

**“UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA”
“FACOLTA’ DI SCIENZE MATEMATICHE
FISICHE E NATURALI”**

**DOTTORATO DI RICERCA XXI CICLO IN “GENETICA E BIOLOGIA
CELLULARE”**

A.A. 2009/2010

REAZIONI CELLULO-MEDIATE “*IN VITRO*” ED “*IN VIVO*”

NELLA SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

Tutor:

Prof. Giuseppe Scapigliati

Coordinatore:

Prof. Giorgio Prantera

Candidato:

Dott. Gianpaolo Zarletti

INDICE

1 <u>SCOPO DELLA TESI</u>	pag.5
2 <u>SINTESI DELLA TESI</u>	pag.7
3. <u>INTRODUZIONE</u>	pag.10
3.1 IMPORTANZA DEL SISTEMA IMMUNE DEI TELEOSTEI COME INDICATORE EVOLUTIVO	pag.12
3.2 MANIPOLAZIONE DEL SISTEMA IMMUNE DEI TELEOSTEI	pag.13
3.3 IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI	pag.14
3.3.1 ORGANIZZAZIONE DEL TESSUTO LINFOIDE NEI TELEOSTEI	pag.14
3.3.1.2 IL TIMO	pag.15
3.3.1.3 IL RENE CEFALICO	pag.15
3.3.1.4 LA MILZA	pag.16
3.3.1.5 LE BRANCHIE	pag.16
3.3.1.6 TESSUTO LINFOIDE MUCOSALE (MALT)	pag.16
3.3.2 L' IMMUNITA' INNATA	pag.17
3.3.3 CELLULE EFFETTRICI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA	pag.18
3.3.3.1 CELLULE CITOTOSSICHE NON-SPECIFICHE (NCC)	pag.19
3.3.3.2 MONOCITI / MACROFAGI E GRANULOCITI	pag.19
3.3.4 L' IMMUNITA' ACQUISITA	pag.21
3.3.4.1 LE CELLULE LINFOIDI	pag.23
3.3.4.2 I LINFOCITI B	pag.23
3.3.4.4 I LINFOCITI T	pag.23
3.4 BIOLOGIA DELLA SPECIE	pag.28
4. <u>MATERIALI E METODI</u>	pag.30
4.1 ANTICORPI MONOCLONALI IMPIEGATI NELLA SPERIMENTAZIONE	pag.31

4.2 PRELIEVO DI SANGUE E PREPARAZIONE DI CELLULE	pag.31
4.3 COLTURE CELLULARI	pag.32
4.4 MISUAZIONE DI ATP INTRACELLULARE	pag.32
4.5 IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA	pag.33
4.6 ANALISI DEL Ca^{2+}	pag.33
4.7 RT-PCR	pag.34
4.8 TEST DI CITOTOSSICITA'	pag.35
4.6 ANALISI STATISTICA	pag.36
5 <u>RISULTATI</u>	pag.40
5.1 CONTA LINFOCITARIA NELLE MLR	pag.40
5.2 RT-PCR	pag.42
5.3 PROLIFERAZIONE CELLULARE E SAGGIO DI CITOTOSSICITA'	pag.43
5.4 CONTENUTO LINFOCITARIO IN ANIMALI VACCINATI CON VRER _v	pag. 44
5.5 ELISA	pag.44
5.6 PCR QUANTITATIVA	pag.45
6 <u>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</u>	pag.47
8 <u>FIGURE</u>	pag.59
9 <u>LEGENDE</u>	pag.75
10 <u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag.80

I. SCOPO DELLA TESI

1.SCOPO DELLA TESI

I pesci ossei, o teleostei, rappresentano un modello animale molto interessante impiegato anche nello studio di patologie umane. La loro importanza deriva dalla posizione filogenetica occupata, in quanto sono i vertebrati più antichi che mostrano un'organizzazione anatomica e funzionale del sistema immunitario conservata in tutte le classi dei vertebrati. Inoltre i teleostei vengono impiegati in vari campi delle biotecnologie animali.

Negli ultimi anni si è assistito ad un rapido incremento nelle conoscenze del loro sistema immunitario e del clonaggio di geni omologhi codificanti per molecole aventi attività immuno-modulatoria.

Tali studi, effettuati con metodiche di biologia molecolare, hanno evidenziato le notevoli somiglianze nelle sequenze geniche esistenti fra teleostei e mammiferi; per contro le attività biologiche espletate dai leucociti dei teleostei sono praticamente sconosciute. È proprio in tale ambito che trova valenza il lavoro effettuato durante gli anni di dottorato, il cui scopo principale è quello di indagare i meccanismi cellulari delle reazioni immunitarie “*in vitro*” così da fornire evidenze sperimentali sulle popolazioni leucocitarie coinvolte e sui loro meccanismi d'azione.

Questo lavoro è stato possibile grazie alla disponibilità di marcatori specifici per le cellule T e B rappresentati dagli anticorpi monoclonali DLT15 e DLig3 utilizzati per la tipizzazione diretta dei linfociti estratti da sangue periferico e da altri organi, da sonde di DNA per vari geni coinvolti in reazioni immunitarie quali: TcR α e β , per la catena leggera delle IgM, MHCII, dei corecettori CD4, CD8 α , delle citochine IL-1, TNF α , COX-2, IL-10, TGF β 1 e della proteina antivirale MX.

Una parte del lavoro è stata volta allo studio della risposta antivirale utilizzando un retrovirus specifico (VERv) di teleostei con lo scopo di chiarire meccanismi di difesa cellulo-mediata.

II. SINTESI DELLA TESI

2. SINTESI DELLA TESI

Il lavoro sperimentale effettuato in questa tesi di dottorato è consistito nello studio dell'attività di leucociti coinvolte in reazioni allogeniche, xeno geniche, di immunomodulazione mediante pratiche di vaccinazione, studio dell'espressione genica e produzione di un anticorpo anti CD8 α . Nella prima fase sperimentale sono state studiate le reazioni di leucociti di sangue periferico (PBL) "in vitro" in risposta a stimolo allogenico derivante da PBL inattivati mediante irradiazione con raggi X nel teleosteo *Dicentrarchus labrax* (spigola). I risultati ottenuti mostrano un marcato incremento del numero dei linfociti T dopo 2 settimane di incubazione in reazioni unidirezionali di leucociti mescolati (MLR: mixed leukocyte reaction). Viceversa i linfociti B non sembrano essere coinvolti nella MLR in quanto i valori ottenuti sono paragonabili ai valori ottenuti dai PBL di controllo mantenuti in coltura senza alcuno stimolo.

La proliferazione dei linfociti T è stata anche confermata mediante RT-PCR attraverso l'analisi dell'espressione dell' mRNA per il recettore dei linfociti T (TCR: T-cell receptor β). Per contro è stato osservato un significativo decremento della proliferazione dei linfociti T mediante l'aggiunta di 5 μ g/ml di ciclosporina A (CsA) alle colture di MLR. I leucociti prelevati dalle colture di MLR hanno mostrato un sensibile aumento dell' attività citotossica rispetto ai campioni di controllo, questo dato suggerisce la presenza ed il coinvolgimento di linfociti citotossici (CTL) nelle reazioni di MLR. L'attivazione cellulare dei PBL in reazioni di MLR a 2 settimane di incubazione è stata determinata mediante l'analisi della mobilizzazione intracellulare di Ca²⁺ anticorpo-indotta misurata con Fura-2 AM. Con questa metodica si è osservato un aumento della mobilizzazione di Ca²⁺ intracellulare negli MLR mentre è diminuita con la presenza di CsA. Nella seconda fase sperimentale, invece, sono state studiate reazioni di citotossicità verso bersagli xenogenici e l'immunomodulazione derivante da vaccinazione. I risultati mostrano un coinvolgimento di linfociti T e B e per quanto riguarda i pesci sottoposti a vaccinazione si evidenzia una notevole produzione di immunoglobuline specifiche, ciò è stato anche evidenziato mediante lo studio dell'espressione genica dei geni coinvolti in tali reazioni. Mediante esperimenti di Real-time PCR sono stati studiati alcuni geni del sistema immunitario in vari organi emopoietici quali Timo, intestino (GUT), rene cefalico (HK), milza (Spleen) e sangue periferico (PBL). La scelta di effettuare indagini anche nell'intestino è maturata dal fatto che esso è il distratto anatomico in cui si denota una predominante espressione di geni associati ai linfociti T. I risultati mostrano una

notevole presenza di geni correlati a cellule T nel timo e nell'intestino; ciò fa pensare che il sistema immunitario acquisito possa aver avuto ed avere importanti correlazioni con il sistema digerente. Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la popolazione T del GALT contiene cellule $CD8\alpha^+$, $TCR\gamma^+$ e ciò suggerisce una similarità con il fenotipo cellulare IELs nei mammiferi.

Il lavoro effettuato durante la tesi rappresenta una determinazione diretta e quantitativa di alcune attività delle cellule T e B “*in vitro*” in una specie di teleosteo. I dati ottenuti chiariscono per la prima volta in un modello piscino alcune attività cellulari legate alle risposte immunitarie e suggeriscono meccanismi conservati nell'evoluzione dei vertebrati.

III. INTRODUZIONE

3. INTRODUZIONE

Il più grande gruppo vivente di Vertebrati è costituito da pesci ossei ed è rappresentato da più di 20000 specie. Tra questi, i Teleostei rappresentano un gruppo di notevole importanza sia da un punto di vista biotecnologico, per il loro largo impiego in acquacoltura, sia perchè sono il più antico gruppo di vertebrati con un sistema immunitario che mostra ampie analogie con i sistemi di difesa innati ed adattativi dei Vertebrati superiori.

Le prime ricerche che evidenziano la presenza di un sistema immunitario nei pesci ossei risalgono agli anni '40 (Duff, 1942), successivamente, negli anni '60, sono stati effettuati studi sulla risposta anticorpale verso un antigene virale (Siegel, 1965). Nel 1969 è stata riportata la scoperta di attività T-mediate (Leslie, 1969) e più tardi quella delle cellule T stesse (Cuchens, 1977).

Dopo questi primi studi è stata supposta la presenza di molecole di amplificazione e regolazione leucocitaria. È stato infatti dimostrato che supernatanti di leucociti da rene cefalico di carpa attivati con fitoemoagglutina (PHA) contengono un fattore di crescita leucocitario che induce la proliferazione di linfoblasti purificati (Grondel, 1984). Negli ultimi anni gli studi si sono indirizzati verso l'identificazione di marcatori immunitari specifici con lo scopo di poter delineare un profilo sempre più dettagliato dei meccanismi molecolari e delle popolazioni cellulari coinvolte nella complessa rete di interazioni del sistema immunitario. A tale scopo, la produzione ed il successivo utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro specifiche popolazioni cellulari ha notevolmente facilitato la caratterizzazione delle popolazioni leucocitarie presenti nelle diverse specie.

Le popolazioni cellulari del sistema immunitario dei teleostei possono essere suddivise in Linfociti B (Irwin et Kaattari, 1986; Miller et al., 1994; Koumans-Van Diepen et al., 1994), Linfociti T (Lin et al., 1992; Miller et al., 1994), granulociti (Bly et al., 1990; Ainsworth et al., 1992; Hine et al., 1992; Slierendrecht et al., 1995; Verburg-van Kemenade et al., 1995), trombociti (Esteban et al., 1989; Rombout et al., 1996), macrofagi (Mesenguer et al., 1991; Hardie et al., 1994; Sveinbjornsson et Seljelid, 1994) e cellule citotossiche non specifiche (Evans et al., 1992; Hogan et al., 1996).

Fino ad oggi sono stati prodotti anticorpi monoclonali diretti contro le immunoglobuline e le cellule B di molte specie quali la carpa *Cyprinus carpio* (Koumans-Van Diepen et al., 1994; Koumans-Van Diepen et al., 1995), il pesce gatto *Ictalurus punctatus* (Miller et al., 1987; Lobb et Olson, 1988), il merluzzo *Gadus*

morhua (Israelsson et al., 1991), l'anguilla *Anguilla anguilla* (Van der Heijden et al., 1995) il rombo *Scophthalmus maximus* (Estévez et al., 1994), il salmone *Salmo salar* (Thuvander et al., 1990), la trota *Oncorhynchus mykiss* (Sanchez et Dominiguez, 1991) e la spigola *Dicentrarchus labrax* (Scapigliati et al., 1995; Romestand et al., 1995; Palenzuela et al., 1996). Viceversa sono stati prodotti anticorpi monoclonali diretti contro le cellule T solo in poche specie quali la carpa *Cyprinus carpio* (Yamaguchi et al., 1996; Rombout et al., 1997) e la ricciola *Seriola quinqueradiata* (Nishimura et al., 1997). Tali anticorpi non sono però specifici per cellule T periferiche poiché cross reagiscono con altre popolazioni leucocitarie. Attualmente i soli anticorpi specifici per timociti e cellule putative T di Teleostei sono disponibili per la spigola (Scapigliati et al., 1995), il pesce gatto (Passer et al., 1996) e la carpa (Rombout et al., 1998).

Recenti studi hanno dimostrato che il Tessuto Linfoide Associato all'Intestino (GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue) contiene un elevato numero di Linfociti T (Abelli, 1997), ciò è stato verificato mediante l'analisi delle sequenze dei cDNA ottenuti a partire dagli RNA isolati dalle cellule dell'intestino. I cDNA ottenuti in tal modo, sono stati utilizzati come stampo in reazioni di amplificazione (PCR) utilizzando primers specifici per la catena β del recettore delle cellule T (TCR) mostrando un fenotipo $\alpha\beta^+$ (Scapigliati, 2000). La presenza di questa popolazione cellulare nel GALT dei teleostei potrebbe essere considerata come il primo stadio verso l'evoluzione del sistema adattativo mucosale nei vertebrati (Matsunaga, 1998).

Nei pesci la principale attività umorale consiste nella secrezione di specifiche immunoglobuline volte alla neutralizzazione dell'antigene ed all'attivazione della cascata del complemento (Rijkers et al., 1980). Studi risalenti agli anni '90 sembrano dimostrare che le immunoglobuline dei pesci appartengano ad un singolo isotipo, quello delle IgM. Tali molecole possono assumere struttura sia monometrica che tetramica e mostrano similarità sia a livello molecolare che fisiologico con le immunoglobuline di mammifero (Marchalonis et al., 1992; Du Pasquier, 1993; Warr, 1995). Sono molteplici le evidenze sperimentali che permettono di concludere che il sistema immunitario dei pesci, ed in particolare dei teleostei mostra chiare analogie con i sistemi di difesa innato ed adattativo dei Mammiferi e degli Uccelli. Studi principali hanno riguardato sull'organizzazione anatomica degli organi linfoidei (Manning, 1994), la scoperta della presenza di linfociti funzionali (Feng, 1996; Marsden,

1996; Boesen, 1997), del Complesso Maggiore di Istocompatibilità MHC (Stet, 1998) e del Recettore delle Cellule T TCR (Charlemagne, 1998; Scapigliati, 2000).

3.1 IMPORTANZA DEL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI COME INDICATORE EVOLUTIVO

I pesci ossei sono in una fase di radiazione adattativa ed occupano tutti gli habitat acquatici del pianeta, dagli ambienti d'acqua dolce, alle calde acque tropicali, ai mari polari, alle profondità abissali (Nelson, 1994).

Di notevole interesse, anche per gli scopi di questa tesi, é che in qualsiasi dei suddetti ambienti acquatici le varie specie di teleostei hanno come obiettivi primari la riproduzione e la difesa contro le possibili invasioni da parte di microbi patogeni. La sopravvivenza di un individuo dipende dall'efficacia della difesa contro gli organismi patogeni. In tutte le specie oggi viventi, i meccanismi difensivi si sono evoluti in maniera tale da fornire la massima protezione per permettere quindi la massima radiazione adattativa. La maggior parte dei microrganismi quali i batteri, i parassiti, i funghi ed i virus, hanno rappresentato direttamente od indirettamente una fonte di aggressori durante l'evoluzione dei metazoi. Da millenni è in atto una coevoluzione che interessa da un lato lo sviluppo di nuove metodologie di invasione da parte dei patogeni e dall'altra di meccanismi di difesa contro questi da parte dei sistemi immunitari. È stato infatti suggerito che la spinta evolutiva del sistema immunitario sia la continua ricerca di meccanismi di patogenicità dei microrganismi (Gonzalez, 2001). Si può ipotizzare che lo sviluppo degli agenti patogeni potrebbe consentire l'acquisizione di un sistema immunitario sempre più efficiente anche al costo del diffondersi di molte malattie contagiose; tale considerazione si può ovviamente estendere a tutti i phila del regno animale anche se ciò non implica che in tutti i phila siano presenti le caratteristiche del sistema immunitario dei vertebrati. Un altro interessante aspetto è che per raggiungere lo stesso grado di efficienza difensiva i vari phila possano sfruttare strategie completamente differenti. Oggi sembra che queste differenti strategie possano derivare da due eventi comuni ossia la duplicazione di geni e di interi genomi. Le duplicazioni geniche sembrano essere la forza evolutiva che sta alla base della differenziazione funzionale dei geni, dello sviluppo di famiglie geniche, dell'aumento delle dimensioni dei genomi e dell'aumento della complessità fenotipica riscontrabile nei vari organismi (Holland et al., 1994; Sidow, 1996). La verifica a

tale ipotesi è fattibile confrontando il genoma dei vari gruppi animali si è visto che nei Deuterostomi vi sono dei geni presenti in singola copia, gli stessi geni sono riscontrabili in quattro copie in organismi più evoluti quali i Cordati (Holland et Garcia-Fernandez, 1996; Pebusque et al., 1998). Questo modello è stato riscontrato anche nei vertebrati superiori, si è infatti osservato che l'uomo possiede un genoma all'incirca doppio rispetto a quello della *Drosophila*. Tuttavia sono in corso dibattiti riguardo questa ipotesi, infatti c'è chi sostiene che l'aumento delle dimensioni del genoma sia imputabile a duplicazioni di piccole regioni di DNA corrispondenti a domini funzionali piuttosto che a duplicazioni di intere regioni geniche (Hughes, 2001). Per tali ragioni sia la riproduzione che le difese immuni sono due caratteristiche indispensabili sottoposte ad un preciso controllo genico e tali geni subiscono le pressioni selettive che permettono l'evoluzione dei suddetti sistemi in relazione ai mutamenti ambientali senza modificarne in peggio l'efficienza. Di conseguenza lo studio delle risposte immunitarie fra i vertebrati può essere un mezzo importante per la comprensione delle risposte adattative, di geni omologhi, di molecole conservate e di epitopi strutturali conservati.

Attualmente i pesci ossei sono ampiamente utilizzati come modelli animali in studi di biologia evolutiva in quanto sono un gruppo animale antico e rappresentano infatti una piattaforma evolutiva. Inoltre i teleostei mostrano un sistema immunitario molto simile a quello dei mammiferi sebbene la sua evoluzione sia avvenuta sotto la spinta di diverse pressioni evolutive (Matsunaga et Rahman, 1998; Sunyer et Lambris, 1998). Da queste considerazioni si deduce che tutte le strutture con le relative funzioni fisiologiche riscontrate in tale gruppo animale debbano essere presenti nei vertebrati superiori pur presentando le differenze morfologiche e funzionali dovute all'evoluzione. Questo presupposto non esclude casi opposti in cui molecole presenti in vertebrati superiori siano assenti o abbiano funzioni differenti nei teleostei; questo è ad esempio il caso dell'interleuchina-1 che pur essendo stata riscontrata in tutti i vertebrati studiati presenta notevoli differenze funzionali da gruppo a gruppo.

3.2 MANIPOLAZIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELOSTEI

Attualmente gli studi sulla biologia dei teleostei trovano anche larghe applicazioni sia in biotecnologia in quanto un gran numero di specie di acqua dolce e marine vengono impiegate

negli allevamenti di piscicoltura e molte altre sono oggetto di studio per la messa a punto dei parametri di coltura. L'importanza degli allevamenti di teleostei è dimostrata dai dati diffusi dalla F.A.O. che indicano che nei prossimi venti anni futuri il consumo di pesce pro-capite aumenterà di circa sette volte. La piscicoltura è una pratica piuttosto antica (Giacobini et al., 1994) e negli ultimi anni tale attività è andata intensificando tanto da divenire un possibile rimedio alle carenze alimentari dei paesi in via di sviluppo. Una delle cause maggiori di perdita di profitti in un allevamento di acquacoltura è proprio la perdita di animali dovuta ad epidemie causate da patogeni, quindi lo studio del sistema immunitario con la messa a punto di pratiche di vaccinazione sempre più efficaci può ridurre sensibilmente i danni da epidemie. Tuttavia lo sviluppo di vaccinazioni efficaci ed economicamente vantaggiose richiede una conoscenza approfondita dei meccanismi molecolari alla base delle reazioni immunitarie. Importanti risultati in tal senso sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di immunoadjuvanti e di immunostimolanti, ma l'acquisizione di nuove metodiche richiede un notevole sforzo scientifico soprattutto riguardo allo studio approfondito dei sistemi di difesa innati ed adattativi. Il sistema immunitario dei teleostei può anche essere utilizzato per il biomonitoraggio di ambienti acquatici infatti recenti studi hanno descritto la modulazione delle attività del sistema immunitario di specie di acqua dolce in risposta alla presenza di varie sostanze inquinanti (Wester et al., 1994; Luebke et al., 1997; Fatima et al., 2000; Sweet et Zelikoff, 2001).

