



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA E AMBIENTALE  
CURRICULUM: BIOTECNOLOGIE VEGETALI E ANIMALI

XXV CICLO

COORDINATORE: Prof. Guido Barbujani

## LA RISPOSTA DEL SISTEMA IMMUNITARIO DEI PESCI ALLE INFESTAZIONI PARASSITARIE: IL RUOLO DELLE MAST CELLS NELLA DIFESA DELL'OSPITE

### **Dottoranda**

Dott.ssa Alice Lui

### **Tutori**

Dott. Bahram S. Dezfuli

Dott.ssa Luisa Giari

Dott. Maurizio Manera

## INDICE

<b>1) PREMESSA</b>	<b>pag. 1</b>
<b>2) INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 3</b>
<b>3) SISTEMA IMMUNITARIO</b>	<b>pag. 6</b>
<b>4) MAST CELLS</b>	<b>pag. 12</b>
<b>5) PISCIDINE</b>	<b>pag. 15</b>
<b>6) MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 19</b>
<b>6.1 <i>Campionamenti</i></b>	<b>pag. 19</b>
<b>6.2 <i>Microscopia ottica ed elettronica</i></b>	<b>pag. 19</b>
<b>6.3 <i>Immunoistochimica (IHC)</i></b>	<b>pag. 20</b>
<b>6.4 <i>Conteggi cellulari, analisi intensità di marcatura ed elaborazioni statistiche</i></b>	<b>pag. 21</b>
<b>7) RISULTATI</b>	<b>pag. 24</b>
<b>7.1 <i>Dicentrarchus labrax</i></b>	<b>pag. 24</b>
<b>7.1.1 <i>Anticorpo anti-Piscidina 3</i></b>	<b>pag. 25</b>
<b>7.1.2 <i>Anticorpo anti-Piscidina 4</i></b>	<b>pag. 27</b>
<b>7.1.3 <i>Confronto anticorpi anti-Piscidina 3 e anti-Piscidina 4</i></b>	<b>pag. 29</b>

<b>7.2 <i>Sparus aurata</i></b>	<b>pag. 31</b>
<b>7.2.1 <i>Anticorpo anti-Piscidina 3</i></b>	<b>pag. 32</b>
<b>7.2.2 <i>Anticorpo G7 nelle branchie</i></b>	<b>pag. 34</b>
<b>7.2.3 <i>Anticorpo anti-Istamina</i></b>	<b>pag. 36</b>
<b>7.2.4 <i>Anticorpo G7 nella cute</i></b>	<b>pag. 36</b>
<b>7.3 <i>Perca fluviatilis</i></b>	<b>pag. 39</b>
<b>7.3.1 <i>Anticorpo anti-Piscidina 3</i></b>	<b>pag. 40</b>
<b>7.3.2 <i>Anticorpo anti-Piscidina 4</i></b>	<b>pag. 42</b>
<b>7.3.3 <i>Confronto anticorpi anti-Piscidina 3 e anti-Piscidina 4</i></b>	<b>pag. 44</b>
<b>8) DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 45</b>
<b>8.1 <i>Dicentrarchus labrax - Diplectanum aequans system</i></b>	<b>pag. 45</b>
<b>8.2 <i>Sparus aurata-Ergasilus lizae system</i></b>	<b>pag. 48</b>
<b>8.3 <i>Sparus aurata-lymphocystis disease virus system</i></b>	<b>pag. 51</b>
<b>8.4 <i>Perca fluviatilis -Acanthocephalus lucii system</i></b>	<b>pag. 53</b>
<b>9) CONCLUSIONI</b>	<b>pag. 55</b>
<b>10) ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI</b>	<b>pag. 57</b>
<b>11) RINGRAZIAMENTI</b>	<b>pag. 58</b>

**12) BIBLIOGRAFIA**

**pag. 59**

**TABELLE E FIGURE**



## 1) PREMESSA

L'acqua è tra i principali costituenti degli ecosistemi ed è alla base di tutte le forme di vita conosciute, uomo compreso; all'acqua si deve l'origine stessa della vita sul nostro pianeta. Sulla Terra l'acqua ricopre il 70,8% della superficie del pianeta e la sua presenza, indispensabile anche per usi civili, agricoli ed industriali, è una condizione essenziale per lo sviluppo e il sostentamento della vita così come la conosciamo. Dalla fine della piaga della peste nera del XIV secolo la popolazione mondiale è cresciuta in modo continuo e, a fronte di questa crescita, si è avuto un parallelo aumento della domanda di cibo. L'allevamento di specie terrestri (bovini, ovi-caprini, suini) non è più sufficiente per soddisfare il fabbisogno alimentare mondiale, per cui si è cominciato a sfruttare l'ambiente acquatico per gli allevamenti ittici. In Italia gli allevamenti di pesce sono presenti dall'età dei Romani quando servivano per soddisfare i bisogni degli imperatori. In tempi moderni la realizzazione di impianti di itticoltura, sia marini (ad esempio per l'orata) che di acqua dolce (trota e altri salmonidi), risponde all'esigenza di produrre in abbondanza pesce per i due principali settori della pesca sportiva e dell'approvvigionamento distributivo.

I pesci presentano molteplici vantaggi dal punto di vista economico-gestionale rispetto agli organismi terrestri. Infatti, molti paesi in via di sviluppo (vedi esempi nel bacino mediterraneo: Tunisia, Marocco, Turchia, Grecia, Cipro), ove fino a qualche tempo fa non esisteva l'acquacoltura, sono diventati i maggiori competitori dei paesi dove questa pratica è una tradizione secolare.

È stato stimato che circa il 40% del pesce che consumiamo è di allevamento e questa è una delle ragioni del rapido sviluppo dell'acquacoltura. Conseguentemente all'aumento degli allevamenti ittici emerge il rischio del rapido sviluppo tra i pesci allevati di nuove malattie diffusibili, fra cui le malattie parassitarie. I pesci, per il tipo di ambiente in cui vivono, sono in continua interazione con organismi patogeni e non, da cui si difendono grazie al loro sistema immunitario. Comprendere come esso risponda permetterebbe non solo una migliore gestione delle conseguenze dovute alle malattie parassitarie ma anche la possibilità di potenziare le strategie di prevenzione. Negli ultimi anni sono aumentati gli studi e l'interesse sull'immunità dei pesci. Ne sono una testimonianza l'incremento degli articoli sulle riviste scientifiche, la nascita di nuove riviste specializzate e la pubblicazione di libri aggiornati sul tema.

Questa tesi di dottorato è incentrata sullo studio di come orata (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758), branzino (*Dicentrarchus labrax* L.) e persico (*Perca fluviatilis* L.), reagiscono alla presenza di macroparassiti. Il tema è stato scelto per ampliare le conoscenze sul sistema immunitario di due specie ittiche di primaria rilevanza economica nell'itticoltura Mediterranea (orata e branzino) e di una specie di pregio, oggetto di pesca professionale (persico). Lo scopo principale è stato capire in

che modo siano coinvolte nella reazione infiammatoria alcune cellule dell'immunità innata, le *mast cells*, le quali esprimono peptidi antimicrobici capaci di combattere virus, batteri, funghi o microparassiti. Con questa ricerca si documenta, per la prima volta, l'azione di questi peptidi contro parassiti metazoi.

## 2) INTRODUZIONE

Le parassitosi sono uno dei maggiori ostacoli al successo dell'acquacoltura e costituiscono spesso la più significativa causa di perdite economiche in questo settore (Schnick *et al.*, 1997; Ligeon *et al.*, 2000; Woo, 2006). Le malattie riscontrabili nei pesci possono essere causate da vari agenti patogeni, quali virus, batteri, funghi, protozoi e parassiti metazoi, ciascuno dei quali richiede un differente e specifico trattamento. Le conseguenze economiche delle malattie parassitarie possono essere molto pesanti e, anche nei paesi sviluppati con una gestione ottimale degli impianti di itticoltura, esse arrivano a determinare il 10% delle perdite (Parker, 2001).

Gli ergasilidi (famiglia Ergasilidae) sono comuni crostacei parassiti dei pesci che attaccano principalmente le branchie (Muzzal *et al.*, 2004). I danni inferti all'ospite sono imputabili alla modalità di ancoraggio e di nutrizione di questi copepodi parassiti e sono stati descritti in vari articoli (Jónsdóttir *et al.*, 1992; Nolan *et al.*, 2000). Johnson *et al.* (2004) indicano gli ergasilidi e le epidemie da essi causate come la principale causa di mortalità negli allevamenti di acque sia dolci che salmastre in diversi paesi fra cui Israele (Paperna *et al.*, 1975), Taiwan (Lin *et al.*, 1998), Giappone (Yamashita, 1980), Cina (Wang *et al.*, 2002), USA (Benetti *et al.*, 2001), Sud Africa (Tsotetsi, 2005) e Ungheria (Molnar and Székely, 2004). In Italia, nella nostra area di studio e nell'estate del 2009, il copepode *Ergasilus lizae* (Krøyer, 1863) ha provocato la morte del 40% delle giovani orate, *Sparus aurata*, in un allevamento semi-intensivo. In seguito, la produzione delle orate è stata accompagnata da perdite annuali del 5-8% (sempre attribuibili alla parassitosi da *E. lizae*) ogni estate fino al 2012 (comunicazione personale del responsabile sanitario dell'allevamento).

Il branzino (*Dicentrarchus labrax*) è la seconda specie marina più allevata in Italia (Montero *et al.*, 2004) e la sua coltura è colpita ogni anno da perdite del 5-10% dovute al parassita *Diplectanum aequans* (Wagener, 1857) Diesing 1858 (Monogenea, Diplectanidae). Si tratta di un comune parassita delle branchie di branzini, sia di allevamento sia di ambiente naturale. Il suo modo di ancorarsi e di nutrirsi provoca diverse alterazioni istopatologiche a carico dell'epitelio branchiale, favorendo così l'instaurarsi di infezioni virali, batteriche o fungine (Stoskopf, 1993; Cone, 1995). Sono ben documentati gli effetti istopatologici di vari parassiti monogenei tra cui anche *D. aequans* (Oliver, 1977; González-Lanza, 1991; Buchmann *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2004; Dezfuli *et al.*, 2007; Whittington *et al.*, 2008) ma scarseggiano le informazioni sulla reazione cellulare dell'ospite a questa infestazione.

I parassiti intestinali generalmente provocano alterazioni strutturali e funzionali del canale alimentare (Hoste, 2001). Il tubo digerente rappresenta una delle sedi elettive per le infestazioni

parassitarie sia nei pesci sia negli altri vertebrati (Ringo *et al.*, 2007). Si ipotizza che ciò sia dovuto a diversi fattori tra cui la facilità di entrata dei parassiti attraverso la cavità orale, la grande disponibilità di siti di ancoraggio e di nutrienti, e la risposta immunitaria non particolarmente aggressiva (Secombes and Chappell, 1996). I protozoi come gli elminti determinano effetti più o meno gravi sulla parete intestinale a seconda della modalità di adesione e al grado di penetrazione nei tessuti (Hoste, 2001). Diverse specie di acantocefali causano estesi danni all'intestino penetrando in profondità con la loro proboscide (Taraschewski, 2000). L'istopatologia dei pesci infestati da acantocefali è documentata in diversi articoli, fra i quali Hamers *et al.* (1992) e Bosi *et al.* (2005). I parassiti intestinali possono indurre nel canale alimentare un'inflammatione, che costituisce una delle prime e più primitive modalità di difesa dell'organismo (Reichlin, 1999).

L'uso di farmaci e di altre sostanze chimiche costituisce il principale sistema di controllo e di difesa adottato negli allevamenti ittici per affrontare le malattie infettive e parassitarie. Questo approccio è però accompagnato da vari problemi fra i quali i costi elevati dei trattamenti, la persistenza in acqua e in natura di residui chimici, l'influenza delle condizioni ambientali in cui vivono i pesci sul metabolismo dei medicinali e, non ultimo, lo sviluppo di farmaco-resistenza da parte dei patogeni e il rischio che tale fenomeno si trasferisca anche all'uomo (Toranzo *et al.*, 2005; Samuelsen *et al.*, 2006). Soprattutto alla luce di quest'ultimo aspetto, nuove strategie di prevenzione e gestione stanno acquistando sempre più importanza e richiamando l'attenzione. Data la necessità di trovare strategie utili contro diversi tipi di parassitosi e adottabili per diverse specie ittiche, l'interesse verso l'immunità aspecifica o innata dei pesci e verso i peptidi antimicrobici (antimicrobial peptides, AMPs) è in crescente aumento negli ultimi anni (Noga *et al.*, 2011).

Gli AMPs sono presenti probabilmente in tutte le forme di vita e costituiscono una componente chiave della difesa innata (Zaslhoff, 2002). La scoperta negli ultimi vent'anni dell'ampia distribuzione negli organismi di questi AMPs ha fornito nuove informazioni sull'immunità innata e sul successo adattativo degli organismi multicellulari. Nelle cellule immunitarie e nelle mucose di vari pesci teleostei sono stati identificati diversi tipi di AMPs, fra cui le piscidine. Esse sono costituite da un numero di aminoacidi variabile tra 22 e 44, presentano una struttura ad  $\alpha$ -elica e sono state isolate per la prima volta nelle mast cells (MCs) di un moronide ibrido (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) (Silphaduang and Noga, 2001). In seguito Mulero e collaboratori (2008a) ne hanno documentato la presenza anche in un altro tipo cellulare proprio dell'orata, i granulociti acidofili (AGs). Le piscidine sono caratterizzate da uno spettro d'azione molto ampio, rivolto contro virus, batteri, funghi e parassiti (Chinchar *et al.*, 2004; Colorni *et al.*, 2008; Mulero *et al.*, 2008a; Andrews *et al.*, 2010; Dezfuli *et al.*, 2010b; Zahran and Noga, 2010; Salger *et al.*, 2011) e sono state segnalate solo in famiglie di pesci quali Moronidae, Scienidae, Siganiidae, Belontiidae, Ciclidae,

Percichthyidae e Latridae appartenenti all'ordine Perciformes (Silphaduang and Noga, 2001; Silphaduang *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2008a; Andrews *et al.*, 2010; Corrales *et al.*, 2010; Dezfuli *et al.*, 2010b; Salger *et al.*, 2011).

Questa tesi di dottorato è incentrata sugli effetti della presenza di diverse specie di macroparassiti sul sistema immunitario innato di tre specie di perciformi: orata (*Sparus aurata* L.), branzino (*Dicentrarchus labrax* L.) e persico (*Perca fluviatilis* L.). Le prime due sono specie marine di grande importanza economica nel panorama dell'acquacoltura mediterranea e la terza, di acqua dolce, negli ultimi anni sta richiamando l'attenzione dei pescatori dei laghi umbri e laziali (come quello di Trasimeno e Piediluco) per la prelibatezza delle sue carni.

L'originalità di questa indagine consiste nell'aver studiato il coinvolgimento delle MCs contenenti le piscidine nella risposta infiammatoria contro macroparassiti (sia ecto- che endoparassiti), poiché in letteratura erano presenti solo dati riguardanti pesci sani o infestati da microparassiti. In particolare il riscontro delle piscidine in un intestino parassitato da acantocefali è del tutto inedito. Vengono, inoltre, presentati per la prima volta i risultati sull'utilizzo dell'anticorpo monoclonale G7 (Sepulcre *et al.*, 2002), specifico per i granulociti acidofili (AGs) dell'orata, su sezioni di branchie e cute di orata parassitate rispettivamente dal crostaceo ectoparassita *E. Liza*, e dal *Lymphocystis Disease Virus* (LCDV, Iridoviridae).

### 3) SISTEMA IMMUNITARIO

I Teleostei hanno subito una forte pressione selettiva che ha consentito loro di colonizzare tutti gli ambienti acquatici presenti sul pianeta dando luogo a una straordinaria radiazione adattativa. Questi pesci possono vivere sia nelle gelide acque dei poli sia nei caldi mari tropicali, in bacini interni con salinità elevatissime, come nei torrenti montani, nelle pozze fangose delle savane africane e nelle fosse oceaniche a profondità elevatissime. Le diverse specie presentano dimensioni, comportamenti e inclinazioni sociali molto diverse tra loro (Secombes, 1996). Abitudini e ambienti di vita così diversi espongono i pesci a un'enorme varietà di agenti patogeni che esercitano una notevole pressione selettiva sul loro sistema immunitario (Secombes, 1996). 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 il sistema immunitario dei pesci riveste 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 (Noga *et al.*, 2011).

Il sistema immunitario dei pesci, deputato alla difesa dell'organismo contro agenti estranei, opera mediante particolari cellule ematiche, chiamate globuli bianchi o leucociti, (Secombes, 1996). I teleostei dispongono di un sistema immunitario (SI) innato e uno adattativo o acquisito che interagiscono fra loro (Flajnik and Du Pasquier, 2004; Alvarez-Pellitero, 2008). Il SI innato rappresenta la prima e aspecifica linea di difesa, quello acquisito agisce producendo linfociti T e B, che vengono codificati da geni ricombinanti, e contribuisce ad elaborare una risposta contro le infezioni più specifica e più efficiente (McGuinness *et al.*, 2003; Medzhitov, 2007). La principale distinzione fra i due sistemi consiste nei recettori utilizzati per riconoscere i patogeni (Medzhitov, 2007): il riconoscimento da parte del sistema innato si realizza mediante un aumento del numero dei recettori (PRRs, recettori per il riconoscimento dei patogeni) a bassa specificità e adibiti al riconoscimento di *patterns* molecolari associati ai patogeni o (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) (Medzhitov and Janeway, 2002; Janeway and Medzhitov, 2002), mentre il riconoscimento da parte del sistema acquisito si realizza mediante recettori antigenici aventi una stretta specificità (Pasare and Medzhitov, 2004).

In tutti i pesci moderni (Condroitti e Osteitti) timo, milza e intestino presentano aggregati linfoidi e molti altri organi, dalle meningi al rene, contengono tessuto linfoemopoietico: questa è la tipica condizione dei vertebrati che mancano di midollo osseo. Il rene e il timo sono organi linfoidi primari, la milza e l'intestino sono organi linfoidi secondari (Zapata *et al.*, 1996).

Il rene è diviso in due parti: rene anteriore o cefalico (pronefro) e rene medio/posteriore (mesonefro). Sebbene entrambe le zone mostrino capacità emopoietica, questa sembra essere maggiore nel rene cefalico che infatti ha ormai perso le normali funzioni renali (Ellis and de Sousa, 1974; Zapata, 1979a, b). Tutti i diversi tipi cellulari del sangue derivano da precursori (Al-Adhami and Kunz, 1976; Zapata, 1981) con capacità linfo- e plasmacitopoietiche (Smith *et al.*, 1967; Zapata, 1979a, 1981). La presenza di questi precursori e la loro capacità differenziativa mostrano la relazione filogenetica esistente tra il rene e il midollo osseo dei più evoluti vertebrati (Zapata, 1979a). In generale il rene viene considerato una fonte postembrionale di precursori ematopoietici (Al-Adhami and Kunz, 1976). Nella maggior parte dei teleostei il timo si trova vicino alla cavità branchiale ed è in continuità, negli adulti, con l'epitelio faringeo. Quest'organo è circondato da una capsula di tessuto connettivo costituita da fibroblasti, macrofagi e fibre collagene. Quando la ghiandola è grande, si presenta divisa in diversi lobi. Il parenchima che costituisce il timo consiste di cellule epiteliali che racchiudono principalmente cellule linfoidi ma anche macrofagi ed altri tipi cellulari. Nei teleostei non si rileva la tipica separazione in corticale e midollare presente invece nel timo degli altri vertebrati (Zapata *et al.*, 1996; Bowden *et al.*, 2005).

In tutti i vertebrati gli organi linfoidi secondari presentano un'organizzazione strutturale volta ad intrappolare gli antigeni e indirizzarli verso cellule capaci di reagire con essi. I linfonodi appaiono per la prima volta nella classe degli uccelli, ma aggregati linfoidi associati al sistema linfatico si trovano sia in anfibi sia in rettili (Zapata and Cooper, 1990). Nei pesci il sistema linfatico presenta similarità con quello degli altri vertebrati, anche se non è del tutto conosciuto. La milza è un grande organo filtrante sangue. Nei pesci adulti che hanno uno sviluppato tessuto linfoemopoietico renale, quello splenico si presenta poco sviluppato; al contrario se nell'adulto il tessuto linfoemopoietico è poco sviluppato a livello del rene lo sarà maggiormente nella milza, come si verifica per gli elasmobranchi (Zapata *et al.*, 1996). Nei teleostei in generale il tessuto linfoide della milza è poco esteso e va a circondare piccole arterie che si trovano diffuse nel parenchima. Il tessuto è costituito principalmente da linfociti e da popolazioni molto eterogenee di reticolociti ed è, inoltre, caratterizzato dalla presenza di centri melano-macrofagici anche chiamati, più propriamente, aggregati dei macrofagi (Zapata *et al.*, 1996).

In tutti i vertebrati, nella lamina propria e nell'epitelio intestinale, si trovano linfociti isolati. Senza considerare variazioni specie-specifiche, l'organizzazione istologica degli aggregati linfoidi associati all'intestino è simile in tutti i pesci studiati e consiste in aggregati liberi di linfociti, macrofagi, cellule plasmatiche e diversi tipi di granulociti (Zapata *et al.*, 1996). Nei teleostei questi aggregati di tessuto linfoide sono disseminati nell'intero tratto intestinale (Doggett and Harris,

1991): nelle specie che presentano un intestino suddiviso in due diversi segmenti, il secondo sembra essere specializzato nella risposta contro gli antigeni (Hart *et al.*, 1988).

Negli ultimi anni gli studi hanno dimostrato che nei pesci, soprattutto nei teleostei ma anche negli elasmobranchi, esiste anche un sistema immunitario legato alle mucose dell'apparato digerente e respiratorio (Hart *et al.*, 1988; Zapata and Cooper, 1990).

Le cellule del sangue deputate alla difesa dell'organismo contro le malattie o contro gli agenti patogeni sono i globuli bianchi o leucociti. I leucociti si suddividono in due classi:

- Agranulociti
- Granulociti

Fra gli agranulociti (letteralmente "cellule senza granuli") si distinguono i monociti e i linfociti. Questi ultimi sono gli elementi principali del sistema immunitario che difende l'organismo dall'attacco di organismi patogeni quali virus, batteri, funghi, protozoi e parassiti metazoi. Esistono diversi tipi di linfociti aventi funzioni differenti: linfociti T e linfociti B. I linfociti B sono responsabili della produzione di anticorpi ovvero proteine in grado di riconoscere e legare una molecola di forma complementare, definita antigene (Arms and Camp, 1998). Come tutte le proteine, anche gli anticorpi sono codificati da geni. In base ad un meccanismo di ricombinazione di alcuni di questi geni e di selezione clonale, ogni linfocita produce anticorpi di una forma particolare e che gli è propria. I linfociti esercitano quindi un'azione definita specifica in quanto capaci di riconoscere soltanto l'antigene di forma complementare. Anche se ogni linfocita è talmente selettivo da riconoscere una sola molecola, il numero di linfociti in circolo è così elevato che essi nel loro insieme possono riconoscere praticamente tutte le sostanze presenti nell'organismo, sia proprie che estranee. Si tratta di un centinaio di milioni di molecole diverse. Quando le cellule B vengono attivate dall'incontro con l'antigene, si riproducono intensamente (selezione clonale) e alcune di esse si trasformano in plasmacellule, le quali secernono nel circolo una grande quantità di anticorpi (risposta umorale). Questi anticorpi liberi, quando incontrano microrganismi che possiedono molecole di forma complementare (epitopi), si legano ad esse formando dei complessi che li inattivano. In seguito, altre cellule non specifiche, ma capaci di riconoscere gli anticorpi, fagocitano questi complessi (Arms and Camp, 1998; Alvarez-Pellitero, 2008).

I linfociti T, responsabili della cosiddetta risposta cellulo-mediata, si dividono in tre categorie: Tc (citotossici), Th (*helpers*), Ts (soppressori). Anche i linfociti citotossici si moltiplicano intensamente quando sono attivati. Tuttavia essi non liberano anticorpi nel circolo, ma li espongono sulla loro membrana e li usano per riconoscere essenzialmente cellule del proprio organismo infettate da virus. I linfociti citotossici uccidono le cellule rilasciando perforine, sostanze



che producono lesioni sulla membrana della cellula bersaglio e ne provocano così la morte per lisi osmotica. I linfociti T helper sono necessari per attivare sia i linfociti B che quelli Tc i quali, pur avendo riconosciuto agenti estranei, generalmente non entrano in azione. I linfociti soppressori riducono l'intensità della risposta immunitaria (Arms and Camp, 1998; Alvarez-Pellitero, 2008).

I monociti sono le cellule del sangue di dimensioni maggiori. In presenza di un focolaio infiammatorio, i monociti migrano attivamente dai vasi sanguigni al tessuto circostante e iniziano un'intensa attività fagocitaria trasformandosi in macrofagi. Il ruolo di queste cellule non si esaurisce nella fagocitosi, infatti esse mostrano anche una notevole capacità secretoria. I monociti producono varie sostanze con funzioni difensive, come il lisozima, gli interferoni ed altre molecole che modulano la funzionalità di altre cellule (Secombes, 1996; Alvarez-Pellitero, 2008).

Con il termine di granulociti si indicano e raggruppano i leucociti caratterizzati dalla presenza di granuli nel loro citoplasma. A seconda delle differenti affinità dei granuli verso i coloranti neutri, acidi o basici, il citoplasma delle cellule assume un colore diverso ed è così possibile distinguere tre tipi di granulociti: neutrofilo, eosinofilo (o acidofilo) e basofilo, secondo una classificazione tintoriale elaborata originariamente nei mammiferi e, in particolare, nella specie umana (Reite, 2005). Neutrofilo ed eosinofilo sono i più comuni, mentre i basofili sono generalmente assenti in molte specie (Secombes, 1996).

Prima di arrivare ad incontrare questi vari tipi di leucociti, gli agenti patogeni devono affrontare e superare la prima linea di difesa dell'organismo, lo strato mucoso. Esso presenta recettori del sistema immunitario innato: i TLRs o toll-like receptors che sono proteine transmembrana, e i NODs che sono proteine intracellulari (Medzhitov, 2007). Il riconoscimento dei patogeni avviene non solo attraverso recettori antigenici specializzati ma anche mediante le stesse cellule dell'epitelio che costituiscono una barriera cellulare primaria (Fritz *et al.*, 2007). Queste cellule riescono ad attivare i segnali per la risposta immunitaria: la relazione fra le cellule epiteliali e le T-cells gioca, per esempio, un ruolo molto importante nella regolazione dell'immunità dell'intestino (Shao *et al.*, 2001). Le cellule mucose contengono sostanze molto importanti nell'interazione ospite-parassita: immunoglobuline, complemento, proteina C-reattiva o CRP, lectine, lisozima, enzimi proteolitici, fosfatasi alcalina, esterasi, proteine antimicrobiche e emolisina (Alexander and Ingram, 1992; Jones, 2001; Palaksha *et al.*, 2008).

La risposta immunitaria dei pesci può essere:

- Aspecifica
- Specifica

Nella risposta aspecifica sono coinvolti numerosissimi tipi cellulari quali monociti/macrofagi, granulociti e cellule citotossiche nonspecifiche (*non-specific cytotoxic cells*, NCCs) (Alvarez-Pellitero, 2008). I macrofagi e i granulociti sono cellule mobili fagocitiche che si trovano nel circolo sanguigno e nei tessuti degli organi linfoidi secondari; essi sono importanti per l'infiammazione che è la risposta all'invasione da parte di organismi estranei e/o al danno da essi arrecato ai tessuti. Nella risposta infiammatoria sono coinvolte anche le cellule granulari eosinofile (*eosinophilic granular cells* o EGCs, un tipo di granulociti conosciuti come mast cells o MCs (Ellis, 1985, 2001; Alvarez-Pellitero, 2008). Le MCs subiscono una degranolazione che porta al rilascio di agenti immunofarmacologici in maniera simile a quanto avviene nei mammiferi (Reite, 2005). Nelle infezioni da virus o protozoi intervengono le NCCs, presenti anch'esse nel sangue e nei tessuti linfoidi, che uccidono le cellule inducendole all'apoptosi o determinandone la necrosi (Alvarez-Pellitero, 2008).

Molti studiosi, fra cui Secombes (1996), e Reite and Evensen, (2006), descrivono tre importanti eventi che caratterizzano l'infiammazione:

1. Incremento dell'afflusso di sangue verso l'area d'infezione/infestazione;
2. Aumento della permeabilità dei capillari;
3. Migrazione dei leucociti dai capillari al tessuto circostante.

Il coinvolgimento cellulare nella risposta immunitaria dei Teleostei sembra essere bifasico: prima si verifica un afflusso di neutrofili e in seguito di macrofagi. I primi vengono prodotti nel rene cefalico e poi rilasciati nel circolo sanguigno. I secondi derivano dalla maturazione dei monociti, i quali vengono prodotti nel rene cefalico e nella milza e, una volta giunti nel sito dell'infiammazione, si attivano aumentando sia la loro capacità fagocitaria che l'attività antibiotica (Reite and Evensen, 2006).

Le infiammazioni da parassiti sono di solito subacute/croniche e possono essere seguite da un incapsulamento dell'agente patogeno, ma non sempre questo fenomeno si riscontra: quando il parassita si limita a penetrare nell'epidermide, l'ospite risponde con una semplice iperplasia delle cellule epidermiche e un incremento aspecifico della produzione di muco (tipico delle infezioni da protozoi ectoparassiti o da monogenei) (Alvarez-Pellitero, 2008). Nei casi in cui l'agente infestante si spinge più in profondità, sotto l'epitelio o nel muscolo, la risposta consiste nella formazione di una capsula di fibroblasti disposti attorno alla cisti del parassita con la possibilità di coinvolgimento di macrofagi trasformati nelle così dette cellule epitelioidi (Secombes, 1996; Alvarez-Pellitero, 2008; Dezfuli *et al.*, 2011b).

Quando ha luogo l'inflammazione, essa è di solito associata a una risposta del tessuto: i neutrofili, gli eosinofili e i monociti si accumulano nella zona dell'iperplasia o formano attorno alla cisti del parassita una seconda membrana costituita di leucociti disposti esternamente allo strato di tessuto connettivo. Il ruolo degli eosinofili nel processo infiammatorio non è del tutto chiaro: è stata documentata la loro presenza nella risposta antiparassitaria di alcune specie di pesci mentre in altre sono risultati assenti (Secombes, 1996).

La risposta aspecifica del sistema immunitario presenta vantaggi e svantaggi. Uno dei vantaggi consiste nel gran numero di cellule che si mobilitano velocemente per la difesa dell'organismo, mentre fra gli svantaggi si annovera la mancanza di cellule della memoria: ciò fa sì che la risposta immunitaria a un eventuale successivo incontro con lo stesso patogeno avvenga con la medesima intensità e velocità della prima volta (Alvarez-Pellitero, 2008). La risposta specifica invece possiede linfociti della memoria che si disattivano rimanendo però pronti a riattivarsi all'occorrenza: in occasione di incontri successivi con lo stesso antigene queste cellule riconoscono subito il patogeno ed attuano pertanto una risposta più veloce, mirata ed efficace (Alvarez-Pellitero, 2008).

Le cellule coinvolte nell'immunità aspecifica e specifica possono interagire tra loro ed essere stimulate le une dalle altre, tale interazione è particolarmente importante nel caso delle infiammazioni croniche in cui c'è bisogno di stimoli per continuare a lungo l'azione difensiva (Alvarez-Pellitero, 2008).

#### 4) MAST CELLS

La prima segnalazione delle mast cells (MCs) risale al 1878 ed è riportata nella tesi di dottorato di Paul Ehrlich, che descriveva i grandi granuli e le particolari caratteristiche tintoriali di queste cellule. Egli, pensando che questi elementi cellulari servissero per nutrire le cellule del tessuto circostante, diede loro il nome di “mastzellen” (dal greco “masto” che significa nutrire) (Ehrlich, 1878). Oggi invece queste cellule sono considerate parte del sistema immunitario e chiamate mast cells o cellule granulari eosinofile (EGCs), termine quest’ultimo introdotto da Roberts *et al.* (1971), per identificare cellule mononucleari eosinofile contenenti granuli e distribuite nei tessuti connettivi di vari teleostei.

Le MCs sono state considerate l’equivalente o l’analogo delle mast cells dei mammiferi (Reite, 1998), simili alle cellule intestinali di Paneth (Sveinbjornsson *et al.*, 1996) e infine rappresentanti di un tipo cellulare originatosi dell’evoluzione di precursori comuni delle cellule di Paneth e delle mast cells (Paulsen *et al.*, 2001). L’identificazione di queste cellule usando specifici *markers* è necessaria e utile per valutare sia le differenze che possono presentarsi tra le diverse specie di pesci sia i cambiamenti nell’abbondanza e nella distribuzione delle MCs che avvengono in risposta ai parassiti (Alvarez-Pellitero, 2008). Queste cellule sono voluminose, di forma irregolare, dotate di un nucleo eccentrico polare e numerosi granuli tondi od ovali nel citoplasma. Alcuni studi hanno documentato che le MCs localizzate attorno ai vasi sanguigni assumono una forma allungata, mentre quelle che si trovano libere nei tessuti e lontane dai vasi sanguigni presentano una forma tonda od ovale (Reite and Evensen, 1994). I granuli delle MCs possono esibire un contenuto elettron-denso omogeneo oppure un alone elettron-trasparente esterno ed un core elettron-denso. Il citoplasma contiene due o tre mitocondri e un apparato di Golgi (Roberts *et al.*, 1971; Reite and Evensen, 2006; Dezfuli and Giari, 2008).

Nei pesci le MCs si trovano prevalentemente nel tessuto connettivo distribuite in tutto il corpo, ma più frequentemente negli apparati tegumentario, urinario, respiratorio, riproduttivo e gastrointestinale (Rocha and Chiarini-Garcia, 2007). Queste cellule sono state documentate in pesci (Roberts *et al.*, 1971; Reite, 1997), anfibi (Chiu and Lagunoff, 1972), rettili (Sottovia-Filho and Taga, 1973), uccelli (Selye, 1965) e mammiferi (Galli, 1990; Chiarini-Garcia and Pereira, 1999).

In molti teleostei le MCs si rinvencono nel tratto digerente (Reite, 1997; Paulsen *et al.*, 2001; Dezfuli and Giari, 2008; Manera *et al.*, 2011), nelle branchie (Powel *et al.*, 1990; Dezfuli *et al.*, 2003; Dezfuli and Giari, 2008) e anche in altri tessuti (Roberts *et al.*, 1971; Reite and Evensen, 1994). Rispetto a quelle dei mammiferi, le MCs dei pesci presentano struttura e funzionalità simili, un’analogia distribuzione nei tessuti e una maggiore concentrazione nelle vicinanze della rete

vascolare (Reite and Evensen, 1994, 2006). Negli intestini di triglia, pesce gatto, gambusia, salmonidi e labridi infestati da trematodi o cestodi è stata documentata una migrazione delle MCs dal tessuto connettivo sottostante lo strato epiteliale (Dezfuli *et al.*, 2003; Reite and Evensen, 2006). MCs sono state trovate anche nelle branchie, sia sane sia parassitate, del ciprinide *Abramis brama* (Linnaeus, 1758), e dei perciformi *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*; erano localizzate soprattutto nella lamella primaria appena sotto l'epitelio, dentro i vasi sanguigni, più raramente nelle lamelle secondarie, e il loro numero è risultato maggiore nelle branchie infestate dagli ectoparassiti rispetto agli esemplari sani (Dezfuli *et al.*, 2007, 2010b, 2011a; Dezfuli and Giari, 2008; Andrews *et al.*, 2010).

Le MCs prendono parte alla risposta immunitaria dell'ospite, grazie alla loro mobilità accorrono nel sito di infestazione dei parassiti (Ferguson, 1989; Reite, 1998, 2005; Dezfuli and Giari, 2008) e subiscono una degranulazione liberando varie sostanze contenute all'interno dei loro granuli. Il rilascio di queste sostanze induce importanti effetti fra cui la dilatazione e l'aumento della permeabilità dei vasi sanguigni che facilitano il passaggio delle cellule dal torrente circolatorio al tessuto circostante (Reite and Evensen, 1994; Dezfuli *et al.*, 2008a, b). Il processo di degranulazione è caratterizzato da un rigonfiamento dei granuli, che possono presentarsi circondati da aloni trasparenti e con la matrice di aspetto reticolato, e in alcuni casi dalla loro fusione. Spesso si riscontra il rilascio dei granuli al di fuori del citoplasma, testimoniato dalla presenza di granuli liberi vicino alle mast cells (Dezfuli and Giari, 2008). Il meccanismo di degranulazione, nei pesci, è la "diacitosi" tramite il quale sono rilasciati all'esterno i granuli intatti mentre nei mammiferi prevale l'esocitosi cioè la fusione della membrana dei granuli con la membrana plasmatica e il rilascio all'esterno delle sostanze in essi contenute (Schmale *et al.*, 2004).

Sembra che queste cellule servano anche per attirare altri tipi di cellule coinvolte nel processo infiammatorio, come i neutrofili, specialmente nella fase iniziale in cui si instaura l'agente patogeno (Matsuyama and Iida, 2002; Reite and Evensen, 2006; Dezfuli and Giari, 2008; Dezfuli *et al.*, 2008a, b).

L'origine delle MCs dei pesci non è chiara: è probabile che esse si formino nei tessuti ematopoietici e raggiungano successivamente, sotto forma di cellule immature, gli organi di destinazione attraverso il sistema circolatorio, come succede per le MCs dei mammiferi (Reite, 2005). Si ipotizza, inoltre, sulla base di alcune ricerche, che i pesci abbiano due popolazioni di MCs, una circolante ed una residente, e che la presenza di parassiti induca il reclutamento delle MCs nel sito d'infestazione (Vallejo and Ellis, 1989; Noya and Lamas, 1997; Murray *et al.*, 2007; Dezfuli and Giari, 2008).

Tutti gli studi finora condotti indicano che le MCs costituiscano una popolazione cellulare molto eterogenea per morfologia, contenuto dei granuli, sensibilità ai fissativi, risposta alle sostanze chimiche ma, soprattutto, per le proprietà metacromatiche dei granuli (Reite and Evensen, 2006). Per quest'ultima caratteristica vengono a volte descritte come basofile e a volte come eosinofile (Mulero *et al.*, 2007). I loro granuli si colorano con coloranti basici come il blu di toluidina e l'astrablù, contengono sostanze come fosfolipidi e mucopolisaccaridi acidi e sono positivi all'attività di fosfatasi alcalina, arilsulfatasi e 5-nucleotidasi (Secombes, 1996). Queste stesse sostanze si trovano nei granuli delle MCs dei mammiferi che contengono tipicamente anche istamina e serotonina. Recenti studi hanno dimostrato che le MCs sono generalmente prive di istamina ma provviste di serotonina (Dezfuli *et al.*, 2008b), ad eccezione dei pesci dell'ordine dei Perciformi, quello più evoluto fra i teleostei, le cui MCs contengono istamina ma non serotonina (Mulero *et al.*, 2007, 2008a).

In alcune specie, come nell'orata (*S. aurata*), è stata documentata la presenza nello strato sottomucoso di due distinte popolazioni di granulociti che si diversificano l'una dall'altra per l'ultrastruttura dei granuli e la reattività agli anticorpi anti-istaminici (Mulero *et al.*, 2007, 2008a). Anche Alvarez-Pellitero *et al.* (2008) hanno individuato due diversi tipi di EGCs coinvolte nella risposta del sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777) alla presenza di protozoi: il primo tipo (molto simile alle MCs dei salmonidi) degranulava e decresceva numericamente col progredire dell'infezione mentre il secondo tipo di MCs aumentava di numero.

Vari autori, fra cui Sveinbjornsson *et al.* (1996), lavorando su pesci infestati da batteri e da parassiti hanno riscontrato all'interno dei granuli delle MCs neuromodulatori ed enzimi (quali il lisozima); in alcuni studi immunoistochimici è stata documentata nei granuli la presenza anche di peptidi antimicrobici (Silphaduang and Noga, 2001) cui viene dedicato il capitolo che segue.

## 5) PISCIDINE

I peptidi antimicrobici (AMPs), presenti in quasi tutte le forme di vita, sono considerati una componente molto importante dell'immunità dell'organismo nei confronti delle infezioni (Zaslhoff, 2002). Essi costituiscono una prima linea di difesa (Hancock and Scott, 2000) essendo tipicamente espressi nelle principali vie di ingresso, come la cute e l'epitelio delle branchie e del tratto gastrointestinale, dove agiscono rapidamente, e in modo aspecifico, contro un'ampia gamma di agenti potenzialmente dannosi (Colorni *et al.*, 2008). Un considerevole numero di peptidi ad attività antimicrobica è stato trovato nei pesci Teleostei, fra cui Salmoniformi, Perciformi e Pleuronectiformi (Oren and Shai, 1996; Cole *et al.*, 2000; Silphaduang and Noga, 2001; Lauth *et al.*, 2002; Shike *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003; Iijima *et al.*, 2003; Patrzykat *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006). Le piscidine (da "pesci"), AMPs di recente scoperta e tipici di questi vertebrati, presentano attività emolitica e antimicrobica ad ampio spettro; sono state isolate in una specie della famiglia Moronidae, nelle MCs dei tessuti branchiale, cutaneo, intestinale e di rivestimento dei vasi sanguigni nei visceri (Silphaduang and Noga, 2001). Recentemente sono state localizzate anche in un altro tipo di cellula immunitaria, i granulociti acidofili (AGs) dell'orata, considerati l'equivalente dei neutrofili dei vertebrati superiori (Mulero *et al.*, 2008a, b).

Si pensava che la presenza di questi peptidi fosse limitata all'ordine dei Perciformi, i teleostei più evoluti, e documentata in particolare nelle famiglie Moronidae, Scienidae, Siganidae, Belontidae, Ciclidae, Percichthyidae e Latridae (Silphaduang *et al.*, 2006; Corrales *et al.*, 2010), ma la scoperta dei geni che li codificano anche nel merluzzo bianco (*Gadus morhua* Linneaus, 1758, superordine Paracantopterigi) ha dimostrato che le piscidine sono un sistema di difesa molto più antico di quanto si credesse (Fernandes *et al.*, 2010).

Fino ad ora sono stati individuati 4 tipi di piscidine, quasi tutte costituite da 22 aminoacidi (ad esclusione della piscidina 4 che ne presenta 44) e aventi una porzione NH<sub>2</sub>-terminale ben conservata che identifica il gruppo (Silphaduang and Noga, 2001). Esse presentano una conformazione ad  $\alpha$ -elica e sono in grado di interagire con le membrane idrofobiche cellulari (Park and Hahm, 2005) ma il meccanismo preciso di interazione non è ancora chiaro. Essendo proteine cationiche, cioè cariche positivamente, vengono naturalmente attratte dalla superficie delle membrane microbiche cariche negativamente (Tossi *et al.*, 2000), e si pensa che esse riescano a permeabilizzare la membrana cellulare del patogeno tramite la formazione di pori toroidali in cui i lipidi di membrana si inseriscono tra le  $\alpha$ -eliche (Campagna *et al.*, 2007). Le diverse piscidine sono accomunate da una porzione ammino-terminale ben conservata, la quale sembra ricoprire un ruolo importante nell'azione antibiotica: Lee e i suoi collaboratori (2007) hanno condotto esperimenti su

questo segmento della molecola scoprendo che la sostituzione di istidina, fenilalanina e arginina fa diminuire l'attività antibatterica. Questi tre aminoacidi sembrano dunque essere coinvolti nel meccanismo di interazione con le membrane cellulari.

Le piscidine 1 (P1) e 2 (P2) presentano una sequenza amminoacidica pressoché identica (differiscono per un solo aminoacido). La piscidina 3 (P3) è caratterizzata dall'aver in posizione 17 la glicina invece dell'istidina: ciò determina l'interruzione dell' $\alpha$ -elica diminuendo la sua anfipaticità e di conseguenza l'attività emolitica (Kondejewski *et al.*, 1999). La P3 presenta, infatti, tra le piscidine finora conosciute, la minore capacità emolitica. La piscidina 4 (P4), ultima a essere stata scoperta e isolata, (Corrales *et al.*, 2009; Noga *et al.*, 2009) è, diversamente dalle precedenti, costituita da 44 aminoacidi.

Le piscidine, come molti dei peptidi isolati dagli organismi acquatici (Jia *et al.*, 2000), hanno una potente attività antimicrobica ad ampio spettro rivolta contro virus (Chinchar *et al.*, 2004), batteri (Silphaduang and Noga, 2001), funghi (Sung *et al.*, 2008) e parassiti, (Colorni *et al.*, 2008; Andrews *et al.*, 2010; Dezfuli *et al.*, 2010b). Quest'azione antibatterica sembra essere collegata alla loro attività citolitica.

Si è cercata la presenza delle piscidine in vari pesci teleostei e le uniche specie che esprimono questi peptidi appartengono ai Perciformi (Moronidae, Sciaenidae, Cichlidae, Sigannidae e Belontiidae), il più grande ordine di vertebrati vivente (Silphaduang *et al.*, 2006). Fra le famiglie di questo ordine si sono evidenziate varie differenze: è stata documentata positività alla P1 in 9 specie di perciformi su 39 testate (Silphaduang *et al.*, 2006), positività alla P4 nelle MCs di 4 specie di Moronidae, in uno di Sparidae (orata) in cellule che non rispondevano alle caratteristiche morfologiche e istologico-tintoriali delle MCs, e in uno di Sciaenidae in un tipo cellulare non chiaramente identificato (Corrales *et al.*, 2010).

Silphaduang *et al.* (2006) descrivono una diversa immunopositività delle MCs alle piscidine a seconda della loro collocazione nel tessuto: le cellule più vicine alla superficie del tessuto sembrano mostrare una maggiore immunoreattività. Nelle branchie le cellule presenti lungo le lamelle secondarie o nella porzione terminale delle lamelle primarie sono più immunopositive rispetto a quelle che si trovano nel connettivo sottostante o lungo l'arco branchiale. Una situazione simile si verifica nell'intestino dove le MCs della lamina propria, dello strato granuloso e di quello compatto mostrano una minore positività rispetto alle MCs presenti tra le cellule epiteliali a palizzata. La diversità intensità di marcatura delle MCs in base alla loro posizione potrebbe indicare che le cellule presenti negli strati più profondi del tessuto e quelle degli strati più superficiali contengano diverse quantità di piscidine ed in particolare che la sintesi delle piscidine incrementi durante la migrazione delle MCs verso la superficie, dove è più probabile incontrare agenti estranei.



Un'altra possibile spiegazione è che a colorarsi meno intensamente sia un precursore delle piscidine mature.

Nelle specie in cui le piscidine sono presenti non tutte le MCs risultano immunopositive agli anticorpi diretti contro di esse: questo potrebbe significare che le cellule immunonegative o si trovano ad un differente stadio di sviluppo o si sono differenziate indipendentemente da quelle immunopositive (Silphaduang and Noga, 2001). Mulero e collaboratori (2008a), hanno documentato una specializzazione delle cellule granulari dell'orata nell'espressione delle piscidine, notando che le MCs nel sottomucosa dell'intestino e gli AGs sono negativi alla P1 ma positivi alla P3, diversamente dalle branchie dove le MCs sono positive anche alla P1. Gli acidofili sono cellule fagocitarie e la presenza delle piscidine nei loro granuli induce a credere che possano svolgere una funzione antibiotica intracellulare (Mulero *et al.*, 2008a). Non è stato ancora esattamente chiarito se le piscidine vengano rilasciate nell'ambiente extracellulare, durante la degranolazione, sebbene la vicinanza delle MCs alle superfici del corpo (tegumento, branchie e intestino) rendano questa ipotesi plausibile. Le MCs dei mammiferi hanno capacità fagocitaria e ci sono prove di questa capacità anche in alcuni pesci: fenomeni di fagocitosi da parte delle MCs sono stati documentati in branzino (Bodammer, 1986) e trota (Sire and Vernier, 1995).

Tramite un esperimento di quantificazione della P4 (Corrales *et al.*, 2009), si è scoperto che nelle branchie di moronidi in salute la concentrazione di questa piscidina è particolarmente elevata rispetto a esemplari in stress nutritivo o malati ( $32,5 \pm 5 \mu\text{g ml}^{-2}$  contro rispettivamente  $14 \pm 3 \mu\text{g ml}^{-2}$  e  $5,9 \pm 1 \mu\text{g ml}^{-2}$ ), suggerendo che la sintesi della P4 sia down-regolata in condizioni di denutrizione o di infezione da protozoi. In ogni caso i livelli P4 espressi nelle branchie risultano ben entro le concentrazioni che risultano letali per vari protozoi patogeni dei pesci. Un analogo caso di "sottoregolazione" dei livelli di piscidine è stato osservato nel merluzzo bianco (*G. morhua*) infettato da *Vibrio anguillarum*, in cui la quantità di piscidine diminuiva, sia nella milza sia nel rene degli esemplari parassitati rispetto a quelli sani, rendendo i pesci ancor più suscettibili a ulteriori e successive infezioni (Ruansgri, Kiron, Caipang and Fernandes, dati non pubblicati).

