestinal mucosa. *J. Exp. Med.* 1994; 180:1337-44.
- Guehler SR, Bluestone JA, Barrett TA. Immune deviation of 2C transgenic in traepithelial lymphocytes in antigen-bearing hosts. *J. Exp. Med.* 1996; 184:493-503.
- Guery JC, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol.* 1995; 154:536-44.
- Gusel'nikov SV, Najakshin AM, Taranin AV. *Fugu rubripes* possesses genes for the entire set of the ITAM-bearing transmembrane signal subunits. *Immunogenetics* 2003;55(7):472-9 [Epub 2003 Aug 30].
- Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Ann. Rev. Immunol.* 1993; 11: 637-85.
- Hadji-Azimi I, Schwager J, Thiebaud C. B-lymphocyte differentiation in *Xenopus laevis* larvae. *Dev. Biol.* 1982; 90:253-8.
- Haire RN, Rast JP, Litman RT, Litman GW. Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell antigen receptor alpha in zebrafish. *Immunogenetics*; 2000; 51(11):915-23.
- Hamdani SH, McMillan DN, Pettersen EF, Wergeland H, Endresen C, Ellis AE, et al. Isolation of rainbow trout neutrophils with an anti-granulocyte monoclonal antibody. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998; 63:369-80.
- Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004;431(7006):371-8.
- Hansen JD and Zapata AG. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews* 1998; 166:199-220.
- Hansen JD, Kaattari SL. The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Immunogenetics* 1996; 44:203-11.
- Hansen JD, Kaattari SL. The recombination activation gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Immunogenetics* 1995; 42:188-95.
- Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102:6919-24.
- Hansen JD, Strassburger P, Du Pasquier L. Conservation of a master hematopoietic switch gene during

- vertebrate evolution: isolation and characterization of Ikaros from teleost and amphibian species. *Eur J Immunol.* 1997 ; 27:3049-58.
- Hansen JD, Strassburger P, Thorgaard GH, Young WP, Du Pasquier L. Expression, linkage, and polymorfismof MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Immunol.* 1999; 163:774:786.
- Hansen JD, Strassburger P, Thorgaard GH, Young WP, Du Pasquier L. Expression, linkage, and polymorphism of MHCrelated genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Immunol* 1999;163:774-86.
- Hansen JD, Strassburger P. Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 alpha, in rainbow trout. *J Immunol* 2000;164(6):3132-9.
- Hansen JD. Characterization of the rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression define the trout primary lymphoid tissues. *Immunogenetics* 1997; 46:367-75.
- Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 1994 ; 41:113.
- Hart S, Wrathmell AB, Harris JE, and Grayson TH. Gut immunology in fish: a review. *Dev. Comp. Immunol.* 1988; 12:453-480.
- Hasegawa S, Nakayasu C, Yoshitomi T, Nakanishi T, Okamoto N. Specific cell-mediated cytotoxicity against an allogeneic target cell line in isogeneic ginbuna crucian carp. *Fish Shellfish Immunol* 1998;8:303-13.
- Hashimoto K, Okamura K, Yamaguchi H, Ototake M, Nakanishi T, Kurosawa Y. Conservation and diversification of MHC class I and its related molecules in vertebrates. *Immunol Rev* 1999;167:81-100.
- Haugarvoll E, Bjerkas I, Nowak BF, Hordvik I, and Koppang O. Identification and charaterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J. Anat.* 2008; 213 pp 202-209.
- Haugarvoll E, Thorsen J, Laane M, Huang Q, Koppang EO. Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83 β teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Res.* 2006; 19:214-25.
- Hébert P, Ainsworth AJ, Boyd B. Histological enzyme and flow cytometry analysis af channel catfish intestinal tract immune cells. *Dev. Comp. Immunol* 2002;26:53-62
- Hein WR. Structural and functional evolution of the extracellular regions of the T cell receptors. *Seminar Immunol* 1994, 6:361-72.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 1999; 126:3735-45.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev. Biol.* 2001; 238:274-88.
- Hild M, Dick A, Rauch GJ, Meier A, Bouwmeester T, Haffter P, et al. The smad 5 mutation somitabun blocks Bmp2b signaling during early dorsoventral patterning of zebrafish embryo. *Development* 1999; 126:2149-59.
- Hine P M. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 1992; 2:79.
- Ho EL, Carayannopoulos LN, Poursine-Laurent J, Kinder J, Plougastel B, Smith HR, et al. Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol* 2002;169(7):3667-75.
- Hogan RJ, Stuge TB, Clem LW, Miller NW, Chinchar VG. Anti-viral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 1996;20(2):115-27.
- Honda S, Kashiwagi M, Miyamoto K, Takei Y, Hirose S. Multiplicity, structures and endocrine and exocrine natures of eel fucose-binding lectins. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:33151-7.
- Hordvik I, Jacob AL, Charlemagne J, Endresen C. Cloning of T-cell antigen receptor beta chain cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 1996;45(1):9-14.
- Hordvik I, Torvund J, Moore L, Endresen C. Structure and organization of the T cell receptor alpha chain genes in Atlantic salmon. *Mol Immunol* 2004;41(5):553-9.
- Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, Bastani N, Krossoy B. Molecular cloning nad phylogentic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand. J. Immunol.* 1999; 50:202-210.
- Hordvik, I., Jacob, A.L.J., Charlemagne, J., Endresen, C.,. Cloning of Tcell antigen receprot beta chain cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 1996; 45, 9-14.
- Huttenhous HBT. Development of the immune system of the common carp (*Cyprinus carpio*). PhD thesis Wageningen, the Netherlands: University of Wageningen. (2005)
- Huttenhuis HB, Huising MO, van der Meulen T, van Oosterhoud CN, Sanchez NA, Taverne-Thiele AJ,

- Stroband HW, Rombout JH. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 2005; 29(12):1033-47.
- Ida H and Yamamoto T. Intracellular transport of horseradish peroxidase in the absorptive cells of goldfish hindgut in vitro, with special reference to the cytoplasmic tubules. *Cell Tissues res.* 1985; 240:553-560.
- Imagawa T, Hashimoto Y, Kon Y, Sugimura M. Immunoglobulin-containing cells in the head kidney of carp (*Cyprinus carpio* L.) after bovine serum albumin injection. *Fish Shellfish Immunol.* 1991; 1:173-185.
- Imai, E., Ishikawa, J., Moritomo, T., Tomana, M., Characterisation of T cell antigenreceptor α chain isotypes in the common carp. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19, 205–216.
- Ingram GA. Substances involved in the natural resistance of fish to infection e a review. *J Fish Biol.* 11980; 6:23-60.
- Irianto A, Austin B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2003;26:59-62.
- Irianto A, Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2002;25:333–42.
- Irwin M J and Kaattari S L. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; 12:39-45.
- Ishimoto Y, Savan R, Endo M, Sakai M. Non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP)-1 type gene in tilapia (*Oreochromis niloticus*): its cloning and analysis. *Fish Shellfish Immunol* 2004;16(2):163-72.
- Jaffe L, Robertson J, Bikoff E K. Distinct patterns of expression of MHC class I and B2- microglobulin transcripts at early stages of mouse development. *J. Immunol* 1991; 147:2740- 2750.
- Jameson SC, Bevan M. T-cell selection. *Curr. Opinion Immunol.* 1998; 10:214-219.
- Janeway CA, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cell bearing receptors. *Immunol. Today* 1988; 9:73-6.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. The immune system in health and disease. *Immunology.* 2002; pp. 239.
- Janossy G, Campana D, and Akbar A. Kinetics of T lymphocytes development. in: Iversen, OH (ed.) *Current Topics in Pathology.* 1988; Vol 79. Berlin: Spinger-Verlag.
- Jaso-Friedman L, Evans D L. Mechanisms of cellular cytotoxic innate resistance in tilapia. (*Oreochromis nilotica*). *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23(1): 27-35.
- Jaso-Friedmann L, Leary 3rd JH, Evans DL. NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost non-specific cytotoxic cells. *Mol Immunol* 1997;34(12-13):955-65.
- Jaso-Friedmann L, Leary 3rd JH, Evans DL. Non-specific cytotoxic cells in fish: antigenic cross-reactivity of a function associated molecule with the intermediate filament vimentin. *Cell Immunol* 1993;148(1):208-17.
- Jensen I, Albuquerque A, Sommer AI, Robertsen B. Effect of poly I: C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.* 2002; 13:311-326.
- Jiang H, Siegel JN, Gewurz H. Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C- reactive protein and C1q. *J. Immunol.* 1991; 146:2324-30.
- Jones M, Cordell JL, Beyers AD, Tse AG, Mason DY Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5429-35.
- Joosten PH, Engelsma MY, van der Zee MD, Rombout JH. Induction of oral tolerance in carp (*Cyprinus carpio* L.) after feeding protein antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997 Dec 12;60(1-2):187-96
- Joosten PHM, Avile's-Trigueros M, Sorgeloos P, Rombout JHWM. Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish & Shellfish Immunology* 1995;5:289e99.
- Joosten PHM, Aviles-Trigueros M, Sorgeloos P, Rombout JHWM. Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish Shellfish Immunol.* 1995; 5:289-99.
- Joosten PHM. Immunological aspects of oral vaccination in fish. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands. 1997.
- Josefsson S, Tatner MF. Histogenesis of the lymphoid organs in sea brea, *Sparus auratus* L. *Fish Shellfish Immunol* 1993; 3:35-50.
- Juul-Madsen HR, Glamann J, Madsen HO, Simonsen M. MHC class II beta chain expression in the rainbow trout. *Scand. J. Immunol.* 1992; 35:687-694.
- Kaattari S.L. Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Annual Review Fish Dis.* 1992; 161-80