3.3.1 ORGANIZZAZIONE DEL TESSUTO LINFOIDE NEI TELEOSTEI

Nei mammiferi gli organi linfoidei primari sono il Timo ed il Midollo Osseo, dal primo si originano i Linfociti T, deputati all' immunosorveglianza ed alla risposta cellulare specifica, mentre dal midollo i granulociti, i monociti, gli eritrociti ed avviene la maturazione dei linfociti B. Gli organi linfoidei secondari, invece, sono quei distretti in cui i linfociti espletano le loro funzioni che consistono nelle interazioni reciproche e con l'antigene; tali organi nei mammiferi sono rappresentati dai linfonodi, dalla milza e dal tessuto associato alle mucose (MALT) come ad esempio le tonsille e le placche del Peyer nell'intestino tenue.

Nei teleostei non è possibile fare una distinzione anatomica così precisa come nel caso dei mammiferi, infatti in tali pesci, pur essendoci una divisione fisiologica per la produzione di cellule specifiche, gli organi possono essere considerati a funzione mista, sono cioè in grado

di produrre sia cellule linfocitarie che mielocitarie e per ciò sono definiti organi linfomieloidi (Fange, 1982; Rombout et al., 1993). Inoltre nei teleostei sono assenti le placche del Peyer, il midollo osseo ed i linfonodi. In questa famiglia animale il corrispettivo del midollo osseo è rappresentato dal rene cefalico (Zapata, 1979; Lamers, 1985), mentre la milza, nella maggior parte delle specie di pesci finora studiati, sembra essere deputata all' eritropoiesi (Rowley et al., 1988; Van Muiswinkel et al., 1991). Studi recenti hanno mostrato che il timo potrebbe essere un organo linfoide primario per i linfociti T. (Abelli et al. 1996).

3.3.1.2 *Timo*

Il timo dei teleostei è stato ampiamente studiato (Ellsaesser et al., 1988; Chantanachookhin et al., 1991; Chilmonczyk, 1992) ed è stato dimostrato che nell' adulto risulta essere una struttura linfoide (Abelli et al., 1996). Negli Elasmobranchi e nei pesci più evoluti il timo è divisibile in una zona midollare e una corticale facilmente distinguibili ed è associato alla camera branchiale (Gorgollon, 1983; Abelli et al., 1996), nei salmonidi, viceversa, questa distinzione in zona corticale e midollare non è presente (Chilmonczyk, 1983). Le popolazioni cellulari che si possono distinguere in tale organo sono linfociti e linfoblasti in relazione con cellule epiteliali reticolari (Manning, 1994). Il timo nei pesci subisce una regressione in relazione all'età, agli ormoni ed alle stagioni. (Picchietti et al. 1993), ad esempio nella trota iridea tale involuzione inizia circa al quindicesimo mese di età (Tatner et Manning, 1983). Durante l'ontogenesi del tessuto linfoide della spigola il timo è il primo organo ad essere popolato da cellule putative T (Abelli et al., 1996), confermando precedenti osservazioni fatte sulla trota iridea (Tatner et Manning, 1983; Chilmonczyk, 1985; Manning, 1994).

3.3.1.3 *Rene Cefalico*

Il rene cefalico dei pesci è composto da uno stroma emopoietico formato da cellule reticolari e fagociti somiglianti a quelli presenti nel midollo osseo dei Tertrapodi. Con molta probabilità questo organo nei teleostei supplisce alle funzioni del midollo osseo in quanto si riscontra la presenza di molte cellule staminali (Lamers, 1985; Zapata, 1979); il rene cefalico (pronefro) e il rene del tronco (opistonefro), sono considerati i maggiori organi emopoietici. Dal momento che in *Oncorhynchus kisutch* le prime cellule presentanti immunoglobuline di membrana (Ig⁺) sono state trovate proprio in quest' organo (Irwin et Kaattari, 1986), si può

ipotizzare che i linfociti B dei teleostei possano svilupparsi nel rene cefalico. Studi morfologici (Zapata, 1979) hanno inoltre fornito indicazioni che il rene cefalico potrebbe essere un organo linfoide primario per i linfociti B.

Molti autori concordano nel ritenere che il rene sia il principale sito di differenziamento degli eritrociti, monociti, granulociti e linfociti B (Ellis, 1977; Zapata, 1979; Bielek, 1981; Botham et Manning, 1981).

3.3.1.4 Milza

Negli Elasmobranchi e nei pesci più evoluti la milza è già una struttura ematopoietica (granulopoietica ed eritropoietica) che fa da organo di accumulo di cellule linfoidei. Nei teleostei, invece, la milza, durante l'istogenesi del sistema linfoide, è l'ultimo organo a svilupparsi (Ellis, 1977; Tatner et Manning, 1983), per cui, come nel caso del rene cefalico, gioca un ruolo sia nell'ematopoiesi che nelle reazioni immunitarie (Manning, 1994). In molti Teleostei, differentemente dai tetrapodi, non c'è una distinzione netta nel parenchima splenico tra polpa bianca e rossa (Manning, 1994). E' stato dimostrato che la milza è sede di cellule B e putative T (Scapigliati et al., 1995; Scapigliati et al., 1996; Romano et al., 1997), quindi potrebbe essere importante come organo linfoide secondario.

3.3.1.5 Branchie

Studi recenti hanno dimostrato che nel tessuto delle branchie sono presenti un considerevole numero di linfociti e macrofagi e di cellule secernenti anticorpi (Davison et al., 1997; Lin et al., 1998). Questi dati indicano che in tale compartimento mucoso sono presenti sia le popolazioni cellulari fondamentali alla processazione e presentazione dell'antigene sia le cellule deputate alla sua neutralizzazione testimoniando che in tale regione c'è una intensa attività difensiva. Questo dimostra che le regioni più esposte agli antigeni esterni necessitano di un notevole grado di protezione (Dos Santo et al., 2001).

3.3.1.6 Tessuto Linfoide Mucosale (MALT)

Questo tessuto è costituito da elementi linfoidei associati alla mucosa dell'intestino, della pelle e delle branchie che rappresentano la prima barriera di difesa dall'attacco di patogeni (Manning, 1994). In tutti i gruppi di Teleostei la parete intestinale è infiltrata sia di linfociti che di altri leucociti (Manning, 1994), mentre sia nelle branchie che nella pelle sono stati trovati soprattutto linfociti (Peleteiro et Richards, 1985; Abelli et al., 1997). In particolare,

nell'epitelio intestinale del teleostei sono stati individuati linfociti, granulociti e macrofagi sia singoli sia organizzati in piccoli gruppi (Rowley et al., 1988; Picchiotti et al., 1997; Abelli et al., 1996).

3.3.2 IMMUNITA' INNATA

L'immunità innata è il risultato di un elevato e complesso numero di fenomeni. A differenza del sistema immunitario adattativo, in cui tutte le cellule sono linfociti e tutte le molecole effettrici sono membri della superfamiglia delle immunoglobuline, il sistema immunitario innato è composto sia da cellule che da molecole estremamente diversificate. Inquadrate in un contesto evolutivo, tutto ciò non è sorprendente infatti il sistema linfoide si è sviluppato piuttosto recentemente (Agrawal, 1998). Prima della comparsa degli Gnatostomi, tutti gli animali si basavano esclusivamente su meccanismi di difesa innati, ossia non linfoidi, contro eventuali invasioni da virus, batteri, funghi, protisti e metazoi e per riparare danni tissutali. Dal punto di vista di un immunologo evoluzionista, il sistema immune adattativo si è sviluppato come uno strumento per aiutare il sistema innato a funzionare più efficientemente. Degno di nota è il fatto che buona parte delle teorie fondamentali sulla natura delle risposte infiammatorie si sono basate sulle analisi condotte sugli Invertebrati (Bidel, 1988). In studi più recenti sull'evoluzione del sistema immunitario l'ordine delle scoperte si è spesso invertito. I componenti della risposta infiammatoria sono stati caratterizzati inizialmente nei Mammiferi, con la conseguente ricerca volta poi alla scoperta di omologhi molecolari e cellulari nei Vertebrati inferiori e negli invertebrati. In particolare è stato dimostrato che i Teleostei sono in grado di attuare una risposta innata contro stimoli antigenici o contro patogeni (Evans, 1992; Ingram, 1980; Fletcher, 1982; Ellis, 1989; Manning, 1994; Van muiswinkel, 1995). La prima linea difensiva include tutte quelle strutture che formano una stabile barriera fisica o chimica contro l'invasione dei microrganismi; fanno parte di questa categoria le superfici epiteliali quali la pelle, le branchie e l'intestino. Per i pesci è di fondamentale importanza mantenere l'integrità dei rivestimenti epiteliali in quanto questi costituiscono elementi fondamentali sia a scopi difensivi, sia per i meccanismi di osmoregolazione. Per questo motivo la riparazione di ferite o di danni tissutali, nei pesci è un processo estremamente rapido. Normalmente l'epitelio è rivestito da uno strato mucosale secreto dalle cellule del calice, la cui funzione principale è quella di prevenire l'adesione dei batteri, funghi o parassiti alla superficie epiteliale (Pickering et Richards, 1980).

L'inflammation è una reazione locale che viene scatenata e coinvolge un elevato numero di granulociti e macrofagi, tale patologia ha un preciso significato biologico e cioè quello di isolare l'area infettata dal resto del corpo conferendogli un certo grado di protezione. Studi istopatologici hanno evidenziato la presenza di una risposta infiammatoria a seguito di infezioni batteriche, fungine, virali o di parassiti protozoi e metazoi (Roberts, 1978; van Muiswinkel et Jagt, 1984). Le risposte infiammatorie acute nei pesci ossei sono paragonabili a quelle dei Mammiferi (Finn et Nielsen, 1971). Infiltrazioni di granulociti compaiono nella trota circa 12-24 ore dopo somministrazione di batteri o adiuvante completo di Freund e le cellule infiltrate, granulociti e macrofagi, aumentano di numero fino al secondo e quarto giorno (van Muiswinkel, 1995). Nei Mammiferi un danno chimico o fisico localizzato porta all'accumulo di cellule fagocitiche (macrofagi e neutrofili) che divengono attive in risposta alla presenza di antigeni microbici o di sostanze rilasciate da cellule danneggiate. Inoltre, tra i mediatori solubili dell'inflammation rilasciati dalle cellule fagocitiche attivate ci sono una serie di chemochine e citochine, le quali portano ad un incremento della permeabilità vascolare, all'attrazione e proliferazione dei leucociti, sintesi e rilascio dei mediatori della fase acuta dal fegato (e.g. la proteina reattiva-C, la proteina sierica amiloide P, la proteina sierica amiloide A, le lectine leganti il mannosio, la transferrina, il lisozima ed il complemento) e di quelli della risposta febbrile attraverso la mediazione dell'ipotalamo. E' pertanto plausibile ritenere che tali molecole siano presenti anche nei pesci Teleostei.

3.3.3 CELLULE EFFETTRICI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA

3.3.3.1 Cellule Citotossiche Non-specifiche (NCC)

Le NCC sono cellule leucocitarie dei pesci che sono in grado di mediare una risposta citotossica acuta innata e potrebbero essere i precursori filogenetici delle cellule Natural-killer dei Mammiferi (Evans et Jaso-Friedmann, 1992). Le NCC sono gli effettori citotossici meglio caratterizzati dell'immunità naturale nel pesce gatto, nella tilapia e in altri teleostei (Evans, 1992; Evans, 1984). Le NCC eliminano un'ampia varietà di cellule bersaglio, incluse cellule tumorali allogeniche e xenogeniche, cellule trasformate da virus o parassiti protozoi, allo

stesso modo di come agiscono le cellule NK di Mammifero (Ristow, 2000). Nella spigola è stata inoltre studiata a livello morfologico la citotossicità cellulo-mediata non-specifica, mostrando la capacità delle NCC di uccidere i loro bersagli mediante l'induzione della necrosi e dell'apoptosi con meccanismi del tutto simili a quelli conosciuti per le cellule citotossiche di Mammifero (Meseguer, 1996). In un altro lavoro, è stata determinata, "*in vitro*", l'attività citotossica spontanea diretta contro linee cellulari tumorali, esplicita da leucociti non stimolati di spigola mediante il test dell'esclusione del tripan blue e del rilascio della deidrogenasi: è stata trovata un'elevata attività anti-tumorale esplicita dai leucociti peritoneali; popolazioni cellulari derivanti dal rene cefalico e dalla milza hanno mostrato invece una bassa attività, mentre i leucociti circolanti non hanno rivelato una attività significativa. Granulociti eosinofili, isolati dal peritoneo, si sono mostrati maggiormente responsivi verso l'attività citotossica "*in vitro*" (Cammarata, 2000). Le NCC collaborano con altri effettori non-specifici (macrofagi e granulociti) per fornire una resistenza innata durante le risposte a situazioni di stress acuto. Situazioni di questo tipo possono essere indotte da diversi stimoli quali agenti infettivi (organismi opportunistici, patogeni, parassiti protozoi) o avverse condizioni ambientali (cambiamenti nella temperatura dell'acqua, elevata densità).

Mentre cellule NK immature hanno una specificità antigenica molto ristretta, cellule killer attivate da linfochine (Lymphokine-Activated Killer Cells, LAK) possono riconoscere un antigene specifico che viene a trovarsi sulla superficie di cellule tumorali una volta trasformate (Frederick, 1997). Le NCC al contrario, presentano questa ampia specificità in modo innato (Evans, 1992).

3.3.3.2 *Monociti/Macrofagi e Granulociti*

La fagocitosi sembra giocare un importante ruolo nelle difese non-specifiche contro le infezioni microbiche così come nell'eliminazione di danni tissutali (Secombes et Fletcher, 1992). La fagocitosi è una forma di endocitosi, dove particelle di una certa dimensione, quali frammenti cellulari, microorganismi, cellule intatte o aggregati macromolecolari, vengono ingeriti all'interno di vescicole endocitiche chiamate fagosomi. Può avere inizio con l'endocitosi mediata da recettori o attraverso interazioni idrofobiche non specifiche della membrana cellulare con le particelle bersaglio.

Cellule del sistema immunitario dei Vertebrati, quali cellule B, macrofagi, fibroblasti e granulociti (neutrofili, basofili ed eosinofili) possiedono tutte capacità fagocitiche a diversi livelli.

Il principale ruolo delle cellule fagocitiche nella difesa dell'ospite risiede nel limitare la diffusione e la crescita dell'organismo estraneo. Una volta contenuto, altre cellule immunitarie vengono reclutate nel luogo d'infezione per aiutare a distruggere l'agente infettivo. Spesso sono i fagociti stessi che sono attivati a distruggere l'organismo estraneo. Le principali cellule fagocitiche, quali macrofagi e neutrofili, possiedono, infatti, un repertorio di potenti molecole antibatteriche preformate conservate all'interno dei granuli e dei lisosomi di tali cellule. Questi organelli sono ricchi di enzimi idrolitici e peptidi anti-microbici che vengono rilasciati all'interno dei fago-lisosomi in seguito all'ingestione della particella estranea. Gli enzimi degradativi quali proteasi, nucleasi, fosfatasi, esterasi e lipasi ed i peptidi anti-microbici come peptidi neutrofilici e proteine basiche, distruggono attivamente la particella fagocitata (Sorensen, 1999; Borelli, 1999; Kaplan, 1999; Ganz, 1997; Levy, 1995; Alberdi Jr, 1995; Gabay, 1993; Lichtenstein, 1988). Le principali cellule fagocitiche dei pesci comprendono i granulociti (specialmente neutrofili), monociti e macrofagi tissutali i quali sono in grado di fagocitare particelle inerti o antigeniche, esercitare attività citotossica e stimolare i linfociti. Numerose evidenze sperimentali, infatti, suggeriscono che i macrofagi ricoprono una funzione importante anche nell'induzione delle risposte immuni umorali mediante la presentazione dell'antigene e la secrezione di specifiche citochine interleuchina-1-simili (Secombes, 1991; Verburg-van Kemenade *et al.*, 1995). Numerosi lavori sono stati effettuati per chiarire maggiormente quelle che sono le principali cellule protagoniste delle reazioni immunitarie della risposta innata. Nella spigola, a livello morfologico, leucociti isolati dal rene cefalico sono stati identificati come cellule stromali, macrofagi e cellule linfociti-simili (Meseguer, 1991). Successivamente, essudati di leucociti isolati da rene cefalico, sangue e peritoneo sono stati studiati in reazioni citotossiche "*in vitro*" con l'impiego del microscopio elettronico a scansione e a trasmissione, e le cellule effettrici esibivano caratteristiche strutturali sia dei monociti che dei linfociti (Mulero, 1994). L'attività fagocitica di cellule aderenti del rene cefalico, a seguito di stimolazione con patogeni batterici (*Aeromonas salmonicida*) o fungini (*Candida albicans*), è stata studiata con il microscopio ottico e attraverso la

produzione degli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) (Benani, 1995). In quest'ultimo lavoro è stato messo in evidenza che il rapporto tra macrofagi-agenti patogeni e l'ampiezza della risposta del ROI variavano con il tipo di patogeno, e che l'opsonizzazione mediata dal siero di pesce incrementava la risposta dei ROI nei macrofagi. La reazione fagocitica dei macrofagi è stata inoltre studiata da un punto di vista morfologico (Esteban, 1997) analizzando i tessuti da cui venivano isolati i leucociti, le specie batteriche impiegate, la presenza o assenza della parete batterica, la vitalità dei batteri, e l'opsonizzazione dei batteri. Questi studi hanno mostrato che macrofagi peritoneali della spigola possedevano una capacità fagocitica più spiccata di quella osservata nelle stesse cellule isolate dal sangue, le quali, a loro volta l'avevano ancora più alta rispetto a quelle provenienti dal rene cefalico. Parassiti come i funghi possono condizionare la salute delle spigole, e di tutti gli altri pesci allevati in acquacoltura, e sebbene una risposta specifica umorale contro questi organismi è stata recentemente studiata (Muñoz, 2000), tali risultati hanno mostrato che immunizzazioni con *S. dicentrarchi* portano principalmente all'attivazione di una risposta immune non-specifica come testimonia la quantificazione dell'attività lisoenzimatica, l'incremento della fagocitosi dei macrofagi, e la produzione attiva dei ROI. Sono stati approfonditi studi relativi a cambiamenti nelle risposte immuni non-specifiche correlati alla dieta (Sitjà-Bobadilla, 1999), ed è stata descritta la modulazione delle risposte a determinate sostanze quali l'alfa-tocoferolo e l'olio di fegato di merluzzo introdotti nel cibo (Obach, 1993). In quest'ultimo studio i fattori immunitari non-specifici testati sono stati l'attività del lisozima plasmatico e l'attività del complemento, l'emolisi naturale delle cellule rosse del sangue della pecora, e la chemiluminescenza delle cellule fagocitiche del rene cefalico.

3.3.4 L'IMMUNITÀ ACQUISITA

Come già accennato in precedenza, la comparsa dell'immunità acquisita è piuttosto recente nella scala evolutiva (Matsunaga et Rahman, 1998; Du Pasquier, 2000; Azumi et al., 2003; van den Berg et al., 2004) ed essendo i teleostei il più antico gruppo di vertebrati che possiede un'organizzazione morfologico-funzionale del sistema immunitario che si è mantenuta conservata fino ai mammiferi (Manning 1994; Van Muiswinkel, 1995), rivestono un ruolo

importante per lo studio dei meccanismi evolutivi e funzionali del sistema immunitario (Trede et al. 2004).

L'immunità specifica si è evoluta per potenziare l'azione dell'immunità innata e soprattutto per conservare la memoria per l'antigene, svolge un ruolo di primaria importanza nella difesa contro i microrganismi patogeni che resistono alle difese aspecifiche. Tali meccanismi di difesa presentano delle caratteristiche peculiari quali la specificità che consiste nel riconoscimento selettivo di molecole antigeniche presenti sulla superficie cellulare dei patogeni da parte dei linfociti, la diversificazione (selezione clonale) che si realizza con un'elevata eterogeneità dei componenti di tale immunità al fine di riconoscere il maggior numero possibile di antigeni. Un'altra fondamentale caratteristica è la memoria antigenica infatti, durante un'infezione, alcuni linfociti B si differenziano in cellule di memoria che permettono una risposta più rapida ad una seconda infezione dello stesso patogeno. È stato recentemente ipotizzato che l'evoluzione dei linfociti e quindi dell'immunità acquisita sia stata una conseguenza dell'evoluzione della mascella dei primi pesci mandibolati (Matsunaga et Andersson, 1994; Matsunaga et Rahman, 1998). Tale ipotesi prevede che la capacità acquisita di mordere l'alimento avrebbe aumentato l'incidenza di lesioni dell'apparato digerente (esofago, stomaco ed intestino) provocando nei primi mandibolati un aumento di patologie causata da una più frequente esposizione agli antigeni. Si pensa inoltre che tale caratteristica sia comparsa piuttosto bruscamente nei vertebrati (Du Pasquier, 2000; 2001). L'evoluzione del TcR sembra derivare da un unico antenato comune rappresentato da un vertebrato mandibolato primitivo, e si pensa che sia avvenuta in un tempo evolutivo piuttosto breve (Marchalonis et al., 1996). Questa rapida evoluzione è stata chiamata il "Big Bang" dello sviluppo dei recettori per l'antigene (Marchalonis et Schultze, 1990; Schultze et al., 1999). Gli invertebrati, presenti prima della riorganizzazione somatica che ha portato ai vertebrati, presentavano delle molecole simili alle regioni variabili del TcR e delle Ig (Mokady, 1996; Halaby et Mornon, 1998; Pancer et al, 1998; Blumberg et al, 1999; Du Pasquier, 2001). Si è ipotizzato che queste molecole presenti in gruppi ancestrali, siano servite come punto di partenza per l'evoluzione del sistema immunitario acquisito (Du Pasquier, 2000). L'immunità acquisita nei vertebrati è mediata da due popolazioni cellulari specifiche che sono i linfociti B e linfociti T e dalle cellule capaci di presentare l'antigene (APC). Le cellule B sono responsabili della produzione e secrezione delle Ig ed espongono sulla loro superficie delle Ig che fungono da recettore per l'antigene. Le cellule T invece sono

responsabili dell'eliminazione delle cellule aventi agenti patogeni, di cellule tumorali e della regolazione diretta delle risposte immunitarie.