Colorni *et al.* (2008) hanno studiato l'attività della P2 contro alcune specie di protisti: *Trichodina* sp., *Ichthyophthrius multifiliis*, *Cryptocaryon irritans* e *Amyloodinium ocellatum*. La piscidina ha provocato una progressiva diminuzione della motilità e la lisi cellulare risultando letale, seppure a concentrazioni diverse, per tutte le quattro specie di parassiti. Da questi esperimenti si evince che la piscidina 2 può agire molto velocemente, modificando la permeabilità della membrana delle cellule bersaglio e causando un danno irreversibile (Colorni *et al.*, 2008); in alcuni casi non risulta nemmeno necessario uccidere il parassita ma è sufficiente, e più conveniente in termini di energie impiegate, immobilizzarlo per renderlo innocuo.

L'efficacia delle piscidine verso funghi patogeni dell'uomo è stata sondata da Sung *et al.*, (2008): i ceppi fungini sono risultati molto suscettibili alla P1 e alla P3 che formano pori nello spessore della membrana portando allo shock osmotico e conseguentemente alla lisi cellulare.

## **6) MATERIALI E METODI**

### **6.1 Campionamenti e dissezione**

I pesci utilizzati per questa ricerca, appartenenti alle specie *Dicentrarchus labrax* (L.), *Sparus aurata* (L.), *Perca fluviatilis* (L.), provenivano da due diverse località. I branzini (*D. labrax*) e le orate (*S. aurata*) provenivano dall'allevamento semi-intensivo di Valle Cà Zuliani di Porto Tolle (Rovigo), e sono stati campionati nel periodo 2009-2012. Gli esemplari di *P. fluviatilis* sono stati campionati nel lago Piediluco (Terni, Umbria) nel periodo 2010-2012.

I pesci sono stati trasportati vivi dal luogo di campionamento in laboratorio, ove sono stati sacrificati, mediante spinalizzazione o annoccamento a seconda delle dimensioni. Di ciascun esemplare sono stati registrati la lunghezza (sia totale sia standard), la massa, il sesso e le condizioni di salute (infestato o sano). Si è poi proceduto alla dissezione e al prelievo di frammenti di branchie e organi interni per la microscopia ottica ed elettronica.

### **6.2 Microscopia ottica ed elettronica**

I frammenti di organi sani e parassitati destinati all'osservazione al microscopio ottico, delle dimensioni massime pari a 12 mm, sono stati fissati in liquido di Bouin per 8 ore circa o in Formalina neutra tamponata al 10% per 24 ore, disidratati nella serie degli alcool etilici crescenti (70 – 80 – 90 – 100%) ed inclusi in paraffina (Diawax, 56-58 °C, Diapath) con un inclusore automatico (Shandon Citadel 2000, London, UK). Tutti i blocchi in paraffina sono stati tagliati al microtomo rotativo (Leica RM 2145, Germany): le sezioni, dello spessore di 5 µm, sono state sottoposte a colorazioni istologiche (Alcian Blu-PAS, Ematossilina e Eosina, Tricromica di Masson, Giemsa) e immunoistochimiche e osservate al microscopio ottico. Le fotografie sono state realizzate con un analizzatore dell'immagine Nikon Eclipse 80i (NIKON, Giappone) e la misurazione delle dimensioni delle cellule è stata effettuata con il programma Nis Elements AR 3.0.

I campioni per l'indagine ultrastrutturale al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), della grandezza di circa 7 mm, sono stati fissati in glutaraldeide (2%) per 2-3 ore, lavati in tampone cacodilato (0.1 M, pH 7.2), post-fissati in tetrossido di osmio (1%) per 2 ore, lavati nello stesso tampone, disidratati in soluzioni crescenti di acetone (50 – 70 – 80 – 90 – 95 – 100%) e quindi inclusi in una miscela di resine Epon-Araldite (Fluka).

Sezioni semifini (1.5 µm) dei vari organi inclusi in resina sono state tagliate utilizzando un ultramicrotomo Reichert OmU3 (mod. 570, American Optical Corporation Buffalo, New York, USA) a lame di vetro e colorate con blu di toluidina (1%). Sezioni ultrafini (90 nm) sono state tagliate con un ultramicrotomo Reichert Ultracut, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo

e osservate con un microscopio elettronico a trasmissione, Hitachi H-800, presso il Centro di Microscopia Elettronica dell'Università di Ferrara.

### **6.3 Immunoistochimica (IHC)**

Le caratteristiche degli anticorpi primari utilizzati in questo studio sono riportati in Tabella 1. Gli anticorpi anti-piscidina 4 (anti-P4), anti-piscidina 3 (anti-P3) e G7 sono stati utilizzati su sezioni di branchie, intestino, milza, rene, fegato e cute.

Le sezioni sono state deparaffinate in xilene, idratate nella serie decrescente degli alcool etilici (100-80-70-50), e successivamente immerse in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% per inibire l'attività delle perossidasi endogene. Dopo lavaggi in acqua distillata e in TBS (*Tris Buffer Solution*)-TRITON, i vetrini sono stati trattati per 30 minuti con siero normale di capra (per IHC con anticorpi primari di coniglio) o di cavallo (per IHC con anticorpi primari di topo) (Vector, Burlingame, USA) per bloccare le reazioni aspecifiche.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario (diluizioni e tempi riportati in Tabella 1) i vetrini sono stati incubati per 30 minuti in anticorpo secondario biotinilato (Vector, Burlingame, USA) di capra o di cavallo (rispettivamente, di capra per gli anticorpi primari di coniglio, e di cavallo per gli anticorpi primari di topo) diluito in TBS e poi trattati per 30 minuti con un complesso avidina-biotina coniugato con perossidasi (Vector, Burlingame, USA) diluito in TBS. La reazione immunoistochimica è stata sviluppata trattando le sezioni con una soluzione di 3-3'diaminobenzidina tetraidrocloridrica (DAB, 0.04% w/v in Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%) per 10 minuti. Successivamente le sezioni sono state controcolorate per 20 minuti con una soluzione di Alcian-Blue 1% e un minuto con Ematossilina di Harris. I vetrini sono quindi stati disidratati in soluzioni alcooliche crescenti (50-70-80-100), immersi in xilene e montati con Eukitt.

Come controlli negativi, sezioni degli stessi pezzi, sono stati incubati con TBS al posto dell'anticorpo primario. Sezioni di intestino di un moronide ibrido (frutto dell'incrocio *Morone saxatilis* maschio x *M. chrysops* femmina) similmente processate, sono servite come controllo positivo per gli anticorpi per IHC con le piscidine. La specificità della reazione è stata confermata tramite pre-assorbimento degli anticorpi primari con i rispettivi antigeni.

Sezioni di cute di *S. aurata* sono state sottoposte a un metodo di doppia immunocolorazione con l'anticorpo G7, specifico per i granulociti acidofili dell'orata, e con l'anticorpo anti-istamina. Dopo la sparaffinatura e la reidratazione, l'attività delle perossidasi endogene e i legami aspecifici sono stati inibiti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (10 minuti) e siero normale di cavallo (Vector, Burlingame, USA). Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo G7 (vedi Tabella 1) e con un anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina (Sigma, 1:50) per un'ora. L'attività enzimatica è stata

successivamente rivelata mediante incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente con Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma). Le sezioni sono state montate con glicerina e immediatamente fotografate. Dopo lavaggio in TBS-Triton i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo anti-istamina (vedi Tabella 1), successivamente per 30 minuti in anticorpo secondario biotinilato (Elite Coniglio IgG Vectastain ABC Kit, Vector) e poi con il complesso avidina-biotina coniugato con perossidasi (Elite Coniglio IgG Vectastain ABC Kit, Vector) per 30 minuti.

La reazione immunostochimica è stata sviluppata trattando le sezioni con DAB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%) per 10 minuti e sono state montate in glicerina e di nuovo fotografate. Come controllo positivo per l'istamina sono state utilizzate sezioni di stomaco di ratto (come indicato sul datasheet dell'anticorpo) e di branchie di orata su cui il G7 è stato testato da Mulero *et al.*, (2007).

Un'altra doppia colorazione IHC è stata effettuata su sezioni seriali di cute di orata utilizzando l'anticorpo G7 e l'anti-interleuchina 1 $\beta$  (vedi Tabella 1) (Mulero *et al.*, 2008a, b). Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo G7 come descritto sopra. Dopo identificazione delle cellule G7-positivo nei vetrini montati in glicerina e fotografati, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo anti-interleuchina 1 $\beta$  (vedi Tabella 1). Dopo il trattamento con questo primario, i vetrini sono stati incubati per 30 minuti con l'anticorpo secondario biotinilato (Elite Coniglio IgG Vectastain ABC Kit, Vector) e poi 30 minuti con il complesso avidina-biotina coniugato con perossidasi (Elite Coniglio IgG Vectastain ABC Kit, Vector). La reazione immunostochimica è stata sviluppata con DAB per 10 minuti e infine le sezioni sono state disidratate, montate con Eukitt e fotografate.

#### **6.4 Conteggi cellulari, analisi intensità di marcatura ed elaborazioni statistiche**

I conteggi del numero di cellule marcate dai due anticorpi contro le piscidine 3 e 4 sono stati effettuati nelle sezioni di branchie di 45 esemplari di *D. labrax* (16 sani e 29 parassitati) e di 46 di *S. aurata* (20 sani e 26 parassitati) e di intestino di 24 esemplari di *P. fluviatilis* (10 sani e 14 parassitati). Nell'orata sono state esaminate e contate anche le cellule positive all'anticorpo G7 e all'anti-istamina. In ciascuna sezione degli organi parassitati, sono state prese in considerazione per i conteggi due zone: una in cui il parassita è in stretto contatto col tessuto dell'ospite (chiamata zona "vicino") e una ad 1 cm circa di distanza dal punto di attacco del parassita (chiamata zona "lontano"). Inoltre i pesci infestati sono stati suddivisi nei gruppi "poco parassitati" e "molto parassitati" in base all'intensità d'infestazione (numero di parassiti per ospite). Nei branzini e nelle orate i conteggi sono stati effettuati in tre diversi distretti della branchia: seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare. Nel caso del persico, le misurazioni sono state effettuate nello strato epiteliale della mucosa e nello strato sottomucoso dell'intestino.

Utilizzando il programma Nis Elements AR 3.0, nella sezione di ciascun pesce per entrambe le zone “vicino” e “lontano” è stato contato al microscopio ottico a 40x di ingrandimento il numero di cellule immunoreattive all’anticorpo in dieci campi, ciascuno con un’area compresa fra 10.000 e 30.000  $\mu\text{m}^2$ : i numeri di cellule positive in questi dieci campi sono stati utilizzati nelle elaborazioni statistiche come un valore unico medio.

Allo scopo di uniformare i dati per la realizzazione dei grafici il numero degli elementi positivi è stato proiettato su un’area standard di 20.000  $\mu\text{m}^2$  per tutte e tre le specie. Tramite i test di Levene e Kolmogorov-Smirnov sono state verificate l’omoschedasticità e la distribuzione normale dei dati. Per poter applicare analisi di tipo parametrico, i valori numerici che non soddisfacevano le condizioni dei sopracitati test sono stati sottoposti a trasformazione quadratica o logaritmica. Avvalendosi del programma STATISTICA 7, è stata poi effettuata l’analisi della varianza (ANOVA) a confronti pianificati per valutare eventuali differenze significative fra sani e parassitati, fra le diverse zone della lamella (vicino e lontano dal parassita), fra i differenti distretti tissutali e fra un anticorpo e l’altro. Nel modello i valori numerici scaturiti dai conteggi cellulari sono stati inseriti come variabili dipendenti, lo stato del pesce (sano, parassitato) come predittore categoriale e l’area effettiva della misurazione come covariata. Il livello di significatività selezionato è stato  $p < 0,05$ .

Il numero delle cellule G7-positive nelle sezioni di cute di orata è stato contato utilizzando il programma Nis Elements AR 3.0 a 40x di ingrandimento al microscopio ottico in aree comprese fra 10.000 e 30.000  $\mu\text{m}^2$ . Per scopi comparativi il numero delle cellule marcate è stato proiettato su un’area standard di 20.000  $\mu\text{m}^2$  per ogni pesce dei due gruppi: sani (n=10) e parassitati con linfocisti (n=10). Il test-t è stato utilizzato per individuare eventuali differenze significative nell’abbondanza di cellule marcate tra i due gruppi di pesci. Il livello di significatività selezionato è stato  $p < 0,05$ .

Grazie al programma ImageJ 1.45s Java 1.6.0\_20 è stato possibile eseguire analisi sull’intensità della marcatura. Le sezioni di ogni pesce (sano e parassitato, zone vicino e lontano dal parassita) sono state fotografate a 40x di ingrandimento al microscopio ottico e esaminate con il filtro RGB blu, il quale permette una migliore demarcazione tra il colore delle cellule immunopositive e quello del tessuto circostante. In ogni fotografia digitale è stata analizzata la marcatura di dieci cellule per ciascuna delle stesse aree di tessuto in cui erano stati effettuati i conteggi cellulari sia nella zona vicino sia nella zona lontano dal parassita. L’analisi è consistita nel calcolo del valore medio dei livelli di grigio dei pixel per ciascuna delle 10 cellule. In particolare i valori dei livelli medi di grigio potevano variare tra il valore massimo 255 (bianco, nella codifica grafica a 8 bit), corrispondente a intensità di marcatura nulla, e il valore minimo 0 (nero, nella codifica grafica a 8 bit), corrispondente alla massimaintensità di marcatura. Queste dieci misure sono state utilizzate nei

confronti fra gruppi come un valore unico medio. Dopo aver testato, tramite i test di Levene e di Kolmogorov-Smirnov, la normalità e l'omoschedasticità dei dati, è stato utilizzato il programma STATISTICA 7 per un'analisi della varianza (ANOVA) a una via confronti pianificati. Il livello di significatività selezionato è stato  $p < 0,05$ .

## 7) RISULTATI

### 7.1 *Dicentrarchus labrax*

I 67 branzini (*D. labrax*) campionati per questo studio avevano una lunghezza totale di  $17,25 \pm 7,85$  cm (media  $\pm$  D.S.) e un peso pari a  $101,63 \pm 199,61$  g (media  $\pm$  D.S.), Quarantotto di essi (71,64%) sono risultati parassitati dal monogeneo *Diplectanum aequans*. Esternamente tutti i pesci apparivano in un buono stato di salute, sia per l'aspetto sia per il colore. Osservando allo stereomicroscopio le branchie dei pesci parassitati si è notata un'elevata quantità di muco e zone con emorragie e talvolta un rigonfiamento del tratto distale delle lamelle secondarie. In tre casi oltre ai monogenei è stata documentata la presenza di protozoi del genere *Trichodina*.

L'intensità di infestazione di *D. aequans* variava da 5 a 200 parassiti per pesce ( $28,44 \pm 54,75$ ; media  $\pm$  D.S.). I parassiti erano distribuiti soprattutto nelle zone mediane e apicali delle lamelle primarie (Figg. 1a,b,c) e in alcuni casi si presentavano raggruppati (Fig. 1a). I monogenei, come tipico per questa specie, erano ancorati all'epitelio branchiale grazie alle spine dorsali e ventrali dello squamodisco (opisthaptor) e agli amuli che penetravano profondamente nel tessuto dell'ospite (Fig. 1d). Il movimento di questi organi di ancoraggio ha causato erosione delle cellule epiteliali, con conseguente formazione di detrito cellulare attorno alle lamelle e ai parassiti (Fig. 1b); le lamelle circostanti l'opisthaptor mostravano un'intensa proliferazione cellulare, che determinava talvolta la fusione delle lamelle adiacenti (Fig. 1c), in alcuni casi accompagnata da piccoli aneurismi dei vasi sanguigni (telangectasia).

L'osservazione al microscopio elettronico ha rivelato la presenza di molte cellule mucose e RCs vicino alla zona di attacco di *D. aequans*; nella lamella primaria queste cellule si trovavano molto vicino alla superficie epiteliale, pronte, probabilmente, a rilasciare il loro contenuto (Fig. 2 a). Sia nei pesci sani sia in quelli parassitati sono state documentate MCs nella lamella primaria, in posizione basale rispetto alle cellule mucose e alle rodlet cells (Fig. 2a). Le MCs (asse maggiore  $10,85 \pm 2,01$   $\mu\text{m}$ ; media  $\pm$  D.S.) presentavano una forma irregolare, un nucleo polare e un citoplasma ricco di numerosi granuli elettrondensi (asse maggiore  $1,25 \pm 0,18$   $\mu\text{m}$ ; media  $\pm$  D.S.) (Figg. 2b,d). Il citoplasma conteneva pochi mitocondri e un apparato di Golgi moderatamente sviluppato. In alcuni branzini parassitati, le MCs sono state viste all'interno dei vasi sanguigni in gruppi così numerosi da restringere il lume del vaso stesso (Fig. 2c). In alcuni casi le MCs sembravano staccarsi dalla parete endoteliale dei vasi (Fig. 2d) per spostarsi verso il centro del lume. Fenomeni di degranulazione non sono stati visti né negli esemplari sani né in quelli parassitati.



Le sezioni istologiche di branchie, intestino, fegato, milza e rene trattate con gli anticorpi anti-piscidina 3 e anti-piscidina 4 hanno mostrato la presenza di MCs immunopositive (Tab. 2). La figura 3 a documenta l'assenza di marcatura in una sezione di controllo negativo. Nelle branchie sia sane sia parassitate, le MCs positive alle piscidine erano disseminate nella lamella primaria (Figg. 3b,c), così come all'apice e nella zona mediana delle lamelle secondarie (Figg. 3b,c). Le MCs marcate erano presenti anche attorno e all'interno dei vasi sanguigni (Figg. 3d,e). In alcuni vasi, queste cellule sembravano staccarsi dalla parete endoteliale (Fig. 3e) e andare verso il centro del lume.

### 7.1.1 *Anticorpo anti-piscidina 3*

Il numero delle cellule positive all'anti-piscidina 3 (o anti-P3) in un'area di 20.000  $\mu\text{m}^2$  di tessuto branchiale variava da 0 a 32 ( $9,10 \pm 7,89$ ; media  $\pm$  D.S.) nei branzini parassitati e da 1 a 15 ( $5,26 \pm 3,99$ ; media  $\pm$  D.S.) in quelli sani. L'abbondanza di cellule immunopositive era simile tra i due gruppi (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 4a) mentre l'intensità della marcatura era significativamente maggiore nei parassitati ( $74,03 \pm 16,36$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto ai sani ( $103,54 \pm 18,33$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 4b). Le MCs esprimenti la piscidina 3 sono state osservate sia nella zona "vicino" sia nella zona "lontano" dal punto di attacco del parassita e il loro numero è risultato significativamente più alto nelle lamelle "vicino" ( $10,60 \pm 7,95$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto alle lamelle sane (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 4c). Non vi era nessuna differenza significativa nel numero delle MCs positive tra la zona "lontano" dal parassita ( $7,59 \pm 7,71$ ; media  $\pm$  D.S.) e le branchie di esemplari sani (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 4c), né tra la zona "vicino" e quella "lontano" dal parassita (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 4c). L'intensità della marcatura invece è risultata significativamente più debole nelle lamelle dei pesci sani rispetto sia alle lamelle lontane dal parassita ( $74,15 \pm 17,58$ ; media  $\pm$  D.S.) sia a quelle ad esso vicino ( $73,92 \pm 15,47$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 4d); nessuna differenza era presente tra le zone "lontano" e "vicino" al punto di attacco di *D. aequans* (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 4d).

I branzini sono stati suddivisi nei gruppi sano ( $n=12$ ), poco parassitati ovvero con una intensità d'infestazione inferiore a 60 parassiti per pesce ( $n=15$ ) e molto parassitati cioè con una intensità d'infestazione superiore a 100 parassiti per pesce ( $n=9$ ). La differenza nel numero di cellule marcate è risultata significativa tra i sani e i poco parassitati ( $11,44 \pm 8,59$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 4e) ma non tra i sani e i molto parassitati ( $5,00 \pm 4,17$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 4e) e nemmeno tra i poco e i molto parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 4e). L'intensità della marcatura mostrava una differenza significativa sia tra i sani ( $103,54 \pm 18,33$ ; media  $\pm$  D.S.) e i poco parassitati ( $75,23 \pm 18,33$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 4f) sia tra

i sani e i molto parassitati ( $70,84 \pm 9,20$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 4f) ma non tra i poco e molto parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 4f).

Le MCs contenenti la piscidina 3 sono state osservate in tutti e tre i distretti esaminati: seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare (Figg. 3d,e). Nei pesci sani il seno venoso centrale conteneva il minor numero di cellule positive ( $0,70 \pm 0,69$ ; media  $\pm$  D.S.) seguito dai capillari delle lamelle secondarie ( $1,54 \pm 1,96$ ; media  $\pm$  D.S.), mentre il tessuto extravascolare ( $3,01 \pm 2,24$ ; media  $\pm$  D.S.) presentava un numero di MCs marcate significativamente maggiore rispetto al comparto vascolare (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 5a). Una simile distribuzione delle MCs marcate si è registrata nel gruppo dei poco parassitati ( $1,55 \pm 1,28$  nel seno centrale,  $4,26 \pm 5,06$  nei capillari delle lamelle secondarie,  $5,62 \pm 3,90$  nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 5b), e nel gruppo dei molto parassitati ( $0,60 \pm 0,72$  nel seno centrale,  $0,74 \pm 0,93$  nei capillari delle lamelle secondarie,  $3,65 \pm 3,42$  nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 5c). La stessa situazione si registra anche nelle lamelle parassitate vicino al parassita ( $1,45 \pm 1,22$  nel vaso centrale,  $3,08 \pm 4,46$  nei capillari delle lamelle secondarie e  $6,06 \pm 3,94$  nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 5d). Nelle lamelle parassitate lontano dal parassita ( $0,96 \pm 1,13$  nel seno centrale,  $2,87 \pm 4,43$  nei capillari delle lamelle secondarie,  $3,75 \pm 3,38$  nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) il tessuto extravascolare presentava un numero significativamente più alto di cellule marcate solo rispetto al seno venoso centrale (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 5e). Dall'analisi sull'intensità di marcatura è risultato che in tutti i tre gruppi, quello dei pesci sani ( $104,34 \pm 17,45$  pixel nel seno centrale,  $99,21 \pm 25,45$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie e  $107,89 \pm 25,24$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.), quello dei poco parassitati ( $77,67 \pm 22,33$  pixel nel seno centrale,  $75,71 \pm 18,29$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie e  $75,35 \pm 24,67$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) e quello dei molto parassitati ( $67,57 \pm 13,49$  pixel nel seno centrale,  $76,13 \pm 15,16$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie e  $69,51 \pm 9,83$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) non vi era nessuna differenza significativa tra i tre distretti (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figg. 6a,b,c). Non si sono rilevate differenze significative nell'intensità di marcatura sia nella zona "lontano" ( $70,94 \pm 16,40$  pixel nel seno centrale,  $78,56 \pm 19,50$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie,  $75,22 \pm 22,21$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) sia nella zona "vicino" al parassita ( $78,91 \pm 23,99$  pixel nel seno centrale,  $73,62 \pm 15,30$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie,  $75,15 \pm 21,26$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) per nessuno dei tre distretti tissutali (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figg. 6d,e).

Confrontando i dati sull'abbondanza di MCs marcate nei pesci sani con i diversi gruppi di pesci parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino") si nota che tutti i tre distretti della lamella (ovvero seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) mostravano un numero simile di cellule

positive e le cellule P3-positive erano significativamente maggiori di numero solo nel gruppo poco parassitato e vicino al parassita rispetto al gruppo dei sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 7a). La situazione è diversa nell'analisi di intensità della marcatura in cui tutti e tre i distretti della lamella branchiale presentavano una marcatura più intensa nei gruppi dei parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino") rispetto ai sani (seno venoso centrale:  $104,34 \pm 17,45$  pixel nei sani,  $75,35 \pm 17,73$  pixel nei poco lontano,  $79,99 \pm 26,64$  pixel nei poco vicino,  $60,63 \pm 4,83$  pixel nei molto lontano,  $75,81 \pm 16,34$  pixel nei molto vicino; media  $\pm$  D.S., ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 7b) (capillari lamelle secondarie:  $99,21 \pm 25,45$  pixel nei sani,  $81,17 \pm 22,30$  pixel nei poco lontano,  $71,34 \pm 13,58$  pixel nei poco vicino,  $72,30 \pm 9,18$  pixel nei molto lontano,  $79,32 \pm 19,12$  pixel nei molto vicino; media  $\pm$  D.S., ANOVA,  $p < 0,05$ ) (GRAFICO 18) (tessuto extravascolare:  $107,89 \pm 25,24$  pixel nei sani,  $79,32 \pm 25,05$  pixel nei poco lontano,  $71,38 \pm 24,47$  pixel nei poco vicino,  $64,94 \pm 6,14$  pixel nei molto lontano,  $74,08 \pm 11,18$  pixel nei molto vicino; media  $\pm$  D.S., ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 7b)

#### **7.1.2 Anticorpo anti-piscidina 4**

Il numero di cellule positive all'anticorpo anti-piscidina 4 (o anti-P4) in un'area di tessuto branchiale di  $20.000 \mu\text{m}^2$  variava da 2 a 50 ( $16,69 \pm 11,93$ ; media  $\pm$  D.S.) nei branzini parassitati e da 3 a 29 ( $13,95 \pm 8,53$ ; media  $\pm$  D.S.) in quelli sani. Tra i due gruppi non erano presenti differenze significative nell'abbondanza di MCs marcate (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 8a) mentre la marcatura era significativamente più intensa nei parassitati ( $74,85 \pm 12,53$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto ai sani ( $94,14 \pm 15,60$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 8b). Il numero delle MCs contenenti la piscidina 4 non cambiava significativamente nelle lamelle vicino al punto di attacco del monogeneo ( $19,02 \pm 13,28$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto sia alla zona "lontano" dal parassita ( $14,35 \pm 10,11$ ; media  $\pm$  D.S.) sia alle lamelle dei pesci sani (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 8c) così come non variava in modo significativo tra la zona "vicino" e quella "lontano" dal parassita (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 8c). L'intensità della marcatura invece è risultata significativamente più debole nei branzini sani rispetto sia alla zona "lontano" dal parassita ( $73,75 \pm 10,47$ ; media  $\pm$  D.S.) sia a quella "vicino" ( $76,02 \pm 14,61$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 8d), senza alcuna differenza tra queste ultime (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 8d).

Il numero delle cellule positive alla P4 variava all'aumentare dell'intensità d'infestazione: la differenza è risultata significativa tra i sani e i molto parassitati ( $18,41 \pm 8,90$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 8e) e tra i poco ( $15,46 \pm 13,67$ ; media  $\pm$  D.S.) e i molto parassitati (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 8e) ma non tra i sani e i poco (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 8e). L'intensità della marcatura aumentava significativamente passando dai sani ai poco parassitati ( $77,44 \pm 12,39$ ;

media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 8f) e dai sani ai molto parassitati ( $69,45 \pm 11,47$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 8f) mentre non sussisteva una differenza significativa tra i poco e i molto parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 8f).

Le MCs contenenti la piscidina 4 sono state osservate in tutti e tre i distretti tissutali esaminati: seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare. Nei pesci sani il seno venoso centrale è risultato quello meno ricco di cellule positive ( $1,23 \pm 1,09$ ; media  $\pm$  D.S.) e rispetto ad esso sia i capillari delle lamelle secondarie ( $7,33 \pm 5,48$ ; media  $\pm$  D.S.) che il tessuto extravascolare ( $5,37 \pm 3,24$ ; media  $\pm$  D.S.) presentavano un numero significativamente maggiore di MCs marcate (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 9 a). Lo stesso quadro osservato nei sani si è registrato nel gruppo dei poco parassitati ( $1,38 \pm 1,35$  nel seno centrale,  $8,64 \pm 10,41$  nei capillari delle lamelle secondarie,  $5,44 \pm 3,95$  nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 9b) e nei parassitati nella zona “lontano” dal parassita ( $1,31 \pm 1,12$  nel seno centrale,  $6,81 \pm 7,46$  nei capillari delle lamelle secondarie,  $6,22 \pm 3,79$  nel tessuto extravascolare; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 9c). Nel gruppo dei molto parassitati, a differenza sia dei poco parassitati che dei sani, il tessuto extravascolare presentava un numero significativamente maggiore di cellule marcate ( $11,36 \pm 5,71$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto a entrambi i distretti del comparto vascolare ( $1,42 \pm 1,41$  nel seno venoso centrale,  $5,63 \pm 4,04$  nei capillari delle lamelle secondarie; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 9d); un’analoga situazione si aveva nei pesci parassitati nella zona “vicino” al monogeneo ( $5,52 \pm 6,20$  nel vaso centrale,  $7,98 \pm 9,44$  nei capillari delle lamelle secondarie e  $9,55 \pm 6,53$  nel tessuto extravascolare; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 9e).

Per quanto riguarda l’analisi di intensità di marcatura, il gruppo dei pesci sani ( $96,64 \pm 19,45$  pixel nel seno centrale,  $90,46 \pm 20,88$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie e  $96,72 \pm 19,63$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) come pure quello dei poco parassitati ( $79,07 \pm 14,83$  pixel nel seno centrale,  $74,49 \pm 12,79$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie e  $78,35 \pm 17,79$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) non mostravano alcuna differenza significativa tra i due comparti vascolari e il tessuto extravascolare (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figg. 10a,b). Nel gruppo dei molto parassitati, invece, la marcatura delle MCs nel tessuto extravascolare ( $63,96 \pm 13,57$ ; media  $\pm$  D.S.) era più intensa rispetto sia a quella delle cellule del seno venoso centrale ( $77,01 \pm 10,63$ ; media  $\pm$  D.S.) sia a quella dei capillari delle lamelle secondarie ( $67,46 \pm 13,72$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 10c). Nelle due zone “lontano” ( $79,23 \pm 11,69$  pixel nel seno centrale,  $71,47 \pm 11,48$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie,  $72,03 \pm 15,13$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) e “vicino” rispetto al punto di attacco del parassita ( $77,16 \pm 15,84$  pixel nel seno centrale,  $73,00 \pm 15,35$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie,  $75,26 \pm 20,53$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) non si registrano differenze

significative nell'intensità di marcatura per nessuno dei tre distretti branchiali indagati (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figg. 10d,e).

Confrontando il numero delle MCs marcate nei pesci sani con i diversi gruppi di pesci parassitati divisi per i tre distretti della lamella branchiale si nota che l'unica differenza significativa si riferisce al tessuto extravascolare: le cellule del comparto vascolare in presenza di parassiti non subiscono variazioni significative della loro abbondanza mentre nel tessuto extravascolare il numero delle cellule marcate aumenta significativamente nei molto parassitati rispetto ai sani, sia "lontano" sia "vicino" al parassita ( $5,37 \pm 3,24$  nei sani,  $8,36 \pm 2,42$  nei molto parassitati "lontano",  $14,36 \pm 6,53$  nei molto parassitati "vicino"; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 11a); risulta significativa, all'interno dello stesso gruppo dei molto parassitati, la differenza nel numero di MCs positive alla P4 tra la zona "lontano" e quella "vicino" al parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 11a) con quest'ultima più ricca di cellule marcate.

Dall'analisi della marcatura è emerso che tutti i tre distretti delle lamelle branchiali presentavano un'intensità significativamente maggiore nei vari gruppi dei parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino") rispetto a quello dei sani (seno venoso centrale:  $96,64 \pm 19,45$  pixel nei sani,  $79,67 \pm 11,83$  pixel nei poco lontano,  $77,97 \pm 20,52$  pixel nei poco vicino,  $78,04 \pm 12,96$  pixel nei molto lontano,  $76,19 \pm 9,91$  pixel nei molto vicino; media  $\pm$  D.S., ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 11b) (capillari lamelle secondarie:  $90,46 \pm 20,88$  pixel nei sani,  $73,99 \pm 11,97$  pixel nei poco lontano,  $75,03 \pm 14,15$  pixel nei poco vicino,  $66,00 \pm 8,84$  pixel nei molto lontano,  $68,92 \pm 18,18$  pixel nei molto vicino; media  $\pm$  D.S., ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 11b) (tessuto extravascolare:  $96,72 \pm 19,63$  pixel nei sani,  $75,37 \pm 15,77$  pixel nei poco lontano,  $81,87 \pm 20,10$  pixel nei poco vicino,  $64,78 \pm 11,65$  pixel nei molto lontano,  $63,14 \pm 16,36$  pixel nei molto vicino; media  $\pm$  D.S., ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 11b).

### **7.1.3 Confronto anticorpi anti-piscidina 3 e anti-piscidina 4**

Il numero delle MCs P4-positive era significativamente maggiore rispetto a quello delle P3-positive sia nei sani che nei parassitati (senza distinzione tra distretti della lamella, grado di parassitosi o vicinanza del parassita) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 12a). Prendendo in considerazione sia il grado di parassitosi (poco, molto) e la vicinanza del parassita ("lontano", "vicino") l'unico gruppo in cui non vi era differenza nel numero di MCs marcate con P4 rispetto a quelle positive alla P3 è quello dei poco parassitati, sia "vicino" sia "lontano" dal parassita (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 12b) mentre nei pesci molto parassitati, "lontano" così come "vicino" al parassita, le cellule che esprimevano la piscidina 4 erano sempre numericamente maggiori (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 12b).

Il seno venoso centrale presentava un numero significativamente maggiore di MCs marcate con l'anti-P4 rispetto a quelle P3-positive solo nel gruppo dei molto parassitati "lontano" dal parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 13a), mentre in tutti gli altri gruppi il numero delle cellule positive alle due piscidine non variava (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 13a). Per quanto riguarda i capillari delle lamelle secondarie, in essi le cellule P4-positive erano significativamente più abbondanti rispetto a quelle P3-positive (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 13b) in tutti i gruppi (sani, poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino") tranne nei poco parassitati "lontano dal parassita" (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 13b). Il comparto extravascolare presentava un numero significativamente più alto di cellule marcate con la P4 rispetto a quelle marcate con la P3 nel gruppo dei molto parassitati, sia "lontano" sia "vicino" al parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 13c) mentre in tutti gli altri gruppi, il numero delle cellule positive alle due piscidine era simile (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 13c).

## 7.2 *Sparus aurata*

Sono state campionate 56 orate (*S. aurata*), con una lunghezza totale di  $19,93 \pm 6,15$  cm (media  $\pm$  D.S.) e un peso di  $145,13 \pm 138,24$  g (media  $\pm$  D.S.), trentasei delle quali (64,28%) sono risultate parassitate dal copepode *Ergasilus lizae*. L'intensità d'infestazione da *D. aequans* variava da 1 a 200 parassiti per pesce ( $32,66 \pm 49,34$ ; media  $\pm$  D.S.). La maggior parte dei copepodi era rappresentata da femmine ovigere adulte distribuite sulla superficie esterna delle emibranchie (Fig. 14a). Molti parassiti si trovavano attaccati al primo arco branchiale, e pochi negli archi sottostanti, soprattutto alla base delle lamelle primarie, nella regione anteriore, mentre più di rado nella zona mediana (Fig. 14a). Il corpo dei copepodi era orientato parallelamente all'asse delle lamelle primarie (Fig. 14b) a cui si ancoravano grazie alle seconde antenne, le quali circondavano (Fig. 14b), comprimevano ed erodevano il tessuto branchiale. Spesso è stata notata una completa rottura e interruzione della lamella primaria. Erosione, desquamazione, necrosi e iperplasia delle lamelle secondarie erano spesso visibili nel tessuto circostante la zona di attacco dei parassiti (Fig. 14c). Con il loro sistema di ancoraggio gli ergasilidi provocavano inoltre occlusione dei vasi ed emorragie.

Sono state documentate numerose EGCs vicino al sito di attacco dei copepodi nel parenchima delle lamelle primarie (Fig. 14c). Molte EGCs sono state viste anche nelle lamelle primarie molto vicino ai capillari e nel tessuto circostante (Fig. 14c,d) e all'interno dei capillari stessi (Fig. 14d). Sia nelle orate sane sia in quelle parassitate le MCs nella lamella primaria erano localizzate, nel tessuto, al di sotto delle cellule mucose e delle RCs (Fig. 15a). Le MCs (asse maggiore  $11,10 \pm 1,96$   $\mu$ m; media  $\pm$  D.S.) presentavano una forma irregolare, un nucleo polare (Fig. 15b) e un citoplasma contenente numerosi granuli elettrondensi (Fig. 15b). L'osservazione al TEM ha permesso di apprezzare le diverse caratteristiche ultrastrutturali delle MCs del tessuto extravascolare rispetto alle MCs all'interno dei vasi. Le prime presentavano un citoplasma contenente pochi mitocondri, un apparato di Golgi non molto sviluppato e numerosi granuli elettrondensi dal contenuto omogeneo (Fig. 15b). Al contrario, tutte le MCs circolanti nei vasi sanguigni avevano un aspetto immaturo, reticolo endoplasmico rugoso molto sviluppato (Fig. 15c), molti ribosomi liberi e mitocondri, pochi granuli elettrondensi (Fig. 15c) e alcune vescicole elettron-trasparenti (Fig. 15c). Nella maggior parte delle branchie infestate, numerose MCs sono state osservate aderenti alla parete endoteliale dei capillari, da cui talvolta sembravano staccarsi (Fig. 15d) per dirigersi verso il centro del lume. In alcuni casi le MCs erano rinvenibili nel tessuto nelle vicinanze dei capillari. Non è stata documentata degranulazione delle MCs né nelle lamelle sane né in quelle parassitate.

### 7.2.1 *Anticorpo anti-piscidina 3*

Le sezioni istologiche trattate con l'anticorpo contro la piscidina 3 hanno rivelato la presenza di MCs positive in branchie, intestino, fegato, milza, rene e cute, mentre nessuna cellula si è marcata con l'anticorpo anti-piscidina 4 (Tab. 2). La figura 16 a mostra l'assenza di marcatura alla piscidina 3 in una sezione branchiale di un controllo negativo.

Sia nelle branchie sane sia in quelle parassitate le cellule contenenti la piscidina 3 sono state osservate nella lamella primaria (Figg. 16b,c,d) e nelle zone apicali, mediane e basali delle lamelle secondarie (Figg. 16b,c,d). Le cellule marcate erano presenti anche in prossimità e all'interno dei vasi sanguigni (Fig. 16b,e). Il numero delle cellule positive in un'area di  $20.000 \mu\text{m}^2$  variava da 0 a 51 ( $10,24 \pm 10,88$ ; media  $\pm$  D.S.) nei parassitati e da 0 a 10 ( $4,76 \pm 2,80$ ; media  $\pm$  D.S.) nei sani. Tra questi due gruppi non erano presenti differenze significative nel numero di cellule marcate (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 17a) e nemmeno l'intensità della marcatura cambiava significativamente nei parassitati ( $91,11 \pm 13,03$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto ai sani ( $88,66 \pm 12,05$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 17b). Le MCs contenenti la piscidina 3 sono state osservate sia nella zona "vicino" sia nella zona "lontano" dal parassita e il loro numero è risultato significativamente più alto "vicino" al copepode ( $14,38 \pm 12,22$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto alle branchie sane (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 17c), e anche rispetto alle lamelle parassitate ma "lontano" dal parassita ( $5,76 \pm 7,03$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 17c); nessuna differenza significativa è stata documentata tra branchie sane e parassitate "lontano" dal parassita (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 17c). Per quanto riguarda l'intensità della marcatura, nelle lamelle dei pesci parassitati, sia "lontano" sia "vicino" al parassita, non vi erano valori significativamente diversi rispetto ai sani ( $91,82 \pm 13,75$  pixel "lontano" e  $90,48 \pm 12,63$  pixel "vicino"; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 17d) e nemmeno tra "lontano" e "vicino" al parassita (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 17d).

Le orate sono state suddivise nei gruppi sani ( $n=20$ ), poco parassitati cioè con meno di 20 parassiti ( $n=14$ ) e molto parassitati ovvero con più 50 parassiti ( $n=12$ ). Il numero delle cellule P3-positive è risultato significativamente più alto nei molto parassitati ( $15,86 \pm 12,88$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto sia ai sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 17e) sia ai poco parassitati ( $5,84 \pm 6,31$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 17e), ma non vi era nessuna differenza significativa tra i poco parassitati e i sani (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 17e). L'intensità della marcatura delle MCs non variava significativamente tra sani e parassitati e nemmeno all'aumentare dell'intensità d'infestazione ( $88,66 \pm 12,05$  pixel nei sani,  $93,04 \pm 15,90$  pixel nei poco parassitati,  $88,17 \pm 19,27$  pixel nei molto parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 17f).

Le MCs contenenti la piscidina 3 sono state osservate in tutti e tre i distretti branchiali esaminati: seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare. Nei



pesci sani il seno venoso centrale è quello che conteneva il minor numero di cellule positive ( $0,79 \pm 0,76$ ; media  $\pm$  D.S.), significativamente inferiore a quello dei capillari delle lamelle secondarie ( $2,23 \pm 2,00$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 18a), mentre nessuna differenza era presente tra comparto vascolare e tessuto extravascolare ( $1,72 \pm 1,88$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 18a). Nel gruppo dei poco parassitati, il tessuto extravascolare presentava un numero significativamente maggiore di cellule positive ( $3,73 \pm 5,62$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto ad entrambi i distretti vascolari ( $0,90 \pm 1,25$  nel seno centrale e  $1,20 \pm 1,18$  nei capillari delle lamelle secondarie; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 18b) e tra il seno venoso centrale e i capillari delle lamelle secondarie non vi erano differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 18b). Nel gruppo dei molto parassitati, il seno venoso centrale conteneva il minor numero di cellule marcate ( $2,74 \pm 2,76$ ; media  $\pm$  D.S.), seguito dai capillari delle lamelle secondarie ( $5,73 \pm 7,23$ ; media  $\pm$  D.S.) e dal tessuto extravascolare ( $7,38 \pm 8,77$ ; media  $\pm$  D.S.), ma l'unica differenza significativa è stata registrata tra il tessuto e il seno venoso centrale (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 18c). Nel gruppo dei parassitati, nella zona "lontano" dal parassita, il tessuto extravascolare e i capillari delle lamelle secondarie avevano un numero significativamente più alto di cellule marcate rispetto al seno venoso centrale ( $0,70 \pm 1,18$  nel vaso centrale,  $2,37 \pm 4,35$  nei capillari delle lamelle secondarie e  $2,69 \pm 4,79$  nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 18d) mentre tra i capillari delle lamelle secondarie e il tessuto non c'erano differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 18d). La zona "vicino" al parassita risultava caratterizzata da un numero significativamente maggiore di cellule marcate nel tessuto extravascolare ( $7,78 \pm 8,44$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto al comparto vascolare ( $2,64 \pm 2,57$  nel vaso centrale e  $3,95 \pm 6,07$  nei capillari delle lamelle secondarie; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 18e) mentre non si è notata una diversa abbondanza tra il vaso centrale e i capillari delle lamelle secondarie (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 18e). Nell'analisi di intensità di marcatura, il gruppo dei pesci sani presentava un'intensità significativamente minore nel tessuto extravascolare ( $104,03 \pm 20,10$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto al comparto vascolare ( $87,74 \pm 27,91$  pixel nel seno venoso centrale e  $76,92 \pm 16,74$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 19 a); tale differenza era però imputabile solo ai capillari dei vasi delle lamelle secondarie e non al seno venoso centrale (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 19a). Negli esemplari poco parassitati non si è registrata nessuna differenza significativa di intensità di marcatura tra i due comparti vascolari e il tessuto extravascolare ( $96,22 \pm 20,31$  pixel nel seno centrale,  $90,02 \pm 20,68$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie e  $93,41 \pm 18,01$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 19b) e la stessa cosa si è notata nei molto parassitati ( $95,60 \pm 25,86$  pixel nel seno centrale,  $84,09 \pm 22,78$  pixel nei capillari delle lamelle secondarie e  $89,31 \pm 21,87$  pixel nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 19c). Anche nei parassitati "lontano" dal parassita

(99,66 ± 21,55 nel seno centrale, 89,38 ± 23,63 nei capillari delle lamelle secondarie e 93,03 ± 21,19 pixel nel tessuto; media ± D.S.) e “vicino” al parassita (93,49 ± 24,36 pixel nel seno centrale, 85,41 ± 19,33 pixel nei capillari delle lamelle secondarie e 90,22 ± 19,62 pixel nel tessuto; media ± D.S.) non sussistevano differenze significative nell’intensità di marcatura tra i diversi distretti delle branchie (ANOVA,  $p > 0,05$ ). (Figg. 19d,e).

Confrontando i dati sul numero delle cellule positive nei pesci sani con i diversi gruppi di pesci parassitati (poco parassitati “lontano”, poco parassitati “vicino”, molto parassitati “lontano”, molto parassitati “vicino”) divisi per le tre zone della lamella branchiale (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) si nota che tutti e tre i distretti si comportavano in modo simile con le cellule P3-positive significativamente più numerose nel gruppo molto parassitato “vicino” al parassita rispetto a quello dei sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 20a). La situazione era diversa per quanto riguarda l’analisi di intensità della marcatura: l’unico dei tre distretti a presentare una differenza significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 20b) era quello del tessuto extravascolare, in cui si registrava una maggiore intensità nei molto parassitati “vicino” al parassita rispetto ai sani (104,03 ± 20,10 pixel nei sani, 91,28 ± 25,16 pixel nei poco parassitati “lontano”, 94,48 ± 14,49 pixel nei poco parassitati “vicino”, 94,35 ± 19,42 nei molto parassitati “lontano” e 85,96 ± 23,57 nei molto parassitati “vicino”; media ± D.S.). Gli altri due distretti della lamella branchiale non presentavano alcuna differenza significativa nel grado di intensità della marcatura né tra i sani e i parassitati e nemmeno tra i diversi gruppi di parassitati (seno venoso centrale: 87,74 ± 27,91 nei sani, 111,64 ± 11,90 nei poco parassitati “lontano”, 90,05 ± 20,02 pixel nei poco parassitati “vicino”, 95,60 ± 25,86 pixel nei molto parassitati “lontano”, 97,31 ± 29,21 pixel nei molto parassitati “vicino”; media ± D.S.) (capillari lamelle secondarie :76,92 ± 16,74 pixel nei sani, 90,65 ± 22,84 pixel nei poco parassitati “lontano”, 89,02 ± 18,06 pixel nei poco parassitati “vicino”, 84,09 ± 22,78 pixel nei molto parassitati “lontano” e 82,16 ± 20,80 pixel nei molto parassitati “vicino”; media ± D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 20b).

### **7.2.2 Anticorpo G7 nelle branchie**

Le sezioni istologiche trattate con l’anticorpo G7, specifico per gli AGs dell’orata, hanno rivelato la presenza di cellule positive a questo anticorpo nelle branchie (Fig. 21a) e in tutti gli altri organi testati (Tab. 2). Nelle branchie, nella regione interessata dall’inflammation era comune l’infiltrazione di AGs (Figg. 21b,c), la quale risultava particolarmente accentuata nell’area di tessuto attorno alle antenne del copepode (Fig. 21c). Gli AGs (asse maggiore 6,40 ± 3,20 µm; media ± D.S.) erano frequenti nel comparto vascolare delle branchie infestate, sia nella lamella primaria sia in quelle secondarie (Figg. 21c,d). Al TEM gli AGs apparivano di forma irregolare, con

un citoplasma ricco di granuli (Figg. 21e,f), numerosi ribosomi, alcuni mitocondri (Fig. 21f) e un reticolo endoplasmatico rugoso ben sviluppato. I granuli, di forma tonda od ovale, presentavano un core elettron-denso (Fig. 21f).

Il numero delle cellule positive al G7 in un'area di  $20.000 \mu\text{m}^2$  variava da 0 a 43 ( $14,29 \pm 11,28$ ; media  $\pm$  D.S.) nei parassitati e da 0 a 13 ( $5,68 \pm 4,73$ ; media  $\pm$  D.S.) nei sani. Questi due gruppi differivano significativamente nell'abbondanza di AGs (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 22a). Le cellule marcate sono state osservate sia nella zona "vicino" sia nella zona "lontano" dal parassita e il loro numero è risultato significativamente più alto nella zona "vicino" ( $18,29 \pm 13,06$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto alle branchie sane (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 22b) ma non rispetto alla zona "lontano" ( $10,30 \pm 7,54$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 22b); tra i sani e i parassitati "lontano" dal parassita non si sono registrate differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 22b). I pesci, come detto sopra, sono stati suddivisi in sani, poco parassitati e molto parassitati in base al numero di parassiti presenti nelle branchie. Le cellule G7-positive erano significativamente più numerose nei molto parassitati ( $20,86 \pm 10,76$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto sia ai sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 22c) che ai poco parassitati ( $8,32 \pm 8,08$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 22c), ma non c'era nessuna differenza significativa tra i poco parassitati e i sani (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 22c).