- Kaattari SL, Zhang HL, Khor IW, Kaattari IM and Shapiro DA. Affinity maturation in trout: clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 2002; 26: 202-10.
- Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Balu S. Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* 2004;28(5):375-94 [Review].
- Kamamori Y, Ishimaru K, Nanno M. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hematopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med.* 1996; 184:1449-59.
- Kamper SM, McKinney CE. Polymorphism and evolution in the constant region of the T-cell receptor beta chain in an advanced teleost fish. *Immunogenetics* 2002;53(12):1047-54 [Epub 2002 Feb 07].
- Kanlis G, Suzuki Y, Tauchi M, Numata T, Shirojo Y, Takashima F. Immunoglobulin in oocytes, fertilized eggs and yolk sac larvae of red sea bream. *Fish Sci.* 1995; 61:787-90.
- Karnovsky M. J., A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1965; 27: 137A-138A.
- Kato T and Owen RL. Structure and function of intestinal mucosal epithelium in Ogra et al. 1994; pp.1-26.
- Kedar E, Ortiz de Landazuri M, Fahey JL. Comparative studies of immunoglobulin receptors and antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) in rat lymphoid organs. *J Immunol.* 1974 Jan; 112(1):37-46.
- Kendall M D Functional anatomy of the thymic microenvironment. *Journal of anatomy.* 1991; 177:1-29.
- Khorasani MZ, Hennig S, Imre G, Asakawa S, Palczewski S, Berger A, et al. A first generation physical map of the medaka genome in BACs essential for positional cloning and clone-by-clone based genomic sequencing. *Mech Dev* 2004;121(7-8):903-13.
- Kikuno R, Sato A, Mayer WE, Shintani S, Aoki T, Klein J. Clustering of C-type lectin natural killer receptor-like loci in the bony fish *Oreochromis niloticus*. *Scand J Immunol* 2004;59(2):133-42.
- Kilshaw PJ, Murant SJ. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur. J. Immunol.* 1990; 20:2201-2207
- Kim DH, Austin B. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006;114:297-304.
- Kishimoto Y, Lee KH, Zon L, Hammersmidt M, Schulte-Merker S. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP1 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* 1997; 124:4457-66.
- Kisielow P, von Boehmer H. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol.* 1995; 58:87-209.
- Kita J and Itazawa Y. Microcirculatory pathways in the spleen of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Jpn. J. Ichthyol.* 1990; 37. 265-272.
- Klausner, R.D., Lippincott-Schwartz, J., Bonifacio, J.S., The T-cell 620 antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1990; 6, 621: 403-431.
- Kollner B, Blohm U, Kotterba G, Fischer U. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2001; 11:127- 42.
- Koppang EO, Hordvik I, Bjerkas I, Torvund J, Aune L, Thevarajan J, Endresen C. Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II α chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 14:115-132.
- Koppang EO, Lundin M, Press C.McL, Ronningen K, Lie O. Differing levels of MHC class II beta chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 1998a; 8:183-196.
- Koppang EO, Press CM, Ronningen K, Lie O. Expression of MHC class I mRNA in tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 1998b; 8: 577-587.
- Korzeniewski C, and Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. 1983; *J. Immunol. Meth.* 64:313-20.
- Koumans-van Diepen JCE, Egberts E, Peixoto BR, Tavrne N, Rombout JH. B cell and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.): an immuno(cyto)chemical study. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19: 97-108.
- Koumans-van Diepen JCE, Taverne Thiele JJ, van Rens Bttm, Rombout JHWM. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B-cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio*): an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.* 1994b; 4:19-28.
- Koumans-van Diepen JCE, van Lisdonk M H M, Taverne-Thiele J J, Verburg-van Kemenade B M L, Rombout JHWM. Characterization of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L). *Dev. Comp. Immunol.* 1994a; 18:45-56.
- Kozlow EJ, Wilson GL, Fox CH, Kehrl JH. Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene

- superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. *Blood* 1993;81(2):454-61.
- Kudo S. Further investigation on enzyme activities and antifungal action of fertilization extract from fish eggs. *Zool Sci.* 1991; 8:1079.
- Kyewski B. Unravelling the complexity of intrathymic cell-cell interactions. *APMIS* 1988; 96: 1049-1060.
- Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature Immunol.* 2006; 7:338-343.
- Laing KJ, Zou JJ, Purcell MK, Phillips R, Secombes C, Hansen JD. Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *J Immunol.* 2006; 177(6):3939-51.
- Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin YM.. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 2004; 28:9-28.
- Lam SH, Chua HL, Gong Z, Wen Z, Lam TJ, Sim YM. Morphologic transformation of the thymus in developing zebrafish. *Dev. Dyn.* 2002; 225:87-94.
- Lamas J, Bruno DW, Santos Y, Anaton R, and Ellis AE. Eosinophilic granular cell response to intraperitoneal injection with *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunol.* 1991; 1:187-194.
- Lamas J, Santos Y, Bruno DW, Toranzo AE, and Anadon R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *Journal of fish Biology.* 1984; 25:839-854.
- Lambolez F, Kronenberg M, Cheroutre H. Thymic differentiation of TcR $\alpha\beta^+$ CD8 α^+ IELs. *Immunological Reviews* 2007; Vol 215:178-188.
- Lamers C H J. Histophysiology of a primary immune response against *Aeromonas Hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Experimental Zoology* 1986; 238: 71-80.
- Lamers C H J. The reaction of the immune system of fish to vaccination. PhD thesis, Agricultural University Wageningen Olanda 1985.
- Landry D, Doyon L, Poudrier J, Lafontaine M, Pelletier M, Montplaisir S. Accessory function of human thymic dendritic cells in Con A-induced proliferation of autologous thymocytes subsets. *The J. Immunol.* 1990;144: 836-843.
- Landry D, Lafontaine M, Barthelemy H, Paquette N, Chartrand C, Pelletier M, Montplaisir S. Human thymic dendritic cell-thymocyte association: ultrastructural cell phenotype analysis. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19:1855-1860
- Landry D, Lafontaine M, Barthélémy H, Paquette N, Chartrand C, Pelletier M and Montplaisir S. Human thymic dendritic cells. Characterization, isolation and functional assays. *Immunology* 1988; 65:135-142.
- Lange S, Bambir S, Dodds AW, Magnadottir B The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) - an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 2004 ;16:359-67.
- Langenau DM, Ferrando AA, Traver D, Kutok JL, Hezel JP, et al. In vivo tracking of T cells development, ablation and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 99:13711-6.
- Langenau DM, Palomero T, Kanki JP, Ferrando AA, Zhou Y, Zon LI, et al. Molecular cloning and development expression of Tlx (Hox11) genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Mech. Dev.* 2002; 117: 243-8.
- Langston AL, Johnstone R, Ellis AE. The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic salmon, following injection of lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 2001; 11:333-45.
- Lanier L. Unusual lymphocytes - $\gamma\delta$ T cells and NK cells. *The Immunologist*, 1995, 3, 182-184.
- Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, et al. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194(12):1813-21.
- Lefranc, M.-P., Lefranc, G. *The T Cell Receptor FactsBook*. Academic 629 Press Burlington, USA. 2001.
- Lefrancois L, Puddington L. Extrathymic intestinal T cell development: virtual reality? *Immunology today.* 1995; 16:16-21.
- Lefrancois L. Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unique T cell repertoire? *Immunol Today.* 1991; 12:436-8.
- Lefrancois, L. and Puddington L. Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality? *Immunology Today*, 1995, 16:16-21.
- Leishman AJ, et al. T cell responses modulated through interaction between CD8 $\alpha\alpha$ and the nonclassical MHC class I molecule, TL. *Science* 2001; 294:1936-1939.