3.3.4.1 Linfociti B

Studi effettuati su varie specie di teleostei hanno dimostrato l'esistenza di popolazioni linfocitarie e la loro capacità di secernere anticorpi, di rispondere nelle reazioni di rigetto da trapianto e di secernere citochine (Rowley et al., 1988; Secombes, 1998; Abelli et al., 1999). Recentemente è stato proposto un modello per la purificazione delle cellule B mediante anticorpi specifici (Scapigliati et al., 2003), inoltre sono stati prodotti anticorpi specifici contro i linfociti B in circa quindici specie di teleostei. Questi anticorpi sono stati validamente utilizzati per studiare le caratteristiche delle risposte primarie e secondarie e per far ciò è stata utilizzata la metodica ELISA che ha permesso inoltre di misurare i livelli di immunoglobuline nei liquidi biologici di varie specie di teleostei (Stromsheim et al., 1994; Scapigliati et al., 1996). Inoltre è stata verificata l'eterogeneità delle Ig nei vari gruppi di teleostei mostrando diversità sia nel peso molecolare che nel grado di specificità mediante l'uso di anticorpi monoclonali e policlonali. Sono state trovate anche diverse isoforme di Ig nelle varie specie, per esempio si è riscontrata la presenza nel siero della trota iridea due isoforme delle catene leggere delle Ig (Sanchez et al., 1995) ed i geni di tali catene sono stati confrontati con quelli delle medesime catene leggere nel merluzzo (Warr e Pilstrom, 1999). Recentemente sono state isolate nel pesce gatto e nella platessa delle Ig simili alle IgD di mammifero (Wilson et al., 1997; Hordvik et al., 1999; Stenvik et Jorgensen, 2000; Hirono et al., 2003). Si è osservato che linfociti B di animali immunizzati possono essere attivati e stimolati a produrre "*in vitro*" immunoglobuline antigene-specifiche (Meloni e Scapigliati, 2000). Inoltre le cellule B di spigola sono state immunopurificate per sorting magnetico da organi linfoidei e tali cellule hanno mostrato un aumento della capacità proliferativa (Scapigliati et al., 2002).

3.3.4.2. Linfociti T

Sono ben note nei teleostei reazioni immunitarie che coinvolgono i linfociti T (Sizemore et al., 1984; Miller et al., 1987), tuttavia l'identificazione di tali cellule è in parte impedita dalla mancanza di anticorpi specifici diretti contro tale popolazione per molte specie. Fino ad ora le strategie seguite per l'identificazione delle cellule T si sono avvalse di metodi indiretti basati sull'assenza di Ig di membrana sulle cellule (Rombout et al., 1989; Rombout et al., 1993) o

sullo studio della loro morfologia (Ellis, 1977; Quesada et al., 1990; Meseguer et al., 1991). I tentativi di produrre anticorpi specifici contro i linfociti T nella carpa e nel pesce gatto (Secombes et al., 1983a; Miller et al., 1986; Yamaguchi et al., 1996) non hanno dato i risultati sperati in quanto cross-reagiscono con le altre popolazioni leucocitarie. Tuttavia sono stati descritti due interessanti anticorpi uno dei quali specifico per un antigene di 35 kDa associato alle cellule T di pesce gatto (Passer et al., 1996), mentre l'altro specifico per una distinta popolazione mucosale di cellule T di carpa (Rombout et al., 1998). Viceversa nella spigola sono stati ottenuti dati interessanti in quanto si è prodotto un anticorpo specifico DLT15 diretto contro i linfociti T periferici (Scapigliati et al., 1995; Abelli et al., 1996; Romano et al., 1997; Abelli et al., 1997; Abelli et al., 1999). Il DLT15, specifico per i timociti e per le cellule T periferiche, è stato ottenuto mediante immunizzazione di topi con timociti fissati in paraformaldeide estratti da spigole allo stadio giovanile (Scapigliati et al., 1995). Questo anticorpo, appartenente alla sottoclasse delle Ig3, ha permesso una prima valutazione delle popolazioni di cellule T nei vari organi in questa specie di teleosteo; si è osservato che tali linfociti sono presenti nel 3% nei PBL, nel 9% negli splenociti, nel 4% nelle cellule del rene cefalico, nel 75% dei timociti nel 51% del GALT e nel 60% delle cellule del tessuto linfoide associato alle branchie (Romano et al., 1997). Uno dei primi studi effettuati mediante l'uso di tale anticorpo ha mostrato che le cellule T compaiono in stadi molto precoci in tale specie (Picchietti et al., 1997). Inoltre si è osservata per la prima volta “*in vivo*” in tale specie, mediante tecniche di immunoistochimica, l'attività delle cellule T nelle reazioni di rigetto da trapianto. In questo lavoro è stato effettuato un allo-trapianto di tessuto muscolare in spigole ed è stato osservato che nelle zone di trapianto in cui si osservava necrosi dei tessuti vi era una forte presenza di linfociti T (Abelli et al., 1999). Recentemente sono stati clonati in molte specie di telostei i componenti del TCR (recettore delle cellule T) ad esempio nella trota sono state clonate le regioni costante (C), variabile (V), e di giunzione (J) della catena α e le regioni V, J, C e di diversificazione (D) della catena β (Partula et al., 1995 1996). Sono state isolate inoltre le sequenze per le regioni V, J, C delle catene α e β nel pesce gatto (Wilson et al., 1998), nel merluzzo atlantico *Gadus morhua* (Wermenstam et Pilstrom, 2001), e nella platessa *Paralichthys olivaceus* (Nam et al., 2003). Nella spigola sono state clonate solo parzialmente le regioni della catena β (Scapigliati et al., 2001). Viceversa nei pesci cartilaginei sono state isolate completamente le sequenze del TcR (Rast et al., 1997) tanto è

vero che nello storione è stato isolato anche il CD3 (Alabyev et al., 2000) che dimostra che tutte le catene del TcR sono presenti in tutti gli gnatostomi.

A differenza dei linfociti B che posseggono le Ig, recettori per l'antigene che vengono secrete, i linfociti T hanno recettori per l'antigene di membrana che non sono secreti ma sono strutturalmente correlati alle Ig delle cellule B.

Nei mammiferi i linfociti T sono presenti in diverse sottopopolazioni distinte dal punto di vista funzionale dal punto di vista delle macromolecole esposte in superficie. Le principali popolazioni di linfociti T sono i linfociti T Helper (Th), i linfociti citolitici o citotossici (CTL); entrambe queste popolazioni cellulari riconoscono solamente gli antigeni che sono stati processati dalle cellule APC (Cellule presentanti l'antigene) e da esse presentate nella superficie associate al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Di conseguenza i linfociti T riconoscono solamente molecole associate alla membrana cellulare contrariamente alle cellule B che riconoscono antigeni in soluzione come proteine, acidi nucleici, polisaccaridi, e piccoli prodotti chimici (Babbitt et al., 1985). Un altro aspetto di ciò è che i linfociti T riconoscono solo peptidi lineari mentre i linfociti B riconoscono proteine anche nella forma nativa per cui nella loro struttura tridimensionale (Abbas et al., 1991).

Affinché si realizzi questo riconoscimento si è evoluta una macromolecola fondamentale presente in tutte le cellule: il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che avendo la capacità di interagire con i recettori dei linfociti T (TcR) permette la distinzione delle cellule sane da quelle infette da patogeni. I linfociti T per poter distinguere le cellule proprie da quelle estranee vengono istruiti durante le fasi maturative nel timo dove incontrano per la prima volta le cellule proprie ed acquisiscono la capacità di distinguerle da quelle estranee. Lo studio dei geni per il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) hanno evidenziato che questa molecola è composta da due catene polipeptidiche denominate α e β legate covalentemente mediante ponti disolfuro. Nei mammiferi la catena α è una glicoproteina acida di 40-50 kDa, mentre la catena β è una glicoproteina basica (per cui non carica) di 40-45 kDa. Questo eterodimero α e β fornisce alle cellule la capacità di riconoscere il complesso MHC-antigene, ma la funzionalità del TcR dipende dalla presenza nella membrana dei linfociti T di un complesso proteico recettoriale denominato CD3 (Van Wauwe et al., 1984; Tsoukas et al., 1985). Il complesso del CD3 nei mammiferi è formato da almeno cinque catene polipeptidiche di circa 16-28 kDa. associate non covalentemente tra loro e con la catena β del TcR.

Sulla superficie di una classe di linfociti T periferici α/β negativi e sui timociti immaturi è presente un altro tipo di TcR formato non più dalle catene α e β , ma dalle catene γ e δ (Heilig et Tonegawa, 1986; Hata et al., 1987; Koning et al., 1988). Le catene γ e δ sono delle glicoproteine transmembrana con struttura molto simile alle catene α e β (Bluestone et al., 1988). L'importanza delle molecole recettoriali accessorie quali il CD3 nell'attivazione dei linfociti T è testimoniata da molti esperimenti che indicano che anticorpi diretti contro tali molecole impediscono l'attivazione delle popolazioni cellulari coinvolte nelle risposte immunitarie (Bierer et al., 1989). Oltre al complesso del CD3 sono state individuate altre molecole accessorie molto importanti quali il CD4 ed il CD8 che sono delle glicoproteine di superficie espresse da due distinte sottopopolazioni di cellule T mature e presentano meccanismi distinti di limitazione da MHC (Parnes, 1989). Per quanto riguarda queste ultime due molecole sono in corso molti studi volti alla loro caratterizzazione e clonazione in molte specie animali tra cui i mammiferi, uccelli (Sowder et al., 1988), anfibi (Chretien et al., 1997; Haire et al., 2002).

Nei teleostei l'esistenza di linfociti T è stata dimostrata negli anni settanta (Stolen et Makela, 1975) mediante esperimenti che hanno dimostrato che in tale gruppo di vertebrati hanno funzioni analoghe a quelle delle cellule T di mammiferi. In particolare si è visto che tali cellule hanno la capacità di proliferare *in vitro* in risposta ad agenti mitogeni (Etlinger et al., 1976; Sizemore et al., 1984), di distinguere le cellule autologhe da quelle eterologhe (Marsden et al., 1996), di rispondere nelle reazioni di leucociti mescolati (MLR) (Miller et al., 1985) e di avere la capacità di funzionare come Helper per le cellule produttrici anticorpi contro gli antigeni timo dipendenti (Miller et al., 1987). In un lavoro risalente ai primi anni novanta (Vallejo et al., 1991) è stata mostrata l'importanza della processazione e presentazione dell'antigene da parte delle APC nella generazione delle risposte immunitarie secondarie nel pesce gatto. In tale lavoro sono state utilizzate linee monocitarie attivate a lungo termine come cellule APC ed è stata riscontrata l'attivazione delle cellule T mediata da molecole MHC o simili presenti sulla superficie delle APC. Questo lavoro dimostra che le reazioni immunitarie nei teleostei sono molto simili alle reazioni immunitarie dei mammiferi.

Un'altra importante attività delle cellule T è stata evidenziata nella carpa ed è rappresentata dalla reazione di rigetto da trapianto verso un ospite (GVHR: graft-versus-host). In questo lavoro sono stati utilizzati esemplari tetraploidi e triploidi (Nakanishi et Ototake, 1999) ed è stato osservato che gli individui tetraploidi che avevano subito il trapianto di

cellule triploidi morivano nel giro di un mese testimoniando la presenza di linfociti T citotossici. Attualmente l'unica prova di una attività *in vivo* delle cellule T è fornita da un lavoro sulla spigola (Abelli et al., 1999) in cui sono stati effettuati trapianti di muscolo in individui adulti ed è stata saggiata l'attività di linfociti T e B mediante l'uso degli anticorpi DLT15 (diretto contro i linfociti T) e DLIg3 (diretto contro i linfociti B). Gli studi di immunoistochimica effettuati in tali esperimenti hanno evidenziato una forte presenza di linfociti T nelle aree interessate dalle reazioni di rigetto da trapianto.

3.3.4.3 Attività Anticorpali

La spigola è una specie di teleostei che è soggetta a vari tipi di agenti patogeni e dato l'interesse biotecnologico che le ruota attorno è oggetto di numerosi studi a carico del sistema immunitario. Alcuni dei patogeni che più frequentemente colpiscono tali specie sono il *Vibrio anguillarum* ed il *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* i quali causano delle vibriosi che sono delle setticemie che possono portare alla morte dell'individuo. Molti degli studi su tale specie riguardano le tecniche di vaccinazioni contro tali microrganismi ad esempio le pratiche di vaccinazione contro il *Vibrio* prevedono la somministrazione intraperitoneale, o per via orale, o per immersione di una sospensione di batteri uccisi. Uno studio su queste pratiche (Dec et al., 1990) ha dimostrato l'inefficacia della somministrazione orale rispetto a quella intraperitoneale e ciò è stato ottenuto mediante la determinazione del titolo delle Ig specifiche nel siero e con la determinazione dell'attività batteriostatica. Tuttavia si è osservato che anche la vaccinazione orale conferisce un certo grado di protezione infatti dopo 2 mesi dalla vaccinazione l'inoculo di *Vibrio* virulento non ha provocato gravi danni agli animali immunizzati. Successivamente sono stati studiati i rapporti tra le quantità di Ig totali nel siero e l'attività delle Ig antigene-specifiche dopo due iniezioni intraperitoneali di una sospensione di *Vibrio* inattivato da calore (Coeurdacier et al., 1997). I risultati di tale lavoro hanno mostrato che l'iniezione del *Vibrio* non ha determinato un aumento delle proteine totali del siero ma ha determinato un aumento della produzione di Ig antigene-specifiche negli animali immunizzati, per contro non è stata rilevata nessuna differenza tra individui maschi e femmine. In un altro lavoro è stato osservato che la parete lipopolisaccaridica dei batteri (LPS) è il principale agente immunogeno per quanto riguarda l'immunità contro i batteri, questi dati sono stati ottenuti mediante l'inoculo in spigole di *Pasteurella* (Bakopulos et al., 1997). Per studiare le reazioni umorali del sistema immunitario della spigola sono stati prodotti anticorpi

monoclonali contro le Ig e le cellule B che espongono le Ig in membrana (Scapigliati et al., 1999). Questi anticorpi sono stati preparati usando come antigene di immunizzazione le Ig purificate con i vari metodi biochimici (Estévez et al., 1994; Bourmaud et al., 1995; Palenzuela et al., 1996). La maggior parte di tali anticorpi riconoscono la catena pesante delle immunoglobuline mentre alcuni riconoscono la catena leggera (Scapigliati et al., 1996; Romestand et al., 1995; Dos Santos et al., 1997); in particolare, nel primo lavoro (Romestand et al., 1995), l'mAb è stato usato in test ELISA per studiare il rapporto tra le Ig totali del siero e quelle antigene specifiche. Successivamente si è visto che l'anticorpo contro le catene leggere è capace di riconoscere l'antigene di immunizzazione sia nella forma nativa che in quella denaturata (Scapigliati et al., 1996). In questo lavoro le Ig di spigola sono state purificate in unico passaggio mediante cromatografia di affinità in colonna di α -sepharose e le Ig così ottenute sono state usate come antigeni di immunizzazione nei topi. A fusione avvenuta sono stati selezionati gli ibridomi specifici per le catene leggere (DLIg3) e per le catene pesanti (DLIg13 e DLIg14). Di questi il DLIg3 è risultato il più valido infatti mentre i precedenti non riconoscevano le cellule vive, quest'ultimo, in analisi di citofluorimetria di flusso, ha marcato il 21% delle cellule estratte da PBL, il 3% dei timociti, il 30% degli splenociti, il 33% delle cellule del rene cefalico ed il 2% delle cellule del tessuto linfoide associato alla mucosa (GALT) (Romano et al., 1997)

3.4 BIOLOGIA DELLA SPECIE

La Spigola, o Branzino, è una specie che appartiene al gruppo dei perciformi, famiglia Percichthyidae. Tale specie è presente in Mar Mediterraneo, in cui è molto comune, nell'Oceano Atlantico di Nordest, nel Mare del Nord e nel Mar Baltico. La spigola occupa un habitat che comprende la zona litoranea da una profondità di 10m ad una profondità massima di 60-80m (Smith, 1990). Questo teleosteo è una specie eurialina che vive nelle acque costiere e nelle foci di fiumi durante i mesi estivi, per poi migrare verso il mare aperto nei mesi freddi e colonizza le acque profonde durante i mesi invernali. Si è osservato che la spigola può vivere all'interno di una gamma di temperatura che varia da 2°C a 32°C, ma a temperature inferiori di 7°C questi teleostei smettono di alimentarsi. La spigola è un predatore vorace che si nutre principalmente di molluschi e gamberi, ma molto spesso anche di pesci (Tortonese, 1986). Nelle specie che popolano il Mediterraneo la deposizione delle uova avviene in inverno e sia le uova fertilizzate che i vari stadi larvali si trovano solo in acque poco profonde.

Gli esemplari giovani si presentano sotto forma di banchi di pesci, mentre gli individui adulti sembrano essere meno gregari (Frimodt, 1995). La maturità sessuale in tali teleostei dipende sia dalle dimensioni che dall'età e corrispondono a circa 23-28 cm e 2-4 anni per i maschi ed a 32-43 cm e 3-5 anni per le femmine. In termini commerciali la spigola è venduta sia fresca che affumicata ed è anche ricercata nella pesca sportiva.

IV. MATERIALI E METODI

4.1 ANTICORPI MONOCLONALI IMPIEGATI NELLA SPERIMENTAZIONE

Gli anticorpi monoclonali DLT15 e DLig3, specifici rispettivamente per le cellule T e per le cellule B, usati per gli studi descritti in questa tesi, sono stati precedentemente prodotti e caratterizzati presso il laboratorio di Biotecnologie animali del Dipartimento di Scienze Ambientali dell' università degli Studi della Tuscia – VT (Scapigliati et al., 1995; 1996).

4.2 MISURAZIONE DI ATP INTRACELLULARE

In tutti gli esperimenti condotti per questa tesi sono state utilizzate delle spigole nate ed allevate in acqua di mare presso lo stabilimento di acquacoltura “Nuova Azzurro” sito in Civitavecchia. Gli animali presentano una variabilità genetica simili ai cospecifici selvatici. Tutte le spigole utilizzate ai fini sperimentali avevano circa 2 anni di età ed un peso di 298 ± 76 g. Prima di essere sacrificati, tutti gli animali sono stati anestetizzati in acqua di mare contenente $1 \mu\text{g/ml}$ di tricaina metasolfonato (Sigma). Tutte le soluzioni usate nel trattamento delle cellule di tali pesci sono state preparate tenendo conto della tipica osmolarità dell'acqua marina, infatti, mediante l'aggiunta di NaCl 2M abbiamo raggiunto, in queste ultime, una concentrazione di sali pari a 355 mOsm/Kg.

Il sangue è stato prelevato dalla vena caudale con una siringa sterile contenente 2 ml di soluzione costituita da 0,7 mg/ml di eparina in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free (HBSS-eparina 10X) per prevenire la formazione di coaguli. Dopo il prelievo, il sangue è stato conservato in HBSS-eparina 10X e mantenute alla temperatura di 4°C .

Successivamente il sangue è stato ulteriormente diluito in HBSS-eparina 10X e la soluzione così ottenuta è stata posta su un gradiente discontinuo di densità di Percoll (Pharmacia AB, Uppsala, Svezia) a densità $1,04 \text{ g/cm}^3$ e $1,07 \text{ g/cm}^3$. Dopo la centrifugazione, operata a $840 \times g$ per 30 minuti a 4°C , le cellule presenti nell'interfaccia tra le due densità, sono state raccolte e lavate a $640 \times g$ per 10 minuti a 4°C con HBSS-eparina 10X risospendendole in fiasche per colture cellulari T-25 alla concentrazione finale di 2×10^6 cell/ml in 5ml di L-15 (GIBCO) contenente 5% FCS (GIBCO) e antibiotici. Le popolazioni leucocitarie così ottenute sono state infine incubate a 18°C . Le cellule risultanti da ogni esperimento sono state contate utilizzando un emocitometro di Neubauer con 0,2% di tripan blue che ha permesso di determinarne anche la vitalità.

4.3 COLTURE CELLULARI

Sono stati saggiati 5 animali per ogni esperimento, per cui ad ogni campionamento veniva prelevato il sangue a 6 esemplari in modo tale da avere a disposizione cellule da un donatore e 5 effettori. Dopo aver determinato il numero totale di cellule da ogni campione, quello che risultava avere il maggior numero di cellule, circa una concentrazione finale di 1×10^8 cell./ml, veniva risospeso in 5 ml di L-15 (senza FBS) in fiasche per colture cellulari da 25 cm³ e successivamente trattato a 20°C con 12 Gy per mezzo di una macchina a raggi X (Gilardoni, Italia) e poste in incubazione a 18°C per tutta la notte. Effettuato tale trattamento le cellule sono state nuovamente contate e mediamente a 5×10^7 cellule effettrici sono state aggiunte 1×10^7 cellule irradiate e le fiasche così ottenute sono state incubate a 18°C per 4 settimane. La percentuale di cellule DLT15-positive e DLIG3-positive è stata determinata ad intervalli di 2 e 4 settimane.