Le cellule marcate sono state esaminate in tutti e tre i distretti della branchia: seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare. Nei pesci sani il tessuto extravascolare conteneva il minor numero di cellule positive ( $0,86 \pm 0,96$ ; media  $\pm$  D.S.), che era significativamente inferiore a quello dei capillari delle lamelle secondarie ( $3,31 \pm 3,19$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 23a), mentre il seno venoso centrale non presentava un numero significativamente diverso rispetto alle altre due aree ( $1,50 \pm 1,20$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 23a). Nel gruppo dei poco parassitati, il seno venoso centrale mostrava un numero significativamente più basso di cellule positive ( $1,56 \pm 1,95$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto sia ai capillari delle lamelle secondarie ( $4,16 \pm 5,14$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 23b) sia al tessuto extravascolare ( $2,60 \pm 2,24$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 23b) ma tra il tessuto extravascolare e i capillari delle lamelle secondarie non sono state osservate differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 23b). La stessa situazione ora descritta nei poco parassitati si è registrata nel gruppo dei molto parassitati: il seno venoso centrale era quello con il minor numero di AGs ( $3,88 \pm 2,95$ ; media  $\pm$  D.S.), seguito dal tessuto extravascolare ( $7,12 \pm 4,94$ ; media  $\pm$  D.S.) e dai capillari delle lamelle secondarie ( $9,85 \pm 7,17$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 23c). Anche nel gruppo dei parassitati, nella zona "lontano" dal parassita, i capillari delle lamelle secondarie presentavano un numero di cellule marcate significativamente più alto rispetto sia al seno venoso centrale sia al tessuto extravascolare ( $1,79 \pm 1,86$  nel seno venoso centrale,  $5,66 \pm 4,88$  nelle

lamelle dei capillari delle lamelle secondarie e  $2,83 \pm 2,70$  nel tessuto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 23d) mentre tra il seno venoso centrale e il tessuto extravascolare non vi erano differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 23d). Nei parassitati, “vicino” al parassita, vi erano meno cellule positive nel seno venoso centrale ( $3,53 \pm 3,16$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto agli altri due comparti ( $8,08 \pm 8,17$  nei capillari delle lamelle secondarie e  $6,66 \pm 4,91$  nel tessuto extravascolare; media  $\pm$  D.S.) e l’unica differenza significativa si è registrata tra il seno venoso centrale e il tessuto extravascolare (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 23e).

Confrontando i dati sul numero degli AGs nelle orate sane con i diversi gruppi di pesci parassitati (poco parassitati “lontano”, poco parassitati “vicino”, molto parassitati “lontano”, molto parassitati “vicino”) divisi per i tre distretti della lamella branchiale si è notato che sia nel seno venoso centrale sia nei capillari delle lamelle secondarie sia nel tessuto extravascolare la situazione era simile: le cellule G7-positive erano significativamente maggiori di numero nel gruppo molto parassitati “vicino” al parassita rispetto al gruppo sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 24). I capillari delle lamelle secondarie delle orate molto parassitate, nella zona “lontano” dal parassita, avevano una maggiore abbondanza di AGs rispetto ai sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 24). Il tessuto extravascolare mostrava un numero significativamente più alto di cellule marcate, rispetto ai pesci sani, nei gruppi dei poco parassitati “vicino” al parassita e dei molto parassitati sia “lontano” sia “vicino” al parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 24); inoltre, all’interno dei poco parassitati e dei molto parassitati si sono registrate differenze significative tra le zone “vicino” e “lontano” (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 24).

### **7.2.3 Anticorpo anti-istamina**

Sezioni branchiali di orata incubate con l’anticorpo anti-istamina hanno rivelato la presenza di MCs sia nel comparto vascolare sia nel comparto extravascolare (Fig. 16f).

Il numero delle MCs positive all’anticorpo anti-Istamina in un’area di  $20.000\mu\text{m}^2$  variava da 1 a 4 ( $2,85 \pm 1,00$ ; media  $\pm$  D.S.) nei sani e da 1 a 3 ( $1,95 \pm 0,86$ ; media  $\pm$  D.S.) nei parassitati. La differenza nell’abbondanza di MCs marcate tra questi due gruppi non era significativa (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Il numero di MCs è risultato significativamente più basso rispetto al numero degli AGs sia nelle branchie sane che in quelle parassitate (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

### **7.2.4 Anticorpo G7 nella cute**

Nel settembre 2009 si sono avuti casi di Lymphocystis Disease Virus (LCDV) nell’allevamento “Cà Zuliani” di Porto Tolle (Rovigo): 32.400 orate su 220.000 (14.7%) avevano la superficie di corpo e pinne interessata da questa malattia virale. Dai rapporti del medico veterinario

dell'allevamento, sei mesi dopo l'inizio della diffusione del virus, il 45% (14.580 esemplari) delle orate che si erano ammalate era morto. Non sono state effettuate analisi *post-mortem* per cui la precisa causa della morte è rimasta sconosciuta. Nella maggior parte delle orate sopravvissute, le lesioni cutanee non sono completamente guarite e persisteva la presenza di tessuto cicatriziale. La figura 25b mostra in sezione la struttura della cute in pesci clinicamente sani. Le linfocisti si presentavano come grandi noduli biancastri sulle pinne pettorali, dorsali e caudali, sulla superficie dell'opercolo branchiale, attorno agli occhi e sulla superficie del corpo (Fig. 25a). Spesso i noduli si univano formando grandi masse di cellule ipertrofiche di aspetto granulare (Figg. 25c,d), che arrivavano a coprire buona parte del corpo (Fig. 25a), alterandone profondamente l'integrità, soprattutto nelle infezioni più gravi (Figg. 25c,d). Le cellule infettate dal virus mostravano una capsula esterna, un grande nucleo interno, inclusioni citoplasmatiche di diverse grandezze (Fig. 25d). L'asse maggiore delle linfocisti aveva una lunghezza variabile tra 112,9 e 311,6  $\mu\text{m}$  ( $229,1 \pm 45,1$ ; media  $\pm$  D.S.) e quello minore fra 75,5 e 237,9  $\mu\text{m}$  ( $154,2 \pm 42,2$ ; media  $\pm$  D.S.), mentre la capsula ialina che le circondava aveva uno spessore che variava da 1,3 a 9,6  $\mu\text{m}$  ( $4,5 \pm 2,3$   $\mu\text{m}$ ; media  $\pm$  D.S.) (Fig. 25d). Le sezioni istologiche colorate con la colorazione di Gram hanno messo in evidenza la presenza di batteri Gram-positivi (bacilli e cocci) nel muco e sulla superficie epiteliale ma non vi era proliferazione batterica all'interno del tegumento nelle aree circostanti le linfocisti.

Le cellule ipertrofiche risultavano circondate da tessuto connettivo e da un elevato numero di cellule granulari di forma irregolare (Fig. 25e). Questi granulociti erano distribuiti nelle vicinanze e all'interno dei capillari (Fig. 25f) ma anche nel derma (Fig. 25f).

Le sezioni di cute trattate con l'anticorpo anti-piscidina 3 hanno rivelato la presenza di cellule positive vicino alle linfocisti (Figg. 26a,b), anche attorno e all'interno dei capillari (Figg. 26c,d). Grazie a sezioni seriali sottoposte a doppia immunocolorazione G7/istamina si è stabilito che le cellule marcate con la piscidina 3 si marcavano con l'anticorpo G7 (specifico per AGs) ma non con l'anticorpo anti-istamina (che viene tipicamente espressa nelle MCs dei pesci perciformi) (Mulero *et al.*, 2007) (Figg. 27a-d). Nella cute infettata dal virus, il numero degli AGs ( $18,5 \pm 10,5$ ; media  $\pm$  D.S., N=10) era significativamente superiore rispetto a quello nella cute dei pesci sani ( $1,4 \pm 2,2$ ; media  $\pm$  D.S., N = 10) (t-test,  $p < 0,05$ ). Gli AGs sono stati documentati nello spessore del derma molto vicino alle cellule ipertrofiche (Figg. 27a-d), e in alcuni casi sembravano circondare le linfocisti (Fig. 27b) o raggrupparsi lateralmente ad esse (Fig. 27c). Tramite la doppia immunocolorazione G7/IL-1 $\beta$  è stata rivelata attorno alle linfocisti la presenza di alcuni AGs contenenti interleuchina-1 $\beta$  (Figg. 28a-d).

Con l'osservazione al TEM si è documentato che il citoplasma delle cellule ipertrofiche conteneva particelle virali (Fig. 29a), le quali erano allungate, presentavano un profilo esagonale (Fig. 29b) e un sottile capsid. Il citoplasma risultava in avanzato stato di degenerazione, ridotto ad una matrice elettrone-trasparente e pieno di residui membranosi poco definiti (Fig. 29a,c). Mitochondri, reticolo endoplasmatico rugoso, ribosomi e vacuoli erano relegati nella periferia delle cellule (Fig. 29a,c). Il bordo del citoplasma risultava dentellato (Fig. 29d).

La risposta cellulare all'infezione coinvolgeva soprattutto AGs, asse maggiore ( $6,84 \pm 1,02 \mu\text{m}$ , media  $\pm$  D.S.,  $n=30$ ) e asse minore ( $5,03 \pm 0,79 \mu\text{m}$ , media  $\pm$  D.S.,  $n=30$ ), i quali al TEM apparivano di forma irregolare e con un citoplasma ricco di granuli elettrone-densi (Fig. 30a). Gli AGs erano spesso nelle vicinanze dei capillari e delle cellule parassitate (Fig. 30b). I granuli elettrone-densi mostravano una forma ovale o tonda con un core elettrone-denso al loro interno (Fig. 30c). Il citoplasma presentava numerosi ribosomi liberi e un reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato, spesso in stretto contatto con i granuli (Fig. 30d).

Con le colorazioni istologiche e il TEM è stato possibile osservare la degranulazione degli AGs, fenomeno frequente soprattutto quando queste cellule si trovavano adiacenti o all'interno dei capillari più vicini alle linfocisti (Fig. 25f, 30b).

### 7.3 *Perca fluviatilis*

Sono stati esaminati 87 persici (*Perca fluviatilis*), con una lunghezza totale di  $19,61 \pm 7,23$  cm (media  $\pm$  D.S.) e peso di  $163,58 \pm 179,70$  g (media  $\pm$  D.S.), di cui 44 (50,57%) sono risultati parassitati dall'acantocefalo *Acanthocephalus lucii*. L'intensità di infestazione da *A. lucii* variava da 1 a 18 parassiti per pesce ( $3,55 \pm 4,58$ ; media  $\pm$  D.S.). La maggioranza dei parassiti era insediata nella zona mediana dell'intestino (Fig. 31a). Gli acantocefali non penetravano in profondità nello spessore intestinale (Fig. 31a), spesso non arrivando ad attraversare nemmeno lo strato granuloso (Fig. 31a) e inducendo così una leggera infiammazione locale.

Il principale danno causato da questi parassiti al tratto intestinale dell'ospite era la distruzione della mucosa epiteliale che copriva i villi adiacenti il loro punto di ancoraggio (Fig. 31a), con il distacco delle cellule epiteliali (Fig. 31a). I villi intestinali più distanti dal corpo dell'acantocefalo risultavano intatti e presentavano un elevato numero di RCs e cellule mucose (Fig. 31a). Le aree dell'intestino dove erano attaccati i parassiti apparivano coperte da uno strato di muco giallastro visibile allo stereomicroscopio; tale *film* mucoso appariva blu intenso nelle sezioni istologiche colorate con l'Alcian-Blu (Fig. 31b). Nello strato sottomucoso, in corrispondenza della proboscide del parassita, erano presenti numerosi granulociti (quali MCs e neutrofili) e fibre collagene (Fig. 31c,d).

Grazie al TEM è stata documentata la presenza di molte MCs (asse maggiore  $10,05 \pm 2,20$   $\mu$ m; media  $\pm$  D.S.) molto vicine alla zona di attacco dell'acantocefalo. Le MCs, di forma irregolare, avevano un nucleo polare e un citoplasma ricco di granuli elettrondensi (asse maggiore  $1,21 \pm 0,11$   $\mu$ m; media  $\pm$  D.S.) (Fig. 32a). Il citoplasma conteneva anche un numero limitato di mitocondri, un reticolo endoplasmatico rugoso molto esteso e un apparato di Golgi non particolarmente sviluppato (Fig. 32a,b). Le MCs erano frequentemente circondate da fibre collagene dello strato sottomucoso (Fig. 32c). Non è stata vista degranulazione delle MCs né nei pesci sani né in quelli parassitati. Negli strati sottomucoso e muscolare molte MCs risultavano in stretto contatto con i capillari e/o al loro interno (Fig. 32c).

Le sezioni trattate con gli anticorpi contro le piscidine 3 e 4 hanno rivelato la presenza di MCs marcate in branchie, intestino, fegato, milza e rene (Tab. 2). Per entrambi gli anticorpi, le cellule positive a livello intestinale erano distribuite nello strato mucoso, tra le cellule epiteliali e più frequentemente alla base dello strato stesso vicino alla membrana basale (Fig. 33a,b), ma anche nel sottomucosa (Fig. 33a,b), nello strato muscolare e nella sierosa (Fig. 33c,d). Le MCs marcate sono state osservate anche in stretto contatto e all'interno dei capillari (Fig. 33c). In cinque fegati infestati dal cestode *Triaenophorus nodulosus* numerose MCs positive alle piscidine 3 e 4

erano presenti sia nel tessuto fibroso che circondava le cisti del parassita sia in prossimità e/o all'interno dei capillari che irroravano la zona parassitata.

### 7.3.1 *Anticorpo anti-piscidina 3*

Il numero delle cellule P3-positive in un'area di  $20.000\mu\text{m}^2$  variava da 0 a 9 ( $1,54 \pm 2,08$ ; media  $\pm$  D.S.) negli intestini dei persici parassitati e da 0 a 4 ( $1,32 \pm 1,20$ ; media  $\pm$  D.S.) in quelli dei sani; tra i due gruppi (senza distinzione in base alla vicinanza ai parassiti o all'intensità di infestazione) non sussistevano differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 34a). L'intensità della marcatura è risultata significativamente più debole nei parassitati ( $142,78 \pm 20,14$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto ai sani ( $126,39 \pm 24,01$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 34b).

I pesci sono stati suddivisi in tre gruppi: sani ( $n=10$ ), poco parassitati ( $<5$  parassiti per ospite,  $n=5$ ) e molto parassitati ( $\geq 8$  parassiti per ospite,  $n=9$ ). Il numero delle mast cells P3-positive era simile fra i tre gruppi ( $0,65 \pm 0,91$  nei poco parassitati e  $2,02 \pm 2,39$  nei molto parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 34c). Il valore dell'intensità della marcatura delle MCs nei poco e molto parassitati era significativamente più debole rispetto a quello dei sani ( $146,97 \pm 19,33$  pixel nei poco parassitati e  $140,69 \pm 20,82$  pixel nei molto parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 34d) ma tra i poco e i molto parassitati non vi erano differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 34d).

La presenza di cellule positive nel tessuto intestinale dei pesci parassitati è stata valutata in due zone: "vicino" (cioè are a stretto contatto con il parassita) e "lontano" (a 1 cm circa dal punto di attacco del parassita). Il numero delle cellule positive non variava significativamente tra i sani e i parassitati "vicino" e "lontano" dall'acantocefalo ( $1,16 \pm 1,27$  zona "lontano" e  $1,91 \pm 2,65$  zona "vicino"; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 34e). Dall'analisi dell'intensità della marcatura è emerso un segnale significativamente più forte nei sani rispetto a quello degli intestini infestati, sia "lontano" che "vicino" al parassita ( $140,02 \pm 23,46$  pixel nei lontano e  $145,55 \pm 16,77$  pixel nei vicino; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 34f) e tra le due zone non si avevano differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 34f).

La valutazione del numero di cellule positive alla piscidina 3 e dell'intensità di marcatura delle stesse è stata condotta in due diversi distretti dell'intestino: strato epiteliale e strato sottomucoso. Sia per l'uno che per l'altro strato non si sono rilevate differenze significative nell'abbondanza di MCs marcate tra sani e parassitati (epitelio:  $0,52 \pm 0,64$  nei sani e  $0,45 \pm 0,61$  nei parassitati; sottomucosa:  $0,78 \pm 0,70$  nei sani e  $1,08 \pm 1,59$  nei parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35a) e il numero medio di cellule positive nell'epitelio non differiva significativamente da quello del sottomucosa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35a). L'epitelio dei sani



mostrava un'intensità di marcatura significativamente più forte di quello dei parassitati ( $121,65 \pm 28,68$  pixel nei sani e  $142,04 \pm 22,40$  pixel nei parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 35b), mentre non è emersa nessuna differenza di intensità confrontando lo strato sottomucoso nei due gruppi ( $131,13 \pm 20,46$  pixel nei sani e  $143,53 \pm 19,60$  pixel nei parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35b). L'intensità di marcatura era simile tra epitelio e sottomucosa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35b).

Sia nell'epitelio sia nel sottomucosa il numero di MCs esprimenti la piscidina 3 non variava significativamente tra esemplari sani, poco e molto parassitati (epitelio:  $0,20 \pm 0,29$  nei poco e  $0,59 \pm 0,70$  nei molto; sottomucosa:  $0,45 \pm 0,70$  nei poco e  $1,43 \pm 1,84$  nei molto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35c). Epitelio e sottomucosa non mostravano differenze significative nell'abbondanza di tali cellule (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35c) e nemmeno nell'intensità della loro marcatura (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35d) né nei sani né nei parassitati (sia poco che molto infestati). La marcatura delle MCs epiteliali era più intensa nei sani rispetto ai poco e ai molto parassitati ( $144,60 \pm 23,61$  pixel nei poco e  $140,75 \pm 22,45$  pixel nei molto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 35d) senza alcuna differenza tra i due gruppi di parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35d). Per quanto riguarda il sottomucosa nessuna differenza significativa si è registrata nell'intensità della marcatura tra i gruppi sani, poco e molto parassitati ( $149,35 \pm 17,30$  pixel nei poco e  $140,63 \pm 21,76$  pixel nei molto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35d).

Nessuna differenza significativa nel numero di cellule positive all'anti-piscidina 3 sussisteva tra i sani e i parassitati, sia "lontano" sia "vicino", nello strato epiteliale come in quello sottomucoso (epitelio:  $0,30 \pm 0,26$  zona "lontano" e  $0,61 \pm 0,82$  zona "vicino"; sottomucosa:  $0,86 \pm 1,08$  "lontano" e  $1,31 \pm 2,00$  "vicino"; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35e) e non si sono registrate differenze significative per i suddetti gruppi nemmeno tra epitelio e sottomucosa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35e). Lo strato epiteliale mostrava un'intensità di marcatura significativamente più debole nei parassitati "vicino" al parassita ( $145,12 \pm 17,40$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto ai sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 35f) ma non vi era alcuna differenza significativa tra i sani e i parassitati "lontano" dal parassita ( $138,96 \pm 26,93$ ; media  $\pm$  D.S.) né, all'interno dei parassitati, tra la zona "lontano" e quella "vicino" al parassita (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35f). Lo strato sottomucoso non presentava una intensità di marcatura significativamente diversa tra sani e parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ), anche se nelle zone "lontano" e "vicino" i valori medi erano più alti rispetto a quelli degli intestini non infestati ( $141,09 \pm 22,92$  pixel zona "lontano" e  $145,98 \pm 18,29$  pixel zona "vicino"; media  $\pm$  D.S.) (Fig. 35f). Tra epitelio e sottomucosa non si sono documentate differenze significative nell'intensità di marcatura (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 35f).

Confrontando i dati relativi allo strato epiteliale nei diversi gruppi di pesci parassitati (poco parassitati “lontano”, poco parassitati “vicino”, molto parassitati “lontano”, molto parassitati “vicino”) si è notato un andamento simile del numero medio di cellule positive dal gruppo dei sani a quello dei molto vicino e non vi erano differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 36a). I dati sull’abbondanza di MCs positive nello strato sottomucoso sono risultati simili a quelli nell’epitelio e sempre senza differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 36a). Per quanto riguarda l’intensità di marcatura, l’epitelio mostrava MCs più debolmente marcate nel gruppo dei poco parassitati “vicino” al parassita rispetto agli esemplari sani (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 36b). I valori medi di intensità dello strato sottomucoso non mostravano nessuna variazione significativa tra i sani e i diversi gruppi di parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 36b). In nessuno dei gruppi si è rilevata una differenza numerica di MCs positive né di intensità di marcatura tra epitelio e sottomucosa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figg. 36a,b).

### **7.3.2 Anticorpo anti-piscidina 4**

Il numero delle cellule marcate con l’anticorpo contro la piscidina 4 in un’area di  $20.000\mu\text{m}^2$  variava da 0 a 9 ( $4,53 \pm 1,83$ ; media  $\pm$  D.S.) negli intestini parassitati e da 3 a 7 ( $5,13 \pm 1,30$ ; media  $\pm$  D.S.) in quelli sani; l’abbondanza di MCs positive in questi due gruppi non è risultata significativamente diversa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 37a). Anche l’intensità della marcatura non variava in modo significativo nei parassitati ( $89,93 \pm 20,14$ ; media  $\pm$  D.S.) rispetto ai sani ( $85,76 \pm 24,64$ ; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 37b).

I tre gruppi dei sani, poco parassitati e molto parassitati presentavano un numero di cellule marcate non significativamente differente ( $4,72 \pm 2,57$  nei poco parassitati e  $4,42 \pm 1,34$  nei molto parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 37c). L’intensità della marcatura era più debole nei poco parassitati rispetto a quella nei molto parassitati ( $101,32 \pm 13,30$  pixel nei poco parassitati e  $83,53 \pm 20,81$  pixel nei molto parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 37d), ma nessuna significatività era presente tra i sani e i due gruppi di parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Il numero delle cellule P4-positive non cambiava significativamente tra il gruppo dei sani e quello dei parassitati nelle zone “vicino” e “lontano” ( $4,04 \pm 1,62$  lontano e  $5,01 \pm 1,96$  vicino al parassita; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 37e). Un simile risultato è scaturito dall’analisi di intensità della marcatura: non vi erano differenze significative fra i tre gruppi ( $92,11 \pm 21,22$  pixel nei lontano e  $87,92 \pm 19,73$  pixel nei vicino; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 37f).

Sia per l’epitelio sia per il sottomucosa non vi erano differenze significative nell’abbondanza di MCs esprimenti la P4 tra sani e parassitati (epitelio:  $2,89 \pm 0,68$  nei sani e  $2,60 \pm 0,90$  nei parassitati; sottomucosa:  $2,24 \pm 0,83$  nei sani e  $1,92 \pm 1,19$  nei parassitati; media  $\pm$  D.S.)

(ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38a) ma sia nei sani sia nei parassitati il numero delle cellule positive era significativamente maggiore nello strato epiteliale rispetto allo strato sottomucoso (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 38a). Per quanto riguarda l'intensità di marcatura delle MCs, in nessun caso si sono registrate differenze significative (epitelio:  $78,94 \pm 25,71$  pixel nei sani e  $86,81 \pm 24,46$  pixel nei parassitati; sottomucosa:  $92,58 \pm 25,75$  pixel nei sani e  $93,06 \pm 20,64$  pixel nei parassitati; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38b).

Il numero di MCs marcate con l'anti-piscidina 4, sia nell'epitelio che nel sottomucosa, non variava significativamente confrontando i sani, i poco e i molto parassitati (epitelio:  $2,37 \pm 1,03$  nei poco e  $2,73 \pm 0,82$  nei molto; sottomucosa:  $2,35 \pm 1,60$  nei poco e  $1,69 \pm 0,85$  nei molto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38c). L'unica differenza significativa nell'abbondanza di cellule positive tra epitelio e sottomucosa si è registrata nel gruppo dei molto parassitati (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 38c). Per quanto riguarda l'intensità di marcatura, le MCs dell'epitelio mostravano una maggiore intensità nei sani e nei molto parassitati rispetto ai poco parassitati ( $104,25 \pm 15,21$  pixel nei poco e  $76,99 \pm 23,43$  pixel nei molto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 38d), senza alcuna differenza tra i sani e i molto parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38d). Nel sottomucosa l'intensità di marcatura era simile nei sani, poco e molto parassitati ( $98,39 \pm 17,57$  pixel nei poco e  $90,06 \pm 22,14$  pixel nei molto; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38d) e in nessuno dei tre gruppi si è vista una differenza di intensità di marcatura tra le MCs epiteliali e quelle del sottomucosa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38d).

Nessuna differenza significativa nel numero di cellule marcate è stata documentata tra i gruppi dei sani e dei parassitati nelle zone "lontano" e "vicino" sia per lo strato epiteliale sia per lo strato sottomucoso (epitelio:  $2,43 \pm 0,90$  zona "lontano" e  $2,77 \pm 0,89$  zona "vicino"; sottomucosa:  $1,61 \pm 0,97$  zona "lontano" e  $2,24 \pm 1,33$  zona "vicino"; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38e) e nemmeno confrontando l'abbondanza tra i due diversi strati dell'intestino ovvero epiteliale e sottomucoso (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38e). Anche nel caso dell'intensità di marcatura non erano presenti differenze significative (epitelio:  $85,88 \pm 25,42$  pixel nei lontano e  $87,66 \pm 24,55$  pixel nei vicino; sottomucosa:  $98,35 \pm 18,54$  pixel nei lontano e  $89,77 \pm 21,98$  pixel nei vicino; media  $\pm$  D.S.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 38f).

Dal confronto dei dati relativi alle MCs dello strato epiteliale nei diversi gruppi di pesci parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino") è emerso un andamento simile dei valori medi delle cellule P4 positive dal gruppo dei sani a quello dei molto vicino, con un'unica differenza significativa tra i sani e i poco parassitati nella zona "lontano" dal parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 39a). I valori di abbondanza delle MCs positive nello strato sottomucoso sono risultati più altalenanti ma sempre senza

differenze significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 39a). Il raffronto tra numerosità di cellule positive nell'epitelio e nel sottomucosa ha messo in luce una sola differenza significativa nel gruppo dei molto parassitati "lontano" dal parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 39a). Per quanto riguarda la marcatura, le MCs dell'epitelio avevano un'intensità significativamente maggiore nei gruppi dei sano e dei molto parassitati nella zona "vicino" rispetto al gruppo dei poco parassitati "vicino" al parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 39b). I valori medi di intensità dello strato sottomucoso non variavano in modo significativo tra i sani e i diversi gruppi di parassitati (ANOVA,  $p > 0,05$ ), come pure l'intensità di marcatura per gli stessi gruppi tra epitelio e sottomucosa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 39b).

### ***7.3.3 Confronto anticorpi anti-piscidina 3 e anti-piscidina 4***

Il numero delle cellule P4-positive risultava significativamente maggiore rispetto a quelle P3-positive sia nei sani sia nei diversi gruppi in cui sono stati suddivisi i pesci parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino") (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 40a). L'epitelio presentava sempre un numero significativamente maggiore di cellule marcate con l'anti-P4 rispetto a quelle positive alla P3 (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 40). Per quanto riguarda il sottomucosa, le cellule P4-positive erano più abbondanti delle P3-positive nei sani e nei poco parassitati, sia "lontano" sia "vicino" al parassita (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Fig. 40c), mentre non c'era differenza significativa nei molto parassitati, alle due diverse distanze dal parassita (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Fig. 40c).

## 8) DISCUSSIONE

Prima di passare a discutere i risultati ottenuti, è importante ribadire l'obiettivo di questo studio, che consiste nel fornire nuove informazioni sul coinvolgimento delle mast cells (MCs) nella risposta immunitaria verso parassiti metazoi. Sono stati scelti metodi di indagine immunoistochimici (basati sull'uso di anticorpi contro le piscidine 3 e 4 specifici per le MCs dei pesci perciformi) per documentare come queste cellule immunitarie reagiscano in presenza di macroparassiti e dell'inflammatione da essi provocata, in particolare, se con una variazione del loro numero (proliferazione) e/o della sintesi degli antimicrobici noti come piscidine. Le analisi nei tessuti sono state condotte considerando il grado di infestazione dell'ospite (suddividendo i pesci parassitati in poco e molto parassitati in base al numero di parassiti presenti), la distanza dal parassita (quindi zona attorno al punto di attacco del parassita indicata come "vicino" e zona più distante da esso indicata come "lontano") e i diversi distretti tissutali dell'organo (nelle branchie: seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare; nell'intestino: strato epiteliale e sottomucoso) per capire se tali fattori incidessero, e in che modo, sulla risposta delle MCs.

### 8.1 *Dicentrarchus labrax* - *Diplectanum aequans*

*Dicentrarchus labrax* (L.) è la seconda specie marina più importante per gli allevamenti ittici in Italia, con una produzione di 3.683 tonnellate in ambienti di transizione e di 2.774 tonnellate in ambiente marino e, per quanto attiene al valore della produzione, rispettivamente 35.772,5 e 26.630,8 migliaia di dollari (FAO, 2010). La produzione risente di perdite annuali dell'ordine del 5–10% che avvengono in primavera probabilmente a causa dell'infestazione da *Diplectanum aequans*. Il genere *Diplectanum* è il più numeroso della famiglia Diplectanidae (Hayward, 1996) ed è ampiamente distribuito nel Mediterraneo e nelle aree dell'Atlantico che coincidono con le zone di presenza dell'ospite. *D. aequans* è la specie parassita più comune nei branzini sia di allevamento sia di ambiente naturale.

I monogenei sono diffusi nel Mediterraneo e a loro è stata attribuita la mortalità di diverse specie allevate: ne sono esempi *Microcotyle* Van Beneden and Hesse 1863 in *Sparus aurata* L. (Sanz, 1992; Alvarez-Pellitero and Crespo, 1995; Padrós and Crespo, 1995) e *Zeuxapta seriolae* (Meserve 1938) in *Seriola dumerili* Risso (Grau *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2004). Sebbene il presente studio riporti dati sulla mortalità di *D. labrax* dovuta a *D. aequans*, le infestazioni di *D. laubieri* Lambert and Maillard 1974, sono considerate più dannose per l'ospite (Alvarez-Pellitero, 2004).

Le infestazioni da monogenei, con il loro sistema di ancoraggio e di alimentazione, possono indurre una varietà di modificazioni istopatologiche a carico dell'epitelio, favorendo così l'instaurarsi di sovrainfezioni secondarie causate da funghi, batteri e/o virus (Stoskopf, 1993; Cone, 1995). In letteratura sono ben documentati i danni istologici provocati da varie specie di monogenei (Hayward *et al.*, 2001; Padrós *et al.*, 2001; Ogawa, 2002; Buchmann *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2004; Mansell *et al.*, 2005).

I lavori di Oliver (1977) e González-Lanza *et al.* (1991), incentrati specificamente sulle infestazioni da *D. aequans* nel branzino, non includono però nessuna descrizione della reazione dell'ospite. In questa ricerca invece, è stata fatta particolare attenzione alla risposta cellulare dei pesci. Nel sito di ancoraggio del parassita e nelle sue immediate vicinanze non si è documentata una elevata presenza di MCs e neutrofili, a differenza di quanto visto nelle branchie di *Abramis brama* infestati dal crostaceo *Ergasilus sieboldi*, il quale nel punto di attacco scatenava un'intensa reazione con abbondanza di cellule immunitarie (MCs e neutrofili).

Per arginare l'epidemia da *Diplectanum aequans* nel suo ospite *Dicentrarchus labrax* sono stati testati diversi trattamenti zooprofilattici e chemioterapici (Silan *et al.*, 1996) e sono stati studiati l'effetto della temperatura nelle dinamiche di infestazione e l'impatto della disidratazione nella schiusa delle uova dei parassiti (Cecchini *et al.*, 2003).

Nei pesci le branchie costituiscono la prima linea di contatto con l'ambiente esterno e la sede in cui avvengono processi fisiologici cruciali quali lo scambio gassoso, la regolazione ionica e l'escrezione di ammonio (Das *et al.*, 2006). I pesci allevati sviluppano spesso forti infestazioni da monogenei, che inducono iperplasia e fusione delle lamelle branchiali con la formazione di foci infiammatori e infiltrazione di cellule leucocitarie (Kritsky and Stephens, 2001). Generalmente la presenza dei monogenei stimola nel tessuto dell'ospite un'elevata produzione di muco, che costituisce un primo meccanismo di difesa in risposta alla parassitosi (Jones, 2001). Il muco contiene diverse sostanze con proprietà antimicrobiche o biostatiche, le quali gli conferiscono un ruolo importante nella difesa contro i parassiti (Ross *et al.*, 2000). L'eccesso di muco tuttavia può rivelarsi nocivo per l'ospite in quanto può causare ipossia (Chaves *et al.*, 2006). Nel nostro studio, le branchie parassitate si presentavano ricoperte da un essudato mucoso biancastro e l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione ha rivelato un'iperplasia delle cellule mucose.

I pesci possono organizzare una risposta protettiva contro i monogenei (Lindenstrøm *et al.*, 2003; Faliex *et al.*, 2008) e in alcuni casi addirittura riuscire a eliminare l'infestazione (Buchmann and Lindenstrøm, 2002; Lindenstrøm *et al.*, 2003). Secondo Buchmann (1999), questi parassiti inducono l'espressione di enzimi che attivano la risposta infiammatoria, favorendo così la morte stessa del monogeneo. Diversi tipi di leucociti sono coinvolti nella regolazione delle funzioni

immunologiche nei pesci (Santhakumar *et al.*, 1999; Kritsky and Stephens, 2001) e questo studio si è focalizzato in particolare sulle MCs.

Le MCs sembrano essere presenti in tutti, o quasi, i teleostei, in vari tessuti e organi (fra cui canale alimentare, pelle, branchie) (Ezeasor and Stokoe, 1980; Ellis, 1985; Mazon *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2007; Dezfuli *et al.*, 2008a), soprattutto in regioni ad elevato rischio infiammatorio, dovuto a infezioni batteriche e parassitarie (Reimschuessel *et al.*, 1987; Sharp *et al.*, 1989; Dezfuli *et al.*, 2008a, b, 2009a, b). Si tratta di cellule mobili che sono state osservate spesso all'interno o nelle immediate vicinanze dei capillari (Vallejo and Ellis, 1989; Reite and Evensen, 2006). Vi sono prove della loro capacità migratoria nelle branchie di *Oncorhynchus mykiss* infettate da *Vibrio anguillarum* (Powell *et al.*, 1990). L'associazione delle MCs alle cellule endoteliali dei capillari suggerisce che esse possano migrare attraverso l'endotelio (Powell *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 2007). Le MCs si spostano inoltre attraverso la microcircolazione delle branchie, la quale permette una rapida diffusione nel tessuto branchiale (Powell *et al.*, 1990). In tutti i vertebrati le MCs sono strategicamente collocate in posizione perivascolare per regolare la risposta infiammatoria (Mekori, 2004) e questo suggerisce che le branchie siano fondamentali per il sistema immunitario innato, scatenando una risposta immediata verso i patogeni (Flaño *et al.*, 1996; Campos-Perez *et al.*, 2000).

Le MCs possono spostarsi attraverso il tessuto connettivo lasso degli archi branchiali e alcuni autori hanno ipotizzato la presenza di una popolazione residente (Noya and Lamas, 1997; Murray *et al.*, 2007) e di una circolante (Powell *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 2007; Dezfuli *et al.*, 2008a). Il grado di infiltrazione delle MCs (aumento del loro numero) viene tipicamente utilizzato per valutare se queste cellule siano coinvolte nella risposta dell'ospite (Dezfuli *et al.*, 2008a, 2009a, b). In questa ricerca il numero delle MCs positive per le piscidine 3 e 4 non aumentava nelle branchie parassitate da *D. aequans* rispetto a quelle dei sani, ma l'intensità della marcatura delle MCs era più forte nei parassitati (indipendentemente dall'intensità di infestazione e dalla vicinanza del parassita) rispetto agli esemplari sani. Anche se ulteriori indagini sono necessarie per confermare questi risultati, si può ipotizzare che la concentrazione delle piscidine nel tessuto parassitato aumenti, non per la proliferazione delle MCs, ma perché le MCs sono stimulate ad aumentare l'espressione/sintesi di questi peptidi antimicrobici (Dezfuli *et al.*, 2010b). Le variazioni nel numero delle MCs nel tessuto non sarebbero quindi sempre un buon metodo per valutare il coinvolgimento di queste cellule nella reazione infiammatoria.

Molte ricerche hanno dimostrato che, a seguito dell'esposizione a vari agenti stimolanti e patogeni, le MCs degranulano rilasciando il loro contenuto (Ellis, 1985; Sharp *et al.*, 1989; Vallejo and Ellis, 1989; Powell *et al.*, 1990; Flaño *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 2007; Dezfuli *et al.*, 2008b;

Manera *et al.*, 2011). Nel nostro studio non si è evidenziato rilascio di granuli delle MCs né nelle branchie sane né in quelle parassitate.

Le somiglianze funzionali tra le MCs dei pesci e quelle dei mammiferi hanno stimolato gli studi volti a scoprire il contenuto dei granuli delle MCs dei pesci. Le MCs dei mammiferi sono molto eterogenee e comprendono popolazioni che si diversificano tra loro per caratteristiche istochimiche, biochimiche e funzionali (Welle, 1997; Corrales *et al.*, 2009). Nei pesci questa eterogeneità è stata descritta da Mulero *et al.* (2008a).

Recentemente si è scoperto che l'istamina è presente nei granuli delle MCs dei pesci perciformi, il più grande e più evoluto ordine di teleostei (Mulero *et al.*, 2007), e che essa regola la risposta infiammatoria (Noya and Lamas, 1997). Diversi lavori hanno documentato che le MCs delle branchie e dell'intestino producono peptidi antimicrobici, come le pleurocidine (Secombes, 1996; Murray *et al.*, 2007) e le piscidine (Silphaduang and Noga, 2001; Noga and Silphaduang, 2003; Silphaduang *et al.*, 2006), e questo fa ipotizzare che le MCs siano direttamente coinvolte nell'uccisione dei microbi. Silphaduang *et al.* (2006), hanno suggerito che, se i granuli non vengono rilasciati dalle MCs tramite il fenomeno della degranolazione, le piscidine in essi contenute potrebbero agire a livello intracellulare sui microbi fagocitati. Secondo quanto riportato da Murray *et al.* (2007), le MCs potrebbero essere direttamente coinvolte nella distruzione dei patogeni e svolgere un ruolo multifunzionale nell'immunità dei teleostei.

## **8.2 *Sparus aurata-Ergasilus lizae***

La principale ragione del rapido sviluppo dell'acquacoltura è che circa il 40% del pesce che viene consumato proviene dagli allevamenti (Naylor and Burke, 2005). Una conseguenza della grande espansione dell'itticoltura è l'aumento del rischio di diffusione di malattie parassitarie tra gli allevamenti e l'ambiente naturale (Naylor *et al.*, 2000; Guo and Woo, 2009). I più comuni ectoparassiti marini dei pesci sono i copepodi (Costello, 2006), i quali possono influire su comportamento, riproduzione, crescita, nutrizione (Manera and Dezfuli, 2003; Pino-Marambio *et al.*, 2007; Palacios-Fuentes *et al.*, 2012) e sopravvivenza dell'ospite (Loot *et al.*, 2004).

Le branchie sono tra i primi distretti esposti all'ambiente esterno e perciò è essenziale per il pesce che questi organi siano forniti di un'efficiente difesa immunitaria (Murray *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2010). L'ancoraggio dei parassiti copepodi alle branchie provoca infiammazione, iperplasia e infiltrazione di cellule immunitarie (Roubal, 1999; Manera and Dezfuli, 2003; Covello *et al.*, 2009; Andrews *et al.*, 2010). Le lamelle parassitate risultano spesso così compromesse da portare alla morte dell'ospite (Benetti *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2009).



Frequentemente questi parassiti sono responsabili di grandi perdite economiche (Johnson *et al.*, 2004; Antonelli *et al.*, 2012; Palacios-Fuentes *et al.*, 2012).

Nella nostra area di studio in questi anni si è registrato un basso tasso di mortalità (~2%) delle giovani orate dovuto a *Ergasilus lizae* (Dezfuli dati non pubblicati) nel periodo autunnale, ma nel periodo estivo esso è salito fino a ~5-8%. Le perdite economiche, dovute a questo copepode, derivano principalmente dai costi di trattamento, dall'attuazione di strategie di gestione, dal ridotto tasso di crescita dei pesci e dalla degradazione dell'acqua per la presenza delle carcasse.

Grazie alla sua importanza commerciale, l'orata è diventata una delle specie più allevate nel Mediterraneo (FAO, 2010) e questo ha portato a un aumento dell'interesse verso la sua biologia. Le indagini sulla risposta immunitaria dei pesci d'allevamento possono migliorare le strategie di gestione in caso di parassitosi ed anche aiutare a prevenire le malattie, potenziando i meccanismi di difesa dei pesci (Whyte, 2007; Henry *et al.*, 2009). Negli ultimi anni molte pubblicazioni hanno approfondito differenti aspetti del sistema immunitario dell'orata (Cabas *et al.*, 2012; Cammarata *et al.*, 2012; Cerezuela *et al.*, 2012; Dezfuli *et al.*, 2012a; Lauriano *et al.*, 2012).

Le superfici epiteliali dell'intestino, della cute e delle branchie rappresentano un'ampia area disponibile per l'entrata e l'eventuale invasione di parassiti nei pesci; le branchie in particolare sono la principale via d'ingresso per i patogeni a seguito di un danno all'epitelio (Palzenberger and Pohla, 1992). L'ancoraggio dei parassiti alle branchie ha come conseguenze infiammazione, infiltrazione e iperplasia di RCs, cellule mucose e MCs (Bennet and Bennet, 1994, 2001; Roubal, 1999; Covello *et al.*, 2009; Andrews *et al.*, 2010; Corrales *et al.*, 2010). Nelle lamelle branchiali di orata parassitate da *E. lizae* erano presenti molte RCs, analogamente a quanto documentato nelle branchie infestate di *Abramis brama* (Dezfuli *et al.*, 2003), *Dicentrarchus labrax* (Dezfuli *et al.*, 2007) e *Latris lineata* (Andrews *et al.*, 2010). Le RCs, esclusive dei pesci, rappresentano una tipologia di cellule infiammatorie strettamente legata ad altre cellule immunitarie (Dezfuli *et al.*, 2000; Reite, 2005; Vigliano *et al.*, 2009; Matisz *et al.*, 2010; De Pasquale, 2012a, b). L'associazione tra presenza di parassiti e proliferazione delle RCs negli organi infestati è stata spesso riportata (Leino, 1979; Reite, 2005; Dezfuli *et al.*, 2007; Vigliano *et al.*, 2009; Andrews *et al.*, 2010; Matisz *et al.*, 2010).

L'immunità innata dei vertebrati si avvale di differenti tipi di cellule, e uno dei più comuni è quello delle MCs (Murray *et al.*, 2003). Nell'orata le MCs sono state documentate all'interno e/o nelle vicinanze della rete vascolare e immerse nel tessuto connettivo lasso degli archi branchiali. La stretta associazione di queste cellule con le cellule endoteliali fa ipotizzare che siano in grado di migrare attraverso l'endotelio (Powell *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 2007). Per quanto riguarda la

degranulazione, nel corso di questa ricerca non sono state documentate MCs nell'atto di degranulare, ma è stata registrata la presenza di granuli liberi nello spazio extracellulare.

La presenza di piscidine è stata segnalata nelle branchie di pesci parassitati da protozoi (Colorni *et al.*, 2008), monogenei (Dezfuli *et al.*, 2010b) e copepodi (Andrews *et al.*, 2010). Questo studio su *S. aurata* ha documentato un numero maggiore di MCs positive alla piscidina 3 nelle branchie di esemplari con un'elevata intensità di infestazione rispetto sia alle branchie poco infestate sia a quelle sane, in tutti i distretti esaminati (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare). Nelle branchie sane di *Latris lineata* le MCs erano assenti, mentre erano numerose, e molte di esse positive alla piscidina 3, nelle branchie parassitate dal copepode *Chondracanthus goldsmidi* (Andrews *et al.*, 2010). In linea con quanto ipotizzato da Andrews *et al.* (2010), sul sistema ospite-parassita *L. lineata*-*C. goldsmidi*, l'abbondanza di MCs esprimenti la piscidina 3 nelle branchie di orate infestate da *E. lizae* potrebbe essere una risposta immunitaria alla presenza dell'ectoparassita in sé e/o la reazione all'invasione da parte di altri patogeni, favorita dall'azione distruttrice esercitata dal copepode nelle lamelle. Nelle branchie molto parassitate le MCs del distretto del tessuto extravascolare presentavano una marcatura alla piscidina 3 più intensa rispetto a quella nelle orate sane. Analogamente, nelle branchie di *Dicentrarchus labrax* con *D. aequans*, l'analisi dell'intensità della marcatura indica una più alta espressione della piscidina 3 nelle MCs delle branchie infestate dal monogeneo (Dezfuli *et al.*, 2010b).

La prima linea di difesa dell'ospite contro un organismo patogeno è l'immunità innata (Fearon, 1997; Beutler, 2004; Magnadóttir, 2006), la quale a sua volta è in grado di attivare l'immunità adattativa per montare così una più specifica risposta (Dixon and Stet, 2001). Tra le cellule dell'immunità innata che si attivano in caso di infiammazione vi sono, oltre alle già citate MCs (Murray *et al.*, 2003), i fagociti (Secombes, 1996). Nei mammiferi è noto che le principali cellule fagocitiche sono i neutrofili e i monociti (Smits *et al.*, 1997). Nei pesci, studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la fagocitosi è attuata principalmente dai monociti/macrofagi e dai granulociti (Secombes, 1996), sebbene non sia del tutto chiaro quale tipo cellulare eserciti questa attività nelle diverse specie, essendoci una grande eterogeneità morfologica dei granulociti nei teleostei (Sepulcre *et al.*, 2002). Nell'orate si è visto che i granulociti acidofili (AGs) mostrano attività fagocitaria (López-Ruiz *et al.*, 1992; Meseguer *et al.*, 1993, 1994; Esteban *et al.*, 1998; Sepulcre *et al.*, 2002, 2007; Chaves-Pozo *et al.*, 2005; Mulero *et al.*, 2008b). Tali cellule sono considerate l'equivalente dei neutrofili dei vertebrati superiori per le seguenti ragioni: sono i granulociti più presenti nel torrente sanguigno e accorrono prontamente (dal rene cefalico) al sito d'infestazione (Meseguer *et al.*, 1993, 1994; Chaves-Pozo *et al.*, 2005); la loro principale funzione è

la fagocitosi dei batteri (Sepulcre *et al.*, 2002); sono coinvolte nella regolazione della risposta infiammatoria dell'ospite e sono in grado di produrre interleuchina-1 $\beta$  dopo attivazione *in vitro* (Sepulcre *et al.*, 2007) e a seguito di infezione batterica *in vivo* (Mulero *et al.*, 2008a). Recentemente Mulero e i suoi collaboratori (2008a) hanno scoperto che gli AGs del rene, dell'intestino, delle branchie e della cute di orata contengono piscidine e che possono essere attivati dall'istamina presente nei granuli delle MCs (Mulero *et al.*, 2007). Le sezioni di cute di orata trattate con l'anticorpo G7, specifico per gli AGs, mostrano che gli AGs sono reclutati e attivati in presenza dell'LCD virus (Dezfuli *et al.*, 2012a). In questo studio l'uso dell'anticorpo G7 nelle branchie di orata ha evidenziato che gli AGs sono più numerosi negli esemplari infestati da *E. lizae* che in quelli sani; la maggiore abbondanza di AGs nelle branchie parassitate è stata riscontrata in tutti i distretti esaminati ovvero seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura circa l'abbondante presenza degli AGs nel sistema vascolare (López-Ruiz *et al.*, 1992; Meseguer *et al.*, 1993, 1994; Chaves-Pozo *et al.*, 2005) e i nostri dati forniscono informazioni su una loro elevata presenza anche nel tessuto circostante i vasi stessi. Dezfuli *et al.* (2011a), riportano la presenza di numerosi granulociti contenenti la piscidina 3 nelle branchie di orate infestate da *E. lizae*, ma, senza l'anticorpo G7, non era stato possibile stabilire se le cellule positive fossero MCs o AGs. In questa ricerca, grazie ad una reazione immunoistochimica con due anticorpi, sono stati chiaramente distinti gli AGs (G7<sup>+</sup>/istamina<sup>-</sup>) dalle MCs (G7<sup>-</sup>/istamina<sup>+</sup>) (Sepulcre *et al.*, 2002; Mulero *et al.*, 2007; questo studio), verificando che gli AGs e non le MCs aumentavano di numero nelle branchie parassitate. Anche nella cute di orate affette da LCDV gli AGs sembrano giocare un ruolo cruciale, visto che erano presenti solo loro e non MCs (Dezfuli *et al.*, 2012a). Sebbene questi risultati indichino inequivocabilmente il coinvolgimento degli AGs contro le malattie parassitarie, sono necessarie ulteriori indagini per scoprire lo specifico ruolo svolto da AGs e MCs nelle differenti patologie.

### **8.3 Sparus aurata-lymphocystis disease virus**

La linfocisti è, di solito, una patologia auto-limitante (cioè generalmente tende a regredire spontaneamente nel tempo) e i pesci recuperano la salute dopo alcune settimane (Roberts, 1976; Paperna *et al.*, 1982; Gonzalez de Canales *et al.*, 1996). Talvolta però questo non accade e, come nel caso di *Paralichthys olivaceus*, si può arrivare a un 90% di mortalità (Harikrishnan *et al.*, 2010). I pesci trattati con Jenoclean (antimicrobico) presentavano una minore mortalità ma ciò era probabilmente legato al controllo delle infezioni microbiche secondarie (Harikrishnan *et al.*, 2010). Il tegumento rappresenta uno dei primi siti di attacco e replicazione di virus in pesci con un sistema

immunitario indebolito, e al contrario negli esemplari forti e sani quest'organo agisce come valida barriera alle infezioni (Dorson and Torchy, 1993). In condizioni normali, ovvero in assenza di agenti di stress, il pesce mantiene uno stato di salute difendendo se stesso da potenziali invasori grazie a un complesso sistema di meccanismi innati di difesa (Ellis, 2001).