- Leong J-AC, Trobridge GD, Kim CHY, Johnson M, Simon B. Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunol. Rev.* 1998; 166:349-63.
- Levelt CN, De yong YP, Mizoguchi E, et al. High- and low-affinity single-peptide /MHC ligands have a distinct effects on the development of mucosal CD8 and CD8 T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96:5628-33.
- Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat. Immunol.* 2006; 7:1116-24.
- Li J, Iwanami N, Hoa VQ, Seiki MF, Takahama Y. Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in Medaka. *The Journal of Immunol.* 2007; 179:1605-1615.
- Lie Ø, Evensen Ø, Sørensen A, Frøysadal E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Org.* 1989; 6:1-5.
- Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Lyton JE. Morfologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish . *Blood* 2001; 98:3087-96.
- Lillehaug A, Sevatdal S, Endal T. Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry against yersiniosis. *Fish Shellfish Immunol.* 1996; 6:521-35.
- Lin G L, Ellsaesser C F, Clem L W, Miller N W. Phorbol ester/ calcium ionophore activate fish leucocytes and induce long-term cultures. *Dev. Comp. Immunol.* 1992; 16:153.
- Littman DR, Thomas Y, Maddon PJ, Chess L, Axel R. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* 1985; 40:237-46.
- Lo D, Feng L, Carson MJ, Crowley M, Pauza M, Nguyen A, et al. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol. Rev.* 1999; 169:225-39.
- Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. 1975 *Blood*; 45(3):321-34.
- Lund V, Olafsen JA. A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. *Dev Comp Immunol* 1998; 22:185-94.
- Lund V, Olafsen JA. Changes in serum concentration of a serum amyloid P-like pentraxin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during infection and inflammation. *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23:61-70.
- Lundqvist C, Baranov V, Hammarstrom S, Athlin L, Hammarstrom ML. Intraepithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell maturation in the human gut epithelium. *Int Immunol* 1995; 7:1473-87.
- Mac Artur J I, Fletcher T C. Phagocytosis in fish. In *Fish Immunology*, M J Manning and M F Tatner (eds). Academic Press, London, 1985; pp. 29-46.
- MacDougal KC, Mericko PA, Burnett KG. Antigen receptormediated activation of extracellular related kinase (ERK) in B lymphocytes of teleost fishes. *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23:221-30.
- Maddox JF, Mackay CR, Brandon MR. Ontogeny of ovine lymphocytes. I. An immunohistological study on the development of T lymphocytes in the sheep embryo and fetal thymus. *Immunology* 1987; 62: 97-105.
- Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bowald J and Dalmo RA. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19: 429-439.
- Magnadottir B, Lange S, Steinarsson A and Gudmundsdottir S. The ontogenic development of immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 2004; 139:217-224.
- Magnadottir B. Innate immunity of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20: 137-151.
- Magor BG, Magor KE. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:651-82.
- Manley NR, Blackburn CC. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:225-32.
- Manning M J. *Fishes. Immunology: a comparative approach* (R J Turner ed) 1994; pp.69-100. Chichester: John Wiley and Sons Ltd. (UK).
- Marchalonis JJ., Schluter SF., Yang HY., Hohman VS., McGee K., Yeaton L. Antigenic cross-reaction among immunoglobulin of diverse vertebrates (elasmobranchs to man) detected using xenoantisera. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992; 101A. 675-87
- Marrak P, Kappler J. I linfociti T e il loro recettore. *Le scienze.* 1998; 165:28-37.
- Marsden MJ, Vaughan LM, Foster TJ, Secombes CJ. A live (Delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Infect Immun.* 1996; 64:3863-9.
- Matsunaga T, Rahman A. In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionarily related. *Scand J. Immunol.* 2001; 53:1-6.
- Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a delicated antigen- presenting cell? *Nature* 1989;

- 338:74-76.
- Maurice S, Nussinovitch A, Jaffe N, Shoseyov O, Gertler A. Oral immunization of *Carassius auratus* with modified recombinant A-layer proteins entrapped in alginate beads. *Vaccine* 2004;23:450e9.
- McCormick MI, Molony BW. Influence of water temperature during larval stage on size, age and body condition of a tropical reef fish at settlement. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 1995; 118:59-68.
- Medzhitov R, Janeway Jr CA. An ancient system of host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:12-5.
- Medzhitov R, Janeway Jr CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296:298-300.
- Meseguer J, Esteban M A, Agulleiro B. Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) an ultrastructural study. *Arch Histol. Cytol.* 1991; 54:299-309.
- Meseguer J, Esteban MA, and Mulero V. The non specific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanism. *Anat. Rec.* 1996; 64:5403-5.
- Meseguer J, Esteban MA, Lopez-Ruiz A, Bielek E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L. and carp: *Cyprinus carpio* L.). *Anat. Rec.* 1994; 244:468-474.
- Miller KM, Withler RE. Sequence analysis of a polymorphic MHC class II gene in Pacific salmon. *Immunogenetics* 1996; 43:337-51.
- Miller NW, Sizemore RC, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 1985; 134:2884-8.
- Miller NW, Van Ginkel JE, Ellsaesser F, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* 1987; 11:739-48.
- Miracle, A.L., Anderson, M.K., Litman, R.T., Walsh, C.J., Luer, C.A., Rothenberg, E.V., Litman, G.W., Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. *Int. Immunol.* 2001;13, 567-580.
- Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, Forster R. Thimic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med.* 2004; 200(4):481-91.
- Moore L J, Somamoto T, Lie K K, Dijkstra J M, Hordvik I. Characterization of salmon and trout CD8 α and CD8 β . *Molecular immunology.* 2005; 42:1225-1234.
- Mor A, Avtalion RP. Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapias. *J. Fish. Biol.* 1990; 37:249-55.
- Mor A, Avtalion RR. Evidence of transfer of immunity from mother to eggs in tilapias. *Isr J Aquacult / Bamidgeh* 1988; 40:22-8.
- Morello D, Duprey P, Babinet C. Asynchronous regulation of mouse H-2D and Beta-2 microglobulin RNA transcripts. *Immunogenetics* 1985; 22:441-452.
- Moretta L, Ciccone E, Ferrini S, Pellicci P et al., Molecular and cellular analysis of human T lymphocytes expressing $\gamma\delta$ T cells receptor. *Immunol. Rev.*, 1991, 120,117-135.
- Mughal MS, Farley-Ewens EK, Manning MJ. Effects of direct in antigen on immunological memory in young carp, *Cyprinus carpio*. *Vet. Immunopathol.* 1986; 12:181-92.
- Mughal MS, Manning MJ. Antibody responses of young carp, *Cyprinus carpio*, and grey mullet, *Chelon labrosus*, immunized with soluble antigen by various routes. In: Manning MJ, Tatner MF, editors. *Fish Immunology*. London: Academic Press. 1985; P. 313-325.
- Mulero I, Sepulcre MP, Roca FJ, Meseguer J, Garcí'a-Ayala A, Mulero V. Characterization of macrophages from the bony fishgilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Dev. Comp. Immunol.* 2008; 32:1151-1159.
- Mulero V, Meseguer J, Esteban MA, Mulero V. The nonspecific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 1994; 57:351-358.
- Muñoz P, Sitja-Bobadilla A, and Alvarez-Pellitero P. Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parassitology* 2000; 120:465-77.
- Nachlas MM et al. The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. 1960; *anal. Biochem.* 1:317-26.
- Nagai T, Mutsuro J, Kimura M, Kato Y, Fujiki K, Yano T, et al. A novel truncated isoform of the mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Immunogenetics* 2000; 51:193-200.