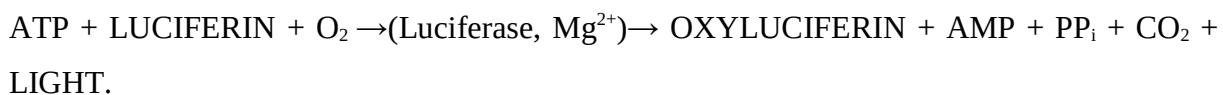
- Ogni PBL è stato suddiviso in 3 aliquote con egual numero di cellule iniziali:
- a) Campione di MLR costituito da cellule irradiate e cellule effettrici in rapporto di 1:5.
 - b) Campione per saggiare gli effetti della ciclosporina-A costituito da cellule irradiate più cellule effettrici in rapporto di 1:5 in terreno L-15 + FBS al 5% con l'aggiunta di ciclosporina-A alla concentrazione finale di 5µg/ml
 - c) Campione di controllo costituito da sole cellule effettrici.

4.4 PROLIFERAZIONE “IN VITRO” DI LEUCOCITI DI SANGUE PERIFERICO

Affinché i dati ottenuti negli esperimenti fossero tra loro paragonabili si è reso indispensabile partire da un medesimo numero di cellule iniziali in ogni campione esaminato. Gli esemplari analizzati sono stati un totale di 10 ed i PBL provenienti da ciascun teleosteo sono stati suddivisi in due gruppi: a) Gruppo di controllo costituito da sole cellule effettrici; b) Gruppo stimolato costituito da cellule effettrici più cellule irradiate. La vitalità cellulare dei gruppi esaminati è stata determinata rapportando i dati ottenuti da cellule vive al tempo iniziale ($t=0$) e dopo 2 settimane ($t=1$).

La proliferazione cellulare dei gruppi di controllo e MLR è stata misurata come conta della vitalità analizzando la concentrazione di ATP intracellulare mediante l'utilizzo di un kit luminometrico (ATP-Lite, Perkin Elmer) dopo 2 settimane di incubazione. 100 µl di soluzione contenente le cellule provenienti dai gruppi di controllo e dai gruppi stimolati sono stati posti in piastre luminometriche da 96 pozzetti. Per determinare il numero di cellule

metabolicamente attive, abbiamo utilizzato un saggio luminometrico (ATP-Lite, Perkin Elmer). Questa metodica ha consentito di effettuare misure di bioluminescenza dell'ATP mediante l'utilizzo di un enzima, la luciferasi, che catalizza la formazione di luce da AMP e D-luciferina secondo la seguente reazione:



Alle piastre contenenti le cellule sono stati aggiunti i reagenti che costituiscono in kit secondo le istruzioni riportate. L'intensità della luce emessa, correlata con la concentrazione di ATP, è stata misurata con un lumenometro (Victor II, Perkin Elmer). Il rapporto effettuato tra i dati ottenuti per i gruppi di controllo e quelli stimolati determina la percentuale di cellule in attività proliferativa.

4.5 IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Per l'analisi tramite immunofluorescenza indiretta (IIF) tutte le operazioni sono state eseguite a 4°C in soluzioni contenenti 0,01% di sodio azide. Le cellule prelevate dalle fiasche sono state preventivamente lavate mediante centrifugazione in soluzione salina contenente fosfati (PBS) e poste in provette per citofluorimetria. Le cellule sono state incubate con 250µl di anticorpo monoclonale DLT15 e DLlg3 come sopranatanti di coltura per 45 minuti. Le aliquote destinate ai controlli negativi sono state incubate con terreno di coltura ottenuto dai surnatanti di cellule di mieloma. Trascorso il periodo di incubazione con l'anticorpo primario, le cellule sono state lavate in centrifuga con PBS osmolare spigola, quindi sono stati aggiunti 250 µl di anticorpo secondario (GAM-FITC) marcato con molecole di fluoresceina (Sigma), diluito 1:200 in PBS osmolare spigola ed incubato per 30 minuti. Le cellule sono state di nuovo lavate come precedentemente visto per asportare gli eccessi di anticorpo non legato. La lettura è stata effettuata mediante il citofluorimetro FACScalibur (Beckton Dickinson, USA) che permette la separazione delle cellule in base alla loro morfologia e fluorescenza. L'analisi è stata effettuata avvalendoci del programma Cell Quest acquisendo 10000 eventi senza gate.

4.6 ANALISI DEL Ca^{2+} INTRACELLULARE

Questa è una tecnica che permette di verificare l'attivazione cellulare mediata da secondi messaggeri; in particolare consente di determinare la concentrazione di Ca^{2+} rilasciato a livello intracellulare. Le cellule di PBL mantenute in coltura in fiasche da 25 cm² sono state

lavate 2 volte con centrifugazione in PBS, sono state risospese in terreno di coltura L-15 senza siero (FCS) ed incubate per 45 minuti a 18°C con il reagente Fura-2 (Sigma) alla concentrazione finale di 4 μ M. Le cellule sono state di nuovo lavate in centrifuga con il terreno colturale RPMI senza FCS e rosso fenolo dopodiché sono state risospese alla concentrazione di 10⁷ cellule/ml nello stesso terreno dializzato in PBS. A questo punto le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 10⁶ cellule per pozzetto in triplicato in piastre da 96 pozzetti ed è stata misurata la fluorescenza emessa da ciascun pozzetto. La rilevazione fluorimetrica è stata misurata automaticamente tramite fluorimetro Victor II (Wallach, USA) per 5 minuti con intervalli di 1 minuto tra una misurazione e l'altra.

4.7 RT-PCR

E' questa una tecnica molto affidabile per testare la presenza, negli RNA citoplasmatici totali, di sequenze di mRNA codificanti per proteine di interesse. Con la RT-PCR, infatti, è possibile amplificare in molte copie una sequenza di RNA a partire da piccolissime quantità iniziali; dopodiché tramite elettroforesi in gel di agarosio è possibile determinare la presenza della sequenza voluta opportunamente amplificata. Nel nostro caso lo scopo era quello di verificare la differenza di espressione del gene per il TcR e per le Ig nelle cellule linfocitarie provenienti dalle reazioni di MLR, dai Controlli, e dagli MLR con CsA.

Prima di procedere alla PCR si è dovuto estrarre l'RNA dalle cellule tramite denaturazione con Tripure (Boheringer, Mannheim) che è stato aggiunto nella quantità di 1 ml ogni 10⁶ cellule. Dopo essere state denaturate, il lisato cellulare è stato conservato a -80°C. L'mRNA ottenuto è stato risospeso in dietilpirocarbonato (DEPC) diluito in acqua ed è stata determinata la concentrazione mediante spettrofotometro. Per la reazione di amplificazione è stato prelevato 1 μ g di RNA totale a cui sono stati aggiunti 0,5 μ g di primers casuali (pd(N)₆) e tale miscela è stata usata per la retrotrascrizione in un volume totale di 50 μ l. Per testare la quantità e la purezza dell' RNA è stata messa a punto una PCR con primers lunghi 543 bp prodotti dal gene per la β -actina di spigola. Per escludere la contaminazione da DNA la PCR è stata effettuata usando come stampo l'RNA con lo stesso protocollo. Per tale ragione sono stati costruiti dei primers di 503 bp a partire dalle sequenze geniche di spigola della regione costante del TcR β (Scapigliati et al., 2000) e di 224 bp a partire dalla regione costante della catena leggera delle Ig di spigola (Dos Santos et al., 2001).

I primers per il TcR β erano 5'-AGATTACCGGACCATCAGTGAAAG (forward) e 5'-TCAGTAGTTCTGCTTTCCCTTTGA (reverse). Il protocollo prevede vari cicli di amplificazione: 1 ciclo a 94°C per 5 minuti, 35 cicli a 94°C per 45 secondi, a 60°C per 45 secondi ed a 72°C per 45 secondi seguiti da 1 ciclo a 72°C per 10 minuti. I primers per le immunoglobuline erano 5'-GAGCTGCAGAAGGACAGTG (forward) e 5'-TCAGACTGGCCTCACAGCT (reverse). Il protocollo dei cicli prevedeva 1 ciclo a 94°C per 5 minuti, 35 cicli a 94°C per 45 secondi, a 50°C per 45 secondi ed a 72°C per 45 secondi seguiti da 1 ciclo a 72°C per 10 minuti.

Tutte le reazioni di amplificazione per PCR sono state effettuate utilizzando il Mini CyclerTM, modello PTC-150-16 (MJ Research).

Dei prodotti delle RT-PCR sono stati prelevati 15 μ l che sono stati usati per osservare l'andamento dell'espressione dei geni desiderati nei vari tipi di campioni. Tale visualizzazione è stata fatta per elettroforesi con 1% (M/V) di gel d'agarosio contenente 10 mg/ml di bromuro d'etidio usando marcatori di 123 bp (Sigma) e di 1 kb (Gibco).

Per verificare che i frammenti ottenuti per amplificazione mediante PCR fossero quelli desiderati, dal gel di agarosio sono state prelevate delle aliquote e direttamente sequenziate tramite sequenziatore automatico ABI377.

4.8 TEST DI CITOTOSSICITA'

Dopo due settimane di coltura, i PBL sia dai campioni di controllo (solo cellule effettrici) che da quelli stimolati (cellule effettrici più cellule irradiate) sono state lavate in PBS e risospese in L-15 con FBS al 5% alla concentrazione desiderata. 100 μ l della sospensione cellulare sono stati posti in piastre da 96 pozzetti, dove il giorno precedente erano state seminate $1,5 \times 10^4$ cellule SAF-1, una linea cellulare di fibroblasti a crescita aderente ottenuta dall'orata (Perez-Prieto et al., 1999), la loro crescita aderente ha permesso di allestire questo saggio. Il numero di cellule target (SAF-1; T) è stato mantenuto costante in tutti i pozzetti, mentre è stato variato il numero di cellule effettrici (PBL; E), in rapporti E/T decrescenti pari a 20:1, 10:1, 5:1, 1:1. Opportuni controlli sono stati effettuati ponendo nei pozzetti solo le cellule effettrici (E) e solo le cellule target (T). Le piastre così ottenute sono state incubate a 18°C per 72 ore al termine delle quali le cellule non aderenti sono state rimosse, ed i pozzetti lavati due volte con PBS osmolare spigola in modo da eliminare tutte le cellule in sospensione. Ad ogni pozzetto sono stati quindi aggiunti 100 μ l di RPMI senza rosso fenolo (GIBCO) e l'attività citotossica

delle cellule effettrici verso le cellule bersaglio è stata determinata tramite il kit ATP-Lite con la stessa metodica riportata precedentemente. L'intensità della luce emessa, correlata linearmente con la concentrazione di ATP, è stata misurata mediante un lumenometro (Victor II, Wallac). La citotossicità è stata calcolata mediante la seguente formula: % della vitalità delle cellule Target = $[(E + T) - E \times 100] / T$

4.9 ELISA

La tecnica ELISA è stata utilizzata al fine di saggiare l'attività antivirale "*in vitro*" di leucociti di spigola estratti da animali vaccinati e non. Brevemente sono stati adsorbiti i pozzetti di reazione (piastre in polistirene Maxisorp, Nunc, Roskild, DK) ciascuno con 100 µl di nodavirus inattivato (VERV) diluito 1:2 con Buffer 0,1M di carbonato-bicarbonato pH 9,4. Dopo un periodo di 24h di incubazione i pozzetti sono stati lavati 3 volte in Tris-HCl 50mM pH 7,4 contenente 0,05% di tween-20 e 0,15M di NaCl (TTN). Dopo aver saturato i siti liberi nei pozzetti con BSA al 3% i TTN (TBT), 100 µl di diluizioni seriali (1:100 a 1:6400) di sieri diluiti in TBT sono stati piastrati ed incubati 24h a 4°C. Sono stati testati sieri provenienti da 10 animali per ogni campionamento e piastrati in triplicato. Trascorso il tempo di incubazione i pozzetti sono stati lavati come precedentemente descritto ed incubati 90 minuti con anticorpo antisiero IgM di spigola marcato con per ossidasi (C1-HRP, Aquatic Diagnostics, Stirling, UK) secondo le specifiche del produttore. I pozzetti sono stati quindi lavati 2 volte in TTN e 2 volte in fosfato-citrato 50mM pH 5,0 contenente 0,001 di H₂O₂. La reazione di sviluppo durata 20 minuti è stata bloccata con acido solforico 3N e, per mezzo di un lettore automatico di micro piastre, è stata letta l'assorbanza a 492nm.

4.10 PCR QUANTITATIVA SU LEUCOCITI DI SPIGOLA DA RENE CEFALICO

L'Rna totale è stato estratto da cellule di rene cefalico mediante Tripure (Roche), seguendo le istruzioni del produttore, e risospeso in acqua con DEPC al fine di essere utilizzato nell'analisi di PCR quantitativa. Sono stati eseguiti dei controlli preventivi per escludere la presenza di DNA genomico utilizzando primers per la β-actina di spigola. Per la retro trascrizione sono stati utilizzati enzimi BioScript RNasi H minus (Bioline) con il seguente protocollo: 2µg di RNA totale con 1 µl di random esameri (0,2 µg/µl Amersham, Pharmacia) ed acqua priva di nucleasi fino ad un volume di 12 µl. Tale miscela è stata incubata per 5 minuti a 70°C e successivamente raffreddata in ghiaccio. A questa sono stati aggiunti 4µl di

un mix di reazione contenente 100 mM di dNTPs (25mM ciascuno, Promega) ed acqua priva di nuclesi fino ad un volume di 19,75 μ l. a questa soluzione sono stati aggiunti 0,25 μ l di BioScript 200U/ μ l ed il tutto incubato a 25 °C per 10 minuti, poi a 37°C per 60 minuti. Dopo tale incubazione la reazione è stata bloccata mediante riscaldamento a 70°C per 10 minuti. Sono stati saggiati i livelli di espressione dei geni INF-1, MX , IL-1, COX-2, TGF- β , IL-10, TCR β , CD4, CD8 utilizzando un'analizzatore automatico per PCR Mx3000P™ (Stargene) equipaggiata con software Versione 2.02 ed utilizzando il Brilliant SYBR Green Q-PCR Master Mix (Stargene) seguendo le istruzioni del fornitore. Come normalizzatore è stato utilizzato ROX in quanto, essendo non reattivo durante reazioni di Q-PCR. Sono stati disegnati appositi primers per l'amplificazione dei trascritti (~ 200bp) dalle regioni costanti di tutti i geni analizzati e ribosomiali 18S come gene "House-keeping". Le condizioni di PCR erano le seguenti: 95°C per 10 minuti seguiti da 35 cicli a 95°C per 45 s, 52°C per 45s e 72°C per 45s. Le reazioni sono state eseguite in triplicato per ogni campione di cDNA ricavato e per ricavare i valori di bianco di reazione i cDNA sono stati sostituiti con acqua. Ad ogni reazione è stata analizzata la curva di melting studiando i picchi di assorbanza specifica per il gene amplificato. L'analisi è stata effettuata utilizzando l'opzione "End-Point" del software "Mx3000P™" che permette l'analisi della fluorescenza al termine di ogni ciclo di amplificazione.

Una quantificazione relativa è stata eseguita paragonando i livelli di espressione genica in animali sperimentali con quelli di animali di controllo (pesci iniettati con PBS), i campioni di controllo sono stati utilizzati come calibratori ponendo il loro valore di espressione pari a 1,0. Durante l'analisi è stato usato come normalizzatore l'RNA ribosomiale 18S. L'analisi quantitativa si è basata sulla soglia del ciclo ct definito come il ciclo in cui si osservava un aumento statisticamente significativo della fluorescenza rispetto a quella di fondo. La specificità e dimensione dei prodotti della Real time PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio. Per ogni campionamento sono stati testati 4 pesci ed i risultati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

4.12 VIRUS E COLTURE CELLULARI

Il nodavirus, precedentemente isolato da spigole con sintomatologia riconducibile a encefalopatia è stato fatto replicare in coltura nella linea cellulare SSN-1 a 20°C in Leibovitz (L-15) medium arricchito con il 2% di FBS (Gibco).

Le cellule SSN-1 infettate sono state mantenute a 25 °C in L-15 con l'aggiunta di 2% L-glutamina (Sigma), 1% penicillina-streptomina (Gibco) e 10 % (FBS) (Cambrex). L'inoculazione virale è stata ottimizzata in cellule in coltura semi-confluente e le particelle virali sono state estratte mediante il metodo TCID50. La crescita virale è stata effettuata presso i laboratori dell'IZVS delle Venezie, a Padova.

4.13 ANALISI STATISTICA

In tutti gli esperimenti effettuati è stata calcolata la media e la deviazione standard di tutti i campioni appartenenti agli stessi gruppi (MLR, Controlli, CsA) ed i valori ottenuti per le varie popolazioni saggiate (linfociti T e linfociti B) sono stati messi in grafico per visualizzare meglio le differenze dei vari trattamenti. Inoltre è stato effettuato il test per la significatività statistica mediante il test ANOVA e tale significatività è stata accettata con il valore p minore di 0.05. I dati sono stati rappresentati come valore medio $\pm$ deviazione standard (SD) e come valore medio $\pm$ errore standard sulla media (SEM).

V. RISULTATI

5. RISULTATI

5.1 CONTA LINFOCITARIA NELLE MLR

La messa a punto della metodica applicata ha richiesto una sperimentazione preliminare per accertare che le cellule sottoposte al ciclo di irradiazione, cioè le cellule donatrici, non proliferassero in presenza delle cellule bersaglio. Questo risultato è stato ottenuto mediante una reazione di MLR bidirezionale in cui entrambe i PBL erano stato irradiati. Dopo 2 settimane di incubazione i dati citofluorimetrici non hanno mostrato differenze significative tra i PBL di controllo e quelli stimolati. Tale dato ci ha dato la certezza che le proliferazioni riscontrate negli esperimenti di MLR unidirezionali fossero dovute alla reale proliferazione dei PBL bersaglio. Il contenuto in leucociti nelle reazioni di MLR unidirezionali sono stati saggiati mediante immunofluorescenza indiretta impiegando anticorpi monoclonali DLT15 e DLIg3, diretti rispettivamente contro i linfociti T e contro i linfociti B. Dopo l'immunofluorescenza indiretta (IIF) la percentuale delle popolazioni di linfociti T e B dei campioni esaminati, è stata determinata mediante l'analisi al citofluorimetro. I dati ottenuti, al netto del controllo, sono mostrati in figura 1. Nei campioni di controllo, cioè i PBL in coltura senza alcun stimolo, si osserva che la percentuale media dei linfociti B decresce all'aumentare del tempo, passando da un valore iniziale di $21.1 \pm 3.8\%$ al tempo zero, ad un valore di $13.3 \pm 7.2\%$ a 2 settimane di incubazione, fino ad arrivare ad un valore di $7.7 \pm 3\%$ a 4 settimane di incubazione, mentre la percentuale delle cellule T rimane pressoché stabile durante le 4 settimane di incubazione mostrando una percentuale costante intorno al 4%. Nei campioni di MLR invece si assiste (Fig. 1b) ad un aumento statisticamente significativo dei linfociti T, si passa infatti, da una percentuale di $3.1 \pm 0.8\%$ al tempo zero, ad una percentuale di $8.8 \pm 4.7\%$ a 2 settimane e ad una percentuale di $7.9 \pm 4\%$ a 4 settimane. Le cellule B (Fig. 1b), diversamente dalle cellule T, nel corso delle 4 settimane di incubazione, subiscono un brusco decremento passando da un valore iniziale di $21.1 \pm 3.8\%$ passando per una percentuale di $6.71 \pm 3.2\%$ a 2 settimane fino ad arrivare ad un valore di $3.0 \pm 1.6\%$ a 4 settimane. Questi dati riportati in figura 1b mostrano chiaramente che la popolazione cellulare ad essere coinvolta nei processi proliferativi è quella dei linfociti T. L'analisi statistica effettuata mediante il test ANOVA ha indicato che la diminuzione delle cellule B nel corso delle 4 settimane è risultata significativa mostrando un valore di $p < 0.05$, così come

l'aumento delle cellule T. Questa significatività statistica è stata evidenziata nei grafici mediante un asterisco.

Nella Tabella 1 sono mostrati i valori della deviazione standard di 3 esperimenti in cui sono stati esaminati un totale di 15 animali per ogni gruppo che sono il gruppo di Controllo, e di MLR. Grazie ai valori ricavati sperimentalmente è stato possibile anche determinare il numero di cellule vive nelle varie fasi di sperimentazione in modo da avere un dato quantitativo delle cellule coinvolte negli eventi proliferativi. Si è osservato che il numero di cellule totali negli esperimenti di MLR è diminuito da 1.2×10^7 cellule al tempo zero, a $6 \pm 0.8 \times 10^6$ cellule a 2 settimane fino ad arrivare a $1.5 \pm 0.7 \times 10^6$ a 4 settimane, da questi valori si può ipotizzare che benché il numero delle cellule T sia aumentato sensibilmente, il numero totale di cellule sia diminuito e ciò è da imputare alla diminuzione marcata del numero dei linfociti B. Nella tabella 1 è riportato anche il grado di variabilità individuale riscontrata nei vari pesci, infatti, oltre al valore medio $\pm$ deviazione standard, sono riportati i valori minimo e massimo osservati per ogni gruppo sperimentale. Inoltre sono stati testati gli effetti della Ciclosporina A. L'aggiunta di tale molecola ad una concentrazione di $5 \mu\text{g/ml}$ nei campioni di MLR, ha impedito la proliferazione dei linfociti T, come è possibile osservare dai dati riportati in Figura 2a. Si nota chiaramente che anche in questo gruppo sperimentale di 12 animali si assiste ad un aumento statisticamente significativo di cellule T nei campioni di MLR ($8.3 \pm 3.8\%$) rispetto ai campioni di controllo ($3.8 \pm 3.2\%$), mentre il quantitativo di cellule T nei campioni di MLR con l'aggiunta di Ciclosporina, rimane inalterato rispetto a quello di controllo. Anche per questo gruppo sperimentale (N=12) abbiamo allestito una tabella (Tab.2) in cui abbiamo riportato i valori medi con le deviazioni standard dei 3 gruppi: controllo, MLR ed MLR+CsA, in cui abbiamo esaminato 12 animali. Dai dati riportati nella tabella si osserva chiaramente il grado di variabilità individuale.