Questa ricerca si è focalizzata sulla reazione cellulare della cute di orata *S. aurata* in presenza dell'LCD virus, ottenendo dati nuovi rispetto a quanto riportato in letteratura ed ampliando le conoscenze sulla risposta immunitaria contro tale tipo di virus. Diversi studi sulla risposta immunitaria contro l'LCD virus in *Pleuronectes platessa* (Roberts, 1976), in *Sciaenops ocellatus* (Colomi and Diamant, 1995) e in *Sebastes schlegeli* (Sheng *et al.*, 2007) descrivono la proliferazione di macrofagi e cellule epitelioidei attorno alle linfocisti. Nel nostro studio nel tessuto circostante le linfocisti sono state documentate cellule granulari che, in quanto negative all'istamina e positive all'anticorpo G7, sono state identificate come AGs (Mulero *et al.*, 2007), solo pochi dei quali contenevano interleuchina-1 $\beta$ . Analogamente, un modesto numero di AGs positivi all'anticorpo per l'interleuchina-1 $\beta$  sono stati trovati in orate infettate da *Vibrio anguillarum* (Mulero *et al.*, 2008b). La possibile spiegazione di questi risultati è che questa proteina viene rilasciata molto rapidamente dopo la sua produzione (Olavarria *et al.*, 2010). Si ipotizza che gli AGs siano coinvolti nella regolazione dell'infiammazione attraverso la produzione di interleuchina-1 $\beta$  in seguito ad attivazione dopo un'infezione (Sepulcre *et al.*, 2007; Mulero *et al.*, 2008a). Sepulcre *et al.* (2002) riportano l'abbondanza di AGs nei tessuti di orata e la loro capacità di fagocitare le cellule batteriche di *Vibrio anguillarum*.

In questo studio gli AGs sono stati documentati vicino e/o all'interno dei capillari. La stretta associazione con la rete vascolare può indicare che queste cellule siano capaci di migrare attraverso i vasi sanguigni e portarsi nella cute infiammata.

Come menzionato sopra, le piscidine sono state trovate nelle MCs di diverse specie di pesci (Silphaduang and Noga, 2001; Lauth *et al.*, 2002; Patrzykat *et al.*, 2003; Silphaduang *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007; Corrales *et al.*, 2010; Dezfuli *et al.*, 2010b; Noga *et al.*, 2011; Salger *et al.*, 2011) e negli AGs di orata (Mulero *et al.*, 2008a). La piscidina 3 viene liberata nei fagosomi degli AGs contenenti cellule batteriche, ad indicare che questi peptidi antimicrobici hanno un duplice meccanismo di uccisione dei batteri: per via intracellulare e per via extracellulare (Mulero *et al.*, 2008a). Fino ad ora non era mai stata documentata la degranolazione degli AGs, ma nella cute delle orate affette dal virus si sono osservati AGs che degranulavano, sia all'esterno sia all'interno dei capillari in prossimità delle linfocisti (Dezfuli *et al.*, 2012a). La degranolazione, la dotazione in piscidina 3, che ha note proprietà anti-virali (Chinchar *et al.*, 2004) e la produzione di interleuchina-1 $\beta$  suggeriscono che gli AGs vengano attivati dall'LCDV e siano direttamente coinvolti nella

risposta anti-virale. Molti AMPs presentano un'attività anti-virale più forte nel caso di virus incapsulati come l'herpesvirus, mentre la loro efficacia diminuisce nei confronti di virus non incapsulati (Chinchar *et al.*, 2004). Dato che l'iridovirus responsabile della LCDV è del tipo non incapsulato, rimane da stabilire se le piscidine siano effettivamente tossiche per questo patogeno oppure se le cellule immunitarie mirino ad attaccare le cellule infette, riconosciute come estranee, e non ad inattivare il virus. In alcune sezioni di cute infetta è stata effettivamente notata la presenza di cellule necrotiche che deporrebbe a favore della seconda ipotesi. Rimane, inoltre, da capire se la degranolazione e il rilascio di interleuchina-1 $\beta$  contribuiscano all'uccisione del virus o alla formazione delle lesioni stesse. In ogni caso, i dati raccolti aprono la strada a nuove importanti indagini sul ruolo di questi granulociti nella risposta anti-virale nei pesci.

Nei mammiferi i neutrofili sono in grado di rilasciare i propri granuli nell'ambiente extracellulare (Lacy and Eitzen, 2008), dove giocano un ruolo essenziale nell'uccisione dei batteri e nel reclutamento e attivazione di macrofagi e cellule dendritiche (Soehnlein *et al.*, 2009). Non si sa ancora se quest'associazione tra AGs e macrofagi ci sia anche nell'orata; questo sarebbe un ulteriore argomento da approfondire per capire come si coordinano i diversi tipi di cellule immunitarie in caso di infezioni.

#### **8.4 *Perca fluviatilis*-*Acanthocephalus lucii***

Gli elminti intestinali sono generalmente responsabili di modificazioni morfologiche del tratto digestivo dell'ospite, e di conseguenza possono alterare la normale funzionalità del canale alimentare (Hoste, 2001). Le diverse specie di acantocefali causano danni all'intestino la cui gravità dipende, oltre che dall'intensità di infestazione, da quanto profondamente viene infissa la proboscide (Taraschewski, 2000; Dezfuli *et al.*, 2009a, b). L'istopatologia del tratto intestinale parassitato da acantocefali è stata oggetto di varie pubblicazioni (Taraschewski, 2000; Bosi *et al.*, 2005; Dezfuli *et al.*, 2007, 2008a, b, 2009a, b, 2010a, 2011b, 2012b). Questi parassiti inducono nel canale alimentare un'inflammazione, che uno dei più primitivi tra i meccanismi di difesa (Reichlin, 1999). Nei teleostei il reclutamento delle cellule durante la risposta infiammatoria è descritto come bifasico: in un primo momento si assiste a un'infiltrazione da parte dei neutrofili, cui segue l'arrivo di monociti/macrofagi (Reite and Evensen, 2006).

In diverse parti d'Europa, il persico, *Perca fluviatilis*, è una specie di grande importanza per la pesca e l'economia locale (Eckmann *et al.*, 2006). I principali danni causati da *Acanthocephalus lucii* al tratto intestinale del persico consistono nella distruzione dell'epitelio che ricopre i villi circostanti al sito di ancoraggio del parassita e nelle conseguenti degenerazione e necrosi del tessuto.

Le sezioni di intestino trattate con gli anticorpi anti-piscidine 3 e 4 hanno rivelato la presenza di MCs positive tra le cellule epiteliali e nello strato sottomucoso.

Fino ad ora nel tratto intestinale è stata documentata la presenza delle piscidine 3 e 4 in diverse specie di pesci perciformi (Silphaduang *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2008a; Corrales *et al.*, 2010). Questa è la prima segnalazione sulla presenza delle piscidine nel persico e sul confronto fra le due piscidine sia negli intestini sani sia in quelli parassitati.

Sia negli intestini sani sia in quelli parassitati le cellule contenenti la piscidina 4 sono risultate sempre più numerose rispetto a quelle contenenti la piscidina 3. Per la piscidina 4 si è registrata una differenza significativa nel numero di cellule marcate tra sani e parassitati nello strato epiteliale. Nell'analisi di intensità di marcatura, per entrambe le piscidine le MCs degli intestini sani hanno mostrato un segnale più forte rispetto a quelle degli intestini parassitati, e nessun cambiamento di intensità è stato notato tra i due strati, epiteliale e sottomucoso. Questi ultimi risultati sono in disaccordo con ciò che riportata Silphaduang *et al.* (2006), i quali hanno trovato una diversa immunoreattività tra gli strati epiteliali più superficiali, di branchie e intestino, e quelli sottostanti più profondi. Tale differenza è spiegata come una diversa differenziazione del contenuto granulare delle MCs oppure come una maggiore induzione a degranulare nelle vicinanze della superficie (Silphaduang *et al.*, 2006).

Questo studio fornisce le prime informazioni riguardo alla presenza delle piscidine nell'apparato intestinale di un pesce parassitato da acantocefali, e documenta un diverso coinvolgimento delle MCs contenenti le piscidine nell'intestino con elminti rispetto alle branchie con ectoparassiti.

## 9) CONCLUSIONI

Gli stress cronici possono portare a una sottoregolazione dell'espressione dei peptidi antimicrobici (AMPs) come il lisozima (Mock and Peters, 1990) o l'HLP-1 (Robinette and Noga, 2001). Il meccanismo responsabile della diminuzione nella produzione di AMPs in relazione allo stress sembra essere ormone-mediato. Uno stress acuto, invece, porta a una sovraespressione degli AMPs, come nel caso di cecropina (Hultmark *et al.*, 1982), parasina I (Cho *et al.*, 2002), epcidina (Bao *et al.*, 2005) o BPI (Xu *et al.*, 2005). Corrales *et al.* (2009) hanno quantificato l'espressione della piscidina 4 nel tessuto branchiale di un moronide ibrido sottoposto a differenti tipi di stress, come la privazione di cibo e la parassitosi da protozoi, evidenziando una sottoregolazione dei livelli di P4. Quando il pesce si trova in situazioni di stress le sue difese immunitarie si abbassano e, conseguentemente, diminuisce la sua resistenza alle malattie (Wedemeyer, 1996; Weyts *et al.*, 1999).

In questo studio sulle branchie di *Dicentrarchus labrax*, le MCs positive alle piscidine 3 e 4 sintetizzavano una maggior quantità di questi peptidi in presenza di metazoi, e questo indipendentemente dal numero di parassiti o dalla vicinanza a essi. Negli esemplari di *Sparus aurata* molto parassitati il numero delle cellule positive alla piscidina 3 era più alto rispetto sia a quelli poco parassitati sia a quelli sani in tutti i distretti tissutali indagati (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare), indipendentemente dalla vicinanza del parassita. Nel tessuto extravascolare, inoltre, l'intensità della marcatura era più forte nei pesci molto parassitati rispetto sia ai poco parassitati sia ai sani. Questi risultati indicano che nei branzini e nelle orate con gli ectoparassiti si assiste a una sovraespressione delle piscidine per l'aumento o delle cellule che le esprimono o della loro produzione, confermando quanto riportato in letteratura per altri AMPs in pesci soggetti a stress acuti (Hultmark *et al.*, 1982; Cho *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005).

L'indagine sull'intestino di *Perca fluviatilis* ha mostrato che l'intensità della marcatura per entrambe le piscidine (P3 e P4) era più forte nei pesci sani rispetto a quelli parassitati e che non vi erano differenze di abbondanza di MCs esprimenti le piscidine in presenza o assenza di elminti. Questi risultati, al contrario di quelli relativi alle branchie parassitate di *D. labrax* e *S. aurata*, indicherebbero negli esemplari infestati una sottoregolazione delle piscidine, come accade per altri AMPs in situazioni di stress cronici.

Per approfondire e confermare i dati sulla sotto- e sovra-espressione delle piscidine in tessuti sani e parassitati, è stata recentemente intrapresa ed è attualmente in corso una serie di analisi molecolari per quantificare questi peptidi tramite estrazione delle proteine ed immunoblotting.

L'insieme dei risultati ottenuti in questo progetto di ricerca ha fornito per la prima volta un quadro sul coinvolgimento delle MCs contenenti le piscidine 3 e 4 nella difesa contro macroparassiti (sia ecto- che endo-parassiti) e sul modo in cui queste cellule reagiscono in vari organi e in presenza di diversi parassiti (Platelminti, Acantocefali, Artropodi), permettendo la pubblicazione di 3 articoli *per extenso* su riviste internazionali (*Fish and Shellfish Immunology* e *Developmental and Comparative Immunology*) e di 3 presentazioni a congressi nazionali ed internazionali. In accordo con gli studi di esperti nel settore dell'immunologia dei pesci, questi dati supportano e fortificano l'ipotesi che le piscidine svolgano un ruolo importante nella difesa dei teleostei e confermano il ruolo delle MCs, e delle AGs nell'orata, quali effettori dell'immunità aspecifica (Silphaduang *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2008a, b; Noga *et al.*, 2011; Salger *et al.*, 2011).



## **10) ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI**

AMPs: Antimicrobial Peptides

MCs: Mast Cells

AGs: Acidophilic Granulocytes

LCDV: Lymphocystis Disease Virus

IHC: Immunohistochemistry

TBS: Tris Buffer Solution

DAB: Diaminobenzidina

D.S.: Deviazione Standard

TEM: Transmission Electron Microscope

RCs: Rodlet Cells

P3: Piscidina 3

P4: Piscidina 4

EGCs: Eosinophilic Granular Cells

## 11) RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare alcune persone che hanno permesso la realizzazione di questa tesi:

- Il Dott. Massimo Lorenzoni dell'Università di Perugia per la collaborazione e il signor Federico Bissoni del Consorzio Pescatori lago Piediluco per il campionamento dei persici;
- La Dott.ssa Samantha Squerzanti per l'aiuto in laboratorio;
- Il Dott. Giovanni Bernacchia e la Dott.ssa Morena De Bastiani per i preziosi suggerimenti e la collaborazione nell'indagine molecolare;
- I professori Edward Noga e Victoriano Mulero per averci fornito alcuni degli anticorpi utilizzati per questa ricerca;
- Paola Boldrini del Centro Microscopia dell'Università di Ferrara per l'assistenza al microscopio elettronico;
- Silvia Fabbri dell'allevamento Cà Zuliani per averci fornito i branzini e le orate.

Inoltre, particolari ringraziamenti vanno a:

- Famiglia e amici;
- Maurizio;
- Due persone che mi hanno dimostrato non solo di essere dei bravi ricercatori ma anche delle belle persone, in grado di dare sincera amicizia: Luisa e Bahram.

## 12) BIBLIOGRAFIA

- Al-Adhami, M.A. and Kunz, Y.W. (1976). Hemopoietic centers in the developing angelfish *Pterophyllum scalare* (Cuvier and Valenciennes). *Wilhelm Roux's Arch* 179:393-401.
- Alexander, J.B. and Ingram, G.A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Journal of Fish Disease* 2:249-279.
- Alvarez-Pellitero, P. (2004). Report about fish parasitic diseases. In: Alvarez-Pellitero P, Barja JL, Basurco B, Berthe F, Toranzo AE (eds) *Etudes et Recherches, Options Mediterranennes*. CIHEAM/ FAO, Zaragoza, pp 103–130.
- Alvarez-Pellitero, P., Crespo, S. (1995). Nuevos aspectos patologicos de la acuicultura mediterranea. In: *Actas del V congreso nacional de acuicultura*, 10–13 May 1995, San Carles de la Rapita, pp 86–97.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126:171–198.
- Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela, O. and Sitjà-Bobadilla, A. (2008). Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Mixozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitology International* 57: 110-120.
- Andrews, M., Battaglione, S., Cobcroft, J., Adams, M., Noga, E., and Nowak, B. (2010). Host response to the chondracanthid copepod *Chondracanthus goldsmidi*, a gill parasite of the striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster), in Tasmania. *Journal of Fish Diseases* 33:211–220.
- Antonelli, L., Quilichini, Y., Marchand, B. (2012). *Lernanthropus kroyeri* (Van Beneden and Hesse 1851) parasitic Copepoda (Siphonostomatoidae, Lernanthropidae) of European cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758) from Corsica: ecological and morphological study. *Parasitology Research* 110:1959-1968.
- Arms, K. and Camp, P.S. (1998). La difesa contro le malattie. In: *Biologia* (Ed. Piccin) Nuova Libreria S.p.A., Padova, pp. 738-756.
- Bao, B., Peatman, E., Li, P., He, C., and Liu, Z. (2005). Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection. *Developmental and Comparative Immunology* 29:939–950.
- Benetti, D.D., Leingang, A.J., Russo, R., Powell, T.M., Cleary, D., Grabe, S.W., Feeley, M.W., Stevens, O.M., and Main, K.L. (2001). Development of aquaculture methods for southern flounder, *Paralichthys lethostigma*: II. Nursery and Grow-out. *Journal of Applied Aquaculture* 11:135-46.

- Bennet, S.M., and Bennet, M.B. (1994). Pathology of attachment and vascular damage associated with larval stages of *Dissonus manteri* Kabata, 1966 (Copepoda: Dissonidae) on the gills of coral trout, *Plectropomus leopardus* (Lacépède) (Serranidae). *Journal of Fish Diseases* 17:447-60.
- Bennet, S.M., and Bennet, M.B. (2001). Gill pathology caused by infestation of adult and preadult *Dissonus manteri* Kabata (Copepoda: Dissonidae) on coral trout, *Plectropomus leopardus* (Lacépède), (Serranidae). *Journal of Fish Diseases* 24:523-33.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40:845-859.
- Bodammer, J.E. (1986). Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12:127-140
- Bosi, G., Arrighi, S., Di Giancamillo, A., and Domeneghini, C. (2005). Histochemistry of glycoconjugates in mucous cells of *Salmo trutta* uninfected and naturally parasitized with intestinal helminths. *Diseases of Aquatic Organisms* 64:45-51.
- Bowden TJ, Cook P, and Rombout JHWM. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology* 19:413-427.
- Buchmann, K. (1999). Immune mechanisms in fish skin against monogenean - a model. *Folia Parasitologica* 46:1-9.
- Buchmann, K., and Lindenstrøm, T. (2002). Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology* 32:309-19.
- Buchmann, K., Lindenstrøm, T., and Bresciani, J. (2004). Interactive associations between fish hosts and monogeneans. In: Wiegertjes GF, Flik G (eds) *Host-parasite interactions*. Garland/BIOS Scientific, Abingdon, pp 161-184.
- Cabas, I., Liarte, S., García-Alcázar, A., Meseguer, J., Mulero, V., and García-Ayala, A. (2012). 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol alters the immune response of the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) both *in vivo* and *in vitro*. *Developmental and Comparative Immunology* 36:547-556.
- Cammarata, M., Vazzana, M., Accardi, D., and Parrinello, N. (2012). Seabream (*Sparus aurata*) long-term dominant-subordinate interplay affects phagocytosis by peritoneal cavity cells. *Brain Behaviour and Immunity* 26:580-587.
- Campagna, S., Saint, N., Molle, G., and Aumelas, A. (2007). Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry* 46:1771-1778.
- Campos-Perez, J.J., Ward, M., Grabowski, P.S., Ellis, A.E., and Secombes, C.J. (2000). The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the Gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunology* 99:153-61.

- Cecchini, S., and Cognetti-Varriale, A.M. (2003). Dehydration is more effective for the control of embryonic development and larval hatching of *Diplectanum aequans* (Monogenea, Diplectanidae) than formalin and trichlorophon. *Aquaculture International* 11:261–265.
- Cerezuela, R., Guardiola, F.A., Meseguer, J., and Esteban, M.Á. (2012). Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. *Fish and Shellfish Immunology* 32:1032-1040.
- Chang, C.I., Zhang, Y.A., Zou, J., Nie, P., and Secombes, C.J. (2006). Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50:185-95.
- Chaves, I.S., Luvizzotto-Santos, R., Sampaio, L.A.N., Bianchini, A., and Martinez, P.E. (2006). Immune adaptive response induced by *Bicotylophora trachinoti* (Monogenea: Diclidophoridae) infestation in pompano *Trachinotus marginatus* (Perciformes: Carangidae). *Fish and Shellfish Immunology* 21:242-50.
- Chaves-Pozo, E., Muñoz, P., López-Muñoz, A., Pelegrín, P., García-Ayala, A., Mulero, V., and Meseguer, J. (2005). Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell and Tissue Research* 320:61–68.
- Chiarini-Garcia, H. and Pereira, F.M. (1999). A comparative study of lymph node mast cell populations in five marsupial species. *Tissue & Cell* 31:318-326.
- Chinchar, V.G., Bryan, L., Silphadaung, U., Noga, E., Wade, D., and Rollins-Smith, L. (2004). Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* 323:268-275.
- Chiu, H. and Lagunoff, D. (1972). Histochemical comparison of vertebrate mast cells. *Histochemical Journal*, 4:135-144.
- Cho, J.H., Park, I.Y., Kim, H.S., Lee, W.T., Kim, M.S., and Kim, S.C. (2002). Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB Journal* 16:429–431.
- Cole, A.M., Darouiche, R.O., Legarda, D., Connell, N., and Diamond, G. (2000). Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular location, and spectrum of activity. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44:2039-45.
- Colorni, A., and Diamant, A. (1995). Splenic and cardiac lymphocystis in the red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 18:467-471.

- Colorni, A., Ullal, A., Heinisch, G., and Noga, E.J. (2008). Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. *Journal of Fish Diseases* 31:423-432.
- Cone, D.K. (1995). Monogenea (Phylum Platyhelminthes). In: Woo PTK, editor. *Fish diseases and disorders: protozoan and metazoan infections*. Wallingford: CAB International. 289-327.
- Corrales, J., Gordon, W.L., and Noga, E.J. (2009). Development of an ELISA for quantification of the antimicrobial peptide piscidin 4 and its application to assess stress in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 27:154-63.
- Corrales, J., Mulero, I., Mulero, V., and Noga, E.J. (2010). Detection of antimicrobial peptides related to piscidin 4 in important aquacultured fish. *Developmental and Comparative Immunology* 34:331-343.
- Costello, M.J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology* 22:475-483.
- Covello, J.M., Bird, S., Morrison, R.N., Battaglione, S.C., Secombes, C.J., and Nowak, B.F. (2009). Cloning and expression analysis of three striped trumpeter (*Latris lineata*) pro-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL 8, in response to infection by the ectoparasitic, *Chondracathus goldsmidi*. *Fish and Shellfish Immunology* 26:773-786.
- Das, P.C., Ayyappan, S., and Jena, J.K. (2006). Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. *Aquaculture* 256: 80-87.
- De Pasquale, J.A. (2012a). Rodlet cells in epidermal explant cultures of *Lepomis macrochirus*. *Acta Zoologica*. Article published online 28 Nov 2012.
- De Pasquale, J.A. (2012b). Tyrosine phosphatase inhibitor triggers rodlet cell discharge in sunfish scale epidermis cultures. *Acta Zoologica*. Article published online 20 Dec 2012.
- Dezfuli, B.S., and Giari, L. (2008). Mast cells in the gills and intestines of naturally infected fish: evidence of migration and degranulation. *Journal of Fish Diseases* 31:845-52.
- Dezfuli, B.S., Simoni, E., Rossi, R., and Manera, M. (2000). Rodlet cells and other inflammatory cells of *Phoxinus phoxinus* infected with *Raphidascaris acus* (Nematoda). *Diseases of Aquatic Organisms* 43:61-9.
- Dezfuli, B.S., Giari, L., Konecny, R., Jaeger, P., and Manera, M. (2003). Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from lake Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). *Diseases of Aquatic Organisms* 53:257-262.
- Dezfuli, B.S., Giari, L., Simoni, E., Menegatti, R., Shinn, A.P., and Manera, M. (2007). Gill histopathology of cultured European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), infected with

- Diplectanum aequans* (Wagener 1857) Diesing 1958 (Diplectanidae: Monogenea). *Parasitology Research* 100:707-13.
- Dezfuli, B.S., Giovinazzo, G., Lui, A., and Giari, L. (2008a). Inflammatory response to *Dentitruncus truttae* (Acanthocephala) in the intestine of brown trout. *Fish and Shellfish Immunology* 24:726-33.
- Dezfuli, B.S., Lui, A., Boldrini, P., Pironi, F., and Giari, L. (2008b). The inflammatory response of fish to helminth parasites. *Parasite* 15:426-433.
- Dezfuli, B.S., Lui, A., Giovinazzo, G., Boldrini, P., and Giari, L. (2009a). Intestinal inflammatory response of powan *Coregonus lavaretus* (Pisces) to the presence of acanthocephalan infections. *Parasitology* 136:929-937.
- Dezfuli, B.S., Manera, M., and Giari, L. (2009b). Immune response to nematode larvae in the liver and pancreas of minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.) *Journal of Fish Diseases* 32:383-90.
- Dezfuli, B.S., Pironi, F., Campisi, M., Shinn, A.P., and Giari, L. (2010a). The response of intestinal mucous cells to the presence of enteric helminths: their distribution, histochemistry and fine structure. *Journal of Fish Diseases* 33:481-8.
- Dezfuli, B.S., Pironi, F., Giari, L., and Noga, E.J. (2010b). Immunocytochemical localization of piscidin in mast cells of infected seabass gill. *Fish and Shellfish Immunology* 28:476– 482.
- Dezfuli, B.S., Giari, L., Lui, A., Lorenzoni, M., and Noga, E.J. (2011a). Mast cell responses to *Ergasilus* (Copepoda), a gill ectoparasite of sea bream. *Fish and Shellfish Immunology* 30:1087-94.
- Dezfuli, B.S., Castaldelli, G., Bo, T., Lorenzoni, M., and Giari, L. (2011b). Intestinal immune response of sheatfish *Silurus glanis* and barbel *Barbus barbus* naturally infected with *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Parasite Immunology* 33:116-123.
- Dezfuli, B.S., Lui, A., Giari, L., Castaldelli, G., Mulero, V., and Noga, E.J. (2012a). Infiltration and activation of acidophilic granulocytes in skin lesions of gilthead seabream, *Sparus aurata*, naturally infected with lymphocystis disease virus. *Developmental and Comparative Immunology* 36:174-182.
- Dezfuli, B.S., Giari, L., Lui, A., Squerzanti, S., Castaldelli, G., Shinn, A.P., Manera, M., and Lorenzoni, M. (2012b). Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression in the intestine of *Salmo trutta trutta* naturally infected with an acanthocephalan. *Parasites & Vectors* 5:198.
- Dixon, B., and Stet, R.J.M. (2001). The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25:683-699.

- Doggett, T.A. and Harris, J.E. (1991). Morphology of the gut-associated lymphoid tissue in *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption. *Fish & Shellfish Immunology* 1:213-228.
- Dorson, M., and Torchy, C. (1993). Viral haemorrhagic septicaemia virus replication in external tissues excised from rainbow trout and hybrids of different susceptibilities. *Journal of Fish Diseases* 16:403–408.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Liebscher, R.S., Dacanay, A., and Tsoi, S.C.M. (2003). Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Developmental and Comparative Immunology* 27:589-601.
- Eckmann, R., Gerster, S., and Kraemer, A. (2006). Yields of European perch from Upper Lake Constance from 1910 to present. *Fisheries Management & Ecology* 13:381-390.
- Ehrlich P. (1878). Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Dissertation at Leipzig University.
- Ellis, A.E. (1985). Eosinophilic granular cells (EGC) and histamine responses to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology* 9: 251-60.
- Ellis, A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25:827-839.
- Ellis, A.E. and de Sousa, M. (1974). Phylogeny of the lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *European Journal of Immunology* 4: 338-343.
- Esteban, M., Mulero, V., Muñoz, J., and Meseguer, J. (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 293:133-141.
- Ezeasor, D.N., and Stokoe, W.M. (1980). A cytochemical, light and electron microscopic study of the eosinophilic granule cells in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 17:619-34.
- Faliex, E., Da Silva, C., Simon, G., and Sasal, P. (2008). Dynamic expression of immune response genes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, experimentally infected with the monogenean *Diplectanum aequans*. *Fish and Shellfish Immunology* 24:759-67.
- FAO (2010). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome.
- Fearon, D.T. (1997). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 388:323-324.
- Ferguson, H.W. (1989). Systemic pathology of fishes. Iowa State University Press, Ames.
- Fernandes, J.M.O., Ruangsri, J., and Kiron, V. (2010). Atlantic cod piscidin and its diversification through positive selection. *PLoS ONE* 5(3):9501.



- Flajnik, M.F., and Du Pasquier, L. (2004). Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology* 25: 640-644.
- Flaño, E., Lopez-Fierro, P., Razquin, B.E., and Villena, A. (1996). In vitro differentiation of eosinophilic granular cells in *Renibacterium salmoninarum*-infected gill cultures from rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* 6:173-84.
- Fritz, J.H., Le Bourhis, L., Magalhaes, J.G. and Philpott, D.J. (2007). Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends in Immunology* 29: 41-49.
- Galli, S.J. (1990). New insights into “The riddle of the mast cells”: Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Laboratory Investigation* 62: 5-33.
- González de Canales, M.L., Muñoz-Cueto, J.A., Arellano, J.M., García-García, A., and Sarasquete, C. (1996). Histological and histochemical characteristics of the lymphocystis disease in *Sparus aurata* L.. *European Journal of Histochemistry* 40:143–152.
- González-Lanza, C., Alvarez-Pellitero, P., and Sitja-Bobadilla, A. (1991). Diplectanidae (Monogenea) infestations of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish Mediterranean area. Histopathology and population dynamics under culture conditions. *Parasitology Research* 77:307-14.
- Grau, A., Crespo, S., Pastor, E., González, P., and Carbonell, E. (2003). High infection by *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) associated with mass mortalities of amberjack *Seriola dumerili* Risso reared in sea cages in the Balearic Islands (western Mediterranean). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 23:139-142.
- Guo, F.C., and Woo, P.T. (2009). Selected parasitosis in cultured and wild fish. *Veterinary Parasitology* 163:207-16.
- Hamers, R. L., Jens Sturenberg, F. J. and Taraschewski, H. (1992). In vitro study of the migratory and adherent responses of fish leucocytes to the eel-pathogenic acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus* (Van Cleave, 1921) Bullock et Samuel, 1975 (Eoacanthocephala: Tenuisentidae). *Fish and Shellfish Immunology* 2: 43-51.
- Hancock, R.E., and Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:8856-61.
- Harikrishnan, R., Kim, M.C., Kim, J.S., Balasundaram, C., and Heo, M.S. (2010). Immune enhancement of chemotherapeutants on lymphocystis disease virus (LDV) infected *Paralichthys olivaceus*. *Fish and Shellfish Immunology* 29:862–867.
- Hart, S., Wrathmell, A.B., Harris, J.E. and Grayson, T.H. (1988). Gut immunology in fish: A review. *Developmental and Comparative Immunology* 17:241-248.

- Hayward, C.J. (1996). Revision of diplectanid monogeneans (Monopisthocotylea, Diplectanidae) in sillaginid fishes, with a description of a new species of *Monoplectanum*. *Zoologica Scripta* 25(3):203-213.
- Hayward, C.J., Kim, J.H., and Heo, G.J. (2001). Spread of *Neoheterobothrium hirame* (Monogenea), a serious pest of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, to Korea. *Diseases of Aquatic Organisms* 45:209-213.
- Henry, M.A., Alexis, M.N., Fountoulaki, E., Nengas, I., and Rigos, G. (2009). Effects of a natural parasitological infection (*Lernanthropus kroyeri*) on the immune system of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Parasite Immunology* 31:729-740.
- Hoste, H. (2001). Adaptive physiological process in the host during gastrointestinal parasitism. *International Journal for Parasitology* 31:231-244.
- Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Kapur, R., and Boman, H. (1982). Insect immunity: isolation and structure of Cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. *European Journal of Biochemistry* 127:207-217.
- Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Muratami, T. and Nakai, T. (2003). Purification and characterization of three isoforms of chrysophrin, a novel antimicrobial peptide in the gills of red sea bream, *Chrysophrys major*. *European Journal of Biochemistry* 270:675-86.
- Janeway, C.A. and Medzhitov, J.R. (2002). Innate immune recognition. *Review of Immunology* 20:197-216.
- Jia, X., Patrzykat, A., Devlin, R. H., Ackerman, P. A., Iwama, G. K. and Hancock, R. E. W. (2000). Antimicrobial Peptides Protect Coho Salmon from *Vibrio anguillarum* Infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1928-1932.
- Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K., and Kabata, Z. (2004). A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies* 43:229-43.
- Jones, S.R.M. (2001). The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasite in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25:841-52.
- Jónsdóttir, H., Bron, J.E., Wootten, R., and Turnbull, J.F. (1992). The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 15:521-7.
- Kondejewski, L.H., Jelokhani-Niaraki, M., Farmer, S.W., Lix, B., Kay, C.M., Sykes, B.D., Hancock, R.E. and Hodges, R.S. (1999). *Journal of Biological Chemistry*, 274:3181-3192.
- Kritsky, D.C., and Stephens, F.J. (2001). *Haliotrema abaddon* n. sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) from the gills of wild and marine cultured West Australian dhufish *Glaucosoma hebraicum* (Teleostei: Glaucosomatidae), in Australia. *Journal of Parasitology* 87:749-754.

- Lacy, P., and Eitzen, G. (2008). Control of granule exocytosis in neutrophils. *Frontiers in Bioscience* 13:5559-5570.
- Lauriano, E.R., Calò, M., Silvestri, G., Zaccone, D., Pergolizzi, S., and Lo Cascio, P. (2012). Mast cells in the intestine and gills of the sea bream, *Sparus aurata*, exposed to a polychlorinated biphenyl, PCB 126. *Acta Histochemica* 114:166-171.
- Lauth, X., Shike, H., Burns, J.C., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., van Olst, J.C., Nizet, V., Taylor, S.W., Shimizu, C., and Bulet, P. (2002). Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *Journal of Biological Chemistry* 277:5030-5039.
- Lee, S.A., Kim, Y.K., Lim, S.S., Zhu, W.L., Ko, H., Shin, S.Y., Hahm, K.S., and Kim, Y. (2007). Solution structure and cell selectivity of piscidin 1 and its analogues. *Biochemistry* 46:3653-3663.
- Leino, R.L. (1979). The effects of periodic acid-silver methenamine staining and protease digestion on the secretory granules of rodlet cells. In: Bailey GW, editor. Thirty-seventh annual meeting of the electron microscopy society of America, Baton Rouge, LA; pp. 310-1.
- Ligeon, C., Jolly, C., Crews, J., Morley, Z., and Dunham, R., (2000). The US catfish industry in the new century. *Aquaculture* 39-43.
- Lin, C.L., and Ho, J.S. (1998). Two species of Caligidae (Copepoda) parasitic on cultured in Taiwan. *Journal of Natural History* 31:1483-500.
- Lindenstrøm, T., Buchmann, K., and Secombes, C.J. (2003). *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1b expression in rainbow trout skin. *Fish and Shellfish Immunology* 15:107-15.
- Loot, G., Poulet, N., Reyjol, Y., Blanchet, S., and Lek, S. (2004). The effects of the ectoparasites *Tracheliastes polycolpus* (Copepoda: Lernaeopodidae) on the fins of rostrum dace (*Leuciscus leuciscus burdigalensis*). *Parasitology Research* 94:16-23.
- López-Ruiz, A., Esteban, M.A., and Meseguer, J. (1992). Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Anatomical Records* 234:161-171.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20:137-151.
- Manera, M., and Dezfuli, B.S. (2003). *Lernanthropus kroyeri* infections in farmed sea bass *Dicentrarchus labrax*: pathological features. *Diseases of Aquatic Organisms* 57:177-180.
- Manera, M., Giammarino, A., Borreca, C., Giari, L., and Dezfuli, B.S. (2011). Degranulation of mast cells due to compound 48/80 induces concentration-dependent intestinal contraction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) ex vivo. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 315:447-457.

- Mansell, B., Powell, M.D., Ernst, I., and Nowak, B.F. (2005). Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *Journal of Fish Diseases* 28:253-262.
- Matisz, C.E., Goater, C.P., and Bray, D. (2010). Density and maturation of rodlet cells in brain tissue of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to trematode cercariae. *International Journal for Parasitology* 40:307-312.
- Matsuyama, T. and Iida, T. (2002). Tilapia mast cell lysate on vascular permeability. *Fish & Shellfish Immunology* 13:243-250.
- Mazon, A.F., Huising, M.O., Taverne-Thiele, A.J., Bastiaans, J., and Verburg-van Kemenade, B.M.L. (2007). The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. *Fish and Shellfish Immunology* 22:27-37.
- McGuinness, D.H., Dehal, P.K., and Pleass, R.J. (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends in Parasitology* 15:312-319.
- Medzhitov, J.R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
- Medzhitov, J.R. and Janeway, C.A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.
- Mekori, Y.A. (2004). The mastocyte: the “other” inflammatory cell in immunopathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114:52-7.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Muñoz, J., and López-Ruiz, A. (1993). Ultrastructure of the peritoneal exudate cells of seawater teleosts, seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell and Tissue Research* 273:301-307.
- Meseguer, J., López-Ruiz, A., and Esteban, M.A. (1994). Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry* 102:37-44.
- Mock, A., and Peters, G. (1990). Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *Journal of Fish Biology* 37:873-885.
- Molnar, K., and Székely, C. (2004). Occurrence and pathology of *Sinergasilus lienii* (Copepoda: Ergasilidae), a parasite of the silver carp bighead, in Hungarian ponds. *Acta Veterinaria Hungarica* 52:51-60.

- Montero, F.E., Crespo, S., Padrós, F., De la Gándara, F., García, A., and Raga, J.A. (2004). Effects of the gill parasite *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the amberjack *Seriola dumerili* Risso (Teleostei: Carangidae). *Aquaculture* 232:153-63.
- Mulero, I., Sepulcre, M.P., Meseguer, J., Garcia-Ayala, A., and Mulero, V. (2007). Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:19434-19439.
- Mulero, I., Noga, E.J., Meseguer, J., Garcia-Ayala, A., and Mulero, V. (2008a). The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis. *Developmental and Comparative Immunology* 32:1528-1531.
- Mulero, I., Sepulcre, M.P., Meseguer, J., Roca, F.J., Garcia-Ayala, A., and Mulero, V. (2008b). Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Developmental and Comparative Immunology* 32:1151-1159.
- Murray, H.M., Gallant, J.W., and Douglas, S.E. (2003). Cellular localization of pleurocidin gene expression and synthesis in winter flounder gill using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cell and Tissue Research* 312:197-202.
- Murray, H.M., Leggiadro, C.T., and Douglas, S.E. (2007). Immunocytochemical localization of pleurocidin to the cytoplasmic granules of eosinophilic granular cells from the winter flounder gill. *Journal of Fish Biology* 70:336-345.
- Muzzal, P.M., and Hudson, P.L. (2004). Occurrence of *Ergasilus megaceros* Wilson, 1916, in the sea lamprey and other fishes from North America. *Journal of Parasitology* 90:184-5.
- Naylor, R.L., and M. Burke (2005). Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea. *Annual Review of Environment and Resources* 30:185-218.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., and Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405:1017-1024.
- Noga, E.J., and Silphaduang, U. (2003). Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News and Perspectives* 16:87-92.
- Noga, E.J., Silphaduang, U., Park, N.G., Seo, J.K., Stephenson, J., and Kozłowicz, S. (2009). Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152:299-305.

- Noga, E.J., Ullal, A.J., Corrales, J., and Fernandes, J.M. (2011). Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics Proteomics* 6:44-54.
- Nolan, D.T., Ruane, N.M., Van der Heijden, Y., Quabius, E.S., Costelloe, J., and Wendelaar Bonga, S.E. (2000). Juvenile *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer) affect the skin and gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and the host response to a handling procedure. *Aquaculture Research* 31:823-833.
- Noya, M., and Lamas, J. (1997). Response of eosinophilic granule cells of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Teleostei) to bacteria and bacterial products. *Cell and Tissue Research* 287:223-230.
- Ogawa, K. (2002). Impacts of diclidophorid monogenean infections on fisheries in Japan. *International Journal for Parasitology* 32:373-380.
- Olavarría, V.H., Sepulcre, M.P., Figueroa, J.E., and Mulero, V. (2010). Prolactin-induced production of reactive oxygen species and IL-1b in leukocytes from the bony fish gilthead seabream involves Jak/Stat and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Journal of Immunology* 185:3873-3883.
- Oliver, G. (1977). Effet pathogene de la fixation de *Diplectanum aequans* (Wagener, 1857) Diesing, 1858 (Monogenea, Monopisthocotylea, Diplectanidae) sur les branchies de *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), (Pisces, Serranidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 53:7-11.
- Oren, Z., and Shai, Y. (1996). A class of highly potent antimicrobial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide from the Moses sole fish *Pardachirus mamoratus*. *European Journal of Biochemistry* 237:304-310.
- Padrós, F., and Crespo, S. (1995). Proliferative epitheliocystis associated with monogenean infection in juvenile sea bream *Sparus aurata* in the North East of Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 15:42-44.
- Padrós, F., Zarza, C., and Crespo, S. (2001). Histopathology of cultured sea bream *Sparus aurata* infected with sanguinicolid trematodes. *Diseases of Aquatic Organisms* 44:47-52.
- Palacios-Fuentes, P., Landaeta, M.F., Muñoz, G., Plaza, G., and Ojeda, F.P. (2012). The effects of a parasitic copepod on the recent larval growth of a fish inhabiting rocky coasts. *Parasitology Research* 111:1661-1671.
- Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R. and Jung, T.S. (2008). Evaluation of nonspecific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology* 24:479-488.

- Palzenberger, M., and Pohla, H. (1992). Gill surface area of water-breathing freshwater fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2:187-216.
- Paperna, I. (1975). Parasites and disease of the grey mullet (*Mugilidae*) with special reference to the seas of the near east. *Aquaculture* 16:173-175.
- Paperna, I., Sabnai, I., and Colorni, A. (1982). An outbreak of lymphocystis in *Sparus aurata* L. in the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Journal of Fish Diseases* 5:433-437.
- Park, Y., and Hahm, K.S. (2005). Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38:507-516.
- Parker, H.S. (2001). Aquaculture research is key to the future of U.S. fish farming. *Agricultural Research* 49:2.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2004). Tool-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection* 6:1382-1387.
- Patrzykat, A., Gallant, J.W., Seo, J.W., Pytyck, J., and Douglas, S.E. (2003). Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:2464-2470.
- Paulsen, S.M., Sveinbjornsson, B. and Robertsen, B. (2001). Selective staining and disintegration of intestinal eosinophilic granule cells in Atlantic salmon after intraperitoneal injection of the zinc chelator dithizone. *Journal of Fish Biology* 58:768-775.
- Pino-Marambio, J., Mordue, A.J., Birkett, M., Carvajal, J., Asencio, G., Mellado, A., and Quiroz, A. (2007). Behavioural studies of host, non-host and mate location by the sea louse, *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). *Aquaculture* 271:70-76.
- Powell, M.D., Wright, G.M., and Burka, J.F. (1990). Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration? *Journal of Fish Biology* 37:495-497.
- Reichlin, S. (1999). Neuroendocrinology of infection and the innate immune system. *Recent Progress in Hormone Research* 54:133-183.
- Reimschuessel, R., Bennett, R.O., May, E.B., and Lipsky, M.M. (1987). Eosinophilic granular cell response to a microsporidian infection in a sergeant major fish, *Abudefduf saxatilis* L. *Journal of Fish Diseases* 10:319-322.
- Reite, O.B. (1997). Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish and Shellfish Immunology* 7:567-584.
- Reite, O.B. (1998). Mast cell eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish & Shellfish Immunology* 8:489-513.
- Reite, O.B. (2005). The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish and Shellfish Immunology* 19:253-67.



- Reite, O.B. and Evensen, O. (1994). 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 Organism* 20:95-100.
- Reite, O.B., and Evensen, Ø. (2006). Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish and Shellfish Immunology* 20:192-208.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T.M., and Olsen, R.E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268:251-264.
- Robinette, D.R., and Noga, E.J. (2001). Histone-like protein (HLP): a novel method for assessing stress in fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 44:97–107.
- Roberts, R.J. (1976). Experimental pathogenesis of lymphocystis in the plaice, *Pleuronectes platessa*. In: Page, L.A. (Ed.), *Wildlife Diseases*. Plenum Press, New York, pp. 431–441.
- Roberts, R.J., Young, H. and Milne, J.A. (1971). Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) 1. The structure and ultrastructure of normal plaice skin. *Journal of Fish Biology* 4:87-98.
- Rocha, J.S. and Chiarini-Garcia, H. (2007). Mast cell heterogeneity between two different species of *Hoplias* sp. (Characiformes: Erythrinidae): response to fixatives, anatomical distribution, histochemical contents and ultrastructural features. *Fish and Shellfish Immunology* 22:218-229.
- Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., and Johnson, S.C. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms* 41:43-51.
- Roubal, F.R. (1999). Extent of gill pathology in the toadfish *Tetractenos hamiltoni* caused by *Naobranchia variabilis* (Copepoda: Naobranchiidae). *Diseases of Aquatic Organisms* 35:203-211.
- Salger, S.A., Reading, B.J., Baltzegar, D.A., Sullivan, C.V., and Noga, E.J. (2011). Molecular characterization of two isoforms of piscidin 4 from the hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Journal of Fish Diseases* 30:420-424.
- Samuelsen, O.B., Nerland, A.H., Jørgensen, T., Schrøder, M.B., Svåsand, T., and Bergh, O. (2006). Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:239-254.
- Santhakumar, M., Balaji, M., and Ramudu, K. (1999). Effect of sub-lethal concentration of monocrotophos on erythropoietic activity and certain haematological parameters of fish *Anabus testudineus* (Bloch). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63:379-384.



- Sanz, F. (1992). Mortality of cultured sea bream (*Sparus aurata*) caused by an infection with a trematode of the genus *Microcotyle*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 12:186-188.
- Schnick, R. A., Alderman, D.J., Armstrong, R., Le Gouvello, R., Ishihara, S., Lacierda, E.C., Percival, S., and Roth, M. (1997). Worldwide aquaculture drug and vaccine registration progress. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 17:251-260.
- Secombes, C.J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defences. In: Iwama G, Nakanishi T, editors. *The fish immune system*. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press Inc. pp. 63-95.
- Secombes, C.J., and Chappell, L.H. (1996). Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. *Annual Review of Fish Diseases* 6:167-177.
- Selye, H. (1965). *The mast cell*. Butterworths, London.
- Sepulcre, M., Pelegrín, P., Mulero, V., and Meseguer, J. (2002). Characterization of gilthead seabream acidophilic granulocytes by a monoclonal antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell and Tissue Research* 308:97-102.
- Sepulcre, M.P., López-Castejón, G., Meseguer, J., and Mulero, V. (2007). The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology* 44:2009-2016.
- Shao, L., Serrano, D. and Mayer, L. (2001). The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin. Immunol.*, 13: 163-175.
- Sharp, G.J.E., Pike, A.W., and Secombes, C.J. (1989). The immune response of wild rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson to naturally acquired plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch 1824) and *D. ditremum* (Creplin 1825). *Journal of Fish Biology* 35:781-794.
- Sheng, X., Zhan, W., Xu, S., and Cheng, S. (2007). Histopathological observation of lymphocystis disease and lymphocystis disease virus (LCDV) detection in cultured diseased *Sebastes schlegeli*. *Journal of Oceanography, Univ. China* 6:378-382.
- Shike, H., Lauth, X., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., Van Olst, J.C., Shimizu, C., Bulet, P. and Burns, J.C. (2002). Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *European Journal of Biochemistry* 269:2232-2237.
- Schmale, M.C., Vicha, D and Cacal, S.M. (2004). Degranulation of eosinophilic granule cells in neurofibromas and gastrointestinal tract in the bicolor damselfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 17:53-63.

- Silan, P., Birgi, E., Louis, C., Clota, F., Mathieu, A., and Giral, L. (1996). Aquaculture et ichtyoparasitologie: action in vitro du nitroxinil (anthelminthique) sur *Diplectanum aequans*, monogene ectoparasite branchial du bar *Dicentrarchus labrax*. *Recueil de Medecine Veterinaire* 172:401-407.
- Silphaduang, U., and Noga, E.J. (2001). Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414:268-269.
- Silphaduang, U., Colorni, A., and Noga, E.J. (2006). Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 72:241-252.
- Sire, M.F., and Vernier, J.M. (1995). Partial characterization of eosinophilic granule cells (EGCs) and identification of mast cells of the intestinal lamina propria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemical and cytochemical study. Biology of the Cell* 85:35-41
- Smith, A.M., Potter, M., and Merchant, E.B. (1967). Antibody-forming cells in the pronephros of the teleost *Lepomis macrochirus*. *The Journal of Immunology* 99:876-882.
- Smits, E., Burvenich, C., and Heyneman, R. (1997). Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 56:259-569.
- Soehnlein, O., Weber, C., and Lindbom, L. (2009). Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends in Immunology* 30:538-546.
- Sottovia-Filho, D. and Taga, R. (1973). Morphological and histochemical study of granular acidophilic cells in the connective tissue of some ophidians. *Archivium Histologicum Japonicum* 36:79-84.
- Stoskopf, M.K. (1993). *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Sun, B.J., Xie, H.X., Song, Y., and Nie, P. (2007). Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins. *Journal of Fish Diseases* 30:335-343.
- Sung, W.S., Lee, J., and Lee, D.G., (2008). Fungicidal effect and the mode of action of piscidin 2 derived from hybrid striped bass. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371:551-555.
- Sveinbjörnsson, B., Olsen, R. and Paulsen, S. (1996). Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 19: 349-355.
- Taraschewski, H. (2000). Host-parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach. *Advances in Parasitology* 46:1-179.