- Nagarajan UM, O'Connell C, Rank RG. Molecular characterisation of guinea-pig (*Cavia porcellus*) CD8 α and CD8 β cDNA. *Tissue Antigens* 2004; 63:184-9.
- Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1999;39:113-26.
- Nakamura O, Suzuki Y, Aida K. Humoral immune response against orally administered human g globulin in the carp. *Fisheries Science* 1998;64:558e62.
- Nakanishi T, Fisher U, Dijkstra J M, Hasegawa S, Somamoto T, Okamoto N, Ototake M,. Cytotoxic T cell function in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 26(2):131-9.
- Nakanishi T. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of marine teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; 26:151-60.
- Nakao M, Musturo J, Nakahara M, Kato Y, and Yano T. Expansion of genes encoding complement components in bony fish: biological implications of the complement diversity. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:749-62.
- Nakao M, Mutsyro J, Obo R, Fujiki K, Nonaka M, and Yano T. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30(3):858-866.
- Nakayasu C, Somamoto T, Hasegawa S, Yoshitomi T, Okamoto N. Differential spontaneous killing of human and murine tumour cell lines by leucocyte subpopulations from carp peripheral blood leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:115-126.
- Nam B H, Hirono I, Aoki T. Bulk isolation of immune response-related genes by expressed sequenced tags of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) leukocytes stimulated with Con A/PMA. *Fish and Shellfish Immunol.* 2003; 14(5): 467-76.
- Nam BH, Hirono I, Aoki T. The four TcR genes of Teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) TcR alpha-, beta-, and delta-chains. *Journal of Immunology.* 2002; 170:3081-90.
- Nam BH, Hirono I, Aoki T. The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR alpha-, beta-, gamma-, and delta-chains. *J Immunol* 2003;170(6):3081-90.
- Nam BH, Hirono I, Aoki TJ. The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR alpha-, beta-, gamma-, and delta-chains. *Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3081-90
- Nam BH, Yamamoto E, Aoki T. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Hirame rhabdovirus*. *Dev. Comp. Immunol.* 2000; 24(1):13-24.
- Namikawa-Yamada C, Naruse K, Wada H, Shima A, Kuroda N, Nonaka M, et al. Genetic linkage between the LMP2 and LMP7 genes in the medaka fish, a teleost. *Immunogenetics* 1997;46(5):431-3.
- Naume B, Gately M, Espevik T. A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor), IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56+NK cells. *J Immunol* 1992;148(8):2429-36.
- Nauta AJ, Daha M, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.* 2003; 24:148-54.
- Nelson KJ, Kelley DE, Perry RP. Inducible transcription of the unrearranged k constant region locus is a common feature of pre-B cells and does not require DNA or protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:5305-9.
- Neutra MR and Kraehenbuhl J. Cellular and molecular basis for antigen transport in the intestinal epithelium. In Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, (Eds.): *Handbook of mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego-New York. 1994; pp27-39.
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius EM. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology* 2003;15:443-52.
- Norment AM, Bevan M. Role of chemokines in thymocyte development. *Immunol* 2000; 12:445-455.
- Novoa B, Bowman TV, Zon L, Figueras A. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 2008 Dec 16.
- O' Neill J G. Ontogeny of the lymphoid organs in an Antarctic teleost *Harpagifer antarcticus*. *Dev. Comp. Immunol.* 1989; 13:25-33.
- Ohmura K, Kawamoto H, Fulimoto S, Ozaki S, Nakao K, Katsura Y. Emergence of T,B, and myeloid lineage-

- committed as well as multipotent hemopoietic progenitors in aorta–gonad–mesonephros region of day 10 fetuses of the mouse. *J Immunol.* 1999; 163:4788–95.
- Ohta Y, Landis E, Boulay T, Phillips RB, Collet B, Secombs CJ, Flajnik MF, Hansen JD. Homologs of CD83 from Elasmobranch and Teleost Fish. *The Journal of Immunol.* 2004; 173: 4553-4560.
- Olsen YA, Press CMcL, Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmon salar* L., and the localisation of immunoglobulin in the egg. *Fish Shellfish Immunol.* 1997; 7:81-91.
- Ottinger CA, Johnson SC, Ewart KV, Brown LL, Ross NW. Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by mannose-binding lectin. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1999; 123:53-9.
- Ourth D D. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Dev. Comp. Immunol.* 1980; 4: 65-74.
- Padros F, Crespo S. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquaculture* 1996; 144:1-16.
- Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998;16:323-58.
- Panigrahi A, Kiron V, Kobayashi T, Puangkaew J, Satoh S, Sugita H. Immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004;102:379–88.
- Park CI, Hirono I and Aoki T. Molecular characterization of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* CD3 and evolution of the CD3 cluster. *Dev. Comp. Immunol.* 2005 ;29: 123–133.
- Park CI, Hirono I, Enomoto J, Nam BH, Aoki T. Cloning of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* CD3 cDNA and gene, and analysis of its expression. *Immunogenetics* 2001;53(2):130-5.
- Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.* 1989; 44:265-311.
- Parrott DM, Tait C, MacKenzie S, Mowat AM, Davies MD, Miklem HS. Analysis of the effector functions of different populations of mucosal lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1983; 409:307-320.
- Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J. Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. *J. Immunol.* 1995; 155:699-706.
- Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J. Structure and diversity of the TCR alpha-chain in a teleost fish. *J Immunol.* 1996; 157:207-12.
- Passer BJ, Chen CH, Miller NW, Cooper MD Identification of a T lineage antigen in the catfish. *Dev Comp Immunol.* 1996 Nov-Dec;20(6):441-50
- Peleteiro MC and Richards RH. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of fish Disease.* 1985; 8:161-172.
- Pelletier M, tautu C, Landry D, Montplaisir S, Chartrand C and Perreault C. Characterization of human thymic dendritic cells in culture. *Immunology* 1986; 58:263-270.
- Pepin JF, Brueil G, Rigobert P, Romestand B. Detection and characterization of immunoglobulin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Ichthyophysiol. Acta* 1997 ; 20:77-85.
- Pereira RA, King NJC, Blanden RV. Comparison of functional properties of thymic and splenic dendritic cells. *Cell. Immunol.* 1986; 102:152-167.
- Persson AC, Stet RJM, Pilstrom L. Characterisation of MHC class I and beta-2-microglobulin sequences in Atlantic cod revealing an usually high number of expressed class I genes. *Immunogenetics* 1999; 50:49-59.
- Petrie-Hanson L, Ainsworth AJ. Humoral immune responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fry and fingerlings exposed to *Edwardsiella ictaluri*. *Fish Shellfish Immunol.* 1999; 9: 579-89.
- Petrie-Hanson L, Ainsworth AJ. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001; 81:113-27.
- Picchiatti S, Abelli L, Buonocore F, Randelli E, Fausto AM, Scapigliati G, Mazzini M. Immunoglobulin protein and gene transcripts in sea bream (*Sparus aurata*) oocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 5:398-404.
- Picchiatti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM, Mulero V, Carnevali O, Cresci A, Abelli L. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol.* 2007 Jan-Feb;22(1-2):57-67.
- Picchiatti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM, Mulero V, et al. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish and Shellfish Immunology* 2007;22:57-67.
- Picchiatti S, Terribili FR, Mastrolia L, Scapigliati G and a Abelli L. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.).