L'attivazione cellulare, in particolar modo dei linfociti T, reazioni di linfociti mescolati, è stata esaminata misurando il rilascio intracellulare di Ca^{2+} mediante l'utilizzo del reagente Fura-2 AM leggendo l'attività mediante il luminometro Victor II. Incubando le cellule con l'anticorpo DLT15 (specifico per le cellule T) si determina un'attivazione di recettori di membrana che scatena una cascata di segnali intracellulari che causano un aumento intracellulare di Ca^{2+} (tale attività è tipica delle cellule capaci di rispondere a stimoli anticorpali). I risultati di tali esperimenti sono riportati in Figura 2b. Il rilascio di Ca^{2+} , che è riportato come unità di valore medio di fluorescenza (RFU), ottenuto mediante lettura al

fluorimetro dopo 5 minuti di incubazione delle cellule con l'anticorpo, mostra che le cellule tenute in coltura per 2 settimane senza alcun stimolo, hanno dato un valore medio RFU di $1,250 \pm 348$ (SEM), rispetto a quelle derivanti dalle reazioni di MLR: RFU di $2,500 \pm 442$ (SEM). Le cellule prelevate dalle colture di MLR con l'aggiunta di CsA mostrano un valore RFU di $1,500 \pm 109$ (SEM). L'analisi statistica ANOVA di questi dati ha dato un valore di $p = 0,05$.

L'incubazione di leucociti provenienti da colture di MLR con l'anticorpo DLlg3, specifico per le cellule B, non ha prodotto alcun risultato significativo ciò a testimonianza del fatto che le cellule B non sono coinvolte massivamente nelle reazioni di MLR (dato non indicato). La Figura 3 mostra un tipico profilo citofluorimetrico ottenuto negli esperimenti. Nella Figura 3a si nota la tipica morfologia dei PBL in cui le varie popolazioni leucocitarie si separano in base alla grandezza ed alla rugosità di superficie (Fig. 3a), non è stata selezionata alcuna regione nella fase di analisi e il valore della fluorescenza di fondo (background) è stato ottenuto incubando le cellule dell'MLR con sovratanante di coltura. Il valore ottenuto (3.2%) è stato sottratto ai valori ottenuti dalle cellule incubate con gli anticorpi DLT15 e DLlg3 in modo da ottenere il valore netto relativo alla fluorescenza dell'anticorpo (Fig.3b); nella figura 3d si nota bene un picco di fluorescenza, di cellule positive al DLT15, provenienti da campioni di MLR il cui il valore è di 14.6%; mentre nella figura 3c è riportato il profilo citofluorimetrico di linfociti T provenienti da campioni di MLR con l'aggiunta di CsA, in tali campioni la percentuale di cellule positive al DLT15 è di 7.4%.

5.2 RT-PCR

Con questa tecnica siamo andati a verificare la differenza nell'espressione dei geni per il TcR β (recettore dei linfociti T) e per le Ig (immunoglobuline) nei campioni di controllo e di MLR. Nella Figura 4 è mostrato il pattern elettroforetico relativo alla RT-PCR di colture leucocitarie. Nei campioni di controllo, PBL non stimolati, si nota chiaramente la banda a 224bp relativa all'espressione del gene per le immunoglobuline nei linfociti B e la banda a 503bp relativa all'espressione del TcR β nei linfociti T (Fig.4a) amplificati con una PCR a 30 cicli. Conducendo la reazione di amplificazione con gli stessi campioni di controllo a solo 17 cicli, si vede solamente l'espressione del gene delle Ig nelle cellule B mentre quello per il TcR β nelle cellule T non viene evidenziato in elettroforesi (Fig. 4b). Questo indica che gli animali non stimolati hanno i geni delle Ig espressi in maggior misura rispetto a quelli per il

recettore delle cellule T. Nei campioni coinvolti nella reazione di MLR invece, si può notare una notevole espressione del gene per il TcR β dei linfociti T evidenziato dalla comparsa della relativa banda a 503bp nel gel elettroforetico mentre non si osserva la banda relativa alle Ig. Questo dato conferma i risultati ottenuti con l'immunofluorescenza e convalida l'ipotesi di eventi proliferativi a carico dei linfociti T. In tutti i campioni è mostrata l'espressione del gene per la β -actina per confermare che tutte le reazioni di RT-PCR sono state effettuate previa la verifica della presenza degli mRNA totali nelle miscele di reazione e che tali mRNA fossero integri ossia capaci di codificare per i geni. E' stato scelto il gene per la β -actina perché da lavori precedenti si è capito che tale gene è espresso costitutivamente in tutte le cellule di spigola e quindi rappresenta un buon elemento per verificare la presenza di RNA codificanti in un estratto cellulare (Buonocore et al. 2003).

5.3 PROLIFERAZIONE CELLULARE E SAGGIO DELLA CITOTOSSICITÀ

Sono stati esaminati un totale di 10 animali e, dopo separazione tramite percoll delle popolazioni leucocitarie dal plasma e dagli eritrociti, è stato determinato il numero delle cellule vitali mediante conteggio manuale con il colorante vitale Tripán Blue. Il numero delle cellule vitali è stato espresso come valore medio $\pm$ deviazione standard, il numero iniziale delle cellule vitali è risultato essere 1.2×10^7 cell/ml. I risultati indicano che dopo 2 settimane di reazione il numero delle cellule vitali era il $70 \pm 10\%$ delle cellule iniziali, come riportato nella Figura 5a. Contrariamente, saggiando gli stessi leucociti di MLR i livelli intracellulari di ATP rispetto ai controlli, hanno dato un valore di $110 \pm 7\%$ (Fig. 5a).

In figura 5b è mostrata l'attività citotossica dei leucociti contro un bersaglio xenogenico rappresentato dalla linea cellulare di orata SAF-1 ed i livelli di tale citotossicità sono stati espressi come rapporto fra i campioni di MLR ed i rispettivi campioni di controllo. L'aumento del numero delle cellule effettrici ha fatto diminuire sensibilmente la vitalità delle cellule bersaglio e l'analisi statistica ANOVA conferma che la differenza tra le diluizioni 1:20, 1:5 ed 1:1 (rapporto tra il numero di cellule effettrici sulle cellule bersaglio E/T) era statisticamente significativa dando un valore di $p < 0.05$.

L'attività citotossica è stata saggiata anche in leucociti estratti da sangue periferico (PBL) e rene cefalico (HK) e branchie (GILLS) di animali sottoposti a vaccinazione con nodavirus (VERV).e sono riportati in fig.12. I leucociti sono stati incubati con VERV inattivato in formalina. Nei PBL derivanti da animali dopo 43 giorni dalla vaccinazione con

VERV si osserva un aumento dei livelli di ATP intracellulare di circa 4 volte rispetto ai leucociti estratti da HK, come anche nel giorno 43+30, sebbene in quest'ultimo campionamento i valori intracellulari di ATP erano molto inferiori che nella precedente. I livelli di ATP in leucociti estratti da HK hanno mostrato una tendenza all'aumento in pesci a 43 giorni da vaccinazione con VERV e tale tendenza è maggiore a 43+30. Nei leucociti estratti dalle branchie (GILLS) si osserva un aumento di livelli di ATP in pesci vaccinati al giorno 43 ed un aumento meno marcato al giorno 43+30. Gli asterischi indicano, nei pesci vaccinati, i valori medi relativi alla luminescenza (RLU) che risultano essere statisticamente significativi (ANOVA, $P < 0,05$).

5.4 CONTENUTO LINFOCITARIO IN ANIMALI VACCINATI CON VERV

Leucociti estratti da PBL, HK, GILLS, SPLEEN e GUT sono stati impiegati per valutare la percentuale di cellule T e B mediante immunofluorescenza ed analisi citofluorimetrica utilizzando anticorpi monoclonali DLT15 e DLIG3 ed i risultati sono mostrati nella tabella 3. Nei PBL estratti da pesci vaccinati si osserva un aumento di linfociti T di circa 3,5% e ciò è riscontrabile nei dati di tutti e tre i campionamenti. Con l'esclusione di qualche variazione sporadica (HK a 43+60gg e GUT a 43gg), negli HK e nei GUT non si riscontrano alcun aumento statisticamente significativo nel contenuto di linfociti T tra controllo e leucociti di animali vaccinati. La vaccinazione ha indotto nei PBL un forte incremento anche nel numero delle cellule B al giorno 43 (circa 7%) ed un aumento minore al giorno 43+30 (4,5%). In tutti gli altri tessuti non si riscontrano alcuna variazione statisticamente significativa nel contenuto di cellule B tra animali di controllo e vaccinati.

5.5 ELISA

Sieri di animali di controllo e vaccinati sono stati esaminati in ELISA ed i risultati ottenuti sono mostrati in figura 13 con diluizioni di sieri a 1:200 (Fig.13a) e 1:3200 (Fig.13b).

È evidente in tutti i campionamenti la presenza di livelli misurabili di immunoglobuline sieriche specifiche per VERV e ciò è molto più evidente nella diluizione di 1:3200. Il trattamento di "boosting" al giorno 43 ha leggermente incrementato la quantità di anticorpi specifici, come si può osservare infatti, dal giorno 43+10 in poi e, l'aumento costante fino all'ultimo campionamento relativo al giorno 43+60. L'analisi statistica dei dati mostra una significatività di $P < 0,05$ (ANOVA) per tutti i punti di diluizione di 1:3200.

5.6 PCR QUANTITATIVA

Mediante PCR convenzionale è stata saggiata la presenza di RNA di VERv sia in animali non trattati (PBS) che in quelli vaccinati (VERv) e ciò ha mostrato la presenza di sequenze di proteine del capsido virale solo in esemplari sottoposti a vaccinazione (dati non mostrati). Il cDNA estratto da cellule di HK è stato sottoposto a PCR quantitativa su geni selezionati per analizzare la loro trascrizione utilizzando la metodica sopra descritta ed i risultati sono mostrati in Fig.14a e 14b. I geni “House-keeping” utilizzati per determinare il “fold change” era l’RNA ribosomiale 18S ed è stato assegnato il valore di 1,0 come livello basale di espressione di ogni gene analizzato nei pesci di controllo (trattati con PBS). La sequenza di DNA dei primers usati per PCR arrays è mostrata nella tabella 4.

Le proteine antivirali IFN ed MX (Fig. 14a) mostrano delle cinetiche temporali simili con un forte aumento a 6h dall’infezione, seguito da una diminuzione con un nuovo significativo aumento dopo “boosting”. Si è riscontrato un modesto aumento dei livelli di espressione della citochina TGF- β a (2 volte l’unità) ed uno più marcato a 10 dopo il boosting (6 volte l’unità). (Fig.14a). La citochina anti-infiammatoria IL-10 ha mostrato un aumento di espressione di 3 volte dopo infezione ed uno ancora più alto a 1 giorno e 10 giorni dopo boosting di 10 e 20 volte. Fig.14a. Le citochine pro-infiammatorie COX-2 e IL-1 Fig14a mostravano diverse cinetiche di espressione, aumentando costantemente a partire da 1 giorno dopo l’infezione (3 volte l’unità) fino a 1 giorno dopo il boosting (22 volte l’unità) per poi mostrare una diminuzione. Per contro IL-1 mostrava un aumento di 9 volte a 3 giorni dall’infezione e di 6 volte dopo boosting, con minori livelli di espressione negli altri momenti di campionamento. La catena leggera dei geni delle IgM mostra una forte espressione di circa 100 volte subito dopo infezione (Fig.14b) rimanendo stabilmente elevata sino al giorno 30 dopo vaccinazione. Dopo un giorno dal boosting si è rilevato un ulteriore aumento nella trascrizione del gene delle IgM (125 volte) mentre in seguito l’espressione diminuiva con il tempo.

I geni correlati alle cellule T: TCR β , CD4 e CD8 α non hanno mostrato alcun aumento significativo nei livelli di espressione (max 2 volte) durante tutto il periodo di campionamento sia dopo infezione che dopo boosting (Fig.14b)

VI. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'MLR rappresenta una reazione “in vitro” di fondamentale importanza per lo studio e la conoscenza dell'immunità acquisita dei vertebrati tanto è vero che è stata ampiamente studiata da molti gruppi di ricerca in varie specie di vertebrati mandibolati. Studi effettuati in tale ambito si riscontrano nei teleostei (Etlinger et al., 1977; Caspi and Avtalion, 1984; Miller et al., 1986; Kaastrup et al., 1988; Somamoto et al., 2004), negli anfibi (Barlow and Cohen, 1981), nei rettili (El Deeb and Saad, 1987), negli uccelli (Lehtonen et al., 1989) e nei mammiferi (Thibault et al., 1973). L'MLR è l'unica reazione che attiva una risposta antigene-specifica dei linfociti T “in vitro” che può essere facilmente ottenuta senza la necessità di una preventiva immunizzazione “in vivo” degli animali utilizzati per gli esperimenti (Abbas, 1991). Esperimenti condotti sui mammiferi hanno evidenziato che i linfociti T vergini possono essere attivati ed indotti a proliferare da una varietà di antigeni quali sostanze farmacologiche, citochine ed anticorpi diretti contro molecole induttori di proliferazione quali CD3 e TcR.

Questi induttori di proliferazione, descritti nei mammiferi, non sono ancora disponibili nei teleostei. Nella spigola, negli ultimi anni, sono stati prodotti gli indicatori cellulari specifici per i linfociti (Scapigliati et al., 1995; 1996), questo permette di monitorare direttamente l'andamento delle popolazioni dei linfociti T e dei linfociti B durante le reazioni “in vitro” che coinvolgono il sistema immunitario di questa specie. Uno di questi marcatori specifici è rappresentato dall'anticorpo monoclonale DLT15 che è stato ampiamente utilizzato per la caratterizzazione dei linfociti T della spigola in individui adulti (Romano et al., 1997; Scapigliati et al., 2000), e durante lo sviluppo larvale (Abelli et al., 1996; 1997; Picchietti et al., 1997). L'antigene riconosciuto dal DLT15 è composto da una glicoproteina di 40kDa che non corrisponde al TcR $\alpha\beta$ (dato non pubblicato) e considerato il suo spettro di immunoreattività, evidenziato in studi precedenti, potrebbe essere considerato come un CD3-simile o come anti- pan T-cells. Per la spigola non sono attualmente disponibili né linee clonali di pesci, né linee clonali di cellule leucocitarie come nel caso del pesce gatto in cui sono disponibili vari cloni cellulari (Miller et al., 1994a; 1994b); questo fatto ha determinato l'obbligo di dover utilizzare pesci geneticamente selvatici derivanti da un parco riproduttori di circa 150 esemplari. Per questi motivi, come del resto avevamo previsto, abbiamo riscontrato un alto grado di variabilità genetica nelle risposte cellulari “in vitro”. Questa elevata variabilità ci ha indotti ad ottimizzare delle definite condizioni sperimentali per le

culture dei leucociti, in modo tale che ogni esperimento fosse ripetibile; abbiamo inoltre esaminato un numero sufficientemente elevato di campioni (un totale di 25 individui di 15 hanno risposto) per raggiungere la significatività statistica dei dati ottenuti.

Nelle nostre condizioni sperimentali, abbiamo osservato che le reazioni allogeniche di PBL “*in vitro*” richiedevano 2 settimane affinché si ottenesse il picco medio di aumento del numero dei linfociti T, conseguentemente abbiamo scelto questo tempo per lo studio delle reazioni di MLR che sono state monitorate al tempo zero, a 2 settimane ed a 4 settimane mediante immunofluorescenza. I dati ottenuti con l’IIF hanno confermato questo andamento temporale, infatti se si osservano le figure 1 e 3, si comprende che c’è un marcato aumento della percentuale dei linfociti T a 2 settimane, mentre a 4 settimane i valori restano pressoché costanti. E’ importante ricordare che precedenti lavori hanno dimostrato un coinvolgimento “*in vivo*” delle cellule T in reazioni allogeniche nella spigola dopo 2 settimane (Abelli et al., 1999), ciò conferma che il tempo di 2 settimane è necessario per ottenere un’ adeguata risposta cellulare. Nell’uomo si è osservato che le reazioni di MLR “*in vitro*” hanno una durata di 7-10 giorni (Abbas, 1991). È stabilito da tempo che le reazioni di MLR coinvolgono la proliferazione dei linfociti T (Abbas, 1991), mentre non stimolano la proliferazione di linfociti B, che diminuiscono di numero nel tempo della reazione di MLR insieme al numero di cellule totali. Questa osservazione è in accordo con i dati ottenuti da lavori precedenti nel pesce gatto (Miller et al., 1986) in cui, in reazioni di MLR unidirezionali, si è osservata una proliferazione selettiva dei leucociti negativi per le Ig di superficie. Inoltre i nostri dati “*in vitro*” sono perfettamente in accordo con i risultati ottenuti “*in vivo*” nella spigola (Abelli et al., 1999), dove si è osservato che i linfociti B partecipano in un numero ed in una misura molto bassa nelle reazioni di rigetto in trapianti allogenici “*in vivo*”.

Per essere maggiormente certi che le cellule in proliferazione, osservate nelle reazioni di MLR, fossero linfociti T, abbiamo pianificato ed utilizzato esperimenti di RT-PCR usando cDNA ottenuto dall’RNA di PBL di controllo e di PBL coinvolti nelle reazioni di MLR. In tali esperimenti sono stati usati primers per marcatori inequivocabili per i linfociti T e B che sono i geni delle Ig e del TcR (Scapigliati et al., 2000; dos Santos et al., 2001). Una volta ottenuti i dati delle PCR è stato facile fare il confronto tra l’espressione del TcR e delle Ig nei campioni di controllo e di MLR ed abbiamo verificato che, mentre l’espressione del gene per le Ig rimaneva inalterata tra i campioni di controllo e di MLR, il gene per il TcR veniva espresso in misura molto maggiore nei campioni di MLR. Tanto è vero che, osservando i gel

elettroforetici ottenuti dopo PCR a 17 cicli, nei campioni di MLR è ben visibile la banda corrispondente al TcR mentre non è possibile vedere la banda corrispondente alle Ig, la situazione è diversa nei campioni di controllo in cui si può vedere la banda corrispondente alle Ig mentre non è rilevabile quella per il TcR (Figura 4).

Per motivi sconosciuti si è osservato che il numero di pesci, che non hanno risposto nelle reazioni di MLR, è di circa il 30% e possibili spiegazioni sperimentali a questo fenomeno potrebbero essere: 1) questi pesci potrebbero avere avuto una recente e spontanea attività dei linfociti T “in vivo”, dovuta probabilmente a circostanze patogene non così evidenti da poter essere rilevate al momento del prelievo, che potrebbe aver silenziato la loro risposta “in vitro”; 2) lo stress indotto a questi pesci durante le operazioni di prelievo potrebbe aver provocato un’ immunodepressione indotta, questo fenomeno è stato infatti dimostrato in lavori recenti (Wendelaar Bonga, 1997; Esteban et al., 2004); 3) infine, le condizioni ricreate “in vitro” negli esperimenti non erano sufficienti a scatenare, in tutti i campioni analizzati, la proliferazione e l’attività dei linfociti T. Per avere un quadro completo dell’andamento degli esperimenti i dati ottenuti in immunofluorescenza sono stato raggruppati in una tabella (Tabella 1 e 2) in cui è possibile apprezzare anche il tasso di variabilità sperimentale che abbiamo riscontrato nei vari esemplari.

Altri dati molto interessanti sono quelli che abbiamo ottenuto con l’utilizzo di Ciclosporina A. Studi effettuati in precedenza hanno dimostrato che Ciclosporina A inibisce in maniera specifica le cellule T nei mammiferi ed in particolare si è visto che la sua azione è quella di impedire l’attivazione dei fattori trascrizionali chiamati fattori nucleari di attivazione dei linfociti T (NFAT) che determinano l’espressione dei geni per le citochine, questi risultati sono stati ottenuti mediante studi sul pesce gatto (Park et al., 2002). In questo lavoro i PBL e le cellule T antigene specifiche di pesce gatto sono state trattate con CsA la quale ha inibito “in vitro” la proliferazione di PBL stimolati da lectine e da allo-antigeni specifici per le cellule T. Partendo da queste basi, abbiamo voluto verificare tali ipotesi anche nella spigola e per far ciò abbiamo pianificato degli esperimenti di MLR a cui è stata aggiunta CsA. I risultati raggiunti con questa metodica sono pienamente in accordo con quelli ottenuti nel pesce gatto dimostrando che i suddetti meccanismi cellulari sono comuni ad entrambe le specie. In effetti la ciclosporina A ha inibito la proliferazione dei linfociti T e, come si può osservare in figura 2, ha mantenuto il numero dei linfociti T a valori paragonabili a quelli dei campioni di controllo. I risultati ottenuti nel nostro e nel precedente lavoro sul pesce gatto, suggeriscono

che le citochine sono direttamente coinvolte nella proliferazione dei linfociti T. Si può ipotizzare che siano coinvolte in particolar modo l'interleuchina 2 e l'interleuchina 4 (IL-2, IL-4) e la loro azione potrebbe consistere nel partecipare attivamente all'attivazione dei linfociti T dei teleostei, come del resto è stato suggerito da altri lavori (Caspi et Avtalion, 1984), e che i processi di attivazione mediati da linfocine siano altamente conservati nei vertebrati.