- Toranzo, A.E., Magariños, B., and Romalde, J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61.
- Tossi, A., Sandri, L. and Giangaspero, A. (2000). Amphipatic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 5:4-30.
- Tsotetsi, A.M., Avenant-Oldewage, A., and Mashego, S.N. (2005). Aspects of the pathology of *Lamproglena clariae* (Copepoda: Lernaeidae) of gills of *Clarias gariepinus* from the Vaal River system, South Africa. *African Zoology* 40:169-78.
- Vallejo, A.N., and Ellis, A.E. (1989). Ultrastructural study of the response of eosinophilic granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Developmental and Comparative Immunology* 13:133-48.
- Vigliano, F.A., Bermúdez, R., Nieto, J.M., and Quiroga, M.I. (2009). Development of rodlet cells in the gut of turbot (*Psetta maxima* L.): relationship between their morphology and S100 protein immunoreactivity. *Fish and Shellfish Immunology* 26:146-153.
- Wang, G.T., Li, W.W., Yao, W.J., and Nie, P. (2002). Mortalities induced by the copepod *Sinergasilus polycolpus* in farmed silver and bighead carp in a reservoir. *Diseases of Aquatic Organisms* 48:237-239.
- Wedemeyer, G.A. (1996). *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. Chapman and Hall, New York. 232 p.
- Welle, M. (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of Leukocyte Biology* 61:233-245.
- Weyts, F.A.A., Cohen, N., Flik, G., and Verberg-van Kemeade, B.M.L. (1999). Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary interrenal axis in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9:1–20.
- Whittington, I.D., and Chisholm, L.A. (2008). Diseases caused by Monogenea. In: Eiras, J.C., Segner, H., Wahli, T., Kapoor, B.G. editors. *Fish diseases*, vol. 2. USA: Science Publishers. 683-816.
- Whyte, S.K. (2007). The innate immune response of finfish – a review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* 23:1127-1151.
- Woo, P. T. K. (2006). *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*.
- Xu, P., Bao, B., He, Q., Peatman, E., He, C., and Liu, Z. (2005). Characterization and expression analysis of bactericidal permeability-increasing protein (BPI) antimicrobial peptide gene from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Developmental and Comparative Immunology* 29:865–878.

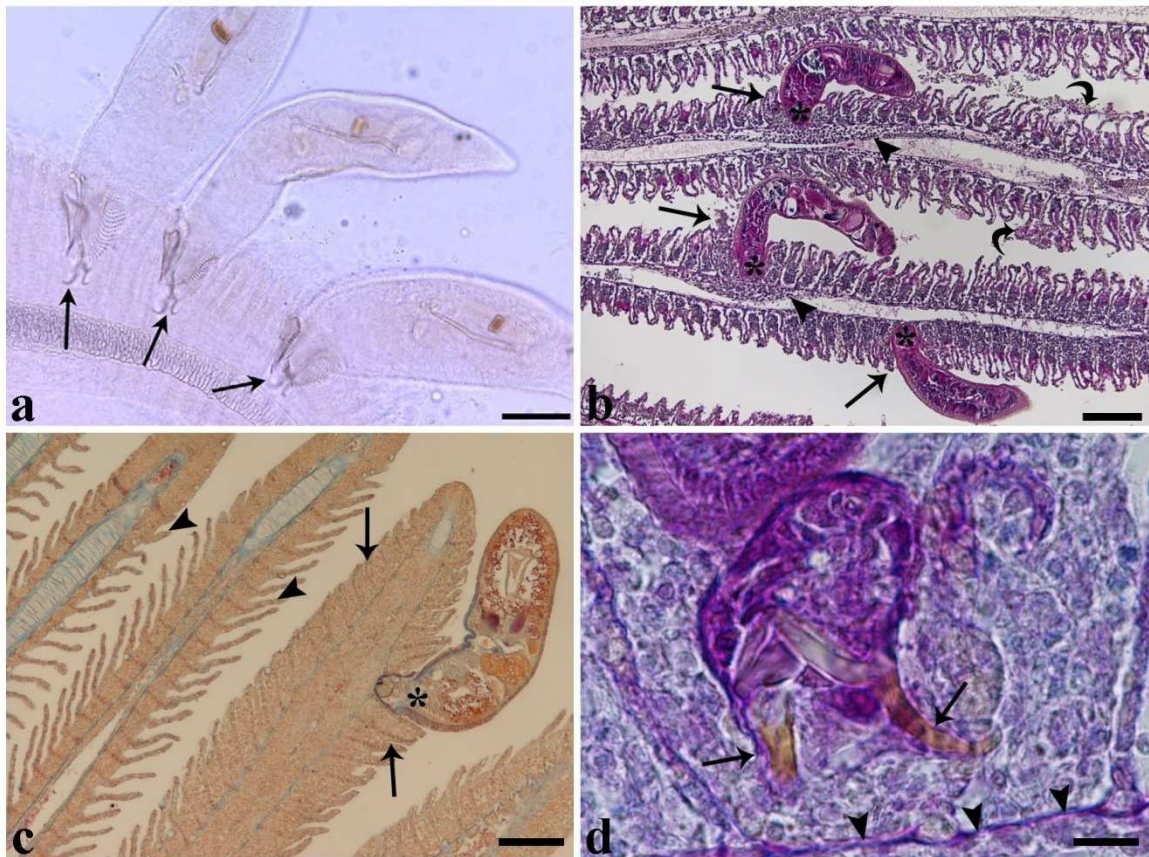
- Yamashita, K. (1980). Parasitic copepoda (*Ergasilus sp.*) found on the epidermis of larval fish of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Pathology* 15:91-94.
- Zahran, E., and Noga, E.J. (2010). Evidence for synergism of the antimicrobial peptide piscidin 2 with antiparasitic and anti-oomycete drugs. *Journal of Fish Diseases* 33:995-1003.
- Zapata, A.G. (1979a). Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Developmental and Comparative Immunology* 3:55-65.
- Zapata, A.G. (1979b). Ultraestructura del tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT) de *Rutilus rutilus*. *Morfologia Normal y Patologica Seccion A* 3:23-29.
- Zapata, A.G. (1981). Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Developmental and Comparative Immunology* 5:685-690.
- Zapata, A.G. and Cooper, E.L. (1990). "The Immune System: Comparative Histophysiology." John Wiley and Sons, Chichester.
- Zapata, A.G., Chibà, A. and Varas, A. (1996). Cells and Tissue of the Immune System of Fish. In: *The Fish Immune System* (Ed Iwama, G. & Nakanishi T.). Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 1-53.
- Zasloff, M.N. (2002). Antimicrobial peptides in health and disease. *English Journal of Medicine* 347(15):1199-1200.
- Zhang, A., Zou, J., Chang, C.I., and Secombes, C.J. (2004). Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 101:259-269.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluizione di lavoro</b>	<b>Tempo di incubazione e temperatura</b>	<b>Provenienza</b>
<b>anti-HAGR-01-3</b> (anticorpo policlonale di coniglio contro la Piscidina 3)	1:400	3 h a TA <sup>a</sup>	Bethyl Laboratories, Montgomery (Texas, USA) <sup>b</sup>
<b>anti-5.3-02-3B.2D</b> (anticorpo policlonale di coniglio contro la Piscidina 4)	1:8000	3 h a TA <sup>a</sup>	Bethyl Laboratories, Montgomery (Texas, USA) <sup>b</sup>
<b>anticorpo G7</b> (anticorpo monoclonale di topo contro gli AGs dell'orata)	1:100	2 h a TA <sup>a</sup>	Dipartimento di Biologia Cellulare, Università di Murcia (Spagna) <sup>c</sup>
<b>anti-Istamina</b> (anticorpo policlonale di coniglio)	1:100	1 h a TA <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich, codice H7403
<b>anti-Interleuchina 1<math>\beta</math></b> (anticorpo policlonale di coniglio contro la porzione C-terminale dell'interleuchina-1b dell'orata)	1:100	1 h a TA <sup>a</sup>	Dipartimento di Biologia Cellulare, Università di Murcia (Spagna) <sup>d</sup>

**Tabella 1** Anticorpi primari testati sulle sezioni istologiche di *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* e *Perca fluviatilis*. <sup>a</sup> TA = temperatura ambiente, <sup>b</sup> Silphaduang and Noga, (2001), Corrales *et al.*, (2009), <sup>c</sup> Sepulcre *et al.*, (2002), <sup>d</sup> Mulero *et al.*, (2008).

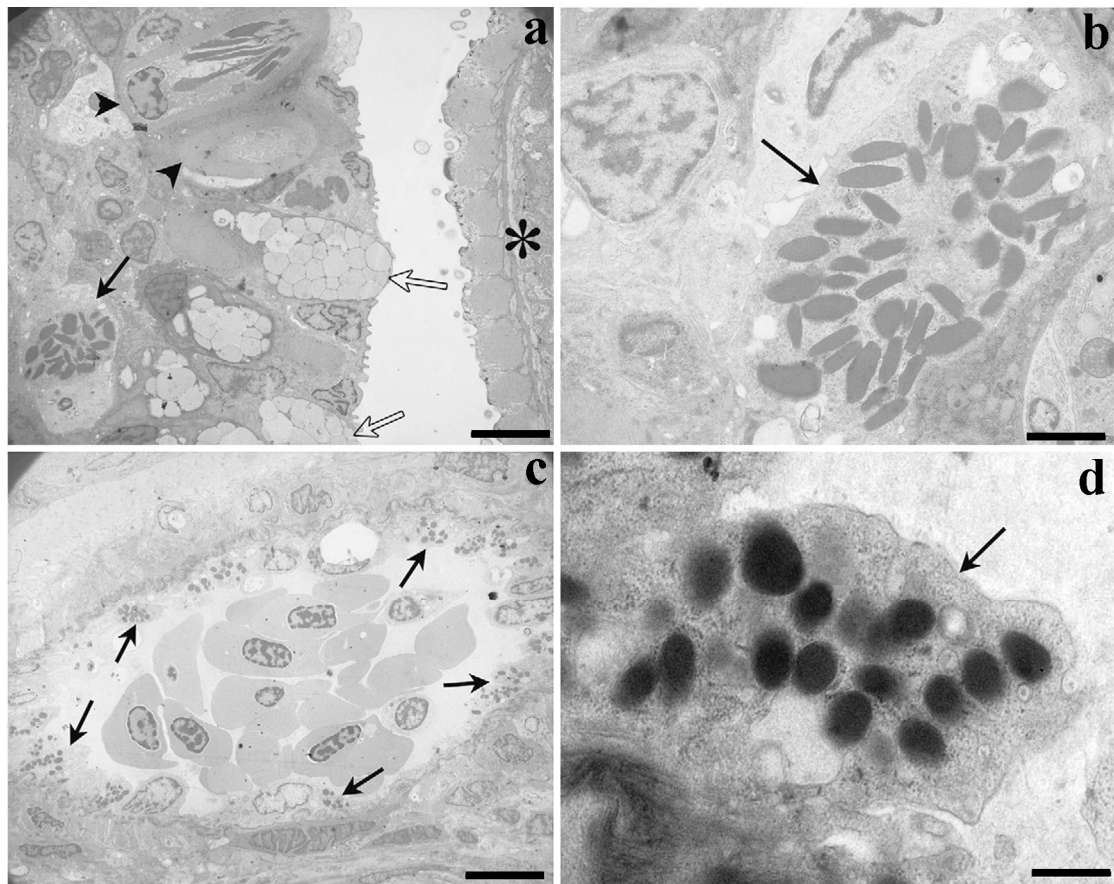
<b>Specie</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Branchie</b>	<b>Intestino</b>	<b>Fegato</b>	<b>Milza</b>	<b>Rene</b>	<b>Cute</b>
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Anti-Piscidina 4	X	X	X	X	X	n.d. <sup>a</sup>
	Anti-Piscidina 3	X	X	X	X	X	n.d. <sup>a</sup>
<i>Perca fluviatilis</i>	Anti-Piscidina 4	X	X	X	X	X	n.d. <sup>a</sup>
	Anti-Piscidina 3	X	X	X	X	X	n.d. <sup>a</sup>
<i>Sparus aurata</i>	Anti-Piscidina 4	-	-	-	-	-	-
	Anti-Piscidina 3	X	X	X	X	X	X
	G7	X	X	X	X	X	X

**Tabella 2.** Tessuti positivi agli anticorpi contro le piscidine 3 e 4 di *D. labrax*, *P. fluviatilis* e *S. aurata* e positivi al G7 in *S. aurata*. <sup>a</sup> n.d.= non documentato

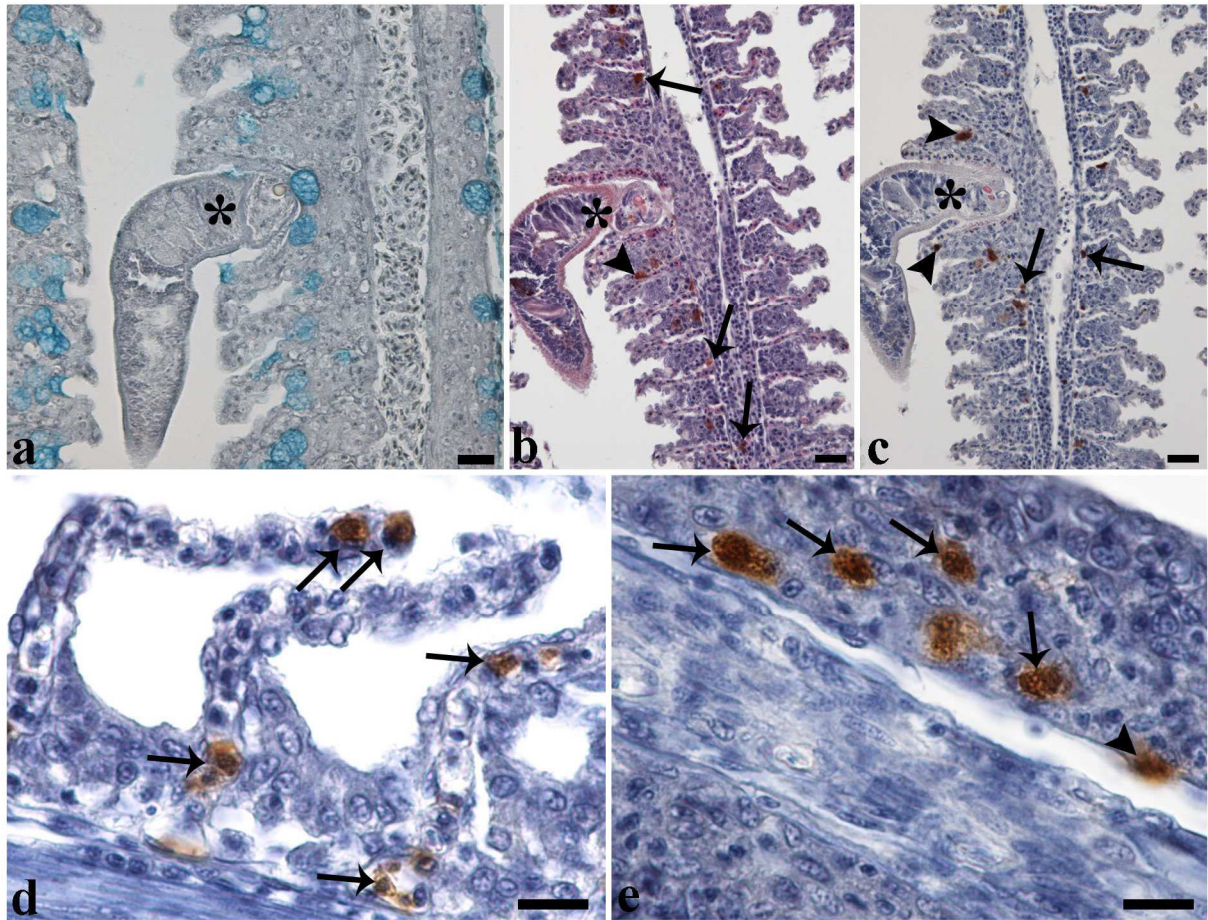


**Figura 1** *Dicentrarchus labrax*, sezioni istologiche di branchie infestate da *Diplectanum aequans* (Monogenea). **a)** Tre *D. aequans* ancorati alle lamelle branchiali, i loro amuli (organi di ancoraggio) penetrano profondamente nel tessuto, barra=50 $\mu$ m. **b)** Lamelle parassitate colorate con Alcian blue-PAS. I monogenei (asterischi) causano la distruzione delle lamelle secondarie (freccie), con formazione di edemi (punte di freccia). Da notare i residui cellulari presenti nelle vicinanze del corpo dei parassiti (freccie curve), barra=50 $\mu$ m. **c)** Colorazione tricromia di Masson, fusione delle lamelle secondarie (freccie) in prossimità dell'attacco del parassita (asterisco). Lamelle secondarie intatte (punte di freccia) nei filamenti adiacenti, barra=50 $\mu$ m. **d)** Punto di ancoraggio del parassita, l'opisthaptor (freccie) è in prossimità della membrana basale (teste di freccia), barra=10 $\mu$ m.



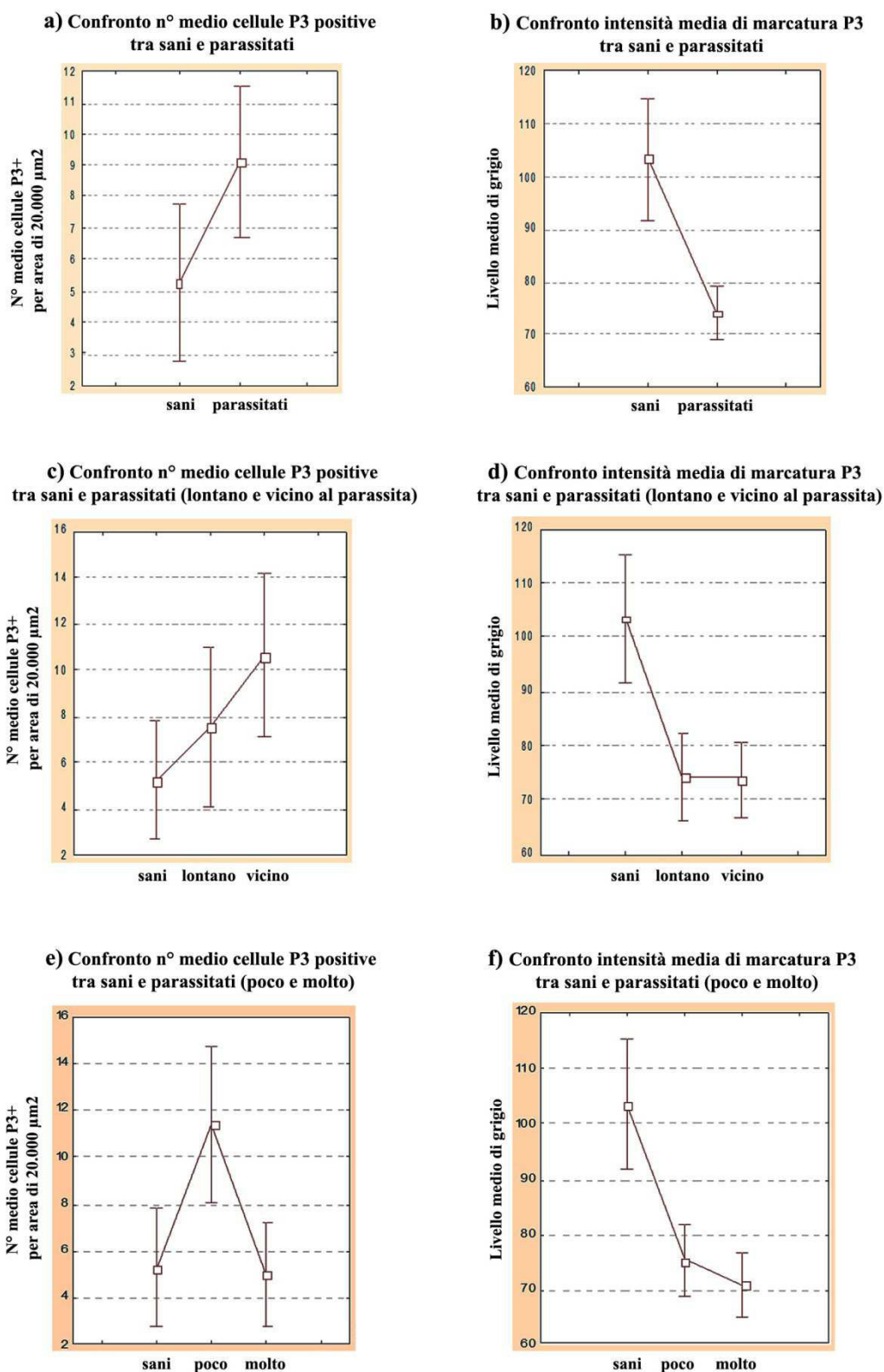


**Figura 2** a) Sezione parassitata di branchie di *D. labrax* infestate da *D. aequans* (asterisco). Nella zona d'infestazione si notano cellule mucose (freccie vuote), una rodlet cell (punta di freccia) e una mast cell (freccia), barra=4,5 $\mu$ m. b) Le MCs (freccia) si presentavano di forma ovale ricche di granuli elettron-densi, barra=0,48 $\mu$ m. c) La microfotografia mostra la presenza delle mast cells (freccie) che tappezzano la parte periferica del lume di un vaso della branchia, barra=1,54 $\mu$ m. d) Le MCs si presentano di forma irregolare, con un nucleo polare e con un citoplasma ricco di granuli elettron-densi. Questa figura mostra il distacco della cellula (freccia) dall'endotelio verso il lume del vaso, barra=0,7 $\mu$ m.



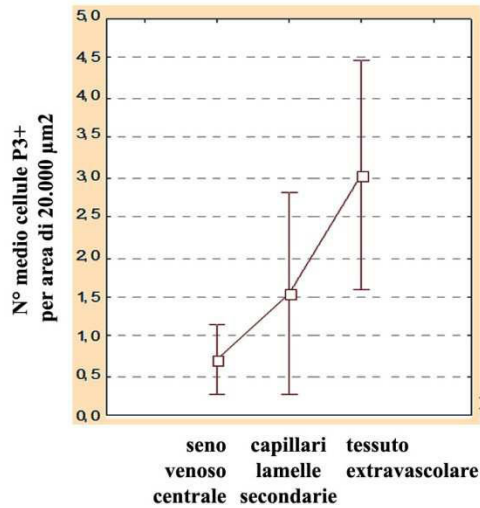
**Figura 3** Colorazione immunohistochimica su sezioni istologiche di *D. labrax* con gli anticorpi per le piscidine. **a)** Sezione di lamella branchiale da *D. aequans* (asterisco) non trattata con gli anticorpi (controllo), da notare l'assenza di marcatura, barra=20 $\mu$ m. MCs positive alla piscidina 3 (**b**) e alla piscidina 4 (**c**) nella lamella primaria (freccie), all'apice e nella zona mediana delle lamelle secondarie (punte di freccia) vicino all'attacco dei parassiti (asterischi), barra=20 $\mu$ m. **d)** MCs positive alla piscidina 3 (freccie) nei capillari delle lamelle secondarie, barra=10 $\mu$ m. **e)** MCs positive alla piscidina 3 nel tessuto extravascolare (freccie), una MC (punta di freccia) sembra staccarsi dalla parete endoteliale del seno venoso centrale, barra=10 $\mu$ m.



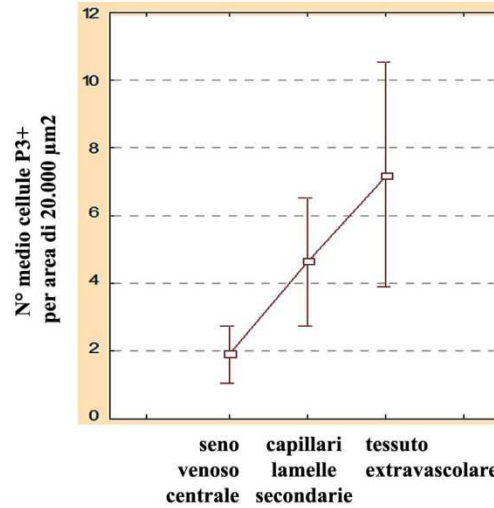


**Figura 4** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura tra branchie sane e parassitate di *D. labrax* (a,b), in base alla distanza dal parassita (c,d), e in base all'intensità d'infestazione (e,f). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

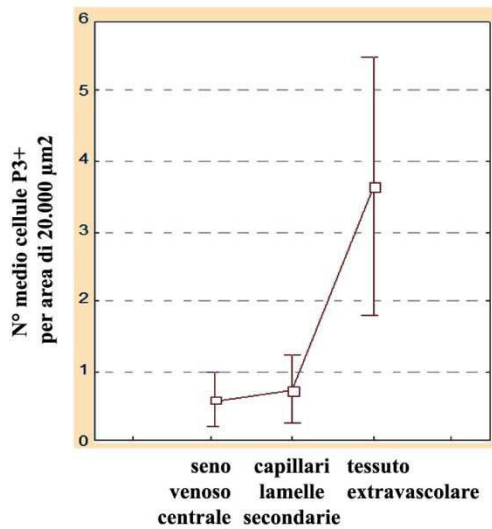
**a) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci sani**



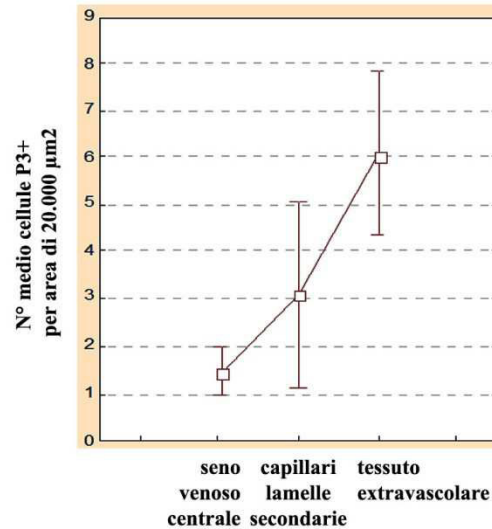
**b) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci poco parassitati**



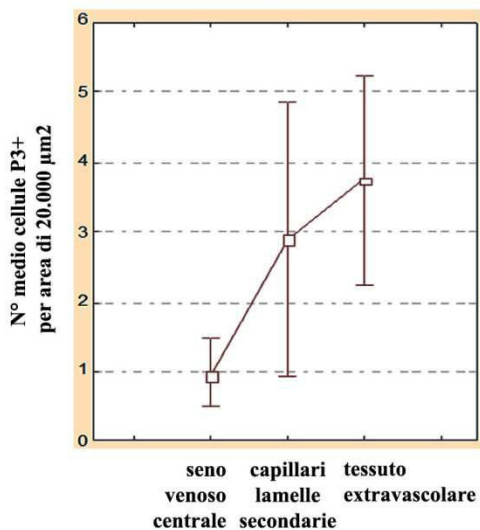
**c) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci molto parassitati**



**d) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle vicino al parassita**

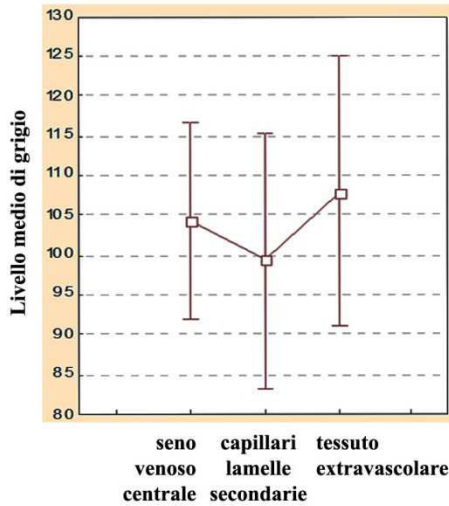


**e) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle lontano dal parassita**

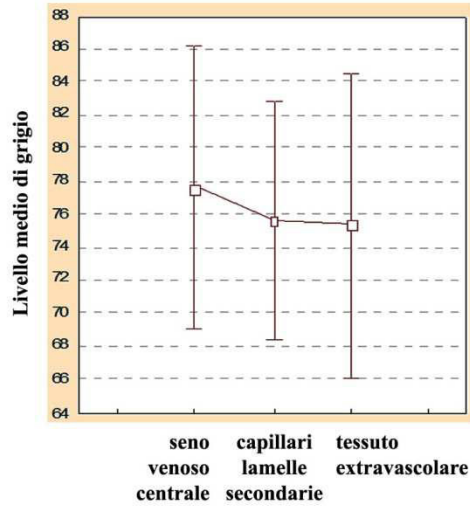


**Figura 5** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, tra i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) negli esemplari di *D. labrax* sani (a), poco (b) e molto (c) parassitati, sia nelle zone “vicino” (d) sia nelle zone “lontano” (e) dal parassita.

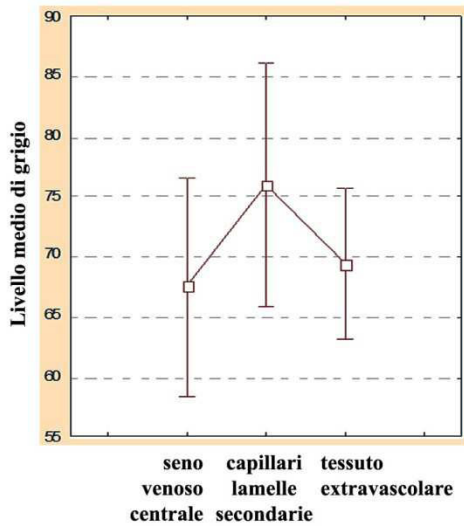
**a) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci sani**



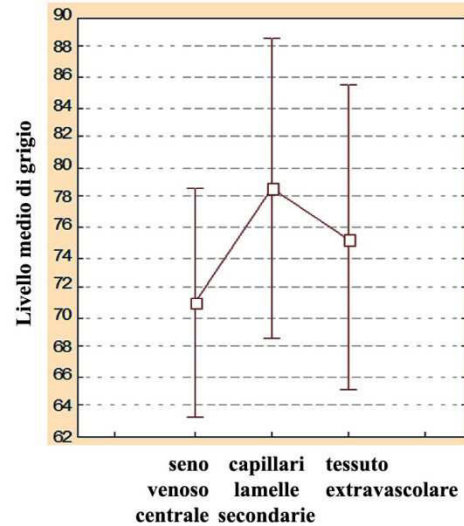
**b) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci poco parassitati**



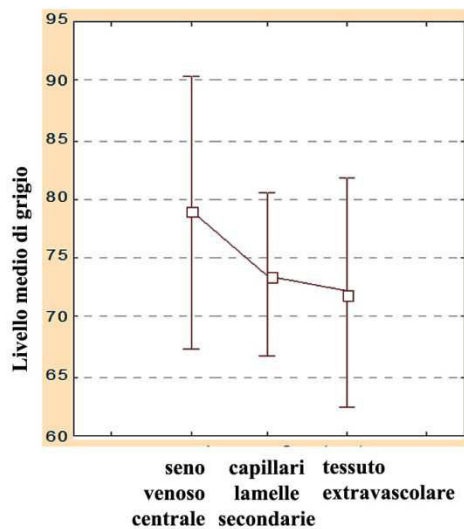
**c) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci molto parassitati**



**d) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle lontane dal parassita**

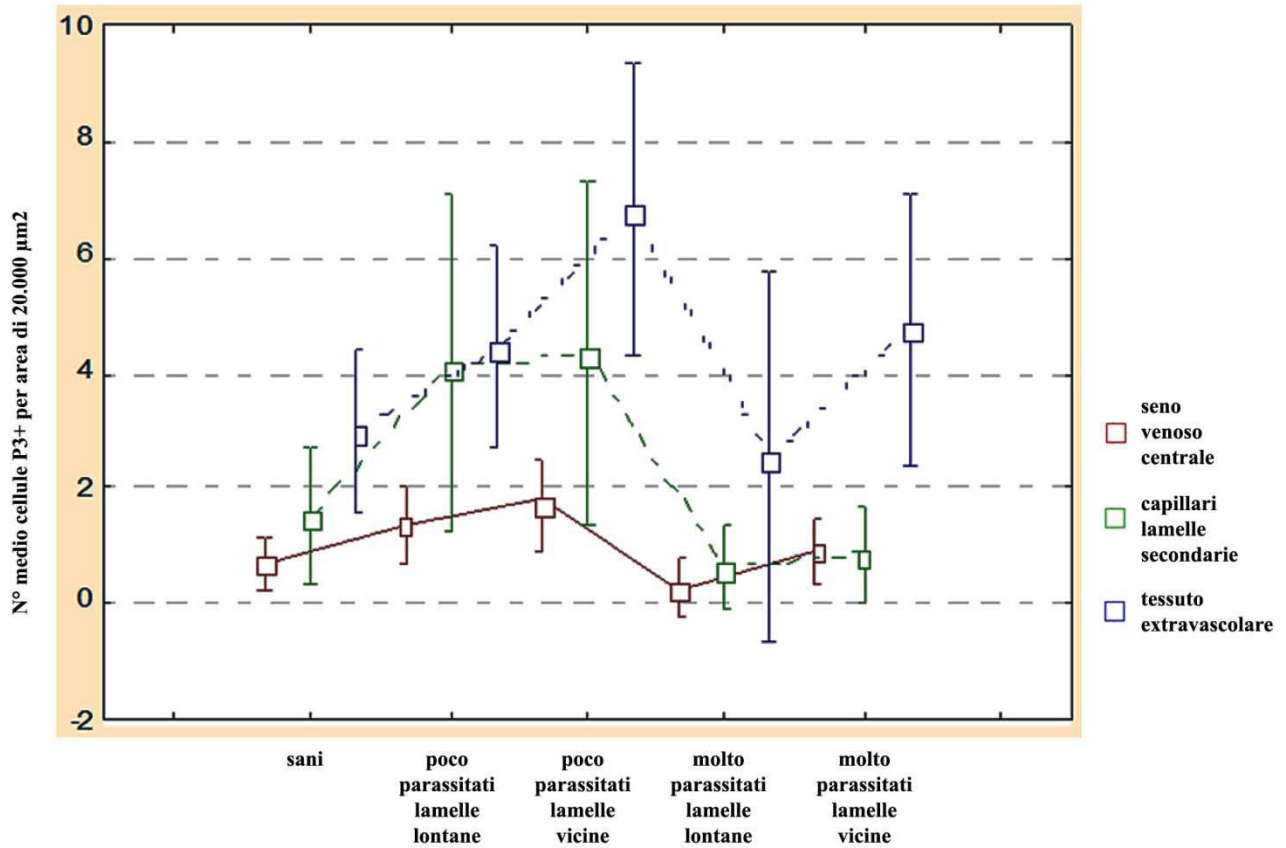


**e) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle vicino al parassita**

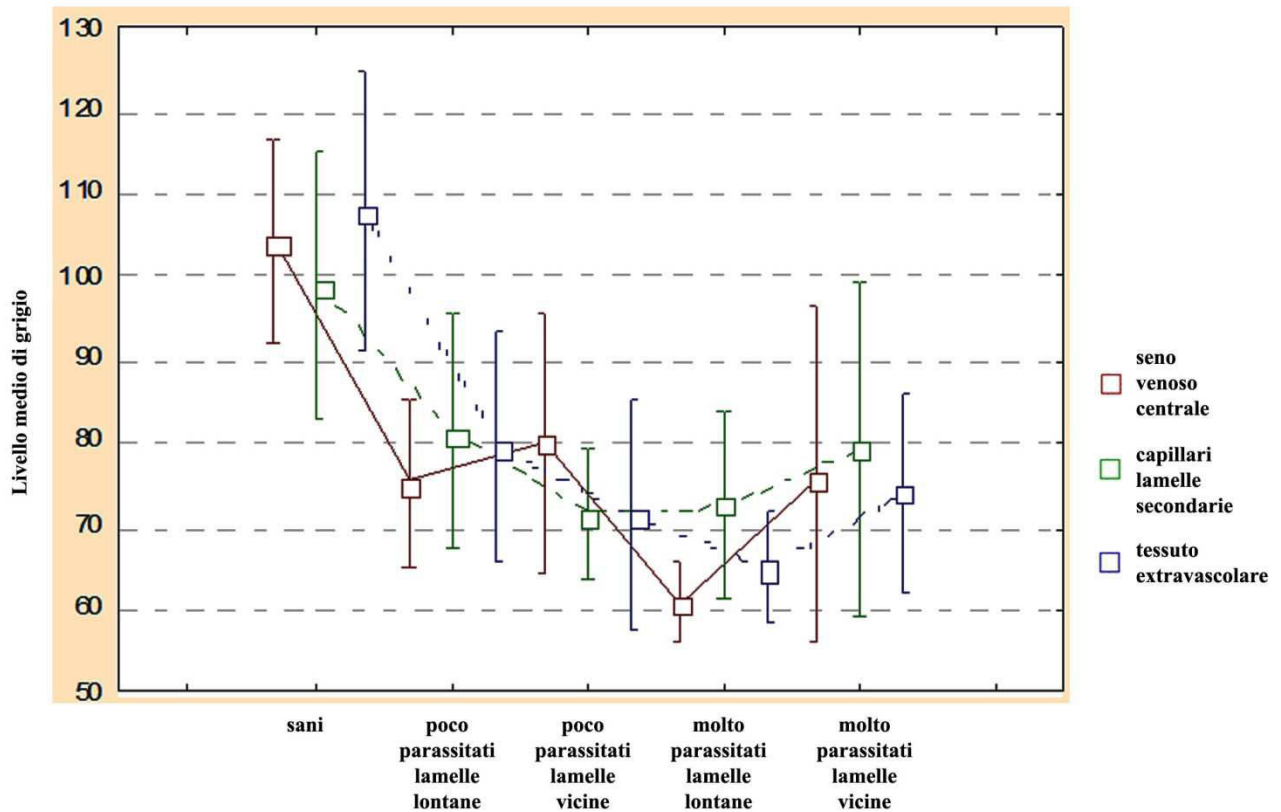


**Figura 6** Confronto dell'intensità di marcatura alla piscidina 3 tra i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) negli esemplari di *D. labrax* sani (a), poco (b) e molto (c) parassitati, sia nelle zone "lontano" (d) sia nelle zone "vicino" (e) al parassita.

a) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei tre distretti tissutali della lamella

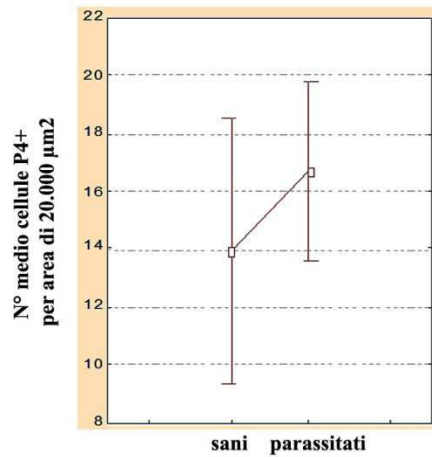


b) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei tre distretti tissutali della lamella

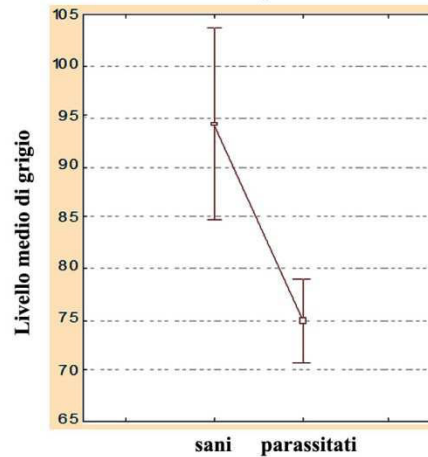


**Figura 7** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3 (a), per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura (b) nei i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) tra *D. labrax* sani e parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino").

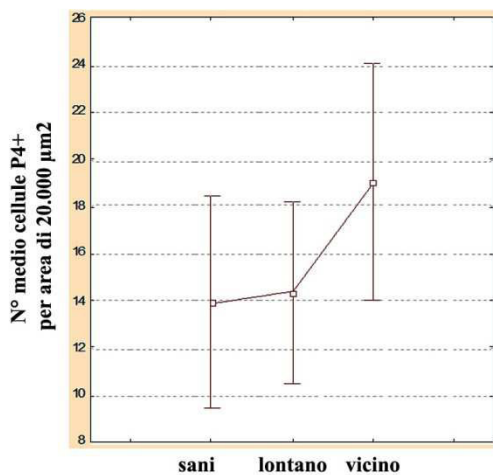
**a) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati**



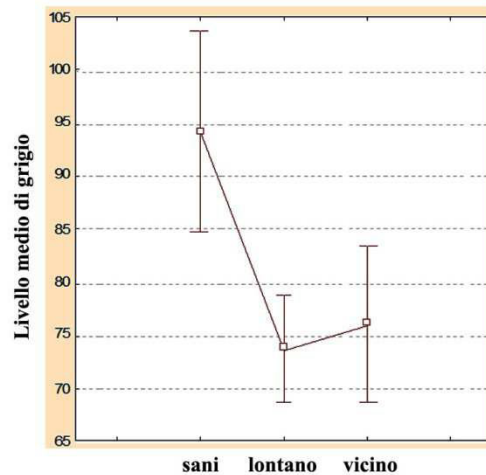
**b) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati**



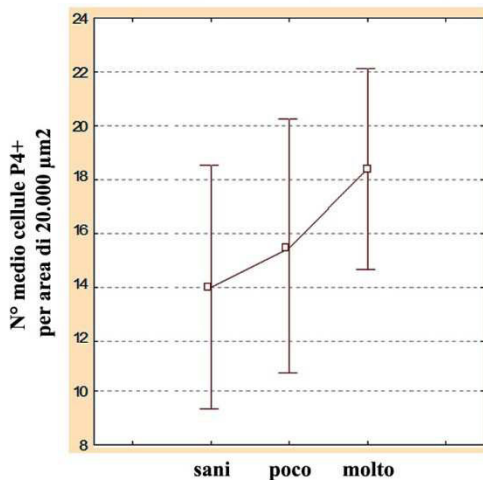
**c) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita)**



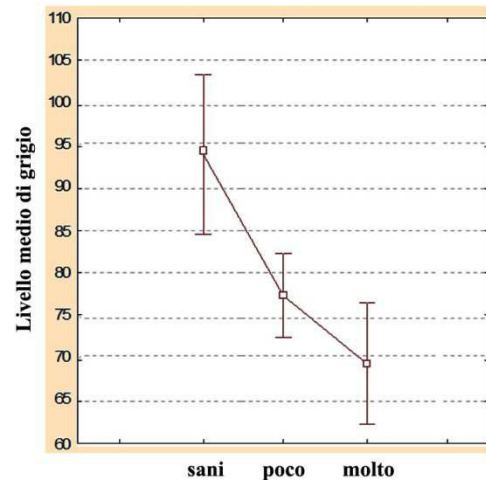
**d) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita)**



**e) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati (poco e molto)**

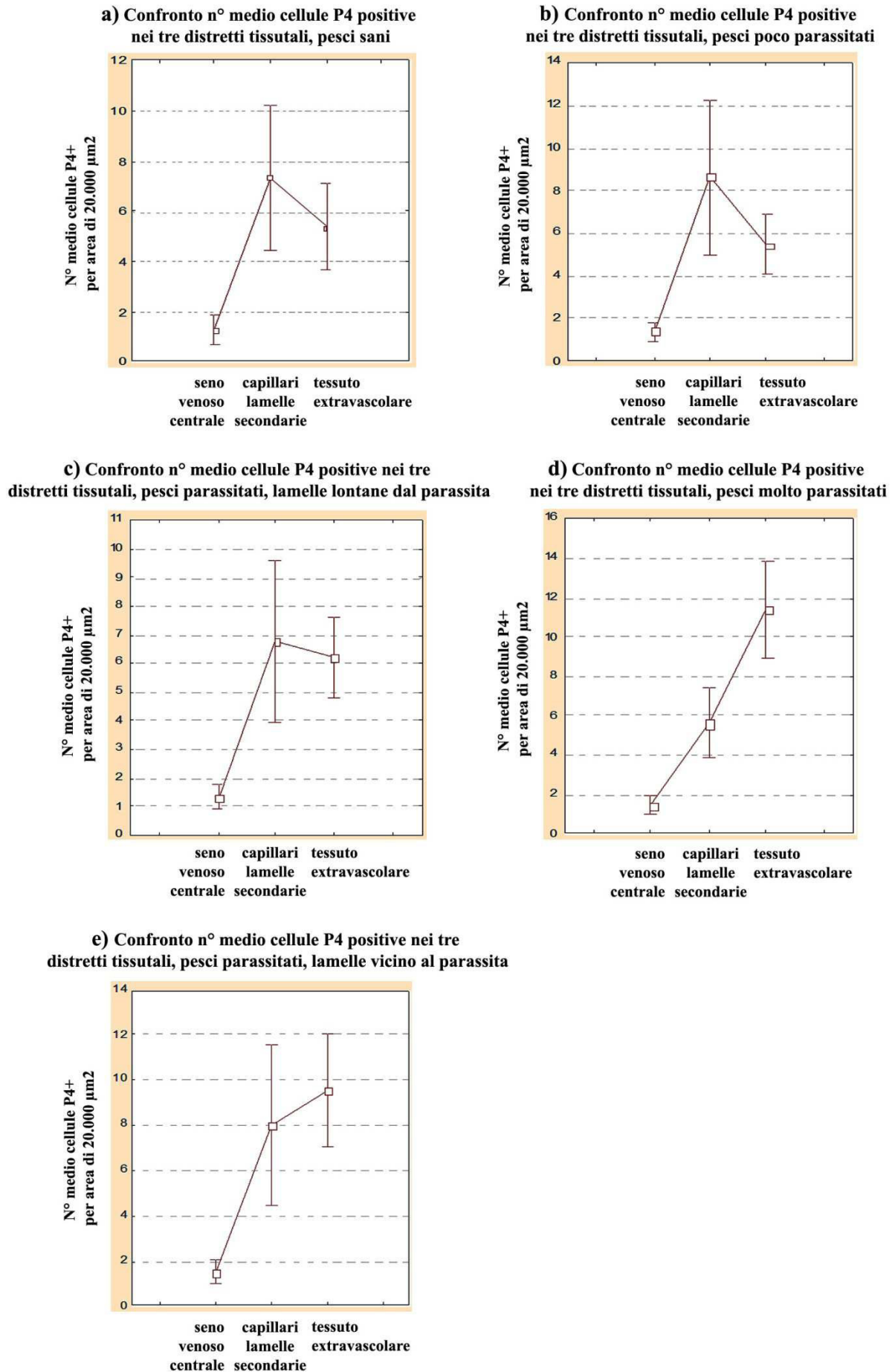


**f) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati (poco e molto)**



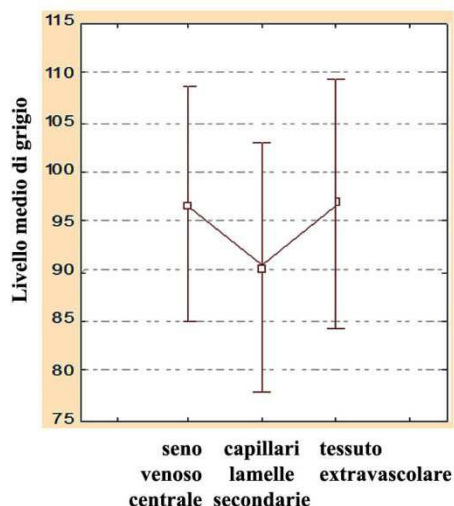
**Figura 8** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 4, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura tra branchie sane e parassitate di *D. labrax* (a,b), in base alla distanza dal parassita (c,d), e in base all'intensità d'infestazione (e,f). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.



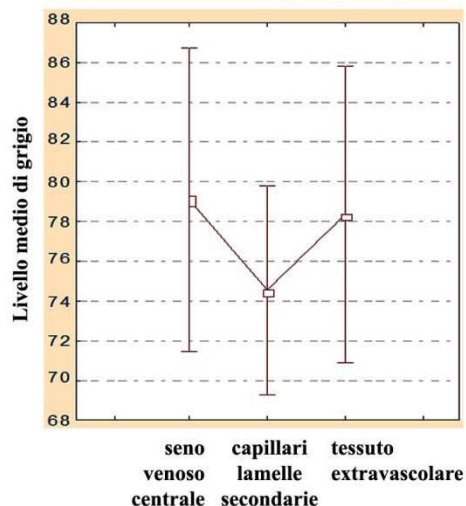


**Figura 9** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 4, per 20.000 $\mu\text{m}^2$  di area standard, tra i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) negli esemplari di *D. labrax* sani (a), poco (b), nelle zone “lontano” dal parassita (c), nei pesci molto parassitati (d), e nelle zone “vicino” al parassita (e).