- Anat. Embriol. 1997; 196(6): 457-463.
- Pickering AD and Richards RH. Factors influencing the structure, function and biota of the salmoid epidermis. Proceedings of the Royal Society, Edinburgh 1980; 79B: 93-104.
- Piganelli JD, Zhang JA, Christensen JM, Kaattari SL. Enteric coated microspheres as an oral method for antigen delivery to salmonids. Fish & Shellfish Immunology 1994;4:179e88.
- Pontius H and Ambrosius H. Beitrage zur Immunobiologie poikilothermer Wirbelterie. IX Untersuchungen zur zellularen Grundalge Humoraler Immunreaktionen der Knochenfische am Beispiel des Flussbarsches (*Perca fluviatilis* L.). Acta Biol. Med. Gem. 1972; 29:319-339.
- Poussier P, Teh HS, Julius M. Thymus-independent positive and negative selection of T cells expressing a major histocompatibility complex class I restricted transgenic T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium . J. Exp. Med. 1993; 178:1947-57.
- Powell MD, Briand HA, Wright GM and Burka JF. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) intestinal eosinophilic granule cells (EGC) response to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* extracellular products. Fish Shellfish Immunol. 1993; 3:279-289.
- Powell MD, Speare DJ, Wright GM. Comparative ultrastructural morphology of lamellar epithelial, chloride and mucus cell glycocalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill. J. Fish Biol. 1994; 44:725-730.
- Powell MD, Wright GM and Burka JF. Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Cell and Tissue Res. 1991; 266: 469- 474.
- Press CML, Dannevig BH and Iansdverk T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). fish Shellfish Immunol. 1994; 4:79-93.
- Pudifin DJ, Harding B, MacLennan IC. The differential effect of gamma irradiation on the sensitizing and effector stages of antibody dependent lymphocyte mediated cytotoxicity. Immunology. 1971 Nov;21(5):853-60.
- Pulsford A, Fange R, Zapata A G. The thymic microenvironment of the common sole (*Solea soea*). Acta Zoologica. 1991; 72:209-216.
- Pulsford A, Tomlinson MG, Lemaire-gony S, Glynn PJ. Development and immunocompetence of juvenile flounders, *Platichthys flesus* L. Fish Shellfish Immunol. 1994; 4:63-78.
- Quesada J, Villena ML and Anguillero B. Structure of the spleen of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopic study. J. Morph. 1990; 206:273-281.
- Quesada J, Villena ML, Navarro V. Ontogeny of the sea bass spleen (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopy study. Journal of morphology. 1995; 221:161-76.
- Rabinowich H, Manciuola M, Metes D, Sulica A, Herberman RB, Corey SJ, et al. Physical and functional association of Fc μ receptor on human natural killer cells with the ζ - and Fel RI γ -chains and with src family protein tyrosine kinases. J Immunol 1996;157:1485-91.
- Raida MK, Larsen JL, Nielsen ME, Buchmann K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). Journal of Fish Diseases 2003;26:495-8
- Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal elimination versus clonal anergy: The role of the thymus in inducing self tolerance. Science 1990; 248:1342-48.
- Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology. Fish Shellfish Immunol. 2008; 25(4):326-40.
- Randelli E, Foglietta A, Mazzini M, Buonocore F, Scapigliati G. Cloning and expression analysis of the co-receptor CD8a in sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture 2006; 256(1-4): 631-7.
- Rast JP, Anderson MK, Strong SJ, Luer C, Litman RT, Litman GW. α , β , γ e δ T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. Immunity. 1997,6,1-11.
- Raulet DH, Barman RD, Saito HY, Tonegawa S. Developmental regulation of T cell receptor gene expression. Nature. 1985; 314: 103-7.
- Raulet DH. How $\gamma\delta$ T cells make a living. Current Biology, 1994, 4, 246-248.
- Razquin BE, Castillo A, Lopez-Fierro P, Alvarez F, Zapata A, Villena A. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdineri* Richardson: an immunological and enzyme-histochemical study. J. Fish. Biol. 1990; 36:159-73.
- Reite OB, and Evensen O. Mast cells in the swimbladder of Atlantic salmon *Salmo salar*, histochemistry and responses to compound 48/80 and formalin-inactivated *Aeromonas salmonicida*. Diseases of Aquatic Organisms 1994; 20:95-100.

- Reite OB. Mast cells/eosinophilic granulocyte cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish Shellfish Immunol.* 1998; 8:489-513.
- Reite OB. The mast cell nature of granule cells in the digestive tract of the pike, *Exox lucius*: similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 1996; 6:363-369.
- Rijkers G.T. Kinetics of humoral and cellular immune reactions in fish. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 1982; 2:93-100.
- Rise ML, von Schalburg KR, Brown GD, Mawer MA, Devlin RH, Kuipers N, et al. Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Res* 2004;14(3):478-90.
- Ristow SS, Grabowski LD, Thompson SM, Warr GW, Kaattari SL, de Avila JM, et al. Coding sequences of the MHC II b chain of homozygous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 1999;23:51e60.
- Ritter M A, Crispe I N. The thymus. 1992 (Richwood D and Male D, eds), pp 1-85. Oxford Univ. Press, Oxford (UK).
- Roberts RJ, 1989. In *Fish Pathology*, 2nd edn. London:Baillière Tindall.
- Roberts RJ. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In *Fish Pathology* (Roberts RJ ed.), London: Baillière Tindall. 1978; pp. 55-91.
- Robertson O H, Wexler B C,. Histological changes in the organs and tissue of migrating and spawning salmon (Genus: *Oncorhynch*). *Endocrinology* 1960; pp 66-222.
- Robertson PAW, O'Dowd C, Burrells C, Williams P, Austin B. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 2000;185:235-43.
- Rocha B, von Boemher H, Guy-Grand D. Selection of interepithelial lymphocytes with CD8alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5336-5340.
- Rocha B. and Tanchot C. CD8 T cell memory. *Seminars in immunology.* 2004; 16: 305-314
- Rocha B. Vassalli P. Guy-Grand D. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha /beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 1991; 173:483-486.
- Rodrigues PN, Dixon B, Roelofs J, Rombout JH, Egberts E, Pohajdak B, et al. Expression and temperature-dependent regulation of the beta2-microglobulin (Cyca-B2m) gene in a cold-blooded vertebrate, the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Immunol* 1998;5(4):263-75.
- Rodrigues PN, Hermsen TT, Rombout JH, Egberts E, Stet RJ. Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol* 1995;19(6):483-96.
- Rodrigues PNS, Hermsen TT, van Maanen A, Taverne-Thiele AJ, Rombout JHWM, Dixon B, et al. Expression of MhcCyca class I and class II molecules in the early life history of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 1998; 22:493-506.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology.* 1993 Gower Med. Publ., London.
- Rojas R. e Apodaca G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Mol. Cell. Biol. Nature Reviews* 2002; 3: 1-12.
- Romano N, Abelli L, Mastrolia L, and Scapigliati G. Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Tissue Res.* 1997; 289:163-171.
- Romano N, Buonocore F, Moschetti A, Abelli L, Baldassini MR, Picchietti S, Scapigliati G, and Mastrolia L. T-cell receptor expression in lymphomyeloid organs of juveniles in sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) 2003.
- Romano N, Fanelli M, Maria Del Papa G, Scapigliati G, Mastrolia L. Histological and cytological studies on the developing thymus of sharpsnout seabram, *Diplodus puntazzo*. *J. Anat.* 1999a; 194(Pt 1): 39-50.
- Romano N, Picchietti S, Taverne-Thiele JJ, Taverne N, Abelli L, Mastrolia L, et al. Distribution of macrophages during fish development; an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anat. Embryol. (Berl)* 1998; 31-41.
- Romano N, Rossi F, Abelli L, Caccia E, Piergentili R, Mastrolia L, Randelli E, Buonocore F. Majority of TCRbeta+ T-lymphocytes located in thymus and midgut of the bony fish, *Dicentrarchus labrax* *Cell Tissue Res.* 2007; 329:479-489
- Romano N, Taverne-Thiele AJ, Fanelli M, Baldassini MR, Abelli L, Mastrolia L, et al. Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment. *Dev. Comp. Immunol.* 1999b; 23:123-37
- Romano N, Taverne-Thiele AJ, van Maanen A, Rombout JHWM. Distribution of leucocyte subpopulations in