Nella figura 3 è mostrato l'aspetto di alcuni citogrammi selezionati dai vari esperimenti per far osservare l'andamento delle IIF e per far notare il tipico aspetto delle cellule di PBL di spigola durante una lettura citofluorimetrica. In particolare nella figura 3a è possibile vedere la morfologia delle cellule leucocitarie di PBL, in questo citogramma sono chiaramente distinguibili tre popolazioni differenti che corrispondono a cellule mieloidi, che si riscontrano nella parte destra del citogramma, a linfociti, che si dispongono in basso, e ad eritrociti che si posizionano nella parte sinistra. Questo modello scelto dai vari campioni testati è tipico dei PBL di teleostei e può essere facilmente comparato con citogrammi ottenuti in lavori precedenti al nostro (Stafford et al., 2001). Gli istogrammi dell'immunofluorescenza mostrano i profili della positività all'anticorpo DLT15 ed in particolare la figura 3b si riferisce alla positività a questo anticorpo nei campioni di controllo, mentre la figura 3d si riferisce alla positività riscontrata nei campioni coinvolti nelle reazioni di MLR. In quest'ultima figura si osserva un picco massimo di fluorescenza al DLT15 e questa ha lo scopo di offrire un dato visivo ed una conferma ai risultati numerici ottenuti dall'analisi di tali profili citofluorimetrici. Nella figura 3c è possibile osservare gli effetti indotti dalla Ciclosporina A, infatti, si può osservare come il picco di positività osservabili, visto nei campioni di MLR, quasi scompaia portando i valori della fluorescenza vicino a quelli dei campioni di controllo. Questo andamento avvalora l'ipotesi che tale sostanza abbia effetti inibitori sull'attivazione e sulla proliferazione dei linfociti T.

Per studiare ulteriormente i complessi meccanismi di riconoscimento che nei nostri esperimenti hanno indotto un'attivazione ed una proliferazione cellulare dei leucociti, abbiamo analizzato un parametro riscontrato associato a fenomeni di attivazione, cioè la mobilitazione intracellulare di Ca^{2+} recettore-mediata (Radman et al., 2002). Questa metodica è stata già utilizzata con successo in altre specie di teleostei (pesce gatto) dove si è studiato il ruolo funzionale di molecole presenti sulla superficie cellulare di cellule citotossiche non specifiche stimulate da anticorpi monoclonali specifici (Evans et al., 1992).

La stimolazione della via del Ca^{2+} mediata da anticorpi è stata già descritta in lavori sui mammiferi (Tsoukas et al., 1985) e nel pesce gatto (Van Ginkel et al., 1994). Nel nostro caso le colture leucocitarie sono state stimulate con gli anticorpi DLT15 e DLlg3, che hanno come antigene molecole di membrana presenti nei linfociti T e B, in modo da indurre la cascata di segnale intracellulare mediata dal Ca^{2+} , misurata rilevando l'aumento transitorio della concentrazione intracellulare di tale ione. La concentrazione è stata determinata mediante la rilevazione della fluorescenza generata dal legame del Ca^{2+} con il reagente Fura-2. Questa tecnica è stata sperimentata in altri lavori su leucociti (Evans et al., 1992), e su cellule di teleosteo (Guibbolini et al., 2000). I risultati ottenuti sono riportati nella figura 2a ed hanno fornito interessanti dati. Le cellule provenienti dalle colture di MLR presentano cellule sensibili DLT15 in numero maggiore rispetto alle cellule dei controlli, ciò implica che nelle reazioni di MLR sono ci siano stati degli eventi proliferativi a carico dei linfociti T, inoltre il fatto che in tali cellule, una volta stimulate dall'anticorpo DLT15, si riscontra un aumento dei livelli di Ca^{2+} suggerisce che queste cellule si trovino nella forma attivata. È interessante notare che anche in questi esperimenti sono stati riscontrati gli effetti inibitori della CsA a carico dei linfociti T. Infatti abbiamo misurato i livelli di Ca^{2+} anche nelle colture di MLR a cui era stata aggiunta CsA e abbiamo osservato che l'attivazione mediata dal DLT15 determinava l'ottenimento di valori paragonabili a quelli ottenuti nei campioni di controllo. Questo suggerisce fortemente che la ciclosporina A eserciti i propri effetti inibitori sui linfociti T in proliferazione durante la reazione di MLR.

I meccanismi di allo-riconoscimento "in vitro" nei mammiferi sono noti da tempo e si è scoperto che essi provocano l'attivazione ed il reclutamento dei linfociti T citotossici (Enkart, 1985) e la presenza di tali linfociti (CTL) è stata osservata anche nei teleostei (Zhou et al., 2001). Era quindi per noi interessante verificare se nelle reazioni di MLR nella spigola fossero coinvolti i linfociti T citotossici. Per far ciò abbiamo effettuato, sia nei campioni di controllo, sia in quelli di MLR, dei test di citotossicità che sono stati attuati mediante l'aggiunta di PBL ad un target xenogenico rappresentato da cellule di orata (SAF-1). I risultati sono stati visualizzati in figura 5 e suggeriscono che i PBL siano capaci di una attività citotossica spontanea contro le cellule bersaglio. Questa attività è risultata fortemente aumentata in maniera dose-dipendente e nei leucociti coinvolti nelle MLR e ciò suggerisce che tra i linfociti T coinvolti in tale reazione ci possa essere una componente di linfociti T citotossici.

Le reazioni di leucociti mescolati (MLR) sono il risultato di complesse interazioni molecolari e cellulari fondamentali nei processi di riconoscimento del non-self, per cui la conoscenza di questi meccanismi è di grossa importanza perché essi intervengono in un elevatissimo numero di reazioni del sistema immunitario. Per capirne l'importanza basta pensare alle reazioni di rigetto che si manifestano in trapianti allogenici, quindi è evidente che una profonda conoscenza di questi processi potrebbe dare un forte contributo alle terapie post-trapianto. Il nostro lavoro si colloca quindi in un campo di grosso interesse sia per quanto riguarda la conoscenza della biologia della specie in esame, ossia della spigola, sia per possibili applicazioni su altre specie ad esempio sui mammiferi in quanto, come abbiamo già osservato, la spigola presenta nel suo sistema immunitario delle notevoli analogie con quello dei mammiferi per cui è un buon banco di prova per lo studio di base. Questo lavoro ha proprio lo scopo di fornire un contributo iniziale alla comprensione di questi complessi processi molecolari e cellulari di base. Presi nel loro complesso i nostri risultati mostrano che durante delle reazioni di riconoscimento allogenico in cui sono coinvolti leucociti di spigola vergini, si ha una proliferazione di linfociti T che possono essere attivati mediante anticorpi specifici anti-linfociti T (nel particolar caso è stato usato il DLT15). Si osserva inoltre che in tali linfociti è presente la sottopopolazione dei linfociti T citotossici (CTL).

Questo lavoro rappresenta una base per altri studi che abbiamo intenzione di effettuare in futuro che vertono su importanti aspetti delle reazioni leucocitarie "in vitro" quali gli effetti dello svuotamento delle APC prima delle reazioni di MLR, l'osservazione delle risposte ottenibili da cellule T purificate, effettuare MLR utilizzando leucociti purificati da altri organi, la determinazione dell'isotipo dei linfociti T utilizzando marcatori per il CD-8 e gli effetti delle citochine contenute nei terreni condizionati. Per quest'ultima applicazione abbiamo intenzione di allestire colture leucocitarie da PBL alle quali aggiungere, a diverse concentrazioni, terreno condizionato ottenuto dalle colture coinvolte in reazioni di MLR; ciò che ci si attende da tali esperimenti è che nei terreni derivanti dalle MLR siano presenti le citochine prodotte durante la risposta allogenica e che tali citochine fungano da stimolo proliferativo per i linfociti T vergini messi in coltura.

- La parte sperimentale riferita alla risposta a vaccinazione contro nodavirus (VERv) è di cruciale importanza in quanto la spigola è molto sensibile alle encefalopatie e retinopatie indotte dallo stesso e si ritiene che la maggior parte degli individui adulti di allevamenti ittici abbiano avuto un contatto con tale virus e siano sopravvissute. In

merito a ciò, le risposte cellulari e molecolari legate al sistema immunitario contro VERv sono pressoché sconosciute, con un conseguente ostacolo nella produzione di un potenziale vaccino candidato a combattere tali patologie. Inoltre, le reazioni immunitarie antivirali richiedono un abbondante coinvolgimento di linfociti T e rappresentano quindi un ottimo modello per studi di immunologia cellulo-mediata. Con questa premessa lo scopo di questa parte del lavoro rende possibile la creazione di un modello “*in vivo*” per studiare la funzionalità del sistema immunitario di tali teleostei. Per portare a termine questo lavoro è stato iniettato stadi giovanili di spigole con un numero di particelle virali precedentemente testato affinché venisse indotta una bassa mortalità (dati non mostrati), e, come supposto, l’infezione ha determinato una mortalità globale del 8%. La prima parte dello studio è servita a verificare se l’infezione da VERv intaccasse l’assetto leucocitario negli organi e tessuti. Ciò è stato fatto mediante IIF ed analisi citofluorimetrica usando anticorpi specifici anti linfociti T e B di spigole dopo infezione e boosting. I risultati hanno dimostrato che tra i tessuti esaminati, i leucociti di sangue periferico mostravano un significativo aumento delle cellule T ad ogni campionamento ed un significativo aumento delle cellule B a 43 giorni dall’infezione e a 30 giorni dal boosting (Tab.3). A nostra conoscenza questa è la prima descrizione di una modulazione del numero di linfociti in una specie di pesci indotta da un’infezione virale. In seguito per accertare se l’infezione ha indotto una risposta immunitaria quantificabile, i leucociti di pesci di controllo ed infettati sono stati estratti e stimolati “*in vitro*” con VERv inattivato mediante calore a 43 e 43+30 giorni dopo infezione e boosting. Precedentemente è stato dimostrato nei mammiferi e nei pesci che i livelli di ATP intracellulare in cellule in coltura possono essere indirettamente correlate alla proliferazione cellulare, ed abbiamo utilizzato tale metodica analitica per valutare la stimolazione VERv dipendente “*In vitro*”. I risultati di questi esperimenti sono riassunti in Fig. 12 ed hanno dimostrato che i PBL di pesci infettati rispetto ai controlli, erano capaci di rispondere dopo 48h di coltura con nodavirus aumentando significativamente i livelli di ATP intracellulare. I leucociti di HK hanno mostrato un minor livello di proliferazione pur evidenziando con un incremento statisticamente significativo a 43 giorni dopo boosting. Interessante è che i leucociti estratti da branchie in pesci trattati con VERv hanno mostrato il più alto incremento di ATP intracellulare rispetto ai leucociti estratti da altri tessuti (circa 10

volte). Presi insieme i dati di immunologia cellulare dimostrano che i leucociti di sangue sono sensibili ad infezione con VERv “*in vivo*” sia nel numero di linfociti che in un aumento di ATP intracellulare indotto da VERv “*in vitro*”. Conseguentemente i leucociti di sangue periferico debbono essere considerato come un importante fonte di cellule per ulteriori studi delle risposte immunitarie cellulo-mediate indotte da virus. In aggiunta, per la prima, volta è stato possibile misurare “*in vitro*” la risposta leucocitaria contro antigeni virali dopo 73 giorni dalla stimolazione “*in vivo*”, suggerendo che l’infezione potrebbe indurre la presenza di leucociti “di memoria” o “attivati” . l’infezione con VERv ha indotto una risposta anticorpale bassa ma specifica come mostrato in Fig.13. I dati di ELISA, ottenuti dal saggio di un elevato numero di sieri, sono stati presentati ad un bassa diluizione (1:200) ed una più alta (1:3200). I risultati mostrano la presenza basale di anticorpi sierici aspecifici IgM ad ogni diluizione (valori di assorbanza da 0,08 a 0,2) con un aumento statisticamente significativo nelle IgM anti-VERv che è stato chiaramente osservato soltanto nei sieri di pesci infetti. Quindi si può suggerire che un esposizione a nodavirus senza una preventiva immunizzazione può indurre la presenza di anticorpi sierici specifici. L’immunogenicità di VERv nella spigola è stata precedentemente studiata con l’aiuto di peptidi derivanti dalle proteine del capsido di VERv, ed i risultati di questo lavoro hanno dimostrato che 3 regioni delle proteine del capsido comprendente i residui amminoacidici 1-32 91-162 e 181-212 erano fortemente immunoreattivi con il siero di spigola. Questi dati ed i nostri confermano l’induzione di anticorpi specifici contro VERv e di derivati antigenici, suggerendo il loro possibile utilizzo di una proteina del capsido come immunogeno nella spigola.

Gli effetti dell’infezione con VERv sono stati anche controllati monitorando l’espressione genica di importanti geni correlati al sistema immunitario e ciò è stato effettuato mediante qPCR con cDNA ricavato da cellule di HK di pesci vaccinati e non. A causa del numero di campioni da analizzare durante la sperimentazione la qPCR è stata condotta utilizzando un sistema PCR-array sviluppato dal nostro gruppo di ricerca, adattato alla spigola a partire da un sistema array già disponibile per qPCR umana. Con questo sistema, per la prima volta in una specie di pesce, è stata possibile l’amplificazione simultanea di 96 campioni per ogni corsa di qPCR. Come previsto i risultati dalla qPCR mostravano una forte amplificazione nell’espressione delle proteine anti-virali IFN e Mx, come riportato per altre

specie di pesci. La “Up-regulation” dei trascritti per IFN e Mx hanno confermato l’efficacia del protocollo dell’infezione virale “*in vivo*” che effettivamente induceva una risposta immunitaria innata antivirale.

La citochina IL-10, nota nei mammiferi per essere coinvolta nella soppressione o disattivazione di alcune risposte immunitarie, ha subito un aumento di espressione nella fase avanzata della stimolazione virale, cioè dopo boosting. Questo risultato potrebbe essere conforme ad una attività regolatoria della citochina durante l’infezione retro virale, come riportato nei mammiferi. In un lavoro recente, nella trota, gli esemplari che sopravvissero ad una infezione “*in vivo*” data da un patogeno batterico mostrarono un forte aumento della trascrizione di IL-10, confermando così il coinvolgimento di questa molecola nell’attività di difesa anti-microbica del pesce.

TGFβ è una citochina coinvolta nella risposta innata nel pesce; l’espressione di questa molecola è risultata leggermente indotta nella spigola dopo infezione da VERv, aumentando precisamente dopo boosting. Lavori precedenti hanno riportato la modulazione del TGFβ nella milza e nel fegato della trota dopo infezione da VHSV, e dopo vaccinazione a DNA dello stesso suggerendo il coinvolgimento anche qui della citochina durante un infezione virale. Le citochine pro-infiammatorie COX-2 ed IL-1 mostrano un differente profilo modulatorio contro l’infezione da VERv, infatti l’espressione di COX-2 aumenta costantemente fino a raggiungere un massimo dopo il boosting, IL-1 viceversa mostra un aumento a 3 giorni dopo il boosting. Questi dati, i primi sul coinvolgimento di molecole pro-infiammatorie in reazioni di infezioni virali in un modello piscino “*in vivo*”, suggeriscono una complessa rete di risposte infiammatorie. In maniera interessante la codifica dei geni per la catena leggere delle IgM di spigola, mostrano una marcata “Up-regulation” della sua espressione subito dopo infezione, seguita da un insignificante declino ed una nuova espressione dopo boosting, suggerendo così l’importanza della modulazione di IgM durante infezioni virali. Sfortunatamente i campionamenti di sieri per ELISA sono iniziati al giorno 43 per cui non è stato possibile elaborare dati di livelli di IgM sierici per confrontare quanto ottenuto in qPCR.

La codifica dei geni di molecole specifiche per i linfociti T, ossia il TCRβ ed i co-recettori CD4 e CD8 non hanno dimostrato significative variazioni trascrizionali durante tutto il protocollo di campionamento. Tuttavia è da sottolineare che le cellule T mostrano un aumento nel numero in PBL di pesci infettati. Ciò può essere spiegato dai diversi tessuti

analizzati e dai tempi di campionamento tra i vari esperimenti essendo infatti prematuro il tempo per saggiare l'espressione genica e tardivo per la conta linfocitaria come mostrato in Tab.3 e Fig.14. Per la sua importanza, sono necessari ulteriori lavori per arrivare a conoscere a fondo il ruolo della risposta innata ed infiammatoria del sistema immunitario nella spigola e, data la recente disponibilità di un ampio pannello di geni correlati al sistema immunitario, unita alla messa appunto della PCR-array questi studi saranno possibili. Concludendo i nostri risultati presentano per la prima volta una visione ampia sulle risposte immunitarie sia innate che acquisite nonché sulle risposte antivirali; in aggiunta in tale lavoro proponiamo un adattamento della qPCR-array con la quale è possibile studiare in blocco i livelli di espressione genica in gruppi di geni in un ampio numero di campioni.