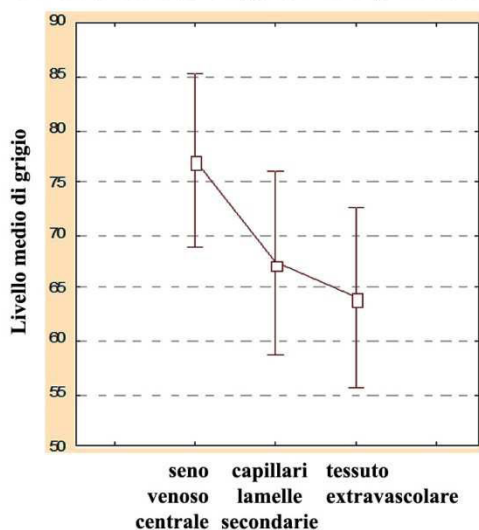
**a) Confronto intensità media di marcatura P4 nei tre distretti tissutali, pesci sani**



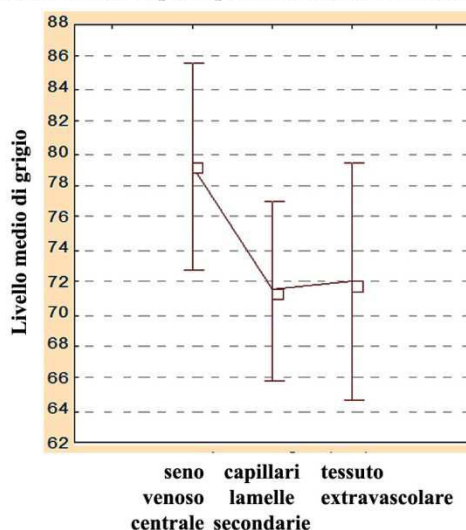
**b) Confronto intensità media di marcatura P4 nei tre distretti tissutali, pesci poco parassitati**



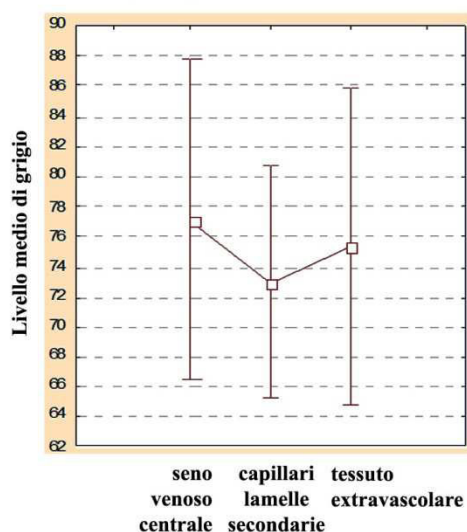
**c) Confronto intensità media di marcatura P4 nei tre distretti tissutali, pesci molto parassitati**



**d) Confronto intensità media di marcatura P4 nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle lontane dal parassita**

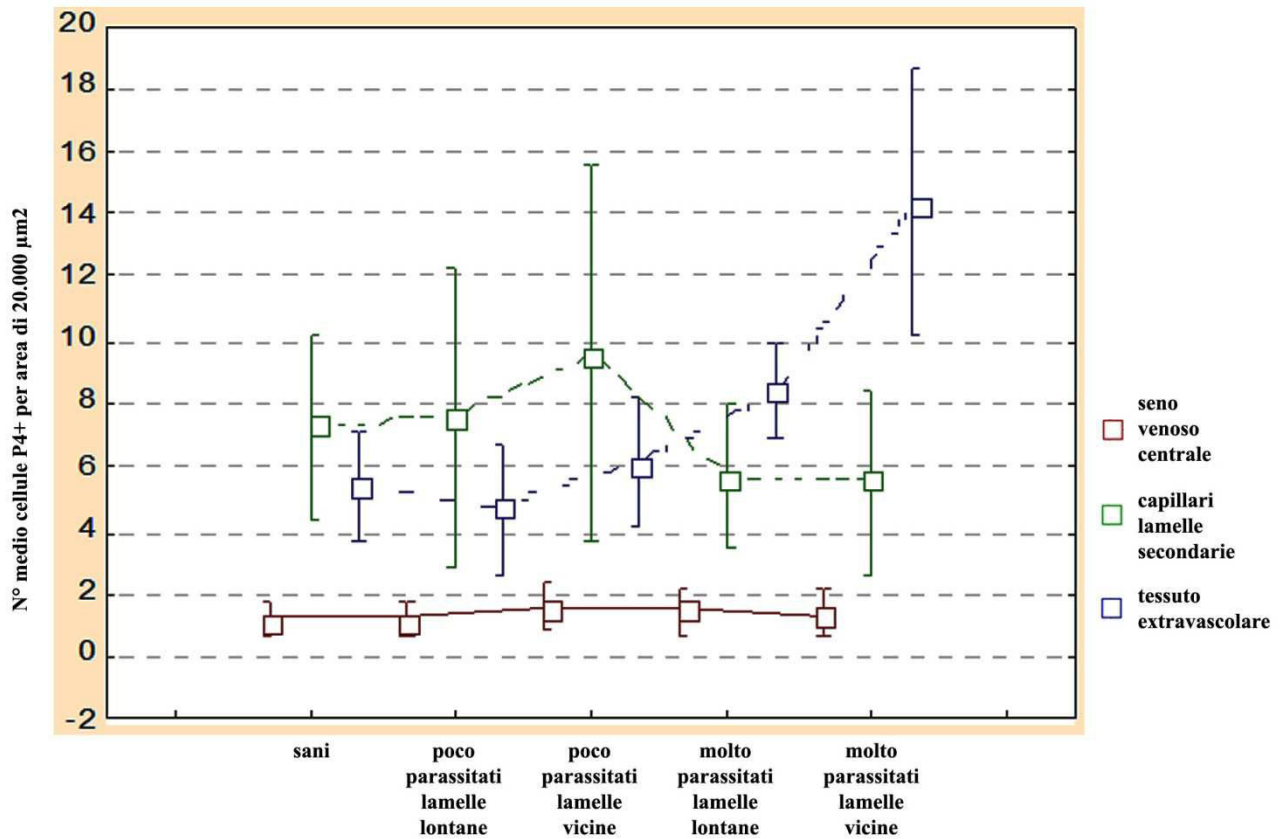


**e) Confronto intensità media di marcatura P4 nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle vicino al parassita**



**Figura 10** Confronto dell'intensità di marcatura alla piscidina 4 tra i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) negli esemplari di *D. labrax* sani (a), poco (b) e molto (c) parassitati, sia nelle zone "lontano" (d) sia nelle zone "vicino" (e) al parassita.

a) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei tre distretti tissutali della lamella



b) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei tre distretti tissutali della lamella

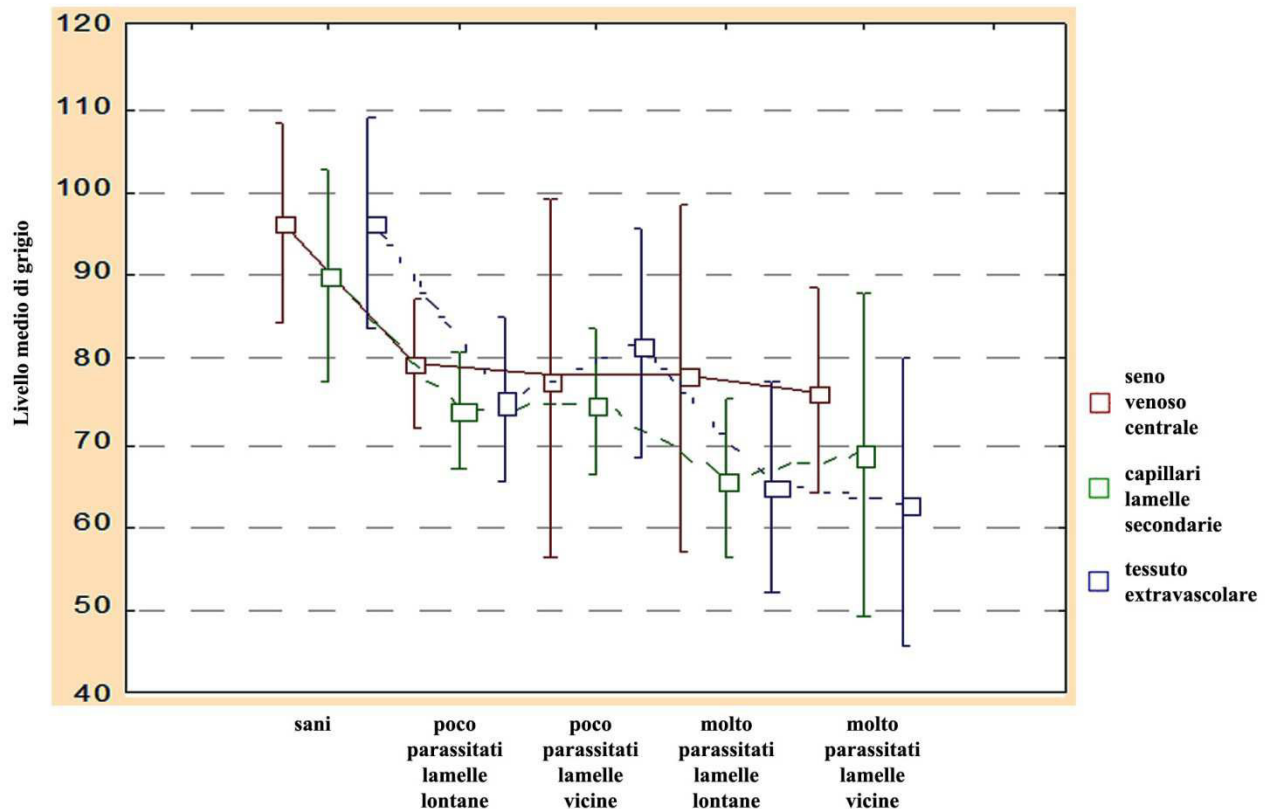
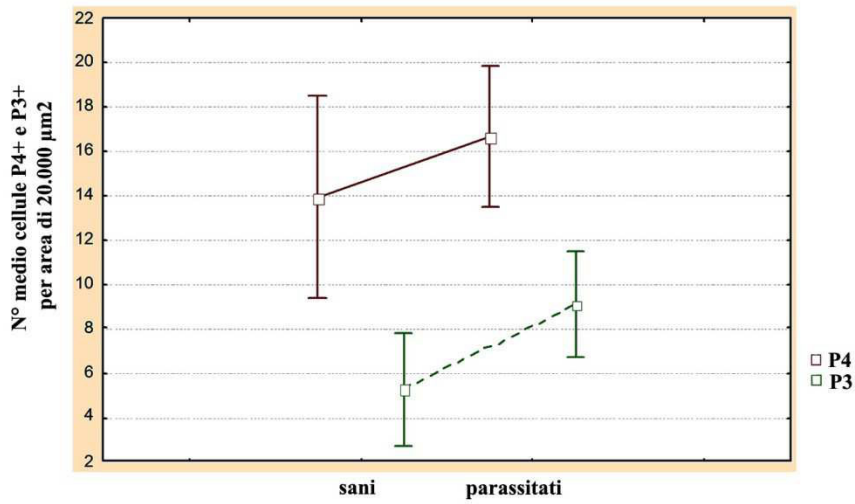


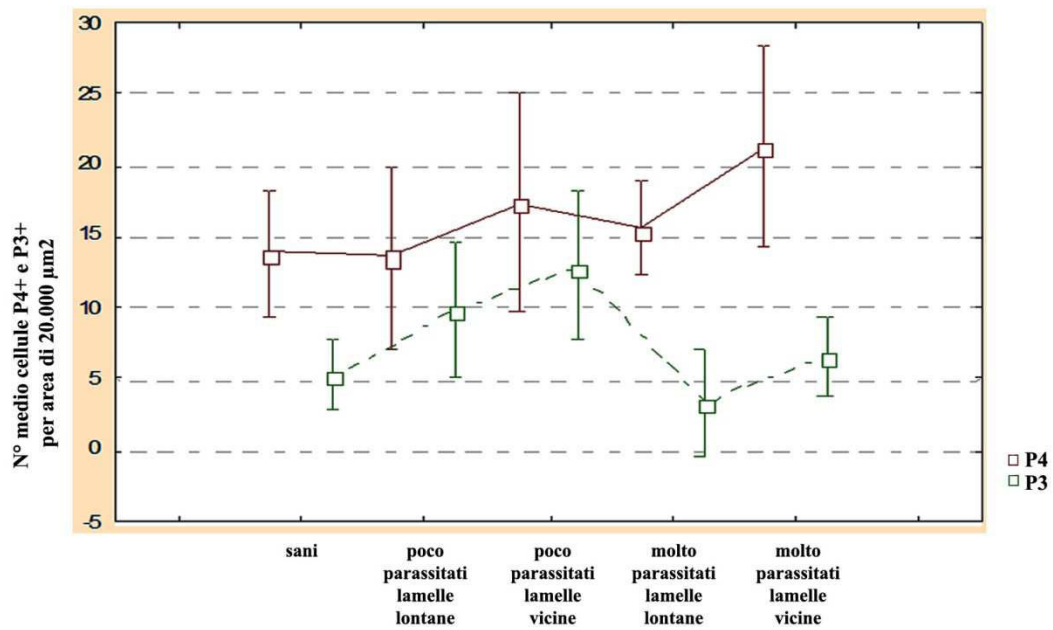
Figura 11 Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 4 (a), per 20.000μm² di area standard, e dell'intensità di marcatura (b) nei i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) tra *D. labrax* sani e parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino").



a) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati

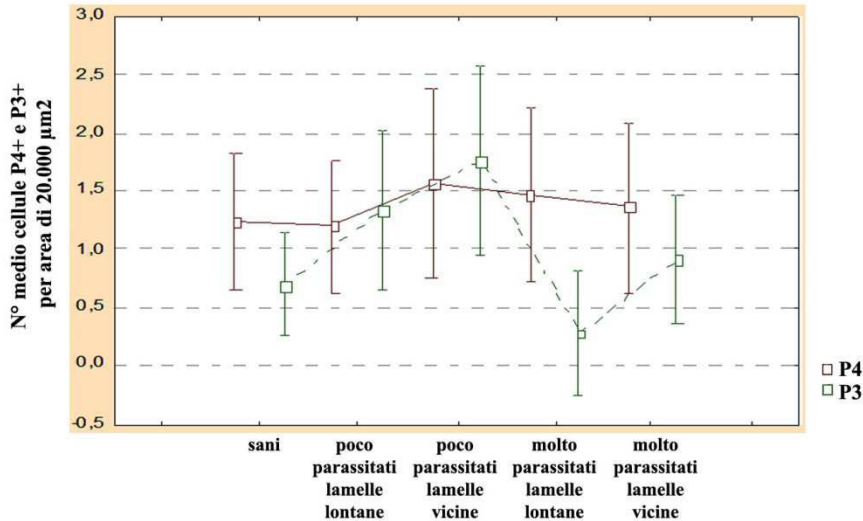


b) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino)

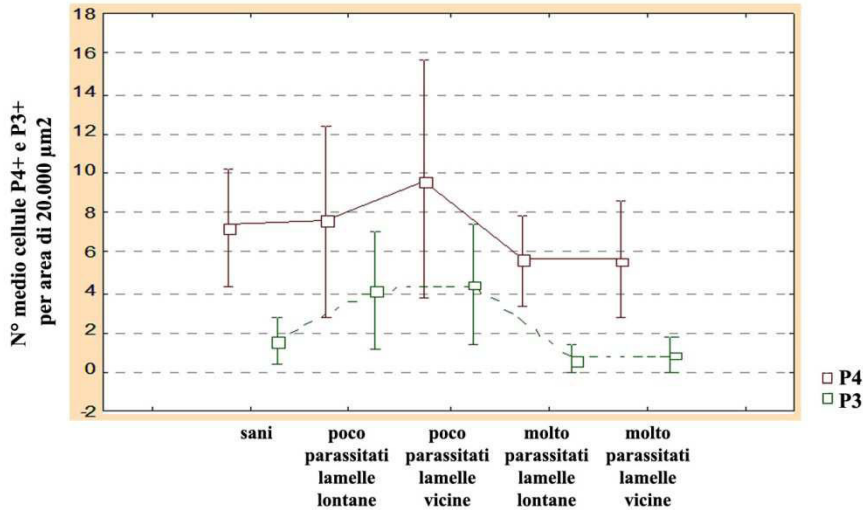


**Figura 12** Confronto tra il numero delle cellule P4 e P3 positive, per 20.000 $\mu\text{m}^2$  di area standard, negli esemplari di *D. labrax* sani e parassitati indipendentemente (a) e in base all'intensità d'infestazione e alla distanza dal parassita (b).

a) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nel seno venoso centrale



b) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei capillari delle lamelle secondarie



c) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nel tessuto extravascolare

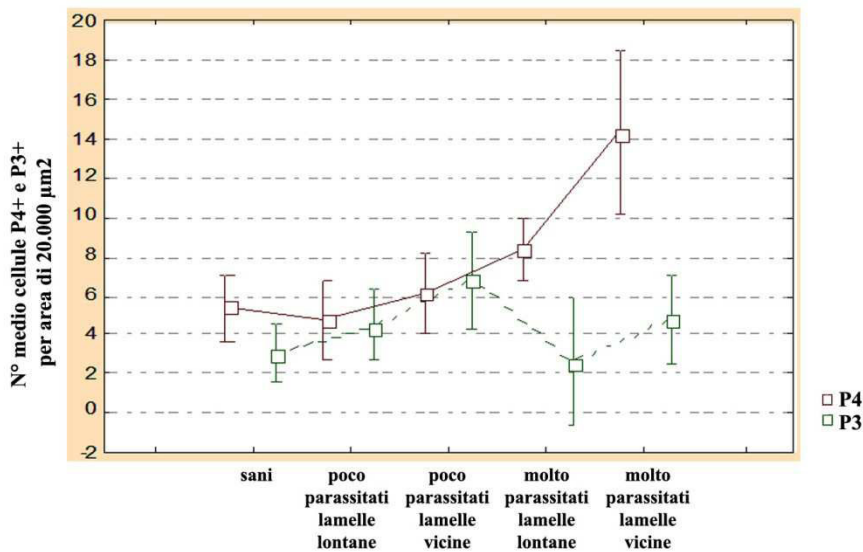
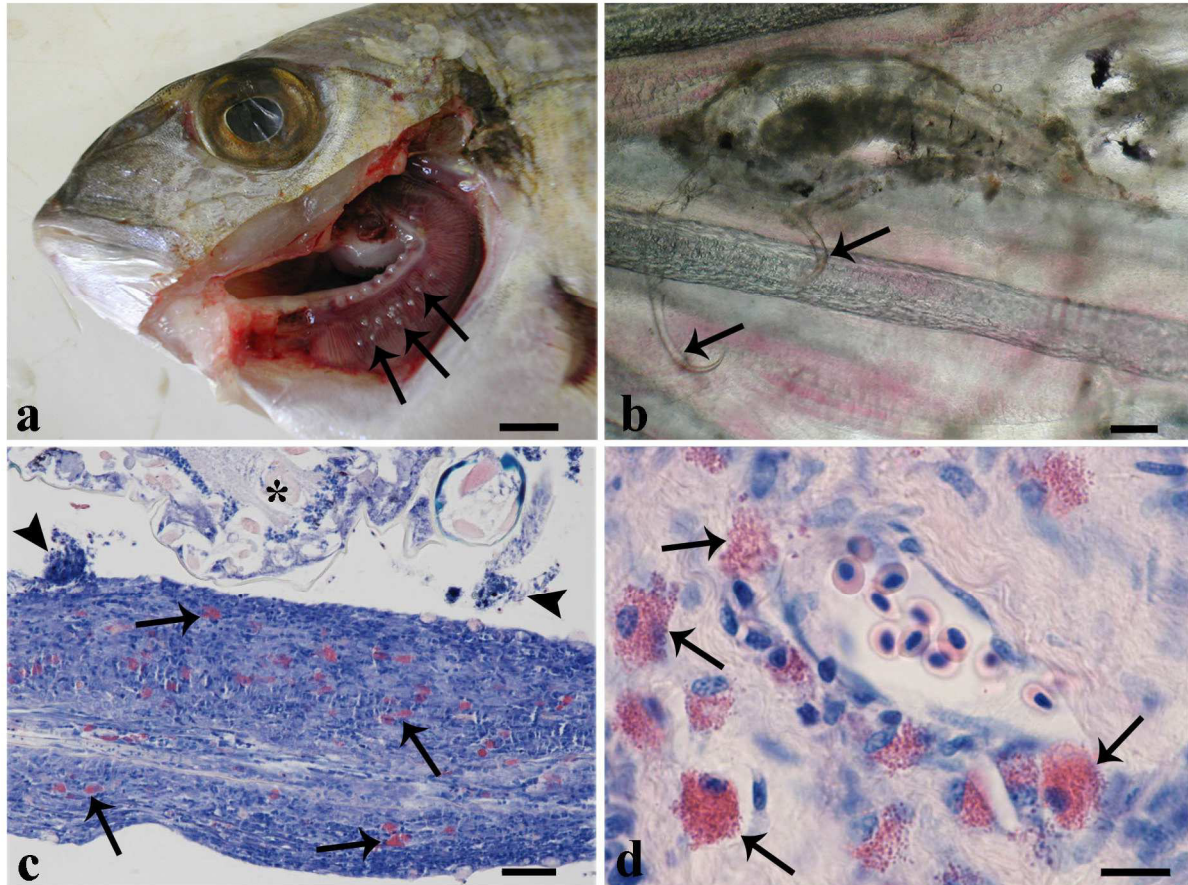
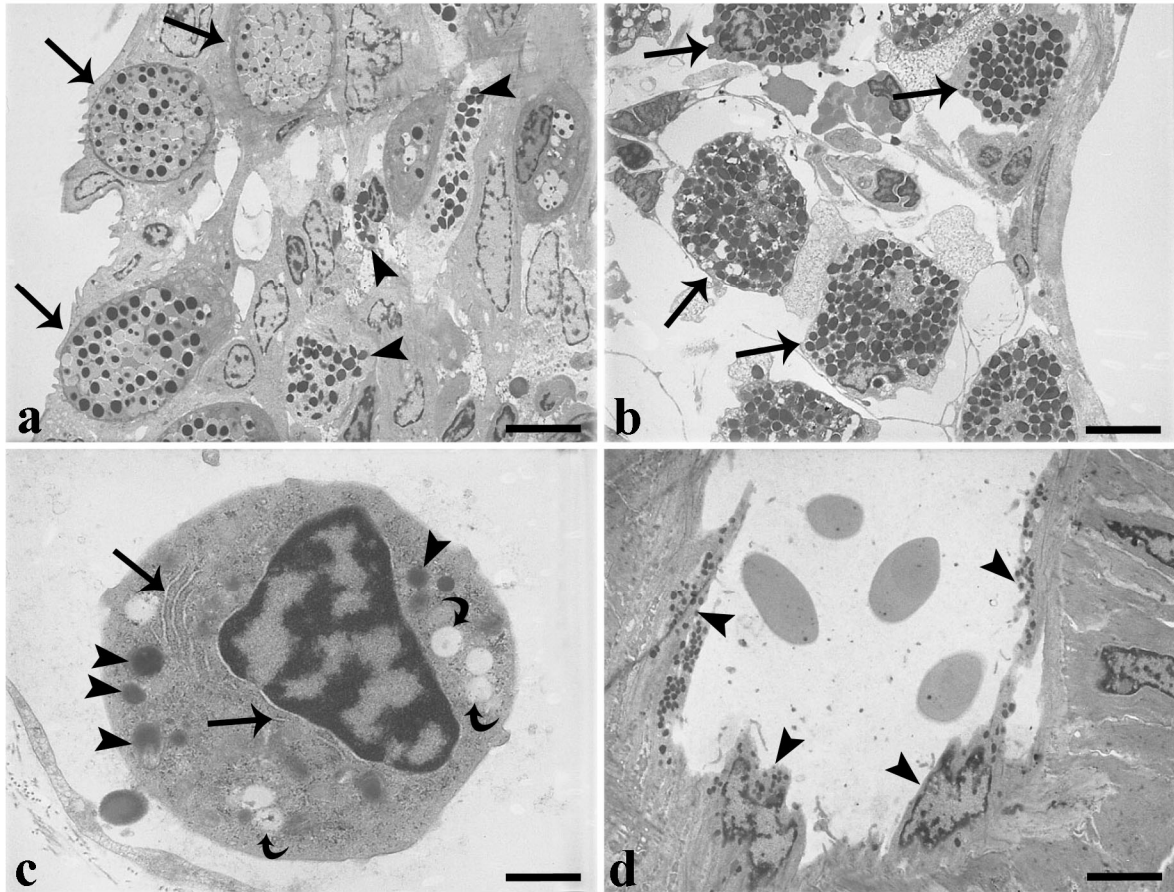


Figura 13 Confronto tra il numero delle cellule P4 e P3 positive, per 20.000 $\mu\text{m}^2$  di area standard, nel seno venoso centrale (a), nei capillari delle lamelle secondarie (b) e nel tessuto extravascolare (c) degli esemplari di *D. labrax* sani e parassitati (poco parassitati “lontano”, poco parassitati “vicino”, molto parassitati “lontano”, molto parassitati “vicino”).

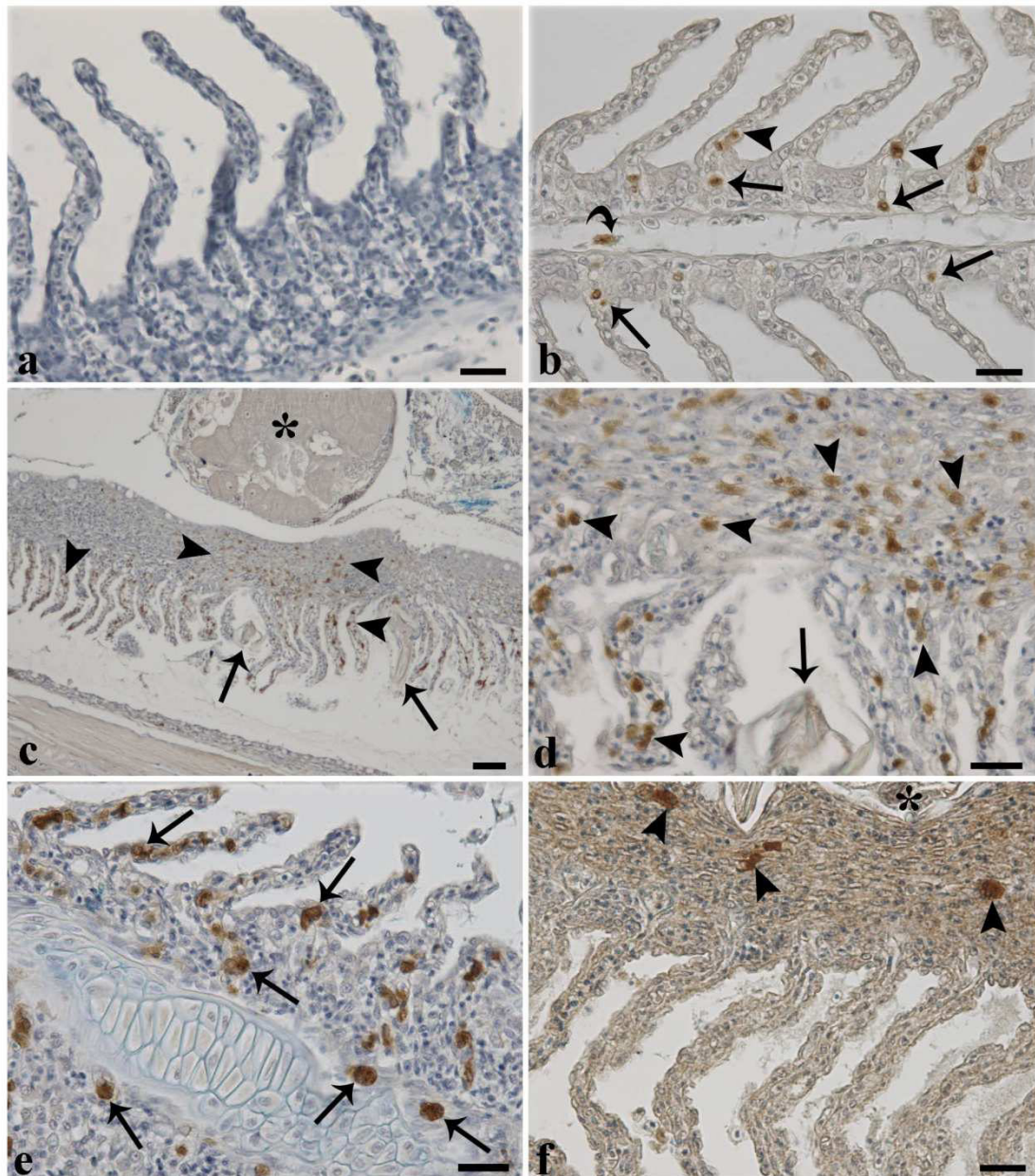


**Figura 14** *Sparus aurata* parassitata dal copepode *Ergasilus lizae*. **a)** La rimozione dell'opercolo mostra la presenza di numerosi parassiti (freccie) sulla superficie esterna delle emibranchie. I copepodi sono localizzati principalmente nella parte centrale e basale dei filamenti branchiali, barra=5mm. **b)** Esame a fresco di un filamento branchiale, il copepode si attacca grazie alle seconde antenne (freccie), barra=100 $\mu$ m. **c)** Sezione istologica colorata con Giemsa di lamella branchiale parassitata da *E. lizae* (asterisco) in cui sono visibili molte EGCs (freccie). Le punte di freccia indicano la presenza di residui cellulari, barra=20 $\mu$ m. **d)** Varie EGCs (freccie) in prossimità e all'interno di un capillare, notare i nuclei eccentrici e il contenuto granulare, barra=10 $\mu$ m.



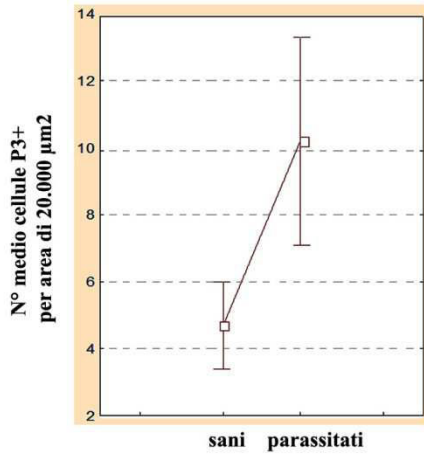
**Figura 15** Fotografie al TEM delle cellule del tessuto branchiale di *S. aurata* parassitato da *E. lizae*. **a)** MCs (punte di freccia) presenti al di sotto delle cellule mucose (freccie) nella lamella primaria, barra=4,6 $\mu$ m. **b)** Molte MCs (freccie) nel tessuto circostante un capillare (asterisco), da notare il citoplasma ricco di granuli elettron-densi, barra=3,0 $\mu$ m. **c)** Dettaglio di una MC immatura all'interno di un vaso, si possono osservare: il reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato (freccie), molti ribosomi liberi, pochi granuli elettron-densi (punte di freccia) e alcune vescicole elettron-lucide (freccie curve), barra=0,8 $\mu$ m. **d)** MCs (punte di freccia) attaccate all'endotelio di un capillare, barra=3,2 $\mu$ m.



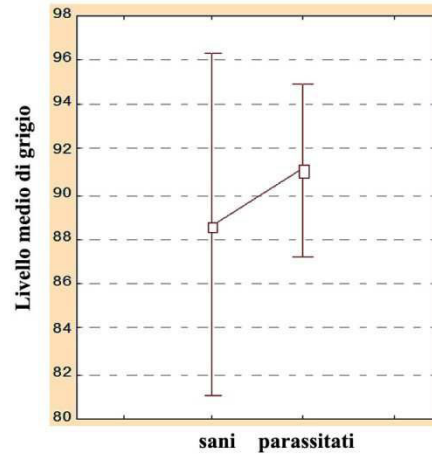


**Figura 16** Colorazione immunistoichimica su branchie di *S. aurata* parassitate da *E. lizae*. **a)** Controllo negativo che mostra l'assenza di marcatura in branchie parassitate, barra=20 $\mu$ m. **b)** Numerose cellule positive alla P3 (freccie) nella lamella primaria, nelle lamelle secondarie (punte di freccia) e all'interno del seno venoso centrale (freccia curva), barra=20 $\mu$ m. **c)** Molte cellule marcate alla P3 sparse nel tessuto extravascolare della lamella primaria e delle lamelle secondarie (punte di freccia) nella zona circostante il punto di ancoraggio di *E. lizae*, le freccie indicano le seconde antenne del parassita e l'asterisco indica il capo, barra=50 $\mu$ m. **d)** Particolare della figura 2c che mostra la positività alla P3 (punte di freccia) attorno alle antenne del parassita (freccia), barra=20 $\mu$ m. **e)** Cellule positive (freccie) alla piscidina 3 all'interno del seno venoso centrale e nei capillari delle lamelle secondarie in una zona lontano dal parassita, barra=20 $\mu$ m. **f)** Alcune MCs marcate (punte di freccia) con l'anticorpo anti-Istamina in prossimità dell'attacco del parassita (asterisco), barra=20 $\mu$ m.

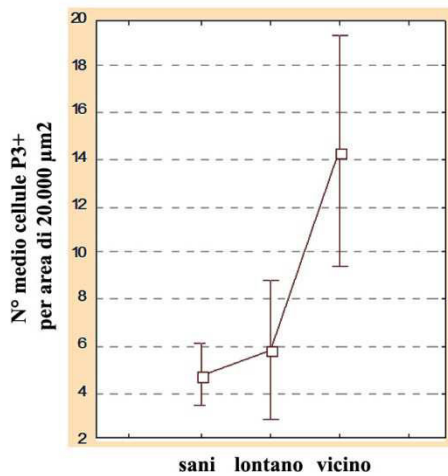
a) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati



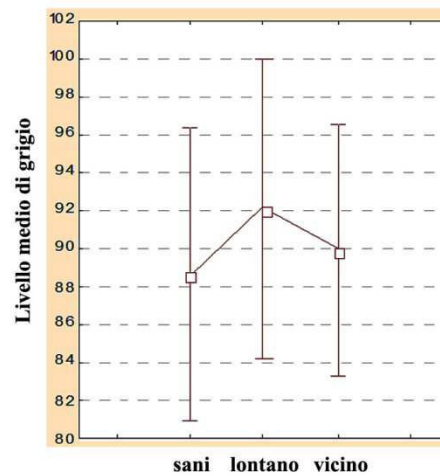
b) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati



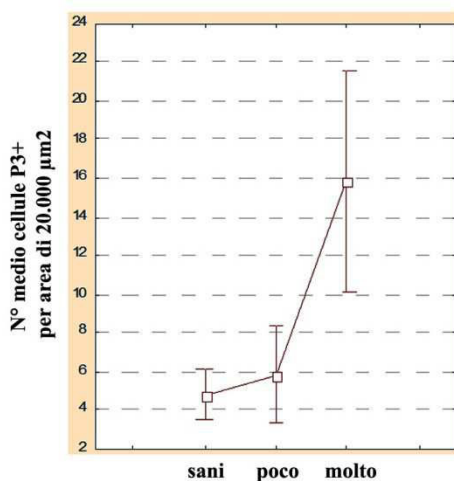
c) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita)



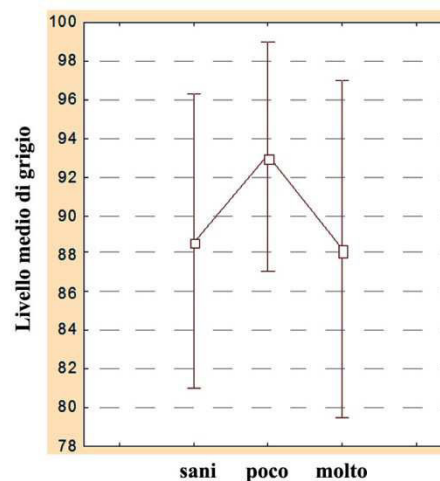
d) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita)



e) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati (poco e molto)

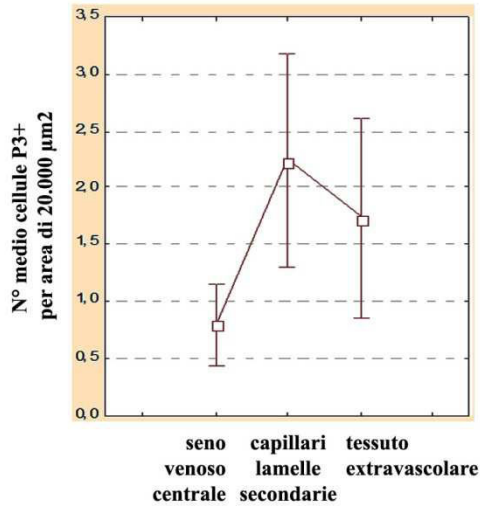


f) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati (poco e molto)

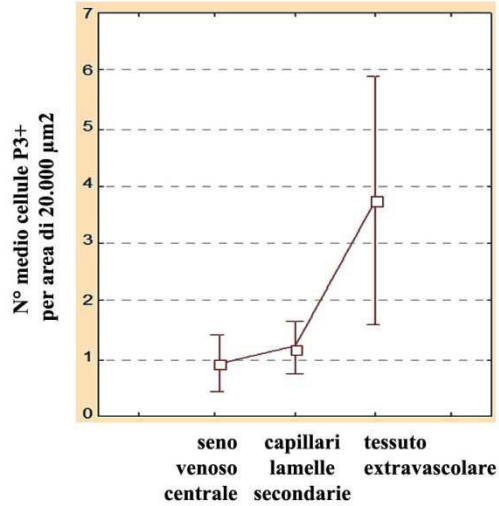


**Figura 17** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura tra branchie sane e parassitate di *S. aurata* (a,b), in base alla distanza dal parassita (c,d), e in base all'intensità d'infestazione (e,f). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

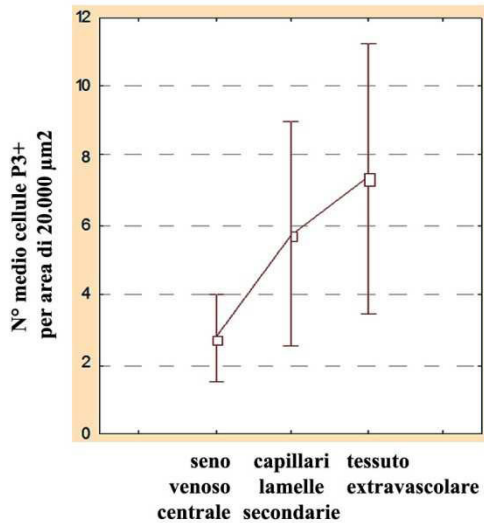
**a) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci sani**



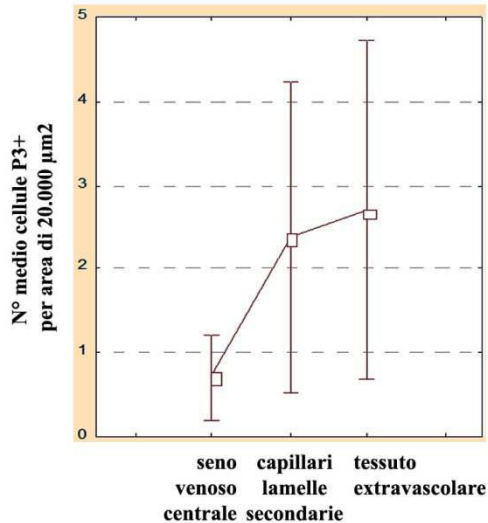
**b) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci poco parassitati**



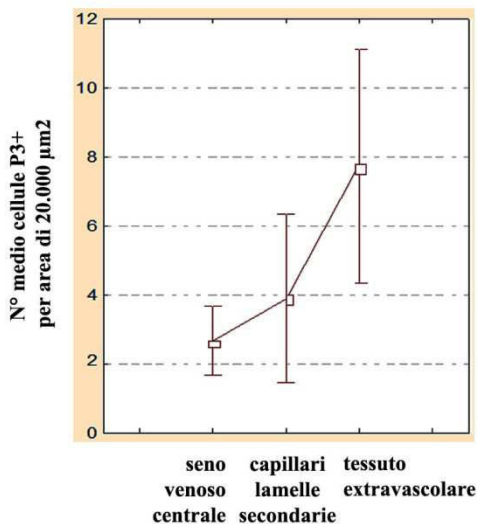
**c) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci molto parassitati**



**d) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle lontane dal parassita**



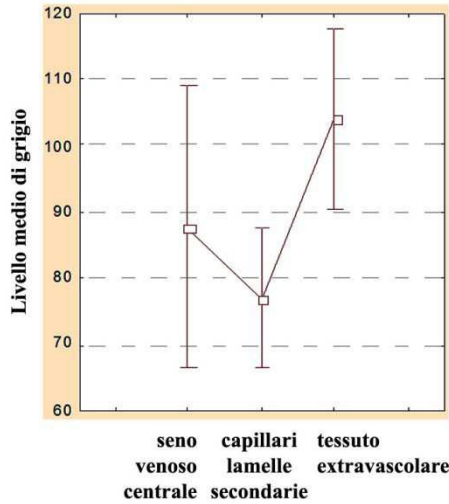
**e) Confronto n° medio cellule P3 positive nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle vicino al parassita**



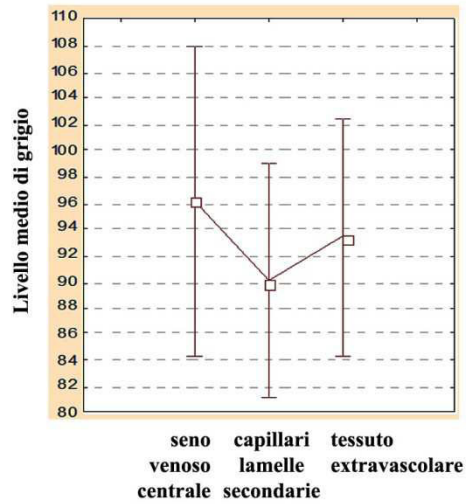
**Figura 18** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, tra i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) negli esemplari di *S. aurata* sani (a), poco (b) e molto (c) parassitati, sia nelle zone “lontano” (d) sia nelle zone “vicino” (e) al parassita. Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.



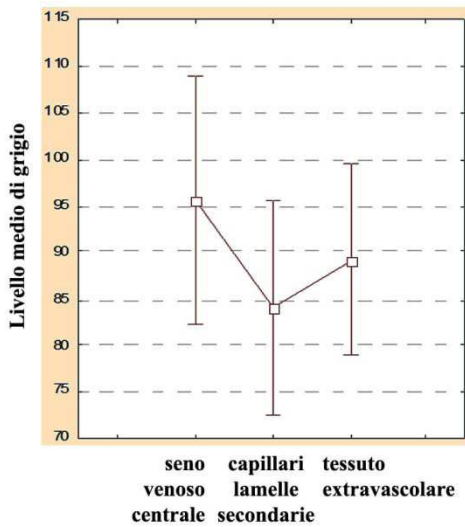
**a) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci sani**



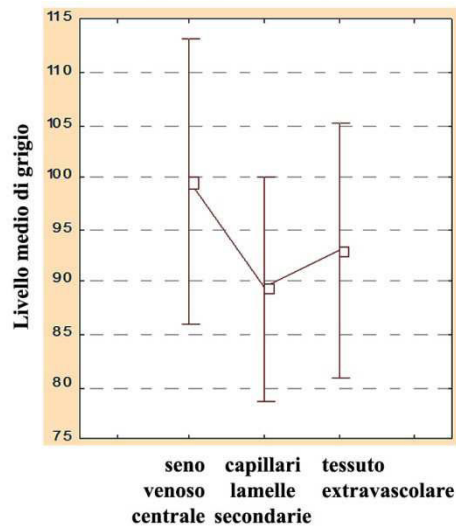
**b) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci poco parassitati**



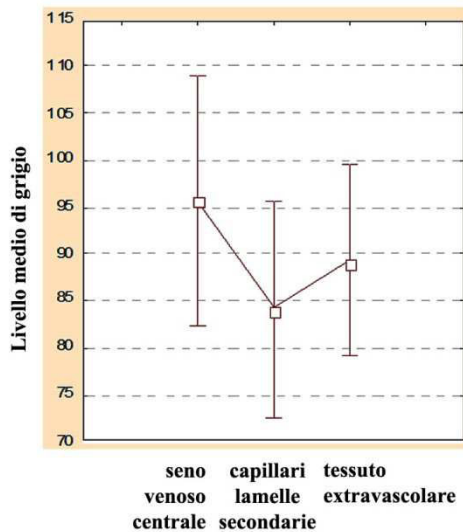
**c) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci molto parassitati**



**d) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle lontane dal parassita**



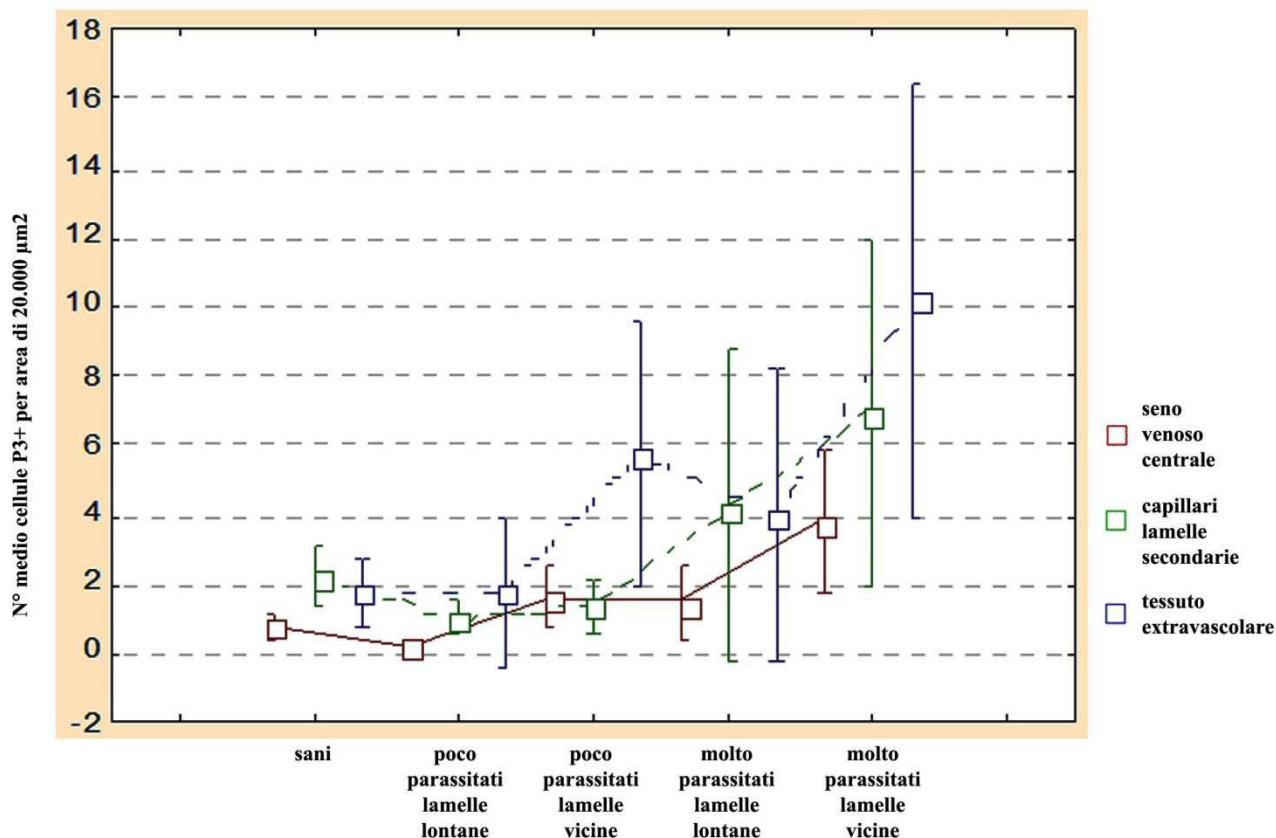
**e) Confronto intensità media di marcatura P3 nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle vicino al parassita**



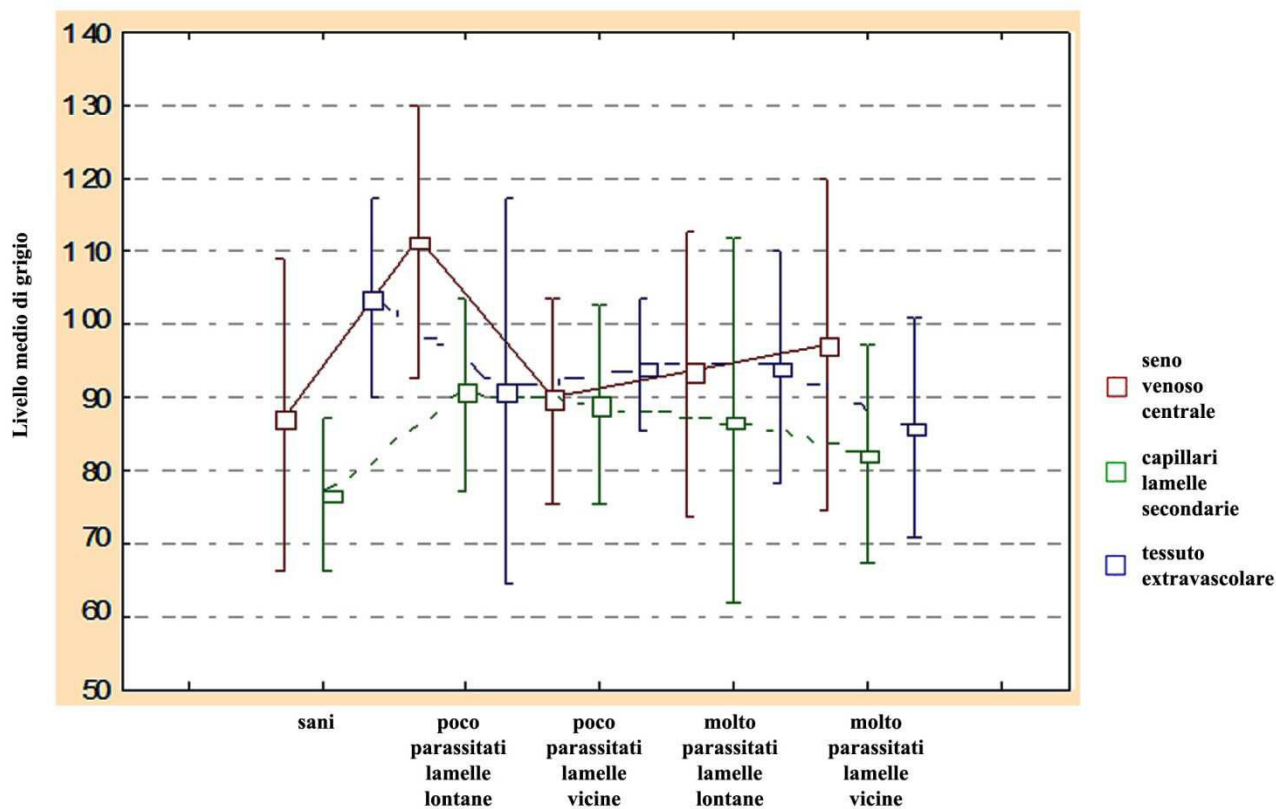
**Figura 19** Confronto dell'intensità di marcatura alla piscidina 3 tra i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) negli esemplari di *S. aurata* sani (a), poco (b) e molto (c) parassitati, sia nelle zone "lontano" (d) sia nelle zone "vicino" (e) al parassita. Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.