- developing carp (*Cyprinus carpio* L.); immunocytochemical studies. *Fish Shellfish Immunol.* 1997b; 7:439-53.
- Rombout J and Van den Berg AA. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J. Fish Biol.* 1989; 35:13-22.
- Rombout J H W M, Koumans-van Diepen J C E K, Emmer P M, Tavernethiele J J, Taverne N. Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *J Fish. Biol.* 1996; 49:521.
- Rombout J, Bot HE and Taverne-Thiele JJ. Immunological importance of the second gut segment of carp. II. Characterization of mucosal leucocytes. *J.Fish Biol.* 1989a; 35:167-178.
- Rombout J, Joosten PHM, Engelsma MY, Vos N, Tavrne-Thiele A. Indication of a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp. *Dev. Comp. Immunol.* 1998; 22:63-77.
- Rombout J, Lamers CHJ, Helfrich MH, Dekker A, Taverne-Thiele JJ. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implication. *Cell Tissue Res.* 1985; 239:519-530.
- Rombout J, Taverne-Thiele AJ and Villena MI. The gut associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 1993; 17: 55-66.
- Rombout JH, van de Wal JW, Companjen A, Taverne N, Taverne-Thiele JJ. Characterization of a T cell lineage marker in carp (*Cyprinus carpio* L.).*Dev Comp Immunol.* 1997 Jan-Feb;21(1):35-46
- Rombout JHWM, Huttenhuis H B T, Picchiatti S, Scapigliati G. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:442-455.
- Rombout JHWM, Van den Berg AA, Van den Berg CTGA, Witte P, Egberts E. Immunological importance of the second gut segment of carp:III Systemic and/or mucosal immune response after immunizations with soluble or particulate antigens. 1998. *J. Fish. Biol* 35,179-186.
- Rombout JHWN, Taverne N, Kamp Mvd, Taverne-Thiele AJ. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 1993b; 17: 309-17.
- Rombout JW, Blok LJ, Lamers CH, Egberts E Immunization of carp (*Cyprinus carpio*) with a *Vibrio anguillarum* bacterin: indications for a common mucosal immune system. *Dev Comp Immunol.* 1986;10(3):341-51
- Rønneseth A, Wergeland HI, Pettersen EF. Neutrophils and Bcells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2007; 23:493-503.
- Rowley A F, Hunt T C, Page M & Mainwaring G. Vertebrate blood cells. A F Rowley & N A Ratcliffe Eds., Cambridge University press, 1988;18-127.
- Ruiz J, Leary JH and Jaso-Friedman L. Phosphorylation-induced activation of thilapia non-specific cytotoxic cells by serum cytokines. *Dis. Aquat. Organ.* 2001; 46(2):129-137.
- Sacedón R, Varas A, Hernández-López C, Gutiérrez-de Frías C, Crompton T, Zapata AG et al. Expression of hedgehog proteins in the human thymus. *J. Histochem. Cytochem.* 2003; 51:1557-66.
- Saeij JP, de Vries BJ, Wiegeertjes Gf. The immune response of carp to *Trypanoplasma borreli*: kinetics of immune gene expression and polyclonal lymphocyte activation. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:859-874.
- Sailendri k. and Muthukkaruppan V. The immune response of the teleost, *Tilapia mossambica* to soluble and cellular antigens. *J.of Exp. Zool.* 1975; 191:371-81
- Saito H, Kamamori Y, Takemori T et al. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 1988; 280:275-8.
- Salinas I, Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 2005;19:67-77.
- Salinas I, Meseguer J and Eteban MA. Assessment of different protocols for the isolation and purification of gut associated lymphoid cells from the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol Proced.Online* 2007;9(1): 43-55.
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology* 1999;10:107-10.
- Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton SE, Garrett TP, Clayberger C et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990; 345:41-6.
- Sanchez C, Alvarez A, Castillo A, Zapata A, Villena A, Domiguez J. Two different subpopulations of Ig-bearing cells in lymphoid organs of rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19:79- 86.
- Sanderson JR, and Walker WA Mucosal barrier, in Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J (Eds): *Handbook of Mucosal Immunology.* Academic Press, San Diego-New York. 1994; Pp.41-51.
- Santos NMSD, Romano N, Sousa Md, Ellis AE, Rombout JWHM. Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:583-96.

- Sapinoro R, Volcy K, Rodrigo WW, Schlesinger JJ, Dewhurst S. Fc receptor-mediated, antibody-dependent enhancement of bacteriophage lambda-mediated gene transfer in mammalian cells. *Virology*. 2008 Apr 10;373(2):274-86. Epub 2008 Jan 14
- Sasaki Y, Maita M, Okamoto N. Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. *Fish Shellfish Immunol*. 2002; 12:243-52.
- Sato A, Mayer WE, Overath P, Klein J. Genes encoding putative natural killer cell C-type lectin receptors in teleostean fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(13):7779-84.
- Sato A, Okamoto N. Oral and anal immunisation with alloantigen induces active cell-mediated cytotoxic responses in carp. *Fish Shellfish Immunol*. 2007 Jul;23(1):237-41.
- Sato A, Somamoto T, Yokooka H, Okamoto N. Systemic priming of alloreactive cytotoxic cells in carp, following anal administration of allogeneic cell antigens. *Fish & Shellfish Immunology* 2005;19:43-52.
- Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* 2007; 219:143-56.
- Scapigliati G, Buonocore F, Mazzini M. Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective. *Curr. Pharm. Design*. 2006; 12:3071-81.
- Scapigliati G, Mazzini M, Mastrolia L, Romano N, Abelli L. Production and characterization of a monoclonal antibody against thymocytes of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shellfish Immunol*. 1995; 5:393.
- Scapigliati G, Meloni S, Mazzini M. A monoclonal antibody against corion proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax*: studies of corion precursors and applicability in immunoassays. *Biol. Reprod*. 1999; 60(4):783-9.
- Scapigliati G, Romano N, Abelli L, Meloni S, Ficca AG, Buonocore F, et al. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 2000;10(4):329-41.
- Scapigliati G, Romano N, Buonocore F, Picchietti S, Baldassini MR, Prugnoli D, et al. The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Dev. Comp. Immunol*. 2002; 26:151-160.
- Scapigliati G, Romano N, Picchietti S, Mazzini M, Mastrolia L, Scalia D, Abelli L. Monoclonal antibodies against sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassay. *Fish and Shellfish Immunol*. 1996; 6:383-401.
- Scapigliati G., Chausson F., Cooper EL., Scalia D., Mazzini M. Qualitative and quantitative analysis of serum immunoglobulins of four antarctic fish species. *Polar. Biol*. 1997; 18:209-13
- Scapigliati G., Romano N., and Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B- lymphocytes. *Aquaculture* 1999; 172:3-28
- Schiffirin EJ, Blum S. Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Current Opinion in Biotechnology* 2001;12:499-502.
- Schmidt B, Furthauer M, Connors SA, Trout J, Thisse B, Thisse C et al. Equivalent genetic roles for *bmp 7* / *snailhouse* and *bmp2b/swirl* in dorsoventral pattern formation. *Development* 2000; 127:957-967.
- Schorpp M, Leicht M, Nold E, Hammerschmidt M, Haas-Assembaum A, Wiest W, et al. A zebrafish orthologue (*whnb*) of the mouse nude gene *eis* expressed in the epithelial compartment of the embryonic thymic rudiment. *Mech. Dev*. 2002; 118:179-85.
- Schroder MB, Villena AJ, Jorgensen TO. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol*. 1998; 22: 507-17.
- Secombes C, Van Groningen J J M, Van Muiswinkel W B, Egberts E. Ontogeny of the immune system carp (*Cyprinus Carpio*): the appearance of antigenic determinants on lymphoid cells detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies. *Dev Comp Immunol*. 1983; 7:455-464.
- Secombes CL The non-specific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T, editore. The fish immune system. Academic Prese; 1996. p. 63-105.
- Secombs CJ and Fletcher TC. The role of Phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review Fish Dis*. 1992; 2: 53-71.
- Secombs CJ. The phylogeny of cytokines. In: The cytokine handbook, Thomson A. Ed., Academic press Ltd, London. 1991; pp.387-412.
- Shang N, Sun XF, Hu W, Wang YP, Guo QL. Molecular cloning and characterization of common carp (*Cyprinus carpio* L.) TCR γ and CD3 γ/δ chains. *Fish Shellfish Immunol*. 2008 Apr;24(4):412-25.
- Shang NA, Xiao-Feng S, Hu W, Wang YP, Guo QL. Molecular cloning and characterization of common carp (*Cyprinus carpio* L.) TcR γ and CD3 γ/δ chains. *Dev. Comp. Immunol*. 2008; 24:412-425.