VIII. FIGURE

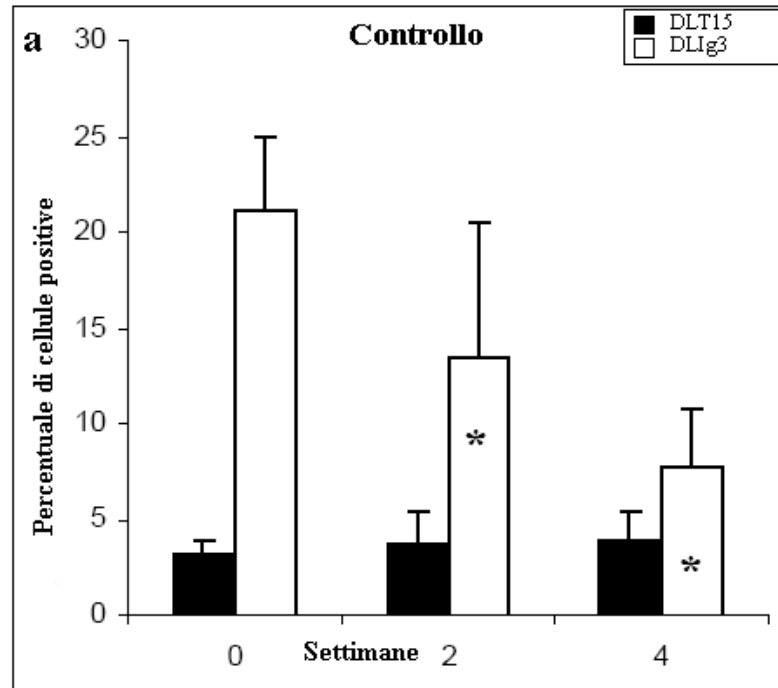


Figura 1a

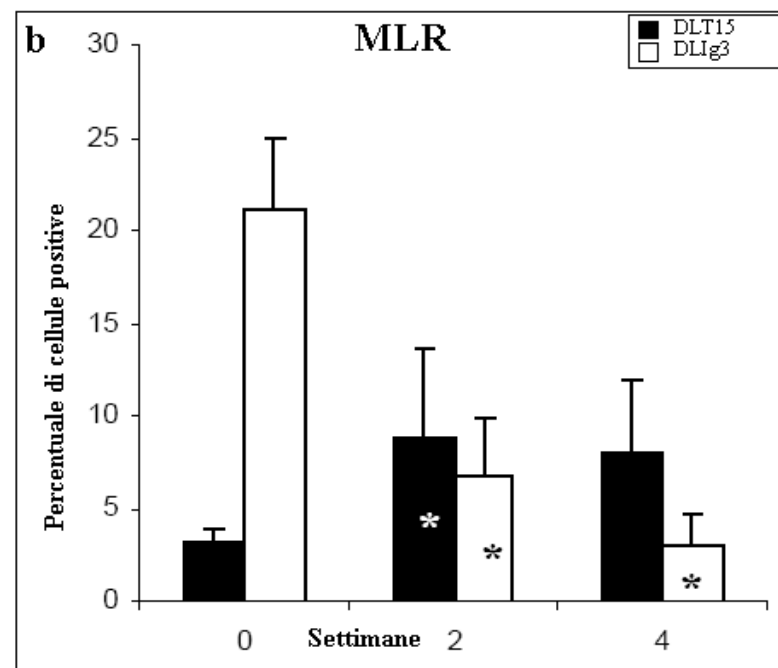


Figura 1b

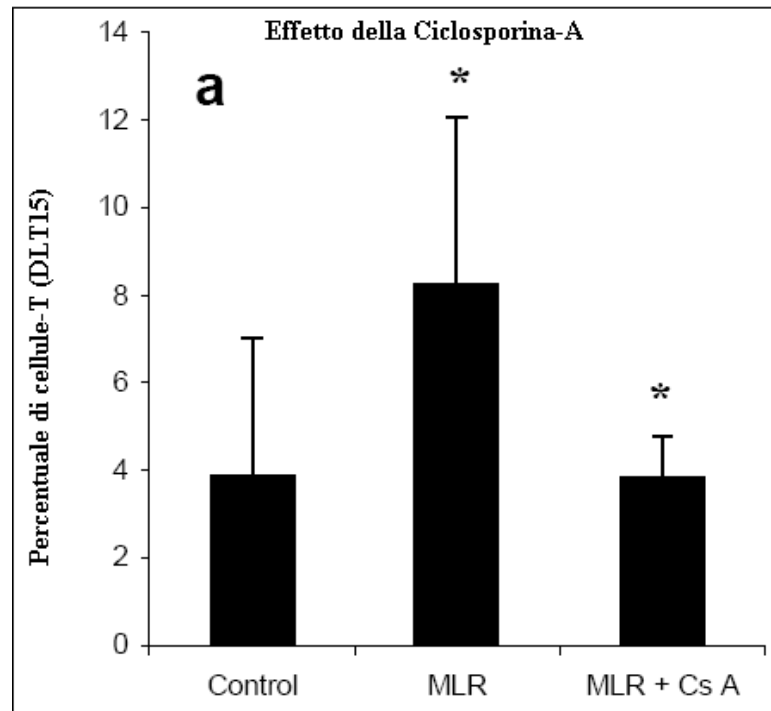


Figura 2 a

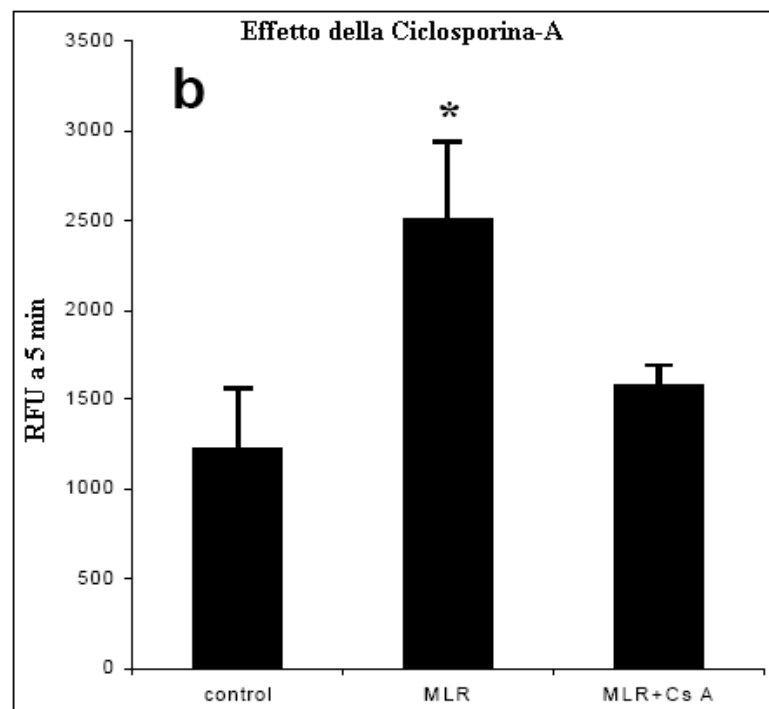


Figura 2b

Analisi Citofluorimetrica

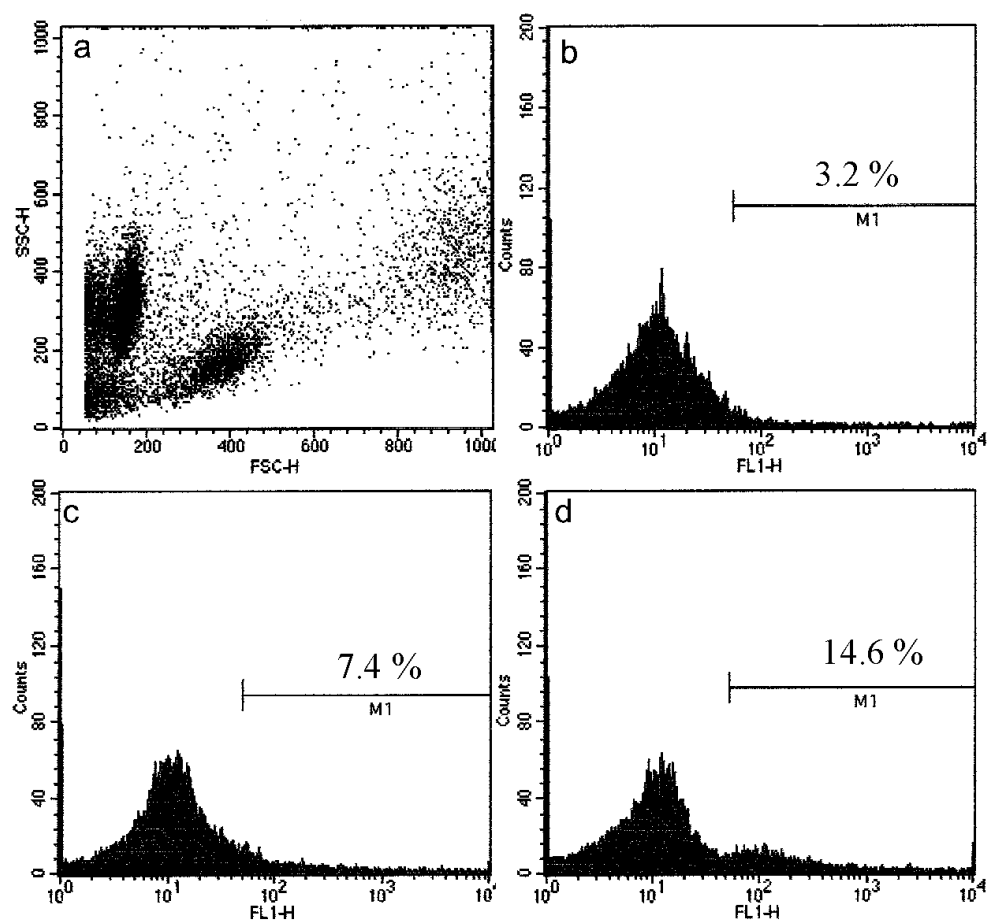


Figura 3

RT-PCR

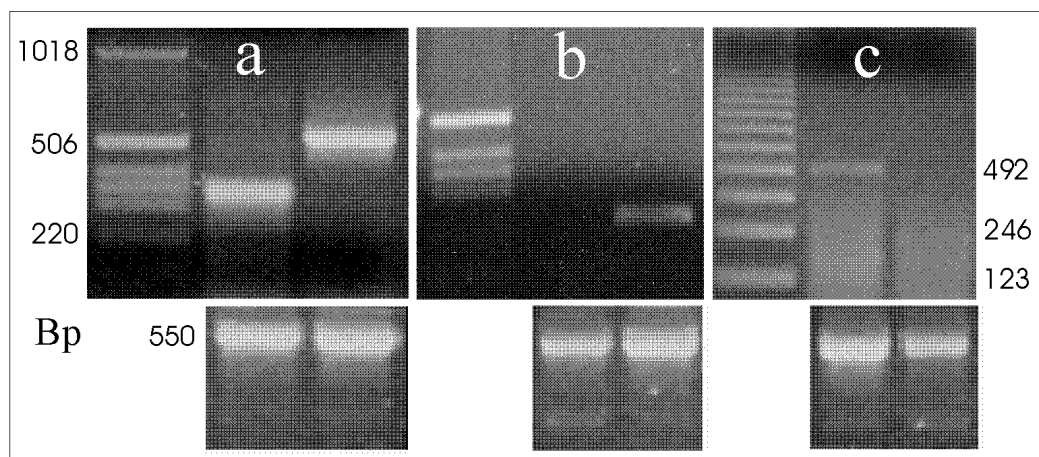


Figura 4

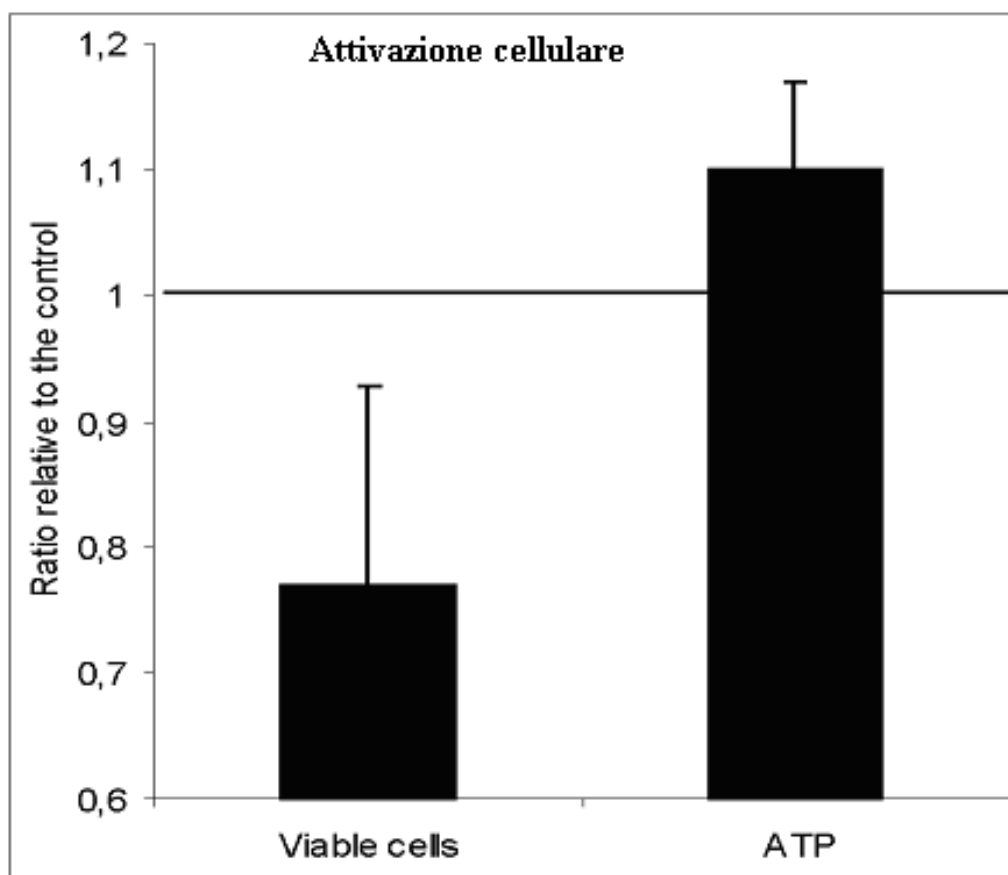


Figura 5

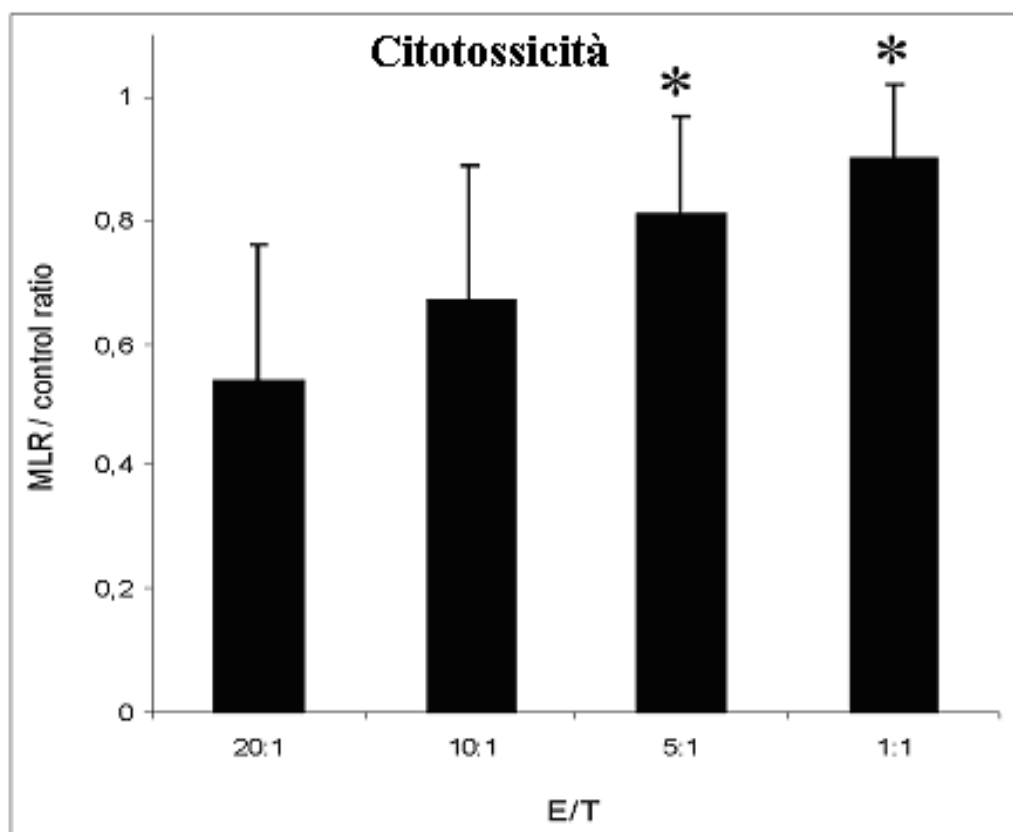


Figura 6

Sample	0 Weeks		2 Weeks				4 Weeks			
Control N = 15	DLT15	3.1 ± 0.8	DLT15	3.7 ± 1.6	Max	3.7	DLT15	3.8 ± 1.5	Max	5.4
					Min	1.2			Min	1.3
	DLIg3	21.1 ± 3.8	DLIg3	13.3 ± 7.2	Max	28.6	DLIg3	7.7 ± 3.0	Max	16.6
					Min	6.12			Min	0.3
	t.v.c.	1×10^7	T.V. C.	$4 \pm 1.6 \times 10^6$			t.v.c.	$1 \pm 1.1 \times 10^6$		
MLR N = 15	DLT15	3.1 ± 0.8	DLT15	8.8 ± 4.69	Max	16.7	DLT15	7.9 ± 4.0	Max	20.4
					Min	2.42			Min	1.4
	DLIg3	21.1 ± 3.8	DLIg3	6.7 ± 3.18	Max	8.9	DLIg3	3.0 ± 1.6	Max	6.3
					Min	1.7			Min	0.2
	t.v.c.*	1.2×10^7	t.v.c.*	$6 \pm 0.8 \times 10^6$			t.v.c.*	$1.5 \pm 0.7 \times 10^6$		

Tabella1. Contenuto di linfociti T e linfociti B nella MLR.

I numeri rappresentano la media $\pm$ deviazione standard del contenuto di cellule T (DLT15) e cellule B (DLIg3) sottratti dei valori di background e riferiti ai dati ottenuti in tre diversi esperimenti in cui sono stati saggiati 5 animali per un totale di 15 campioni per ogni gruppo. Il numero totale di cellule vitali è stato indicato per ml (t.v.c.), gli asterischi indicano che nella conta sono presenti anche le cellule irradiate.

Sample	2 weeks					
	DLT15			DLIg3		
Control N=12	3.85 ± 3.2	Max	9.4	14.7 ± 0.6	Max	15.5
		Min	0.4		Min	14.0
MLR N=12	8.26 ± 3.8	Max	11.3	11.2 ± 3.6	Max	16.1
		Min	2.6		Min	5.8
CsA N=12	3.81 ± 0.9	Max	5.4	N.D.		
		Min	0.2			

Tabella 2. Effetto della Ciclosporina-A negli MLR.

I numeri rappresentano la media ± deviazione standard del contenuto di cellule T (DLT15) e cellule B (DLIg3) sottratti dei valori di background. I valori sono riferiti a tre diversi esperimenti in cui sono stati saggiati 4 animali per volta in ogni gruppo per un totale di 12 individui.

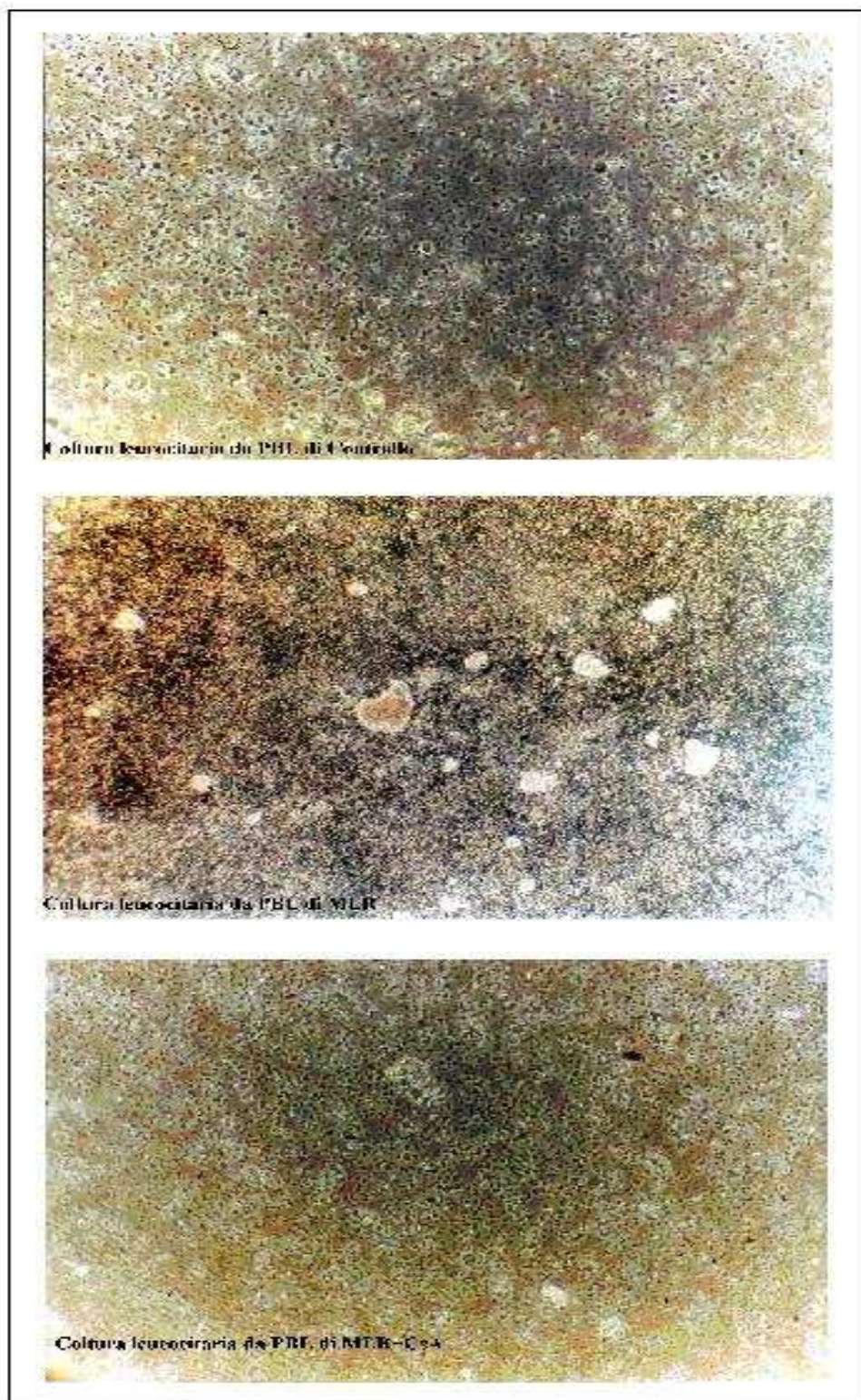


Figura 7

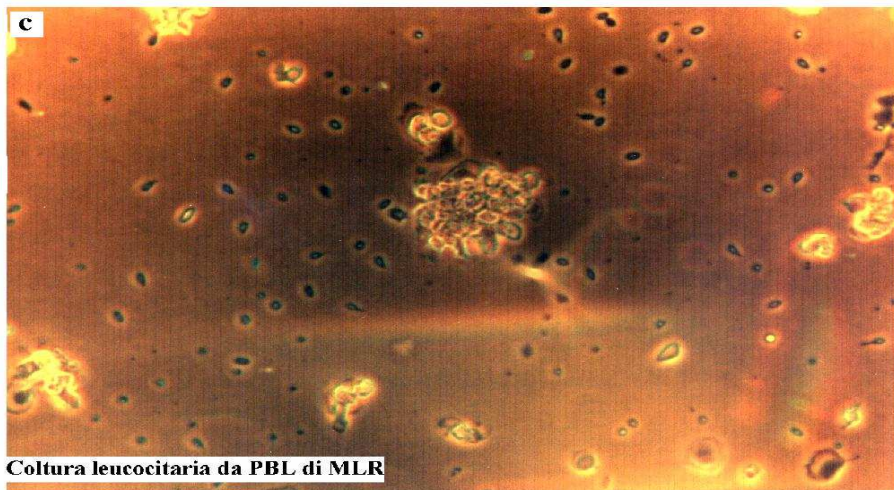
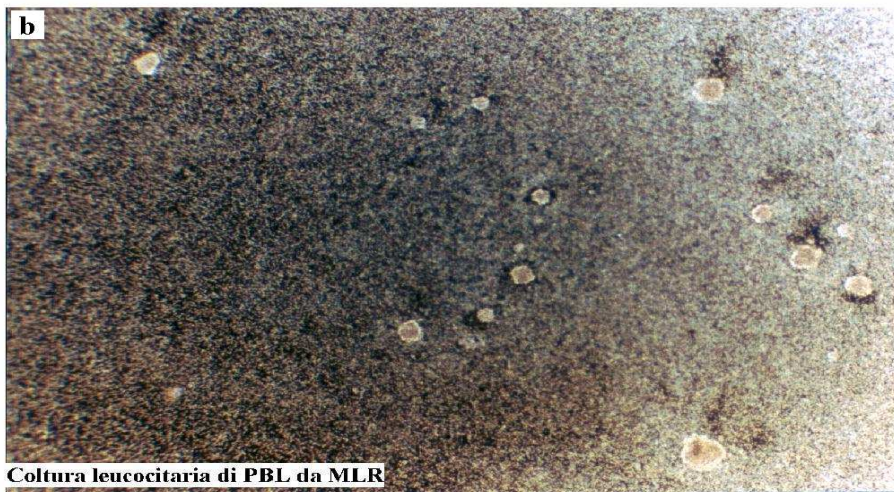
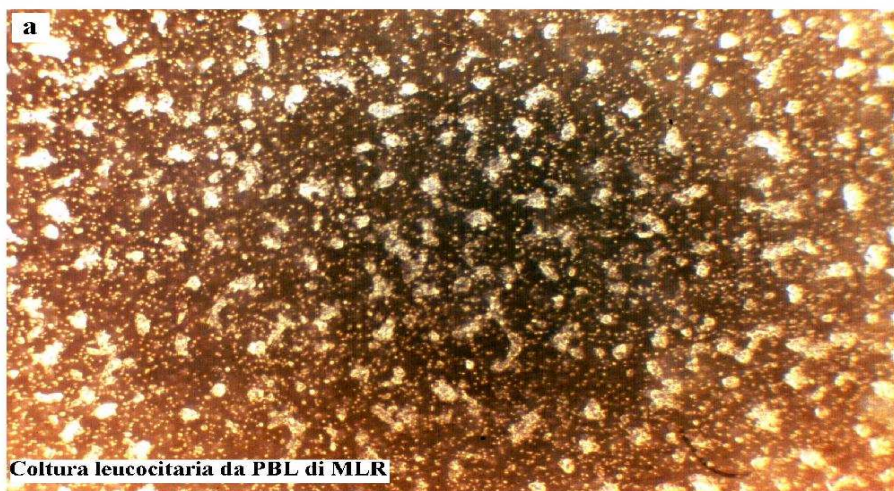