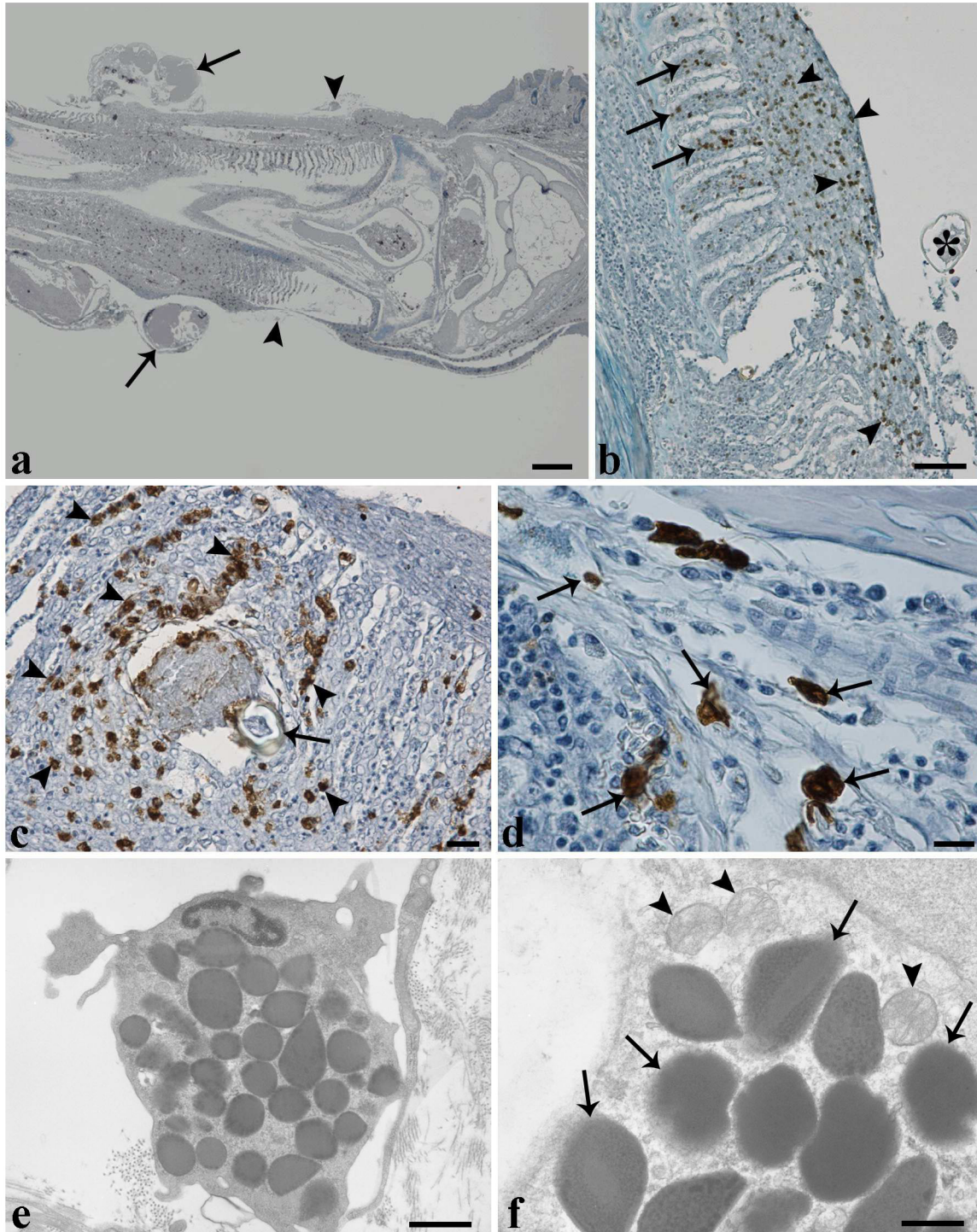
a) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei tre distretti tissutali della lamella



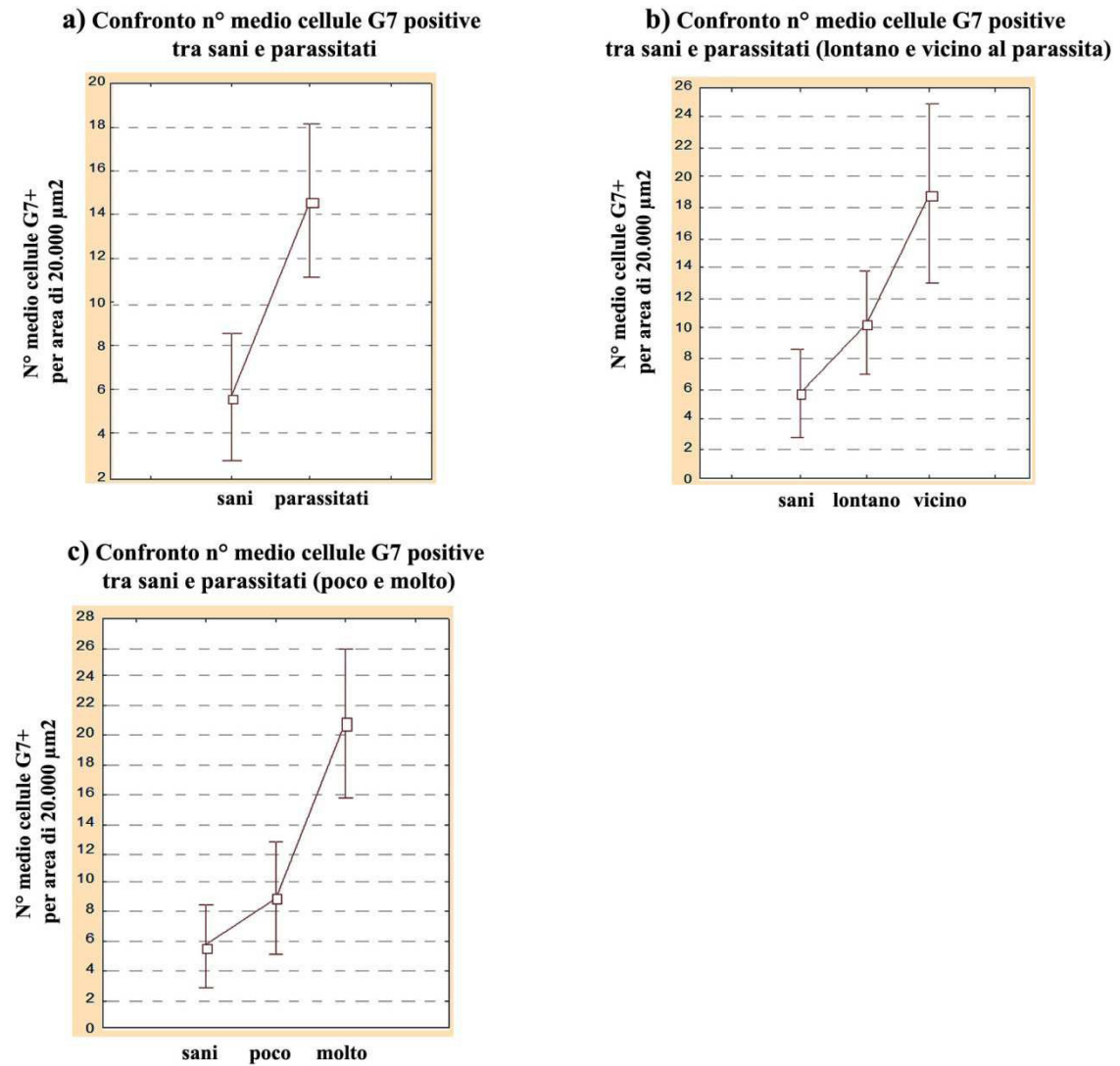
b) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei tre distretti tissutali della lamella



**Figura 20** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3 (a), per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura (b) nei i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) tra *S. aurata* sani e parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino"). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.



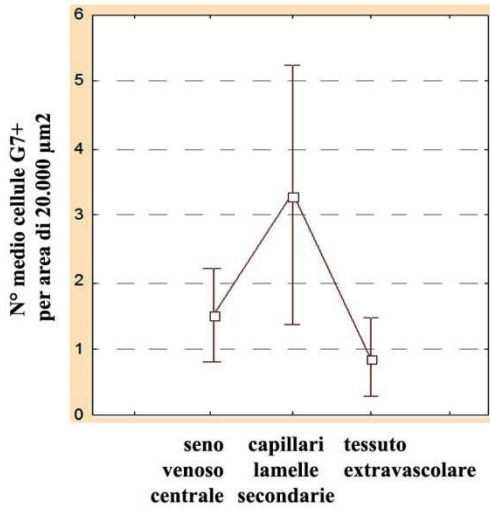
**Figura 21** a) Colorazione immunohistochimica con anticorpo G7 su branchie di *S. aurata* parassitate da *E. lizae*. Attorno alla zona di attacco dei copepodi (freccie) era visibile la desquamazione e la necrosi del tessuto (punte di freccia), barra=200 $\mu$ m. b) Numerosi AGs positivi al G7 nel tessuto extravascolare della lamella primaria (punte di freccia) e delle lamelle secondarie (freccie) vicine all'attacco del copepode (asterisco), barra=50 $\mu$ m. c) Molti AGs marcati con G7 (punte di freccia) nella zona di infiammazione che circonda le seconde antenne (freccia) del copepode, barra=20 $\mu$ m. d) AGs marcati con G7 (freccie) nel seno venoso centrale, barra=10 $\mu$ m. e) Foto al TEM di un AG all'interno di un capillare, notare la forma irregolare e i numerosi granuli elettron-densi all'interno del citoplasma, barra=0,8 $\mu$ m. f) Particolare di alcuni granuli (freccie) di forma tonda e/o ovale con un core elettron-denso al loro interno, sono visibili anche alcuni mitocondri (punte di freccia), barra=0,4 $\mu$ m.



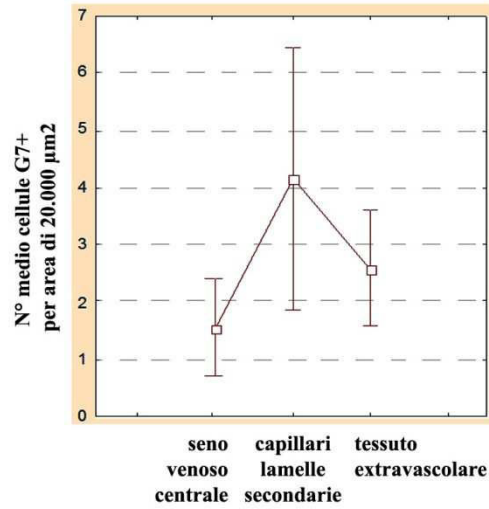
**Figura 22** Confronto del numero di AGs positivi al G7, per 20.000 $\mu\text{m}^2$  di area standard, tra branchie sane e parassitate di *S. aurata* (a), in base alla distanza dal parassita (b), e in base all'intensità d'infestazione (c). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.



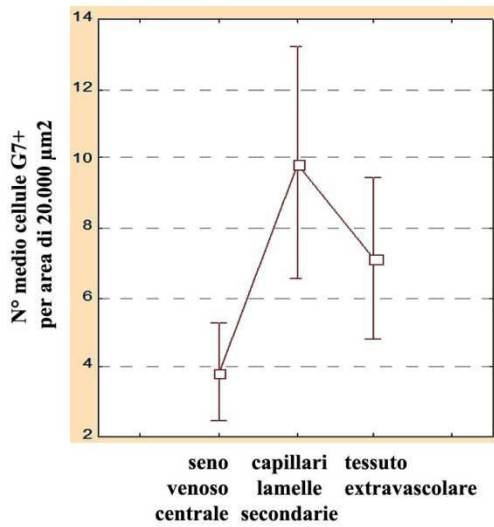
**a) Confronto n° medio cellule G7 positive nei tre distretti tissutali, pesci sani**



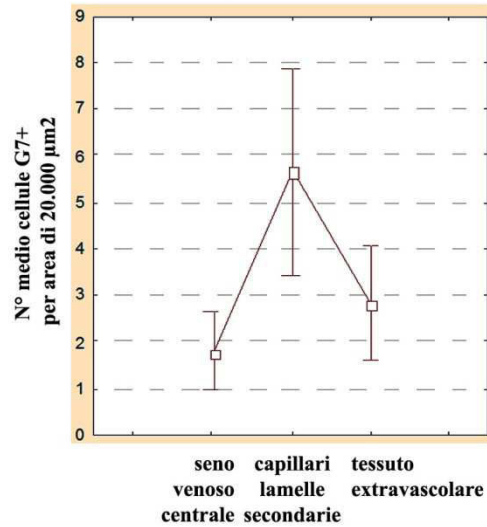
**b) Confronto n° medio cellule G7 positive nei tre distretti tissutali, pesci poco parassitati**



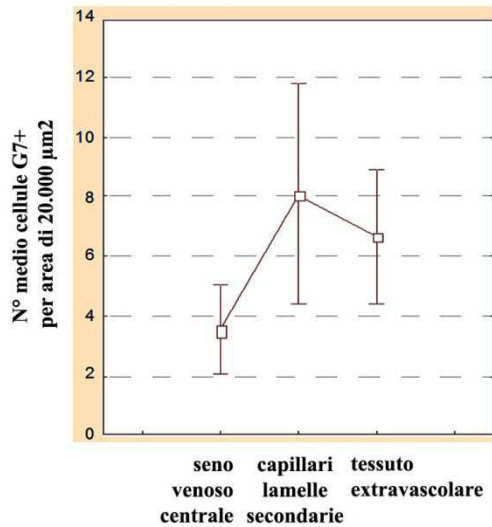
**c) Confronto n° medio cellule G7 positive nei tre distretti tissutali, pesci molto parassitati**



**d) Confronto n° medio cellule G7 positive nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle lontane dal parassita**

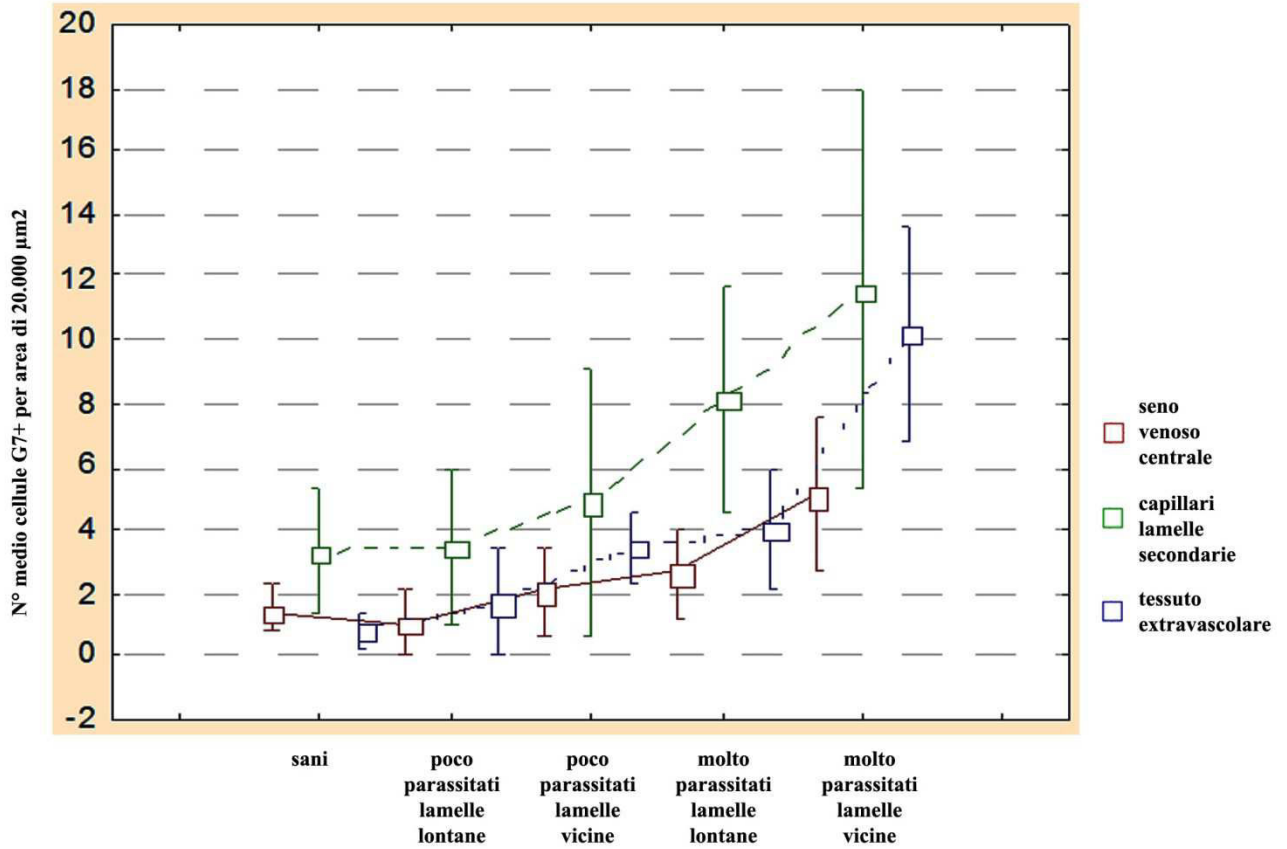


**e) Confronto n° medio cellule G7 positive nei tre distretti tissutali, pesci parassitati, lamelle vicino al parassita**

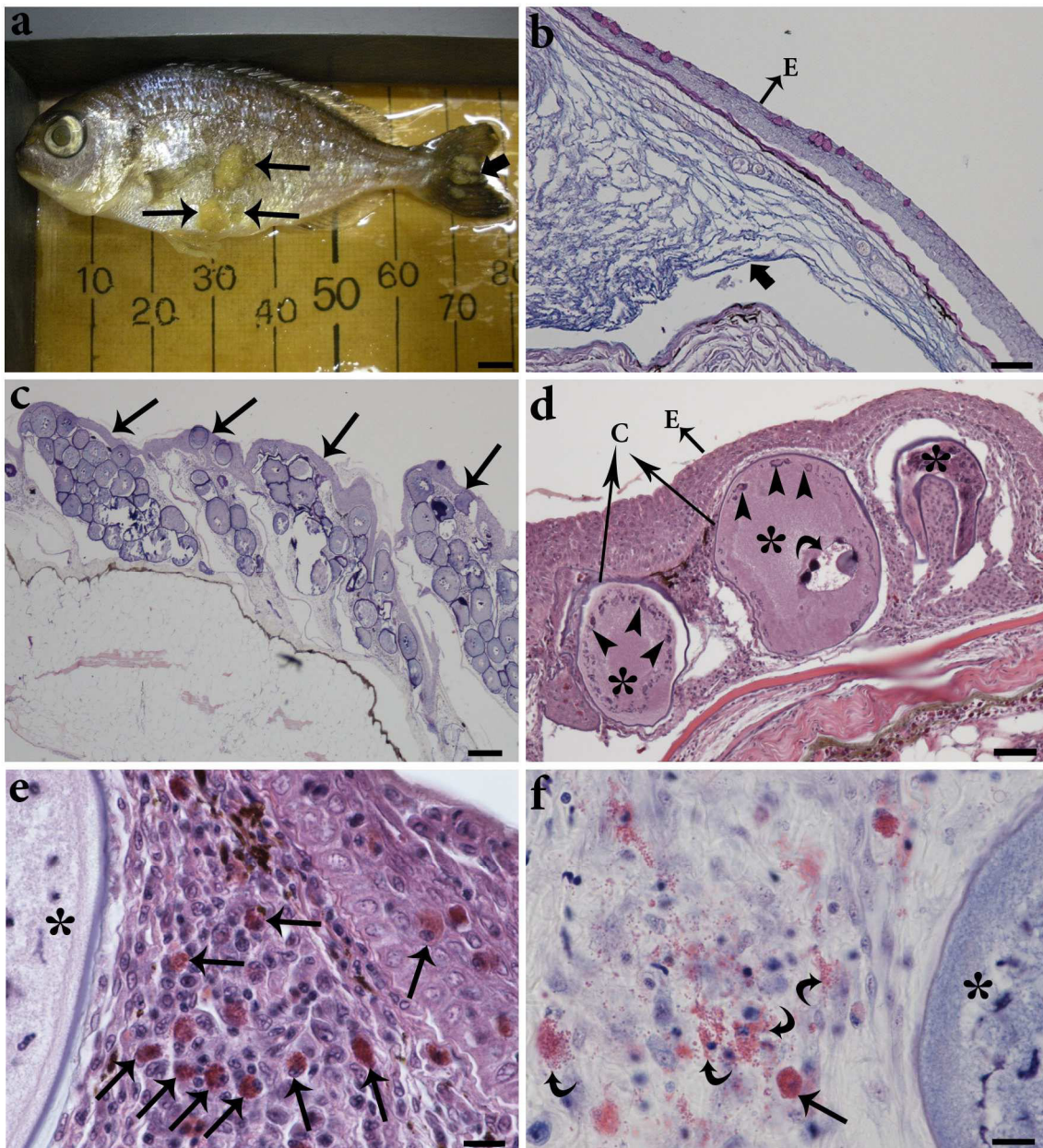


**Figura 23** Confronto del numero di AGs positivi al G7, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, tra i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) negli esemplari di *S. aurata* sani (a), poco (b) e molto (c) parassitati, sia nelle zone “lontano” (d) sia nelle zone “vicino” (e) al parassita. Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

Confronto n° medio cellule G7 positive tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nei tre distretti tissutali della lamella

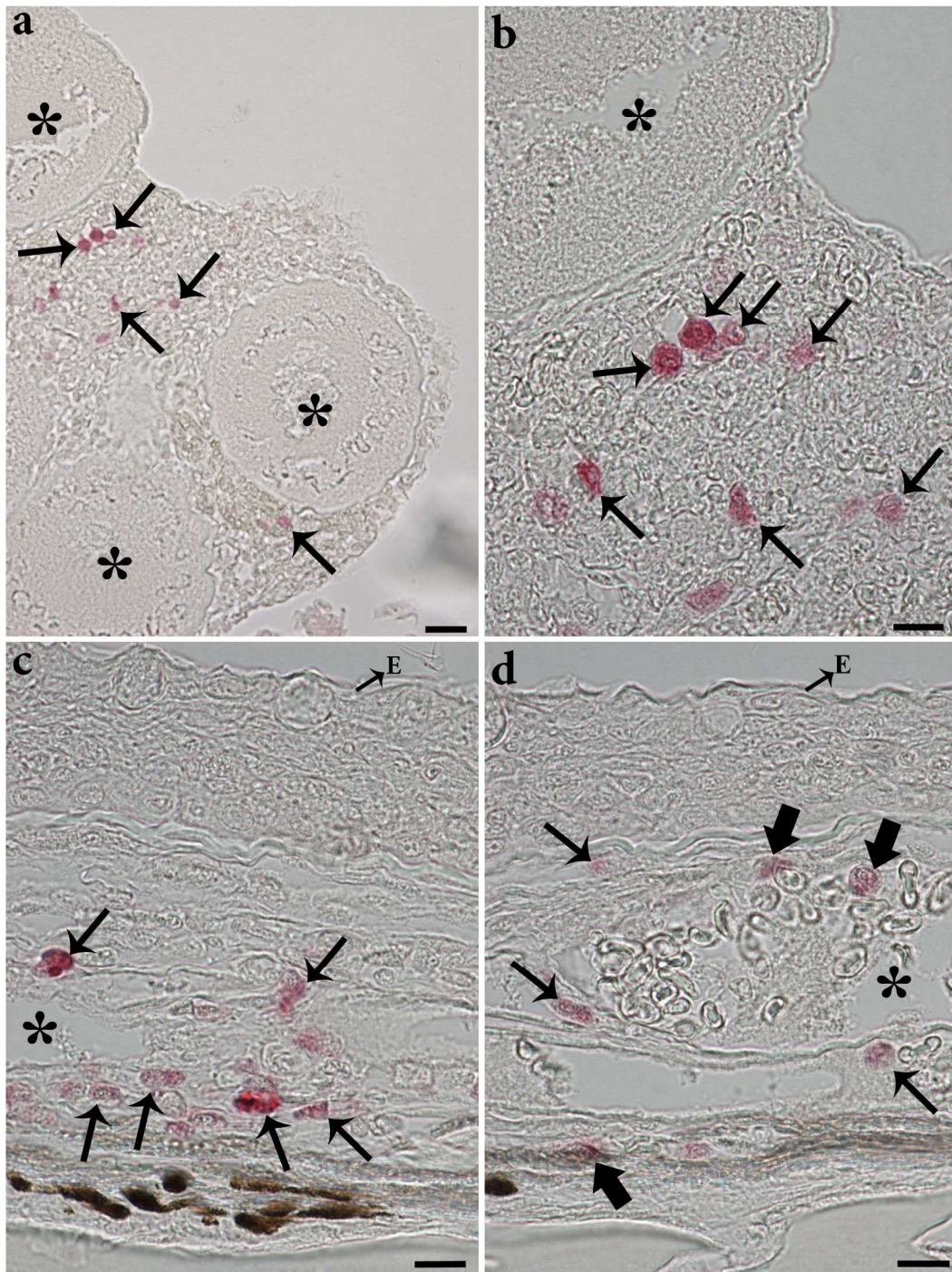


**Figura 24** Confronto del numero di AGs positivi al G7, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, nei i tre distretti tissutali (seno venoso centrale, capillari delle lamelle secondarie e tessuto extravascolare) tra *S. aurata* sani e parassitati (poco parassitati “lontano”, poco parassitati “vicino”, molto parassitati “lontano”, molto parassitati “vicino”). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.



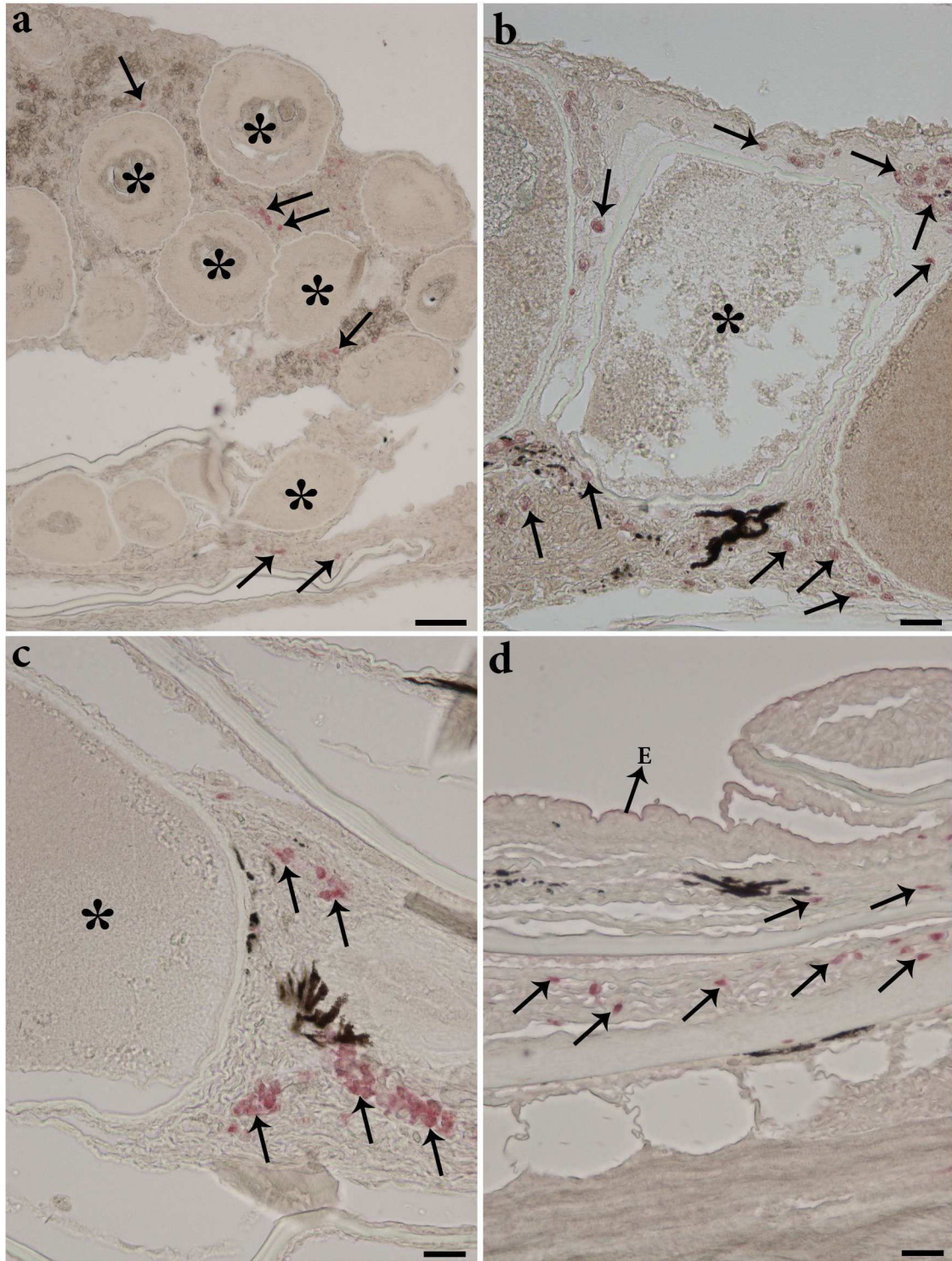
**Figura 25** Lymphocystis Disease Virus (LCDV) sulla cute di *S. aurata*. **a)** Linfocisti sulla pinna caudale (freccia grossa) e sulla parte laterale del corpo (freccie), barra=6mm. **b)** Sezione istologica di *S. aurata* sana, si nota l'integrità del derma (freccia grossa) e dell'epitelio (E), Alcian-Blue, barra=50µm. **c)** Diverse linfocisti formano quattro grandi noduli (freccie) nello spessore del derma, Giemsa, barra=200µm. **d)** Le linfocisti sono rappresentate da fibroblasti ingrossati (asterischi) per la presenza del virus, nucleo in degenerazione (freccia curva) con nucleoli, inclusioni citoplasmatiche (punte di freccia) e una capsula (C) esterna, epitelio (E), E&E, barra=50µm. **e)** Intensa reazione cellulare vicino ad una linfocisti (asterisco), sono evidenti numerose EGCs colorate in rosso (freccie), E&E, barra=10µm. **f)** Presenza di alcune EGCs intatte (freccia) all'interno dei capillari vicino alla linfocisti (asterisco) e alcune in fase di degranolazione (freccie curve), E&E, barra=10µm.





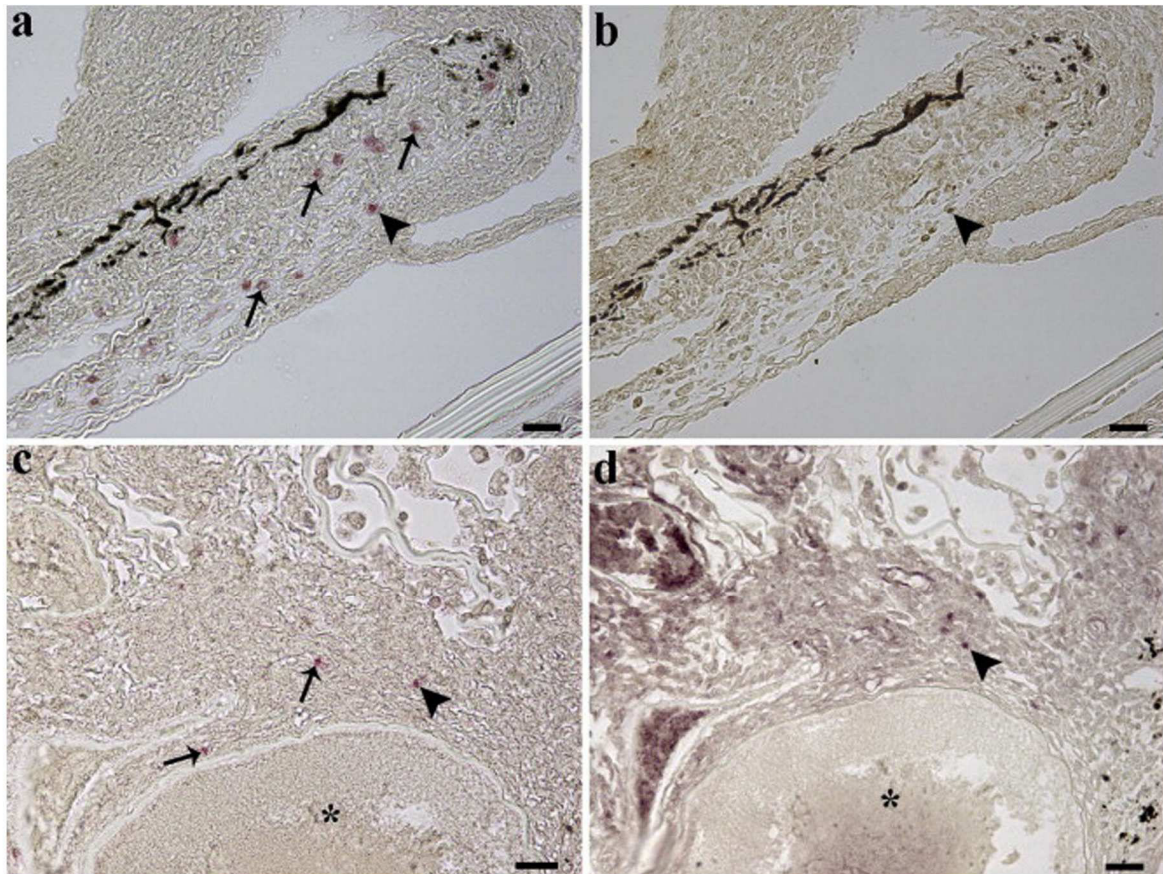
**Figura 26** Colorazione immunohistochimica con anti-piscidina 3 su sezioni istologiche di cute di *S. aurata* con linfocisti. **a)** AGs positivi (freccie) in prossimità delle linfocisti (asterischi), barra=20 $\mu$ m. **b)** Particolare della foto precedente che mostra la presenza degli AGs marcati (freccie) vicino alla linfocisti (asterisco), barra=10 $\mu$ m. **c)** Alcuni AGs positivi (freccie) nel tessuto connettivo del derma in prossimità dei capillari (asterischi), epitelio (E), barra=10 $\mu$ m. **d)** Gli AGs positivi sono stati osservati sia all'interno di un capillare (freccie grosse) sia nel tessuto circostante (freccie), epitelio (E), capillare (asterisco), barra=10 $\mu$ m.



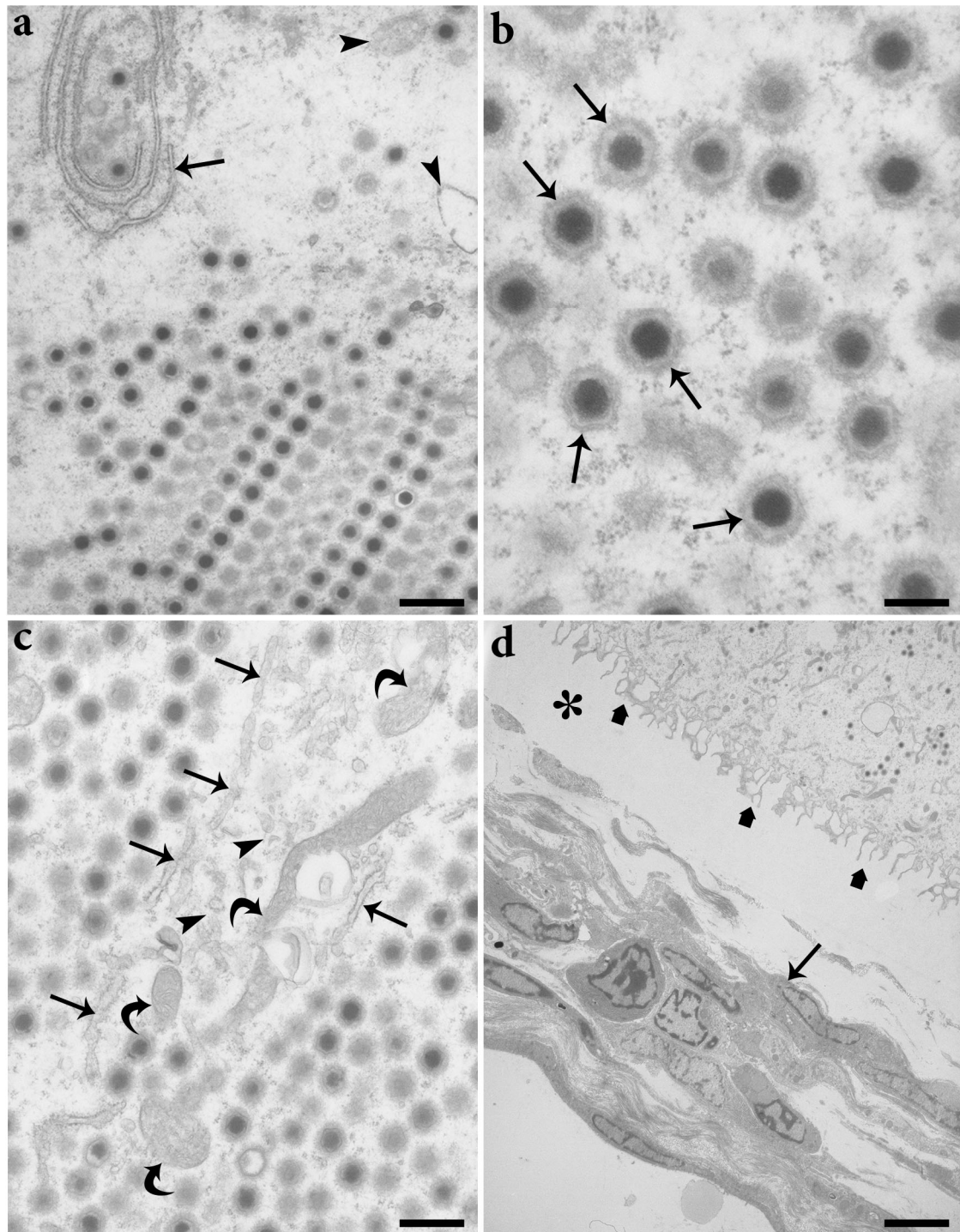


**Figura 27** Colorazione immunoistochimica con G7 su sezioni istologiche di cute di *S. aurata* con linfocisti. **a)** AGs positivi (frece) in prossimità delle linfocisti (asterischi), barra=50µm. **b)** AGs marcati (frece) attorno a una linfocisti (asterisco), barra=20µm. **c)** Numerosi AGs positivi (frece) raggruppati ad un lato di una linfocisti (asterisco), barra=20µm. **d)** Vari AGs positivi (frece) sparsi nello spessore del derma di una cute parassitata, epitelio (E), barra=50µm.

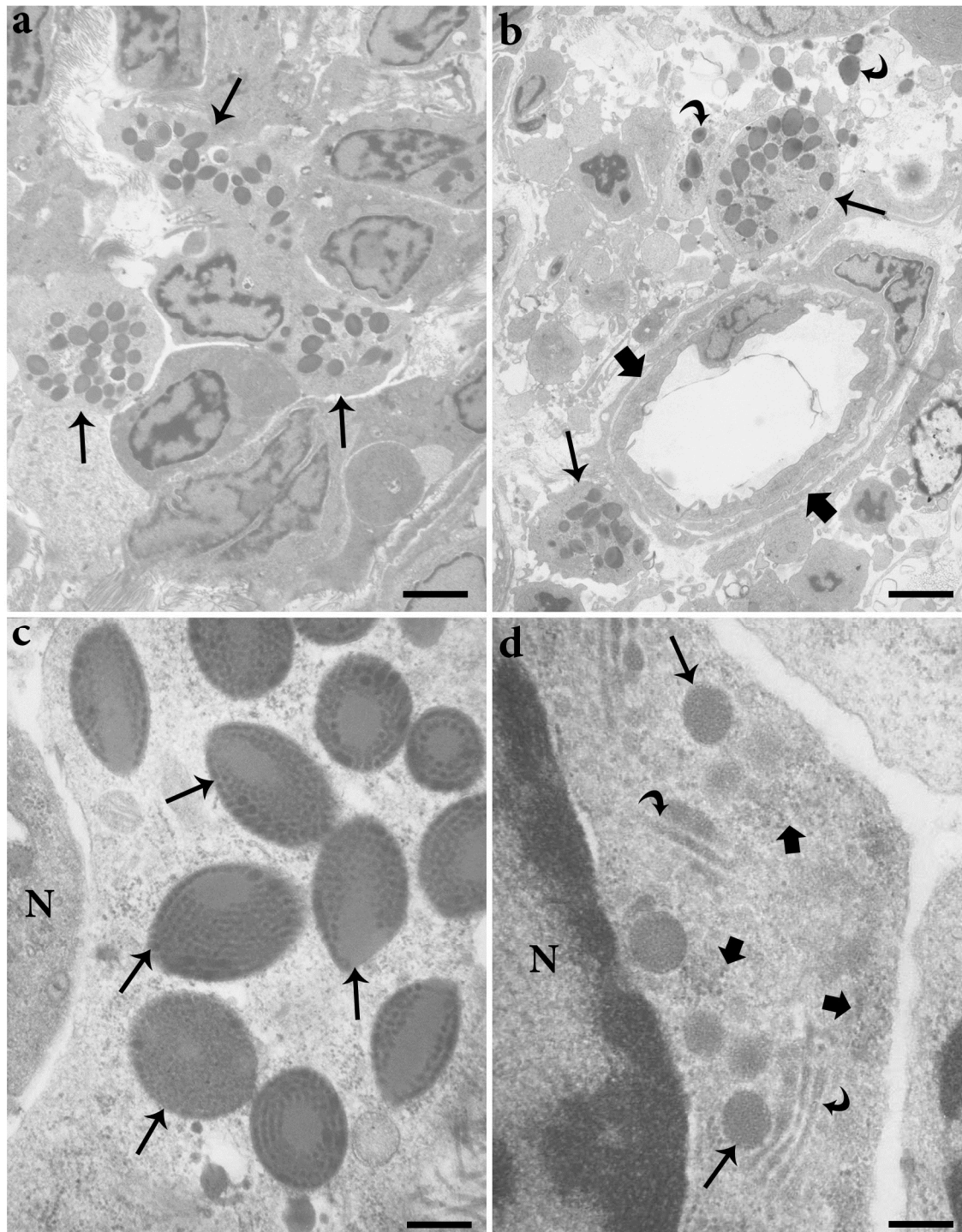




**Figura 28** Doppia colorazione immunohistochimica con G7 (**a,c**) e anticorpo anti-Interleuchina 1 $\beta$  (**b,d**) su sezioni di cute di *S. aurata* con linfocisti. **a**) AGs positivi (freccie e punta di freccia) nel derma di una cute infettata, barra=20 $\mu$ m. **b**) Stessa sezione della foto precedente, notare un AG marcato con l'anti-IL 1 $\beta$ , barra=20 $\mu$ m. **c**) Alcuni AGs marcati con G7 (freccie e punta di freccia) vicino ad una linfocisti (asterisco), barra=20 $\mu$ m. **d**) Stessa sezione della foto precedente, solo un AG risultava marcato anche per l'IL 1 $\beta$ , barra=20 $\mu$ m.

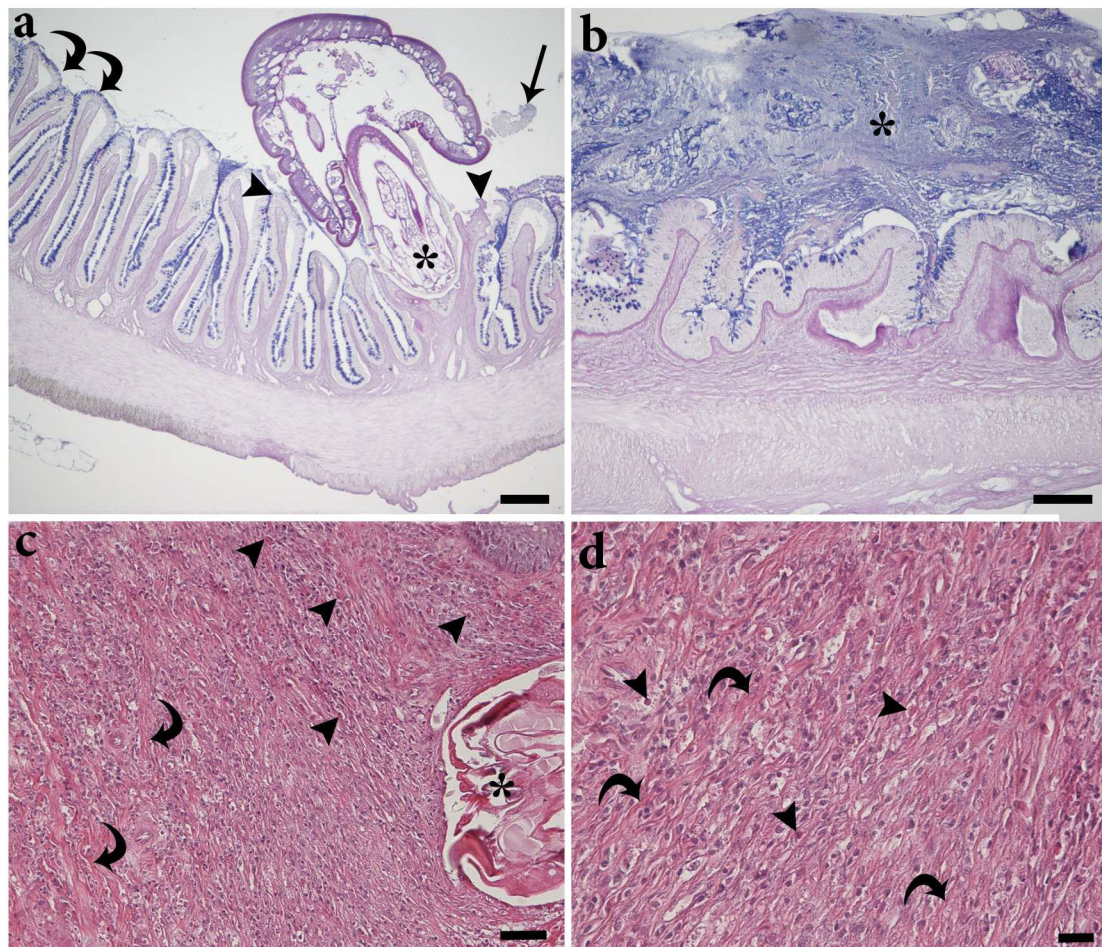


**Figura 29** Fotografie al TEM di cute con linfocisti di *S. aurata*. **a)** Immagine delle particelle virali nel citoplasma di una linfocisti, sono visibili anche il reticolo endoplasmatico rugoso (freccia) e residui membranosi non ben riconoscibili (punte di freccia), barra=0,6 $\mu$ m. **b)** Particolare del profilo esagonale delle particelle virali (freccie) circondate dal proprio capside, barra=0,13 $\mu$ m. **c)** Citoplasma di una cellula infettata, sono visibili i mitocondri (freccie curve), frammenti del reticolo endoplasmatico rugoso (freccie) e residui membranosi poco definiti (punte di freccia), barra=0,46 $\mu$ m. **d)** Zona periferica di una cellula infettata, è visibile il margine dentellato del citoplasma (freccie grosse), la parete cellulare ialina (asterisco) e il tessuto cutaneo circostante (freccia), barra=2,76 $\mu$ m.