- Sheid B, Prat JC, Gaetjens E. A tumor growth inhibitory factor and a tumor growth promoting factor isolated from unfertilised ova of shad (*Alosa sapidissima*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 149:713-9.
- Shen L, Stuge TB, Bengten E, Wilson M, Chinchar VG, Nafte) JP, et al. Identification and characterization of clonal NK-like cells from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 2004;28(2):139-52.
- Shen L, Stuge TB, Evenhuis JP, Bengten E, Wilson M, Chinchar VG, et al. Channel catfish NK-like cells are armed with IgM via a putative FcmicroR. *Dev Comp Immunol* 2003;27(8):699-714.
- Shin DH, Fujiki K, Nakao M, Yano T. Organization of the NKEF gene and its expression in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev Comp Immunol* 2001;25(7):597-606.
- Shum BP, Aiuni K, Zhang S, Kehrer SR, Raison RL, Detrich HW, et al. Unexpected beta2-microglobulin sequence diversity in individual rainbow trout. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2779-84.
- Shum BP, Rajalingam R, Magor KE, Azumi K, Carr WH, Dixon B, et al. A divergent non classical class I gene conserved in salmonids. *Immunogenetics* 1999; 49:479e90
- Sizemore RG, Miller NW, Cuchens MA, Lobb CJ, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 1984; 133:2920-4
- Smith AM, Potter M and Merchant EB. Antibody-forming cells in the pronephros of the teleost *Leponis macrochirus*. *J. Immunol.* 1967; 99: 876-882.
- Smyth MJ, Ortaldo JR, Bere W, Yagita H, Okumura K, Young HA. IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J Immunol* 1990;145:1159-66.
- Somamoto T, Yoshimura Y, Nakanishi T, Ototake M. Molecular cloning and characterization of two types of CD8 α from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langdortii*. *Dev. Comp. Immunol.* 2005; 29: 693-702.
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Sick EB, Pipper CB, Martinussen T, et al. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 2001;3:755-65.
- Sprent J, Gao EK, Webb SR. T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance. *Science* 1990; 248:1357-1363.
- St. Luise Cormier E A, Osterland C K, Anderson P D. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmon Gairdneri*). *Dev. Comp. Immunol.* 1984; 8:71-80.
- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:101-15.
- Staudt LM, Lenardo MJ. Immunoglobulin gene transcription. *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9:373-8.
- Steinhagen D and Jendrysek S. Phagocytosis by carp granulocytes; in vivo and in vitro observations. *Fish Shellfish immunol.* 1994, 4: 521-525.
- Stenvik J, Jorgensen TO. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics* 2000; 51: 452-61.
- Stet RJM, de Vries B, Mudde K, Hermsen T, van Heerwaarden J, Shump BP, et al. Unique haplotypes of cosegregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes. *Immunogenetics* 2002; 54:320-31.
- Stet RJM, Kruiswijk CP, Saeij JPJ, Wiegertjes GF. Major histocompatibility genes in cyprinid fishes: theory and practice. *Immunol. Rev.* 1998; 166:301-16.
- Stuge TB, Wilson MR, Zhou H, Barker KS, Bengten E, Chinchar G, et al. Development and analysis of various clonal alloantigen-dependent cytotoxic cell lines from channel catfish. *J Immunol* 2000;164(6):2971-7.
- Su K, Wu J, Edberg JC, McKenzie SE, Kimberly RP. Genomic organization of classical human low-affinity Fc γ receptor genes. *Genes Immun.* 2002 Oct;3 Suppl 1:S51-6
- Suetake H, Araki K, Suzuki Y. Cloning expression and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics* 2004; 5:368-364.
- Sultmann H, Mayer WE, Figueroa F, O'hUigin C, Klein J. Zebrafish MHC class II alpha chain- encoding genes: polymorphism, expression, and function. *Immunogenetics* 1993; 38:408-420.
- Sun J, Leahy DJ, Kavathas PB. Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domain of MHC class I. *J. Exp. Med.* 1995; 182:1275-80.
- Sun PD. Structure and function of natural-killer-cell receptors. *Immunol Res* 2003;27(2-3):539-48.

- Sunyer JO and Tort L. The complement system of the teleost fish *Sparus aurata*. Ann. NY Acad. Sci. 1994; 712:371-373.
- Sunyer JO, Tort L. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* are effected by the alternative complement pathway. Vet Immunol Immunopathol 1995;45:333-45.
- Suzuki Y, Orito M, Furukawa K, Aida K. Existence of low molecular weigh immunoglobulin M in carp eggs. Fish Sci. 1994; 60:159-62.
- Sveinbjorsson B, Seljelid R. Aminated (b)-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages in vitro. Vet. Immunol. Immunopathol. 1994; 41:113.
- Sydora BC, Mixer PF, Holcombe HR, Eghtesady P et al., Intestinal intraepithelial lymphocytes are activated and cytolytic but do not proliferate as well as other T cells in response to mitogens. J. Immunol., 1993, 150,2179-2191.
- Szalai AJ, Hu X, Raman C, Barnum SR Requirement of the Fc receptor common gamma-chain for gamma delta T cell-mediated promotion of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 2005 Dec;35(12):3487-92
- Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. Annu Rev Immunol 1997;15:797-819 [Review].
- Takami K, Zaleska-Rutczynska Z, Figueroa F, Klein J. Linkage of LMP, TAP, and RING3 with Mhc class I rather than class II genes in the zebrafish. J Immunol 1997;159(12):6052-60.
- Takano T, Iwahori A, Hirono I, Aoki T. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. Fish Shellfish Immunol. 2004; 17:367-374.
- Takano T, Kondo H, Hirono I, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Mol. Immunol. 2007; 44:1845-1853.
- Takemura A, Takano K. Transfer of maternally-derived immunoglobulin (IgM) to larvae in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol. 1997; 7:355-63.
- Takemura A. Immunoistochemical localization of lysozyme in the prelarvae of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol. 1996; 6:75-7.
- Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic nonpeptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. Nature. 1995; 375:155-8.
- Tatner MF, Manning ML The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. Dev Comp Immunol 1983;7(1):69-75.
- Tatner MF. Natural changes in the immune system of fish. In The fish immune system: organism, pathogen, & environment (series: fish physiology) (Iwana, G. & Nakanishi, T. eds.) 1996; pp. 255-287. Academic Press. Inc. S. Diego (CA, USA).
- Tatner MF. The ontogeny of humoral immunity of in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Vet. Immunol Immunopathol. 1986; 12:93-105.
- Temkin RJ and McMillan B. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, *Carassius auratus* J.morphol. 1986; 190:9-26
- Temmink J H M, Bayne C J. Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio* L.). Dev. Comp. Immunol. 1987; 11:125-37.
- Thompson MA, Ransom DG, Pratt SJ, Macleman H, Kieran MW, Detrich 3rd HW, et al. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. Dev. Biol. 1998; 196: 248-69.
- Timmerman HM, Koning CJM, Mulder L, Rombout FM, Beynen AC. Monospecies, multistrain and multispecies probiotics: a comparison of functionality and efficacy. International Journal of Food Microbiology 2004;96:219-33.
- Tlaskalová-hogenová H, Farrè-Castany MA, Stepánková R, Kozáková H, TuckováL, Funda DP, Barrot R, Cukrowska B, Sinkora J, Mandel L, Karská K, and Kolinská J. The gut as a lymphoepithelial organ: the role of intestine epithelial cells in mucosal immunity. Folia Microbiol. 1995; 40(4):385-91.
- Topliss JA, Rongers DJ. An anti-fucose agglutinin in the ova of *Dicentrarchus labrax*. Med. Libr. Sci. 1985; 42:199-200.
- Townsend A, Elliot T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A. Assembly of MHC class I molecules analysed in vitro. Cell 1990; 62: 285-295.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. Immunity 2004; 20:367-79.