Figura 8



Figura 9a

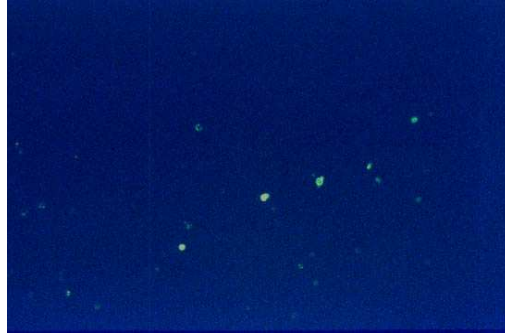


Figura 9b



Figura 10a



Figura 10b



Figura 11a

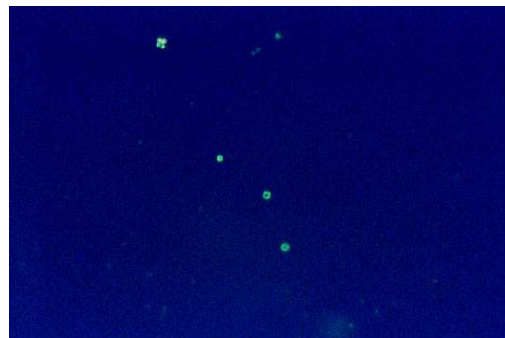


Figura 11b

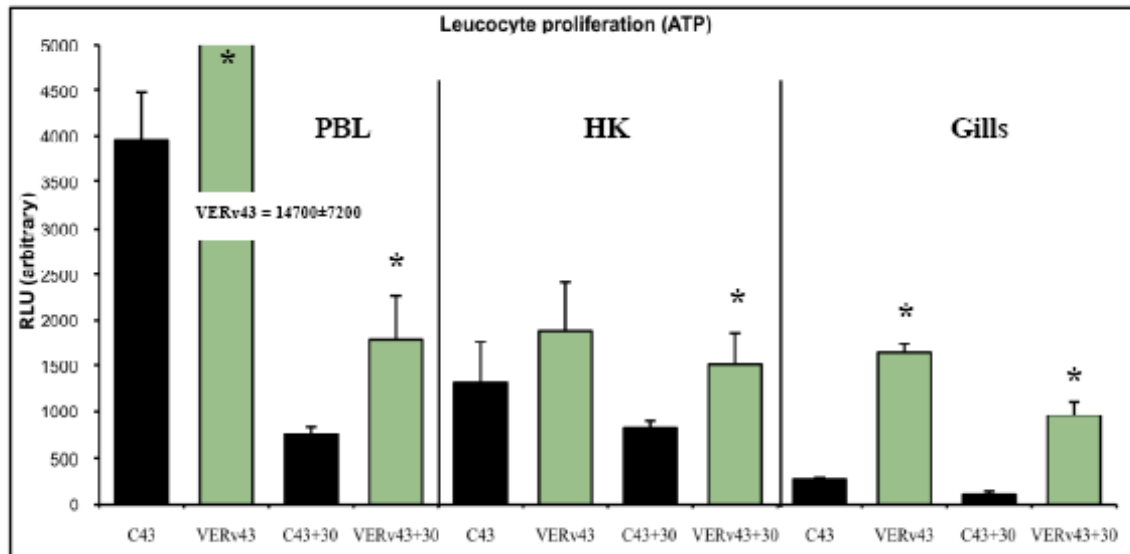


Figura 12

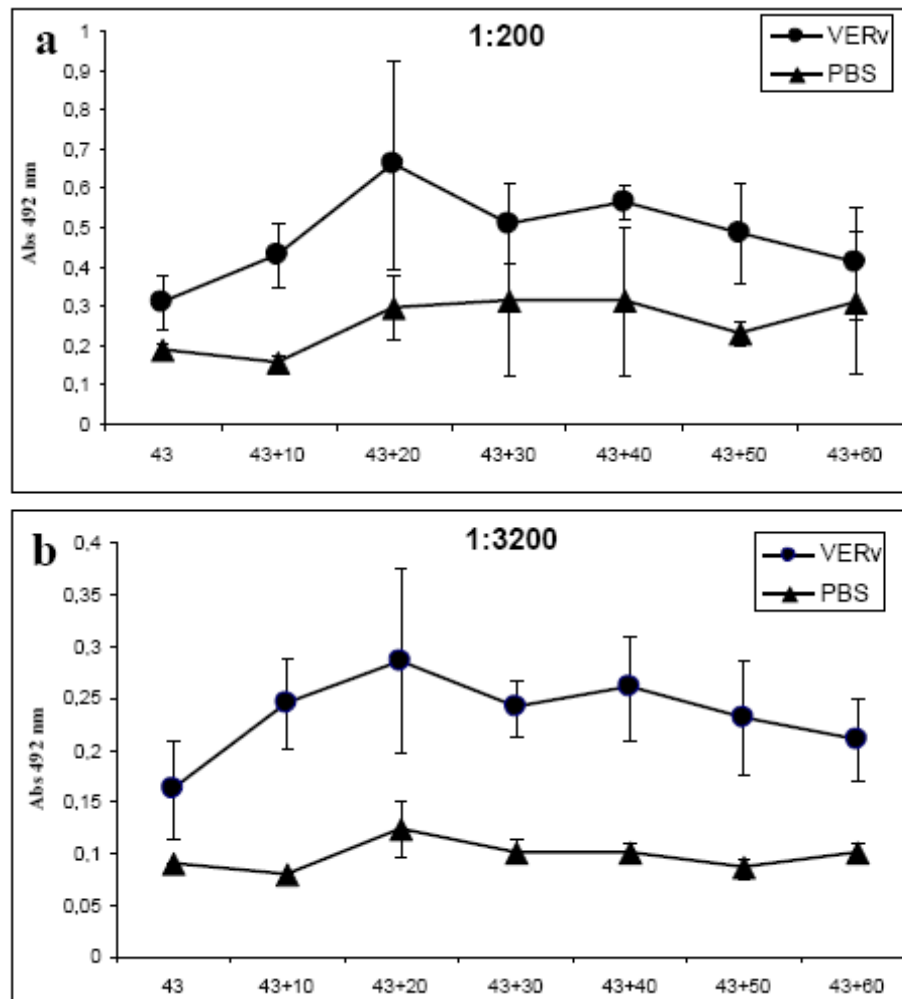


Figura 13

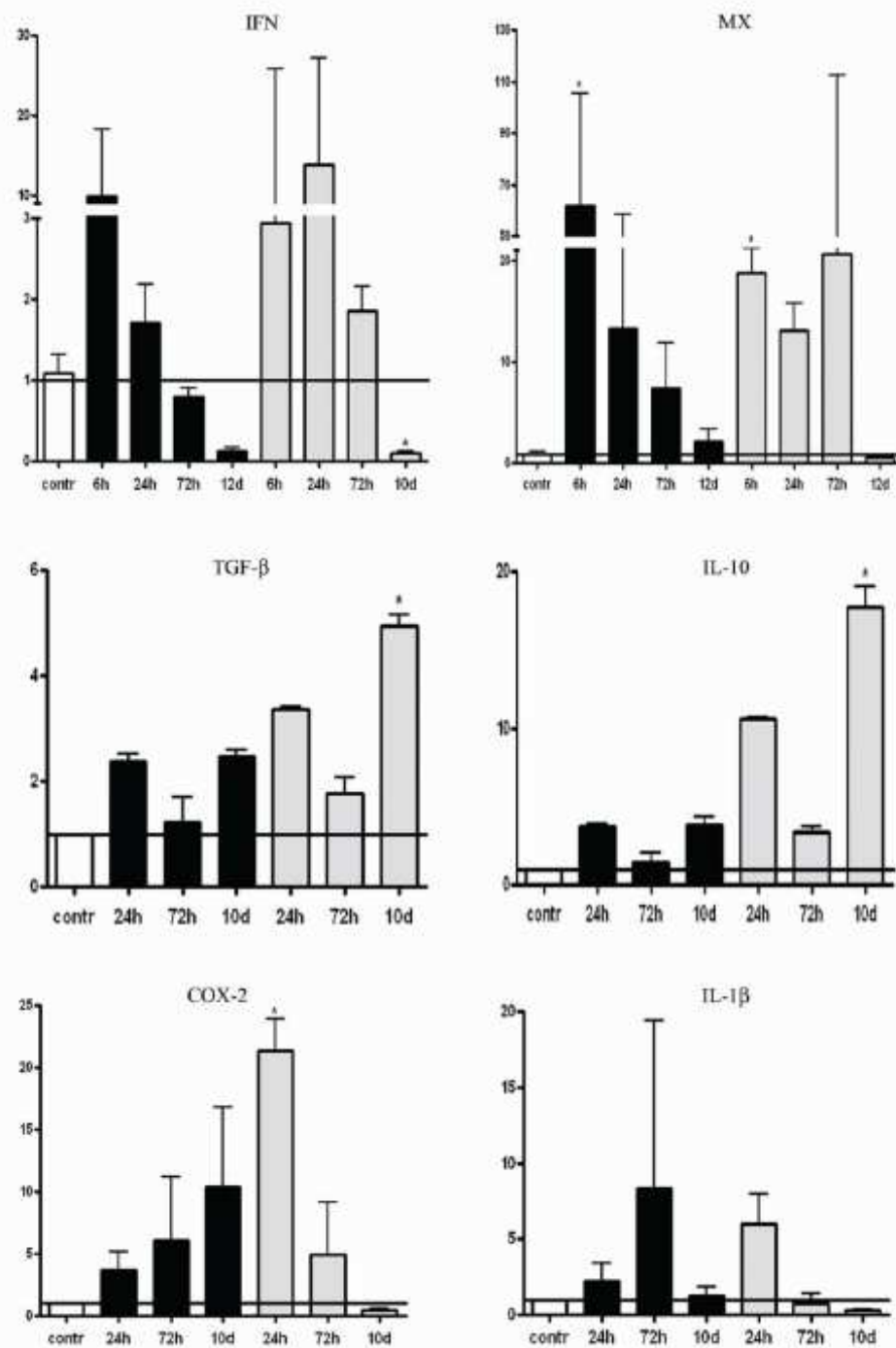


Figura 14a

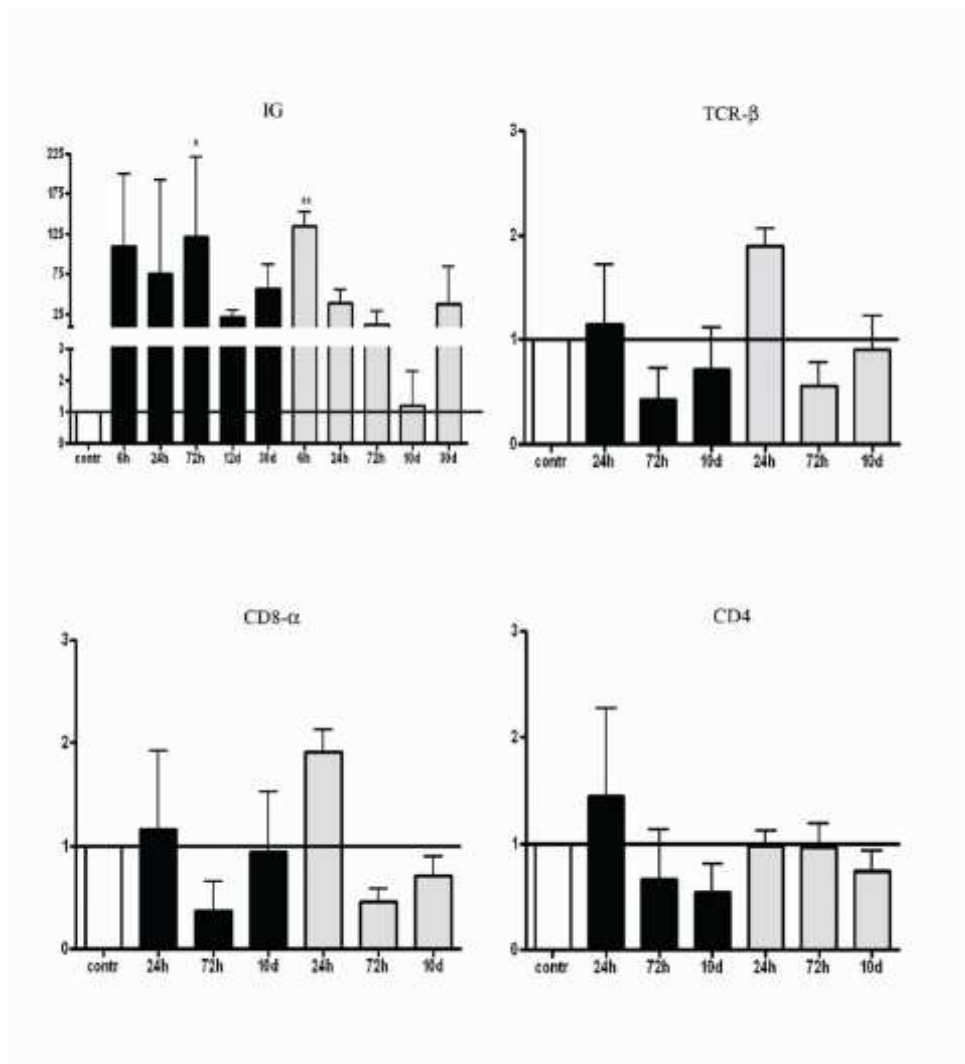


Figura 14b

T cells		Day 43	Day 43+30	Day 43+60
PBL	PBS	6.82 ± 2.29	3.17 ± 1.74	6.72 ± 1.8
	VERv	10.95* ± 4.3	6.73* ± 2.66	10.04* ± 1.74
HK	PBS	11.75 ± 1.2	6.1 ± 2.66	5.09 ± 0.8
	VERv	14.95 ± 3.2	9.42 ± 2.58	16.56* ± 3.06
SPL	PBS	12.37 ± 2	6.05 ± 2.4	10.4 ± 1.6
	VERv	9.92 ± 3.3	7.1 ± 2.65	9.4 ± 2.06
GUT	PBS	14.15 ± 2.6	18.04 ± 7.9	8.97 ± 3.9
	VERv	22.48* ± 5.3	20.81 ± 7.1	9.37 ± 2.55
GILLS	PBS	9.5 ± 2.7	11.53 ± 8.72	11.45 ± 2.1
	VERv	8.21 ± 3	11.89 ± 1.72	9.63 ± 1.82
B cells		Day 43	Day 43+30	Day 43+60
PBL	PBS	6.71 ± 3.7	4.14 ± 2.86	9.97 ± 3.1
	VERv	13.59* ± 5	8.96* ± 3.25	12.47 ± 5
HK	PBS	10.65 ± 2.3	7.65 ± 3.65	8.64 ± 3.11
	VERv	12.99 ± 3.3	9.23 ± 3.12	13.27 ± 2.47
SPL	PBS	13.54 ± 2	7.47 ± 2.82	13.35 ± 3.4
	VERv	12.38 ± 3.71	16.15 ± 10.1	12.22 ± 5.27
GUT	PBS	7.7 ± 2.42	12.13 ± 10.83	7.37 ± 3.04
	VERv	6.33 ± 1.83	18.02 ± 7.18	6.8 ± 0.67
GILLS	PBS	4.77 ± 3.8	5.5 ± 4.61	10.45 ± 1.9
	VERv	2.79 ± 0.88	6.37 ± 1.72	9.03 ± 2.64

Tabella 3: Contenuto di linfociti nei tessuti indicati con i relativi tempi di vaccinazione

In tabella sono riportati i risultati di immunofluorescenza indiretta ottenuti mediante analisi citofluorimetrica con l'utilizzo di anticorpi monoclonali DLT 15 (cellule T) e DLIG3 (cellule B). I valori, derivanti dall'analisi di 5 pesci per gruppo, sono espressi come media±SD della percentuale di immunoreattività leucocitaria. Gli asterischi indicano un valore di P<0,05 (ANOVA), negli esemplari vaccinati con VERv quando comparati con i controlli (PBS)

Gene	Primer sequence	EMBL accession
β-actin	FW: 5'-ATGTACGTTGCCATCC-3' RW: 5'-GAGATGCCACGCTCTC-3'	AJ493428
18S rRNA	FW: 5'-CCAACGAGCTGCTGACC-3' RW: 5'-CCGTTACCCGTGGTCC-3'	AY831388
CD8-α	FW: 5'-CTAAGATTCGGCAAAATAACTCGA-3' RW: 5'-GATGAGGAGTAGAAGAAGAAGGCC-3'	AJ846849
TCR-β	FW: 5'-GACGGACGAAGCTGCCCA-3' RW: 5'-TGGCAGCCTGTGTGATCTTCA-3'	AY831387
IL-1β	FW: 5'-GGTGGACAAAGCCAGTC-3' RW: 5'-CCGAGCCTTCAACATCG-3'	AJ311925
COX-2	FW: 5'-CATTCTTTGCCAGCACTTCACC-3' RW: 5'-AGCTTGCCATCCTTGAAGAGTC-3'	AJ630649
IL-10	FW: 5'-ACCCCGTTGCTTGCCA-3' RW: 5'-CATCTGGTGACATCACTC-3'	AM268529
TGF-β	FW: 5'-GACCTGGGATGGAAGTGG-3' RW: 5'-CAGCTGCTCACCTTGTG-3'	AM421619
CD4	FW: 5'-GTGATAACGCTGAAGATCGAGCC-3' RW: 5'-GAGGTGTGTCATCTCCGTTG-3'	AM849812
IFN	FW: 5'-GGCTCTACTGGATACGATGGCT-3' RW: 5'-CTCCCATGATGCAGAGCTGTG-3'	AM765847
Mx	FW: 5'-GTCTGGAGATCGCCTCT-3' RW: 5'-GTGGATCCTGATGGAGA-3'	AM228977
IgM	FW: 5'-GAGCTGCAGAAGGACAGTG-3' RW: 5'-TCAGACTGGCCTCACAGCT-3'	AJ400233

Tabella 4: Elenco dei primers utilizzati nelle qPCR-arrays

La tabella mostra la sequenza dei primers forward e reverse impiegati nella qPCR e corrispondenti ai codici identificativi. Per un protocollo di amplificazione standardizzato, tutte le sequenze sono state selezionate per avere una temperatura di melting pari a $52 \pm 1^\circ\text{C}$.

IX. LEGENDE

9. LEGENDE

Figura 1. IIF in PBL di Controllo e di MLR.

L'immunofluorescenza è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica ed è stata effettuata nei controlli (Fig.1a) e nelle colture di MLR (Fig.1b) mediante l'uso degli anticorpi monoclonali DLig3 (che marca le cellule B, Barra vuota nel grafico) e DLT15 (che marca i linfociti T, barra piena del grafico). I valori rappresentano la percentuale di cellule positive espressi come media $\pm$ deviazione standard e sono stati ottenuti sottraendo al valore relativo alla marcatura di ogni anticorpo, il valore del background derivante dalla fluorescenza spontanea delle cellule. I gruppi sperimentali sono stati comparati mediante il test ANOVA e le differenze sono state considerate statisticamente significative se $p < 0.05$. Gli asterischi indicano i gruppi statisticamente significativi a 2, 4 e 0 settimane.

Figura 2. Effetti della Ciclosporina-A.

L'immunofluorescenza, effettuata su campioni di controllo e di MLR con l'aggiunta di $5\mu\text{g/ml}$ di Ciclosporina-A, è stata eseguita con l'anticorpo DLT15 e monitorata mediante citofluorimetro (Fig. 2a). I valori, espressi come media $\pm$ deviazione standard, indicano la percentuale delle cellule positive a cui sono stati sottratti i valori di fluorescenza spontanea.

La Figura 2b mostra le medie $\pm$ deviazione standard dei livelli intracellulari di $[\text{Ca}^{2+}]$ misurati con Fura-2 AM a 5 minuti dopo aver stimolato le cellule con anticorpo DLT15. I valori sono espressi come unità relativa di fluorescenza (RFU) sottratti dei valori di background. È stata effettuata l'analisi statistica mediante il test ANOVA e le differenze sono state considerate statisticamente significative quando il valore di $p < 0.05$. Gli asterischi indicano le differenze statistiche tra i campioni di MLR ed i PBL di controllo.

Figura 