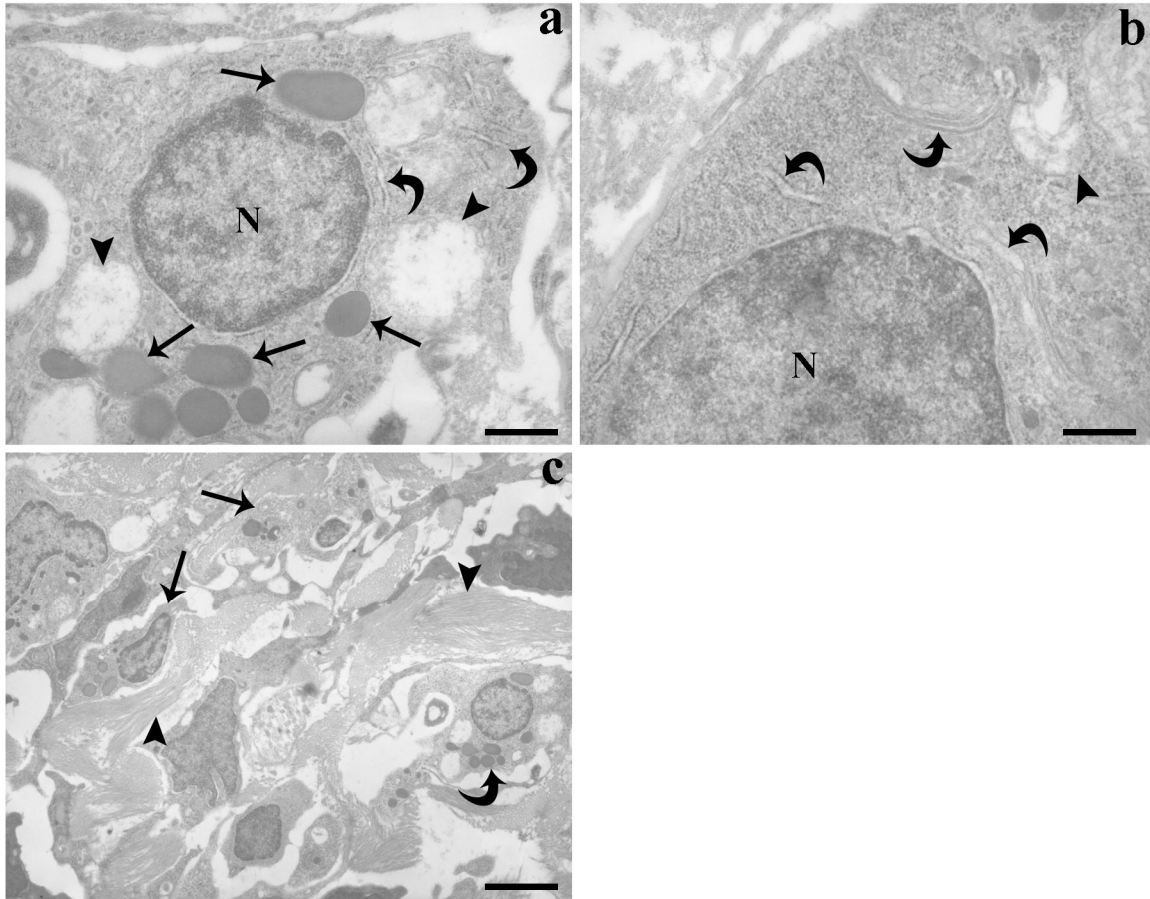


**Figura 30** Fotografie al TEM di cute con linfocisti di *S. aurata*. **a)** Alcuni AGs (freccie) in prossimità di una linfocisti (non mostrata), barra=1,89 $\mu$ m. **b)** Due AGs (freccie) nelle vicinanze di un capillare (freccie grosse), è visibile la degranulazione (freccie curve), barra=2 $\mu$ m. **c)** Particolare dei granuli (freccie) di un AG, notare il core elettron-denso più interno, nucleo (N), barra=0,24 $\mu$ m. **d)** Citoplasma di un AG, sono visibili il reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato (freccie curve) in contatto con i granuli (freccie) e i numerosi ribosomi liberi (freccie grosse), nucleo (N), barra=0,15 $\mu$ m.



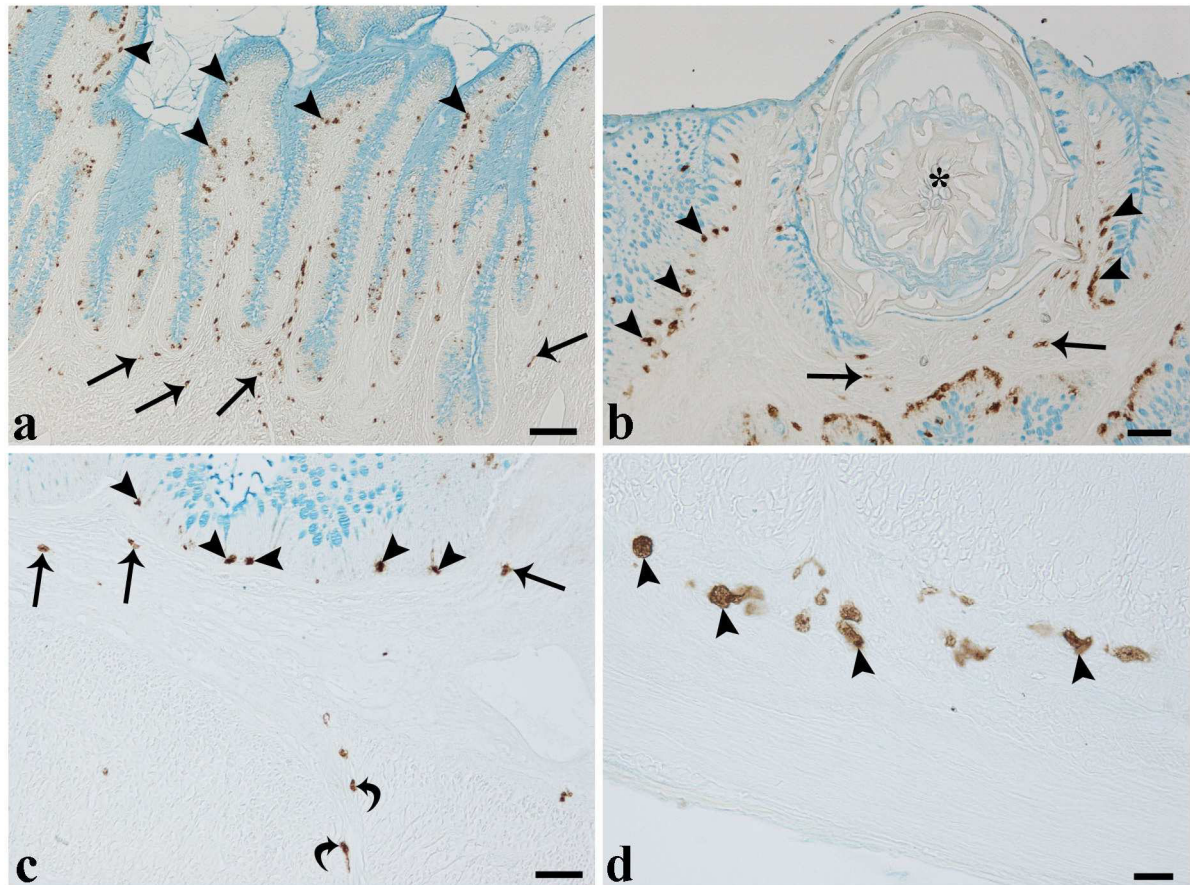


**Figura 31** Sezioni istologiche di intestino di *Perca fluviatilis* parassitato da *Acanthocephalus lucii*. **a)** *A. lucii* (asterisco) non penetra profondamente nella parete intestinale. La distruzione dell'apice dei villi (punte di freccia) e la presenza di residui cellulari (freccia) adiacenti il corpo del parassita sono evidenti, i villi più distanti presentano un elevato numero di cellule mucose (freccie curve), Alcian-Blu, barra=200 $\mu$ m. **b)** Zona "lontano" dall'attacco del parassita in cui è ben visibile l'eccessiva secrezione di muco che ricopre i villi (asterisco), Alcian-Blu, barra=100 $\mu$ m. **c)** Nello strato sottomucoso sottostante la proboscide del parassita (asterisco) sono presenti molti granulociti (punte di freccia), fibroblasti e fibre collagene (freccie curve), E&E, barra=50 $\mu$ m. **d)** Particolare della foto precedente in cui sono visibili i granulociti (punte di freccia) e le fibre collagene (freccie curve), E&E, barra=50 $\mu$ m.

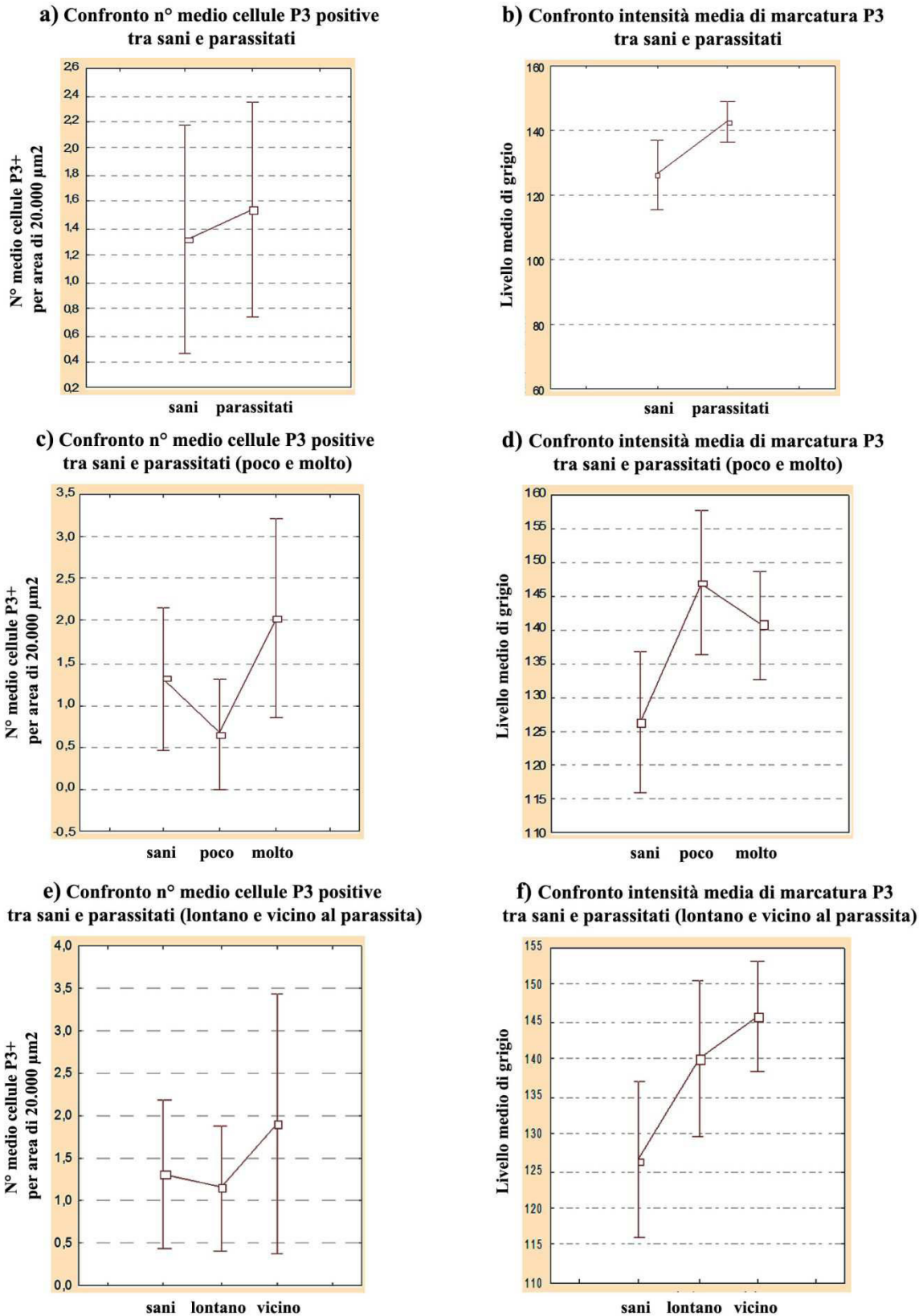


**Figura 32** Fotografie al TEM di intestino di *P. fluviatilis* con *A. lucii*. **a)** Mast cell nel sottomucosa, sono visibili i numerosi granuli elettron-densi (freccie), alcuni mitocondri in degenerazione (punte di freccia) e il reticolo endoplasmatico rugoso (freccie curve), nucleo (N), barra=0,58 $\mu$ m. **b)** Particolare del citoplasma di una MC in cui è ben visibile il reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato (freccie curve) e un mitocondrio (punta di freccia), nucleo (N), barra=0,37 $\mu$ m. **c)** Le MCs nel sottomucosa sono presenti sia all'interno dei capillari (freccia curva) sia nel tessuto circostante (freccie) in stretto contatto con le fibre collagene (punte di freccia), barra=2,8 $\mu$ m.



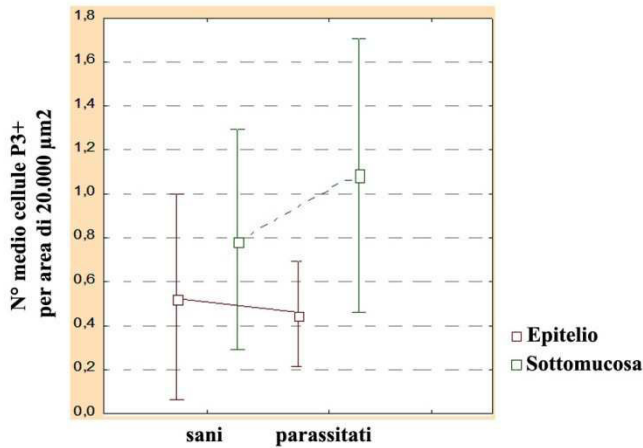


**Figura 33** Colorazione immunohistochimica con anti-piscidina 3 e 4 su sezioni istologiche di intestino di *P. fluviatilis* infestato da *A. lucii*. **a)** Mast cells positive presenti nello strato epiteliale vicino alla membrana basale (punte di freccia) e nello strato sottomucoso (freccie) in una zona lontana dall'attacco del parassita, barra=100 $\mu$ m. **b)** Numerose MCs marcate nell'epitelio (punte di freccia) vicino alla proboscide dell'acantocefalo e nel sottomucosa (freccie) in contatto con gli uncini della proboscide (asterisco), barra=50 $\mu$ m. **c)** MCs positive alla base dell'epitelio (punte di freccia), nello strato sottomucoso (freccie) e nei capillari che attraversano lo strato muscolare (freccie curve) in una zona vicina all'attacco del parassita, barra=50 $\mu$ m. **d)** MCs positive nella zona della sierosa (punte di freccia), barra=20 $\mu$ m.

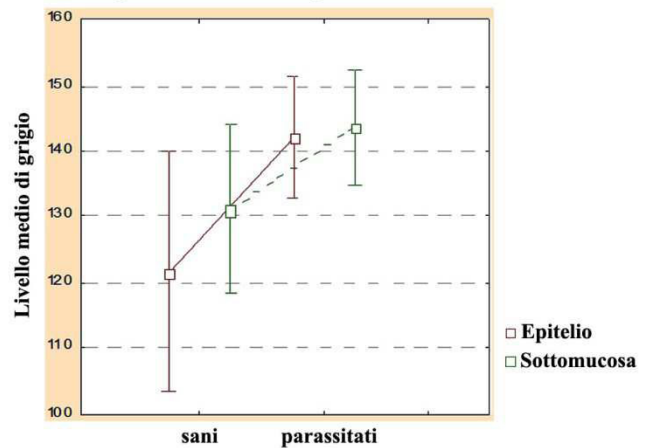


**Figura 34** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura tra intestini sani e parassitati di *P. fluviatilis* (a,b), in base all'intensità d'infestazione (c,d), e in base alla distanza dal parassita (e,f). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

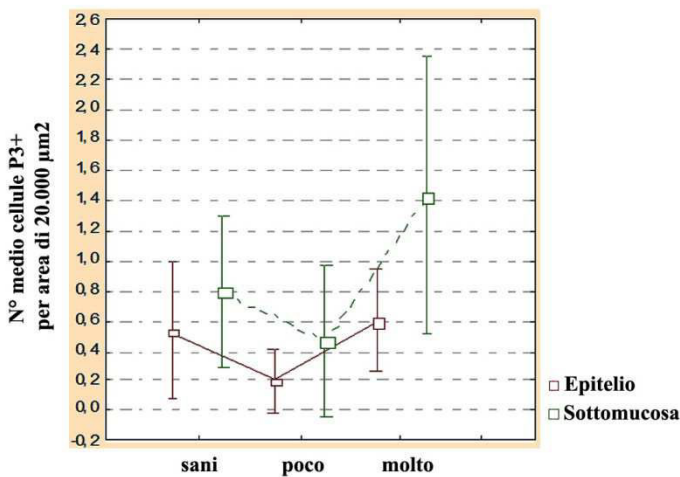
**a) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati, strato epiteliale e sottomucoso**



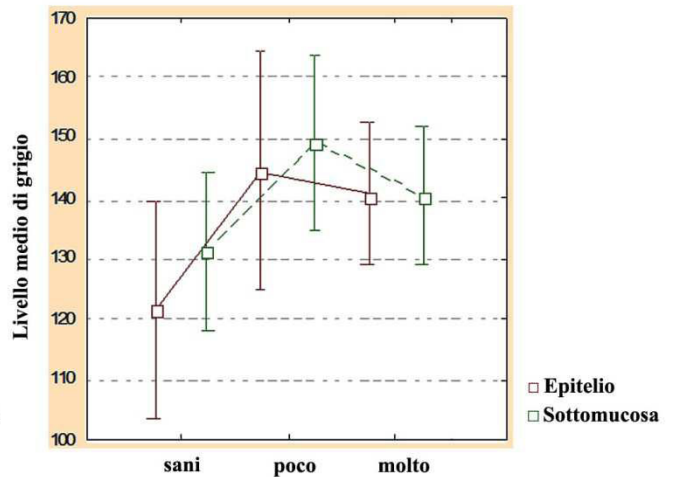
**b) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati, strato epiteliale e sottomucoso**



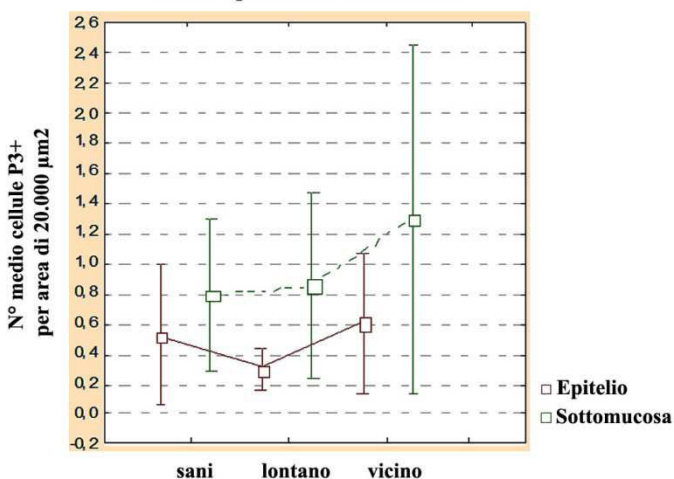
**c) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati (poco e molto), strato epiteliale e sottomucoso**



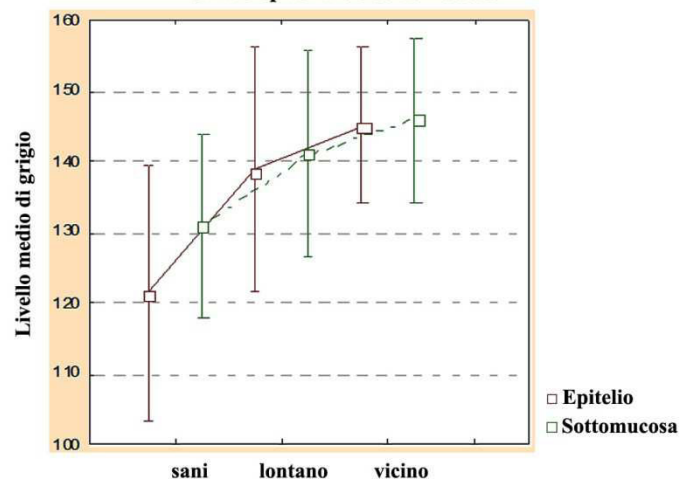
**d) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati (poco e molto), strato epiteliale e sottomucoso**



**e) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita), strato epiteliale e sottomucoso**



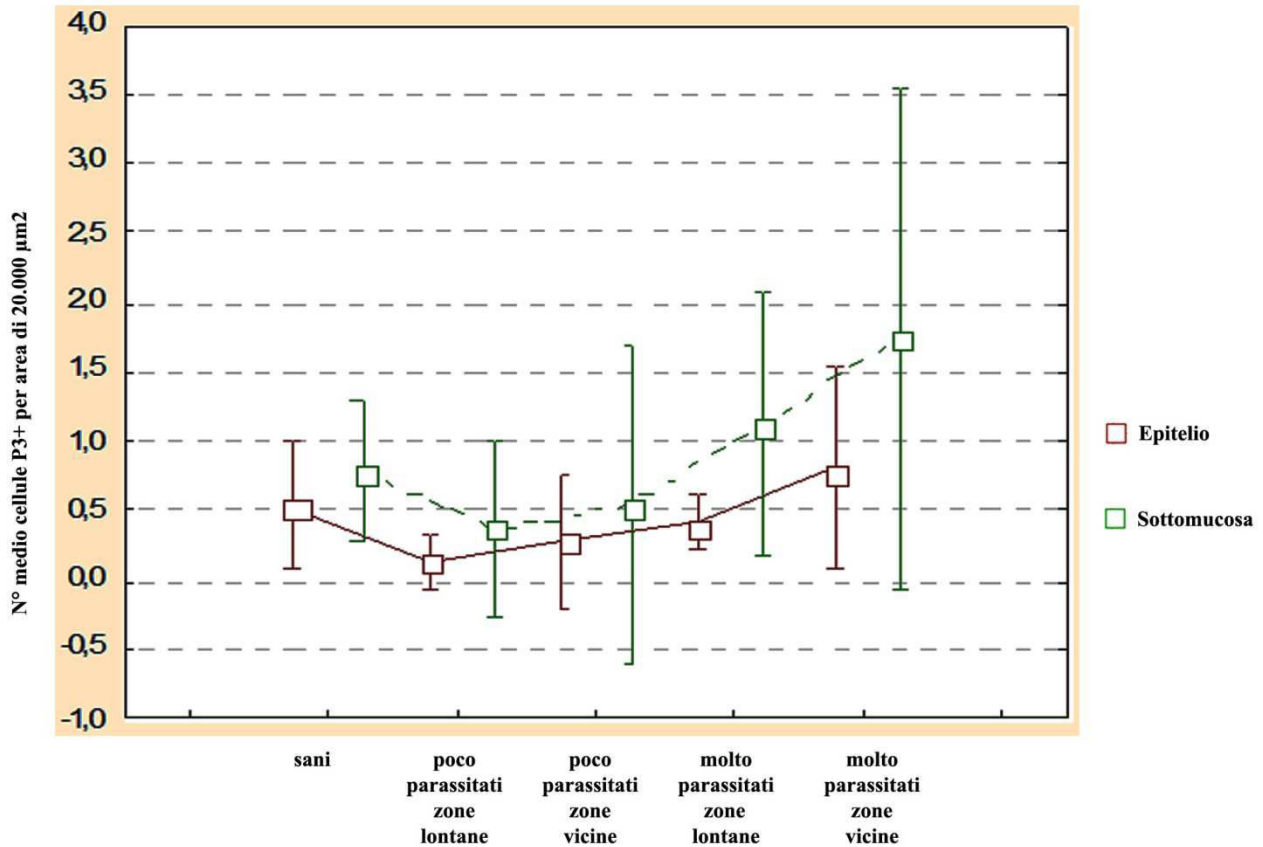
**f) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita), strato epiteliale e sottomucoso**



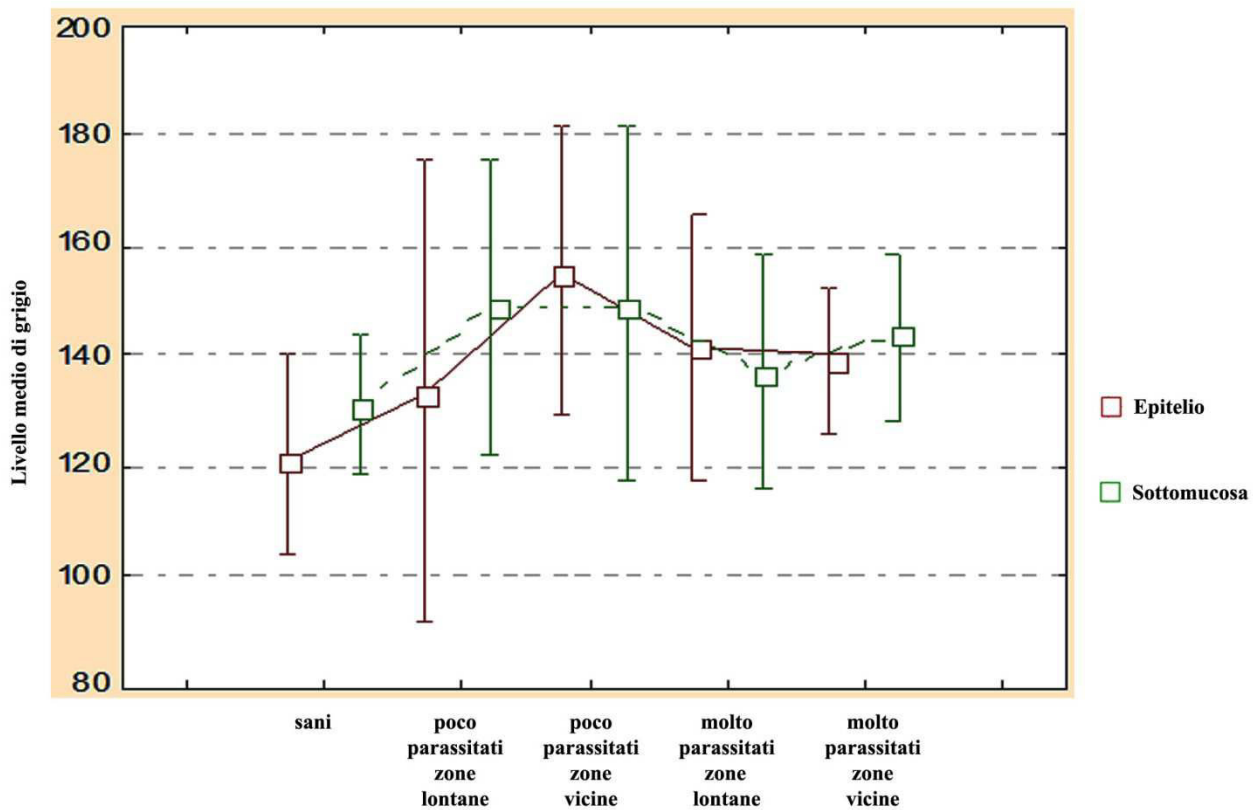
**Figura 35** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3, per 20.000 $\mu\text{m}^2$  di area standard, e dell'intensità di marcatura tra i due strati intestinali (strato epiteliale e sottomucoso) negli esemplari sani e parassitati di *P. fluviatilis* (a,b), in base all'intensità d'infestazione (c,d), e in base alla distanza dal parassita (e,f). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.



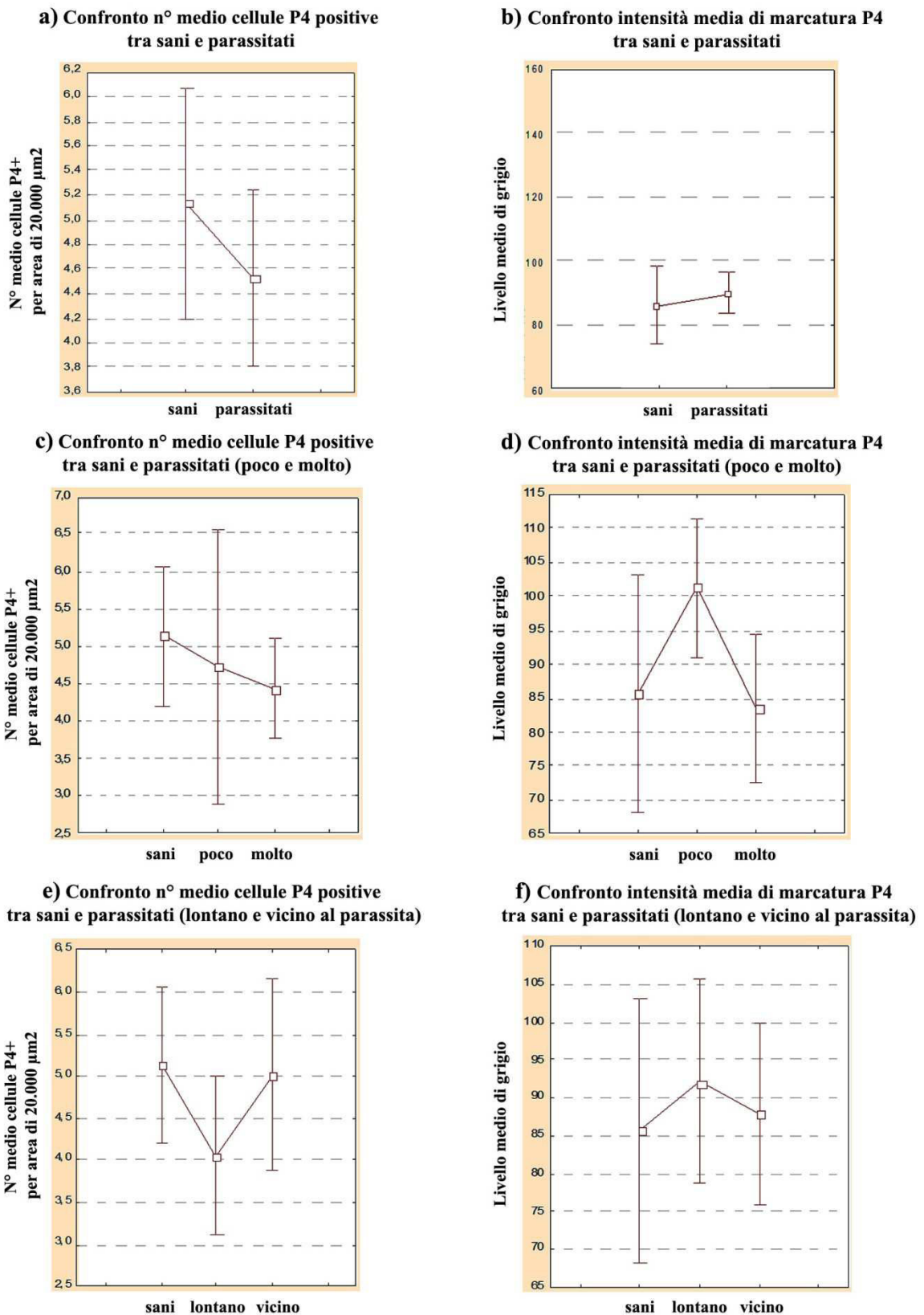
a) Confronto n° medio cellule P3 positive tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) negli strati epiteliale e sottomucoso



b) Confronto intensità media di marcatura P3 tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) negli strati epiteliale e sottomucoso

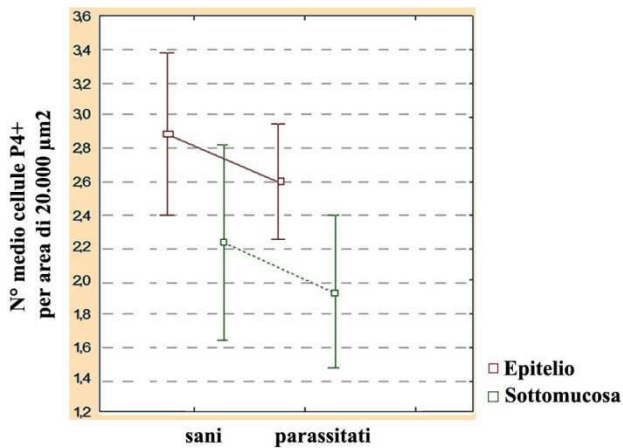


**Figura 36** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 3 (a), per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura (b) tra i due strati intestinali (strato epiteliale e sottomucoso) negli esemplari di *P. fluviatilis* sani e parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino"). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

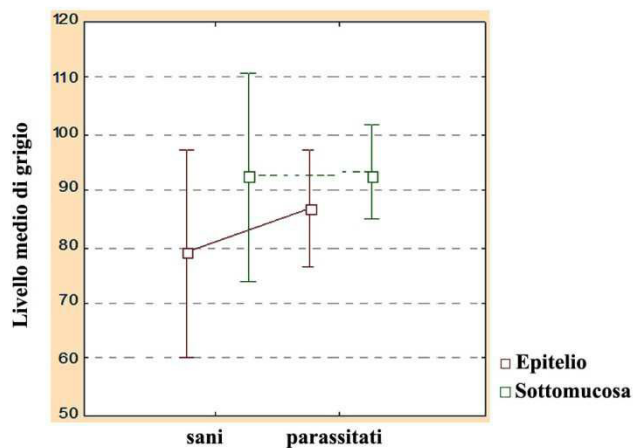


**Figura 37** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 4, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura tra intestini sani e parassitati di *P. fluviatilis* (a,b), in base all'intensità d'infestazione (c,d), e in base alla distanza dal parassita (e,f). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

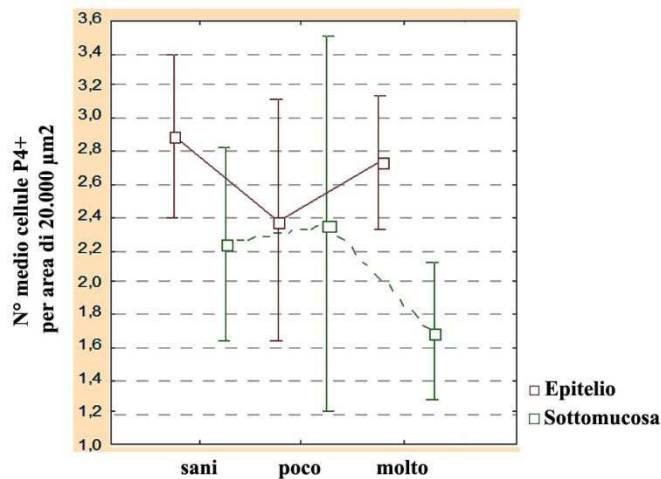
**a) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati, strato epiteliale e sottomucoso**



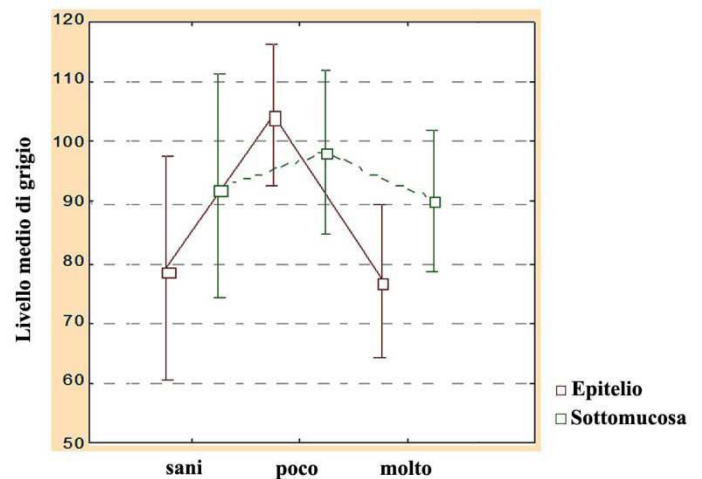
**b) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati, strato epiteliale e sottomucoso**



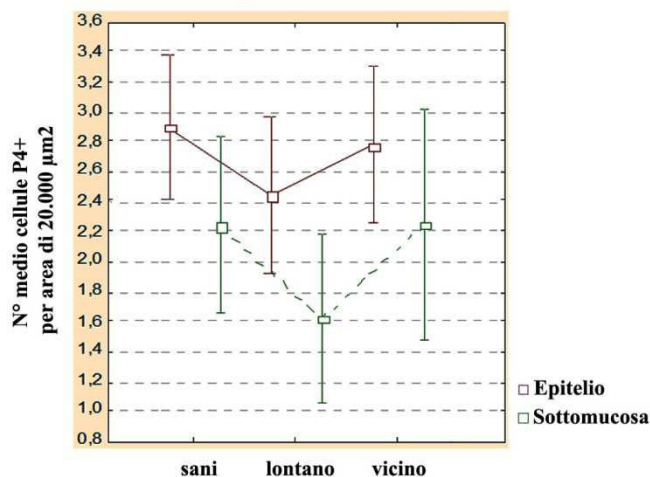
**c) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati (poco e molto), strato epiteliale e sottomucoso**



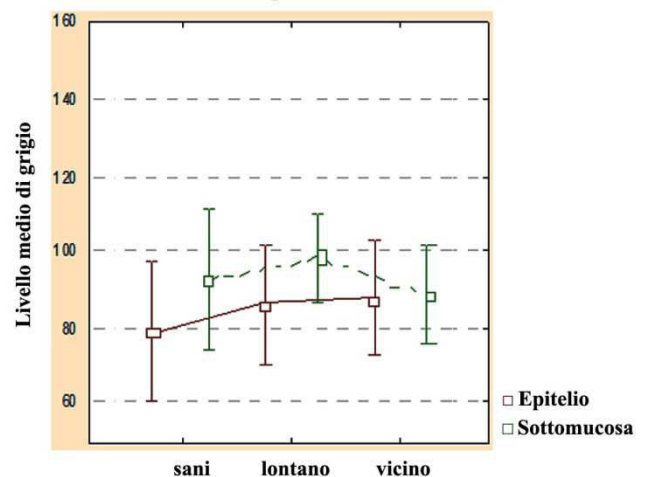
**d) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati (poco e molto), strato epiteliale e sottomucoso**



**e) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita), strato epiteliale e sottomucoso**

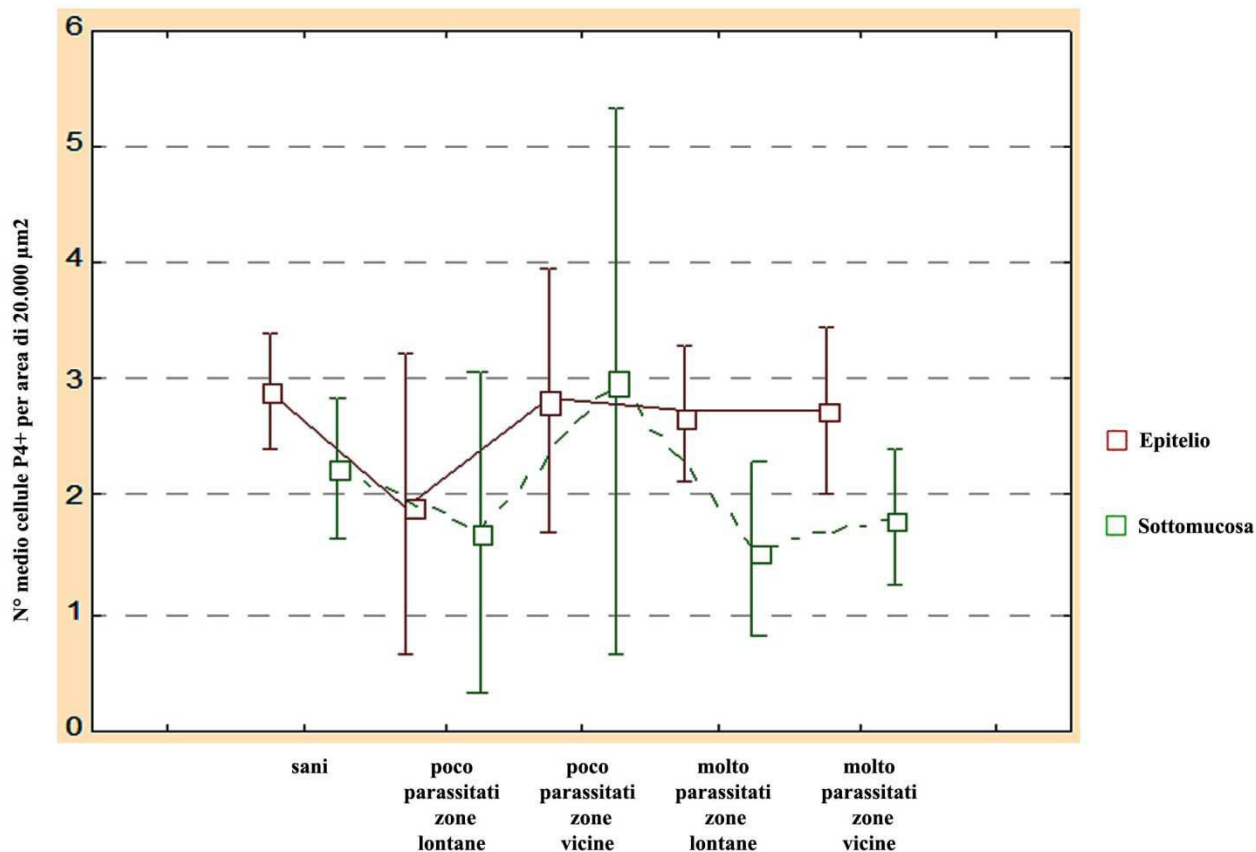


**f) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati (lontano e vicino al parassita), strato epiteliale e sottomucoso**

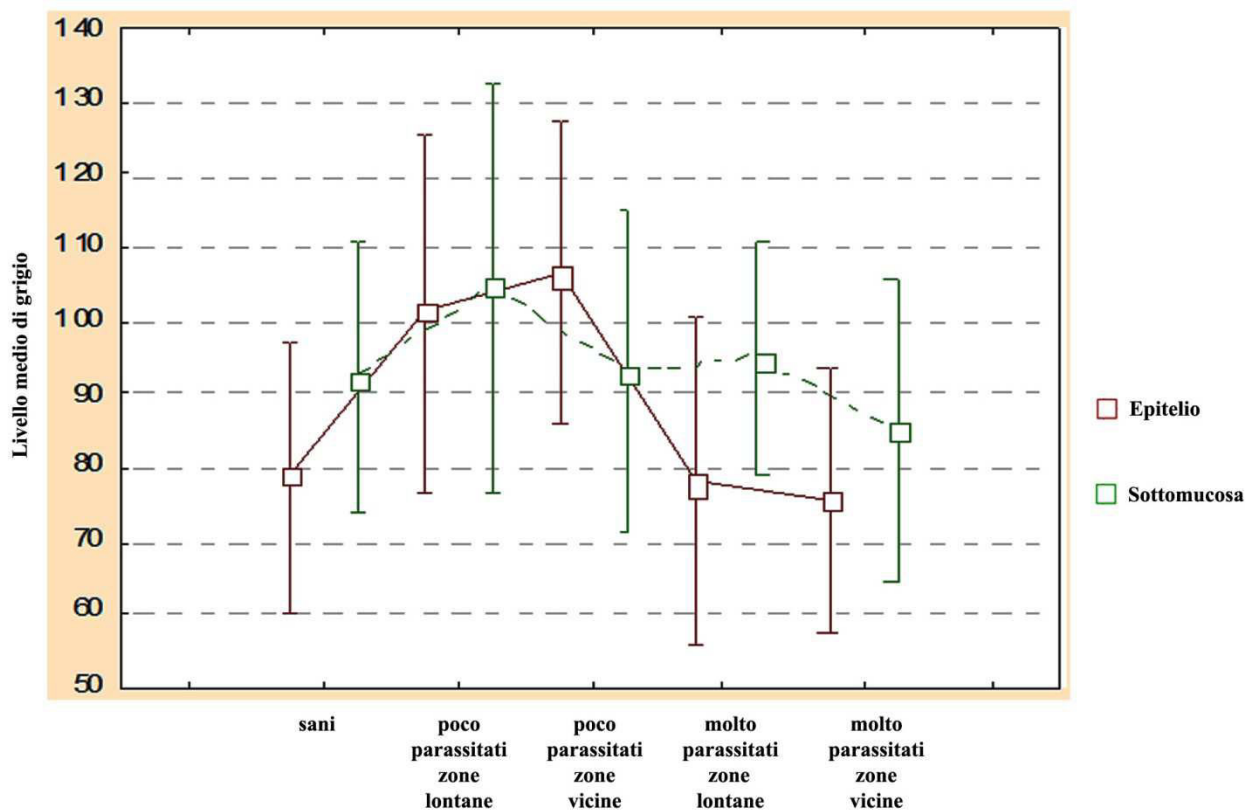


**Figura 38** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 4, per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura tra i due strati intestinali (strato epiteliale e sottomucoso) negli esemplari sani e parassitati di *P. fluviatilis* (a,b), in base all'intensità d'infestazione (c,d), e in base alla distanza dal parassita (e,f). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

**a) Confronto n° medio cellule P4 positive tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) negli strati epiteliale e sottomucoso**

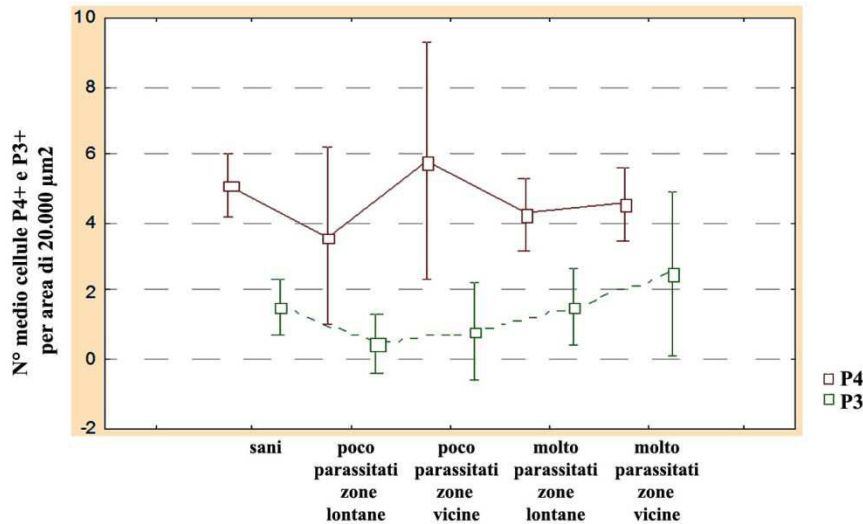


**b) Confronto intensità media di marcatura P4 tra sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) negli strati epiteliale e sottomucoso**

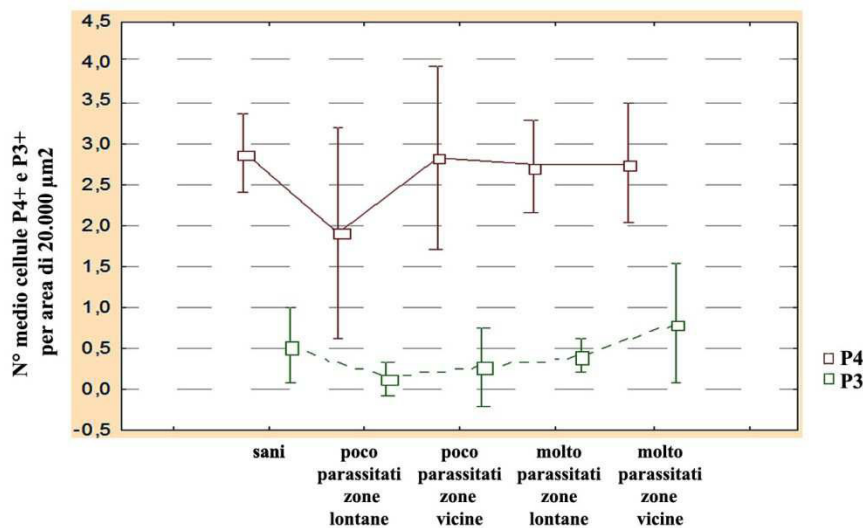


**Figura 39** Confronto del numero di cellule positive alla piscidina 4 (a), per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, e dell'intensità di marcatura (b) tra i due strati intestinali (strato epiteliale e sottomucoso) negli esemplari di *P. fluviatilis* sani e parassitati (poco parassitati "lontano", poco parassitati "vicino", molto parassitati "lontano", molto parassitati "vicino"). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.

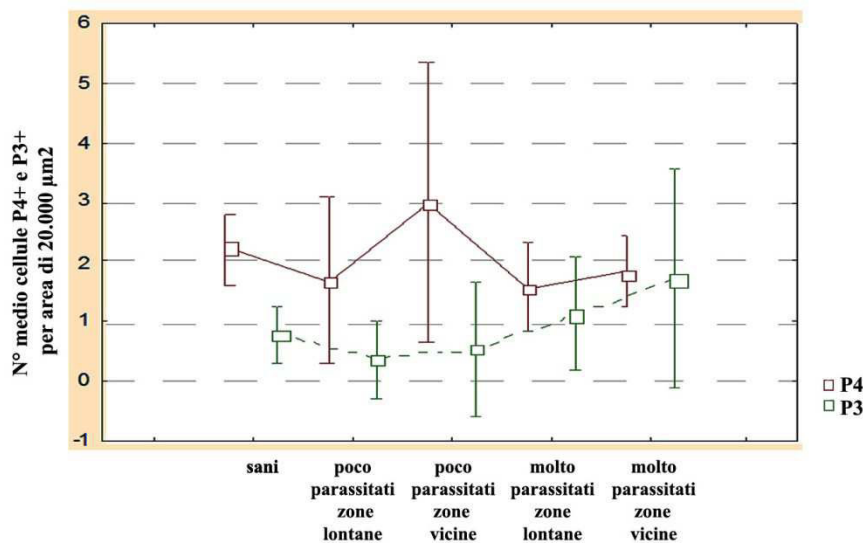
a) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino)



b) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nello strato epiteliale



c) Confronto n° medio tra cellule P4 e P3 positive in pesci sani e parassitati (poco, molto, lontano, vicino) nello strato sottomucoso



**Figura 40** Confronto tra il numero delle cellule P4 e P3 positive (a), per 20.000μm<sup>2</sup> di area standard, negli esemplari di *P. fluviatilis* sani e parassitati (poco parassitati “lontano”, poco parassitati “vicino”, molto parassitati “lontano”, molto parassitati “vicino”), nello strato epiteliale (b) e sottomucoso (c). Intervallo di confidenza al 95%. □ valore medio.