- Trede NS, Zapata A, Zon LI. Fishing for lymphoid genes. *Trends Immunol* 2001; 22:302-307.
- Trede NS, Zon LI. Development of T-cells during fish embryogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 1998; 22:253-263.
- Turka LA, Schatz DG, Oettinger MA, Chun JJ, Gorka C, Lee K, McCormack WT and Thompson CB. Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 1991; 253:778-781.
- Turley SJ. Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14:765.
- Utke K, Kock H, Schuetze H, Bergmann SM, Lorenzen N, Einer-jensen K, Koller B, Dalmo RA, Velsey T, Ototake M, Fischer U. Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2008; 32:239-52.
- Vallejo AN, and Ellis AE. Ultrastructural study of the response of eosinophil granule cell to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol.* 1989; 13:133-148.
- Vallejo AN, Miller NW, and Clem LW. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annual Review of fish Dis.* 1992; 2:73-89.
- Van Boxel JA, Stobo JD, Paul WE, Green I. Antibody-dependent lymphoid cell-mediated cytotoxicity: no requirement for thymus-derived lymphocytes. *Science.* 1972 Jan 14;175(18):194-6
- Van Endert P. Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr Opin Immunol* 1999;11:82-8.
- Van Erp SHM, Egberts E, Stet RJM. Characterization of major histocompatibility complex class II A and B genes in a gynogenetic carp clone. *Immunogenetics* 1996; 44:192-202.
- Van Ginkel FW, Miller NW, Cuchens MA, Clem LW. Activation of channel catfish B cells by membrane immunoglobulin cross-linking. *Dev. Comp. Immunol.* 1994; 18:97-107.
- Van Muiswinkel W B. The piscine immune system: innate and acquired immunity. In: Woo PTK, editor. *Fish diseases and disorders. Volume I: protozoan and metazoan infections.* Canada: Department of Zoology, University of Guelph. 1995; p.729-49.
- Van Muiswinkel WB and Jagt LP. Host-parasite relationships in fish and other ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 1984; 3205-208.
- Van Muiswinkel WB and Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish. In: Woo PTK (ed). *Fish Diseases and Disorders*, second edition. CAB International, Wellingford. 2005.
- Van Muiswinkel WB, Anderson DP, Lamers CHJ, Egberts E, van Loon JJA, Ijssel JP. Fish immunology and fish health. In: Manning MJ, Tatner MF, editors. *Fish Immunology.* London: Academic Press; 1985; p 1-8.
- Van Muiswinkel WB, Lamers CHJ & Rombout JHW. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Research Immunol.* 1991; 142:362-366.
- Van Rees EP, Dijkstra CD, Sminia T. Ontogeny of the rat immune system: an immunohistochemical approach. *Dev. Comp. Immunol.* 1990; 14:9-18.
- Verburg van Kemenade B M L, Weyts F A A, Debets R & Flik G. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.* 1995;19: 59-70.
- Verburg van Kemenade L, Groeneveld A, hermsen S and Nagelkere L. Role of phagocytic on the immune response of carp (*Cyprinus carpio* L.). *International Conference of Phylogeny of Immunity.* 1989; July 23-28, Roscoff France. pp 44.
- Verho S, Jārvinen S, Nikoskelainen S, Lilius EM. Biological effect of vaccination can be assessed directly from diluted whole blood of rainbow trout using homologous blood phagocytes as immunosensors. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:175-83.
- Via CS, Rus V, Gately MK, Finkelman FI). IL-12 stimulates the development of acute graft-versus-host disease in mice that normally would develop chronic, autoimmune graft-versus-host disease. *J Immunol* 1994;153(9):4040-7.
- Villamil L, Tafalla C, Figueras A, Novoa B. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002;9:1318-23.
- Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 1998; 62:59-66.
- Walker RB, McConnell TJ, Walker RA. Variability in a MHC Mosa class II beta chain-encoding gene in striped bass (*Morone saxatilis*). *Dev. Comp. Immunol.* 1994; 18:325e42.
- Warr G.W. The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19:1-12.
- Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Carmichael AJ, Sissons JG. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol* 1999;73:2099-108.
- Wermentstam NE and Pilstrom L. T-cell antigen receptors in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): structure,

- organization and expression of TcR alpha and beta genes. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:117-35.
- White A, Fletcher TC, Pepys MB, Baldo BA. The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-Component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1981; 69:325-9.
- Wieland W H, Orzaez D, Lammers A, Parmentier H K, Verstegen M W A, Shots A. A functional polymeric immunoglobulin receptors in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochem. Journal.* 2004; 380: 669-676.
- Willet CE, Kawasaki H, Amemiya CT, Lin S, Steiner RA. Ikaros expression as a marker for lymphoid progenitors during zebrafish development: *Dev Dyn* 2001; 222: 694-8.
- Willett CE, Cortes A, Zuasti A, Zapata AG. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn.* 1999; 214:323-326.
- Wilson M, Bengten E, Miller NW, Clem LW, Du Pasquier L Warr GW. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to Ig D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 453-7.
- Wilson MR, Zhou H, Bengten E, Clem LW, Stuge TB, Warr GW, et al. T-cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR alpha and beta genes. *Mol Immunol* 1998;35:545-57.
- Witt CM, Raychaudhuri S, Schaefer B, Chakraborty AK, Robey EA. Directed migration of positive selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol* 2005; 3:1062-9.
- Wu Y, Wang S, Peng X. Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma. *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 16:381-9.
- Xiao SY, Li Y, Chen WF. Kinetics of thymocyte developmental process in fetal and neonatal mice. *Cell Research* 2003; 13(4):265-273.
- Yazawa R, Cooper GA, Beetz-Sargent M, Robb A, McKinnel L, Davidson WS, Koop BF. Functional adaptive diversity of the Atlantic salmon T-cell receptor gamma locus. *Mol Immunol.* 2008 Apr;45(8):2150-7.
- Yoffey m. A contribution to the study of the comparative histology and physiology of the spleen, with reference chiefly to its cellular constituents. *J. Anat.* 1929; 63:314-344.
- Yoshida SH, Stuge TB, Miller NW, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: cytotoxic activity of channel catfish peripheral blood leukocytes directed against allogeneic targets. *Dev Comp Immunol* 1995;19(1):71-7.
- Yoshikai Y. The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense. *Immunol Res* 1999;20(3):219-35.
- Yoshiura Y, Kiryu I, Fujiwara A, Suetake H, Suzuki Y, Nakanishi T, et al. Identification and characterization of *Fugu* orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics* 2003;55(5):296-306 [Epub 2003 Jul 05].
- Yousif AN, Albright LJ, Evelyn TPT. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* 1994a; 19:15-9.
- Yousif AN, Albright LJ, Evelyn TPT. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and its interaction with bacterial fish pathogens. *Dis Aquat Org.* 1994b; 20:127-36.
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez-de Frias C, Cortés A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20:126-136.
- Zapata A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* 1979; 3: 55-65.
- Zapata AG, Chibà A, Varas A. Cell and tissues of the immune system of fish (1). In *The fish immune system: organism, pathogen, and environment (series: fish physiology)*, (Iwama G, and Nakanishi T, eds) pp. 1996; 225-287. Academic Press. Inc. S.Diego (CA, USA).
- Zapata AG, Cooper E L.. Cells of the immune system. *The immune system: comparative histology.* Pp 1990; 15-30.
- Zapata AG, Torroba M, Varas A, Jimenez AV. Immunity in fish larvae. *Dev. Biol. Stand.* 1997; 90: 23-32
- Zapata AG. Lymphoid organs of teleost fish. I. Ultrastructure of the thymus of *Rutilus rutilus*. *Dev. Comp. Immunol.* 1981b; 5:427-436.
- Zapata AG. Lymphoid organs of teleost fish. III. Splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 1982; 6:87-94.
- Zapata AG. Phylogeny of the fish immune system. *Bull. Inst. Pasteur.* 1983; 81:165-186.
- Zarkardis IK, Sarrias MR, Sfyroera G, Sunyer JO and lambris JD. Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25(1):11-24.
- Zettergren LD. Ontogeny and distribution of cells in B lineage in the American leopard frog, *Rana pipiens*. *Dev. Comp. Immunol.* 1982; 6:311-20.

- Zhang H, Evenhuis JP, Thorgaard GH, Ristow SS. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 2001;25(1):25-35.
- Zhou H, Stuge TB, Miller NW, Bengten E, Naftel JP, Bernanke JM, et al. Heterogeneity of channel catfish CTL with respect to target recognition and cytotoxic mechanisms employed. *J Immunol* 2001;167(3):1325-32.
- Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 1992; 149(2):735-42.
- Zhou LJ, Tedder TF. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83⁺ blood dendritic cells. *Blood*. 1995; 86(9):3295-301.

Pubblicazioni e Abstract di congressi nazionali:

1. Abelli L, Coscia MR, Zeni C, **Bertoni F**, U. Oreste. Peculiar immune mechanisms in the liver of the antarctic teleost fish *Trematomus Bernacchii*. 10° Congress -International Society Developmental and Comparative Immunology-Charleston (USA) July 1-6, 2006. pag. 59.
2. Abelli L, Coscia MR, **Bertoni F**, Caprera C, Romano N, Oreste U. B cells in lymphoid tissues of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii* VIII° Congress-Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology, Napoli 1-2 March 2007
3. Biondi C., Ferretti ME., Lunghi L, Medici S, Cervellati F, Abelli L, **Bertoni F**, Adinolfi E, Vesce F, Bartolini G, Papi A, D'Andrea S, Berton S, Baldassarre G Somatostatin as a regulator of first-trimester human trophoblast functions. Placenta. 2008 Aug;29(8):660-70.
4. Picchietti S, Guerra L, Randelli E, **Bertoni F**, Fausto AM, Buonocore F, Abelli L: Gene expression and functional studies on gut immune system of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). IX Congress-Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology, Varese 26-29 February 2008
5. Salinas I, Abelli L, **Bertoni F**, Picchietti S, Roque A, Furones D, Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. . Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 2008 Jul;25(1-2):114-23.
6. Abelli L, Coscia MR, **Bertoni F**, Romano N, Oreste U. Identification of B-lineage cells in lymphoid tissues of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. Minor revision
7. Biondi C, Ferretti ME, Lunghi L, Medici S, Cervellati F, Pavan B, Vesce F, Adinolfi E, **Bertoni F**, Abelli L. Cyclic AMP efflux from human trophoblast cell lines: a role for MRP1 transporter. Minor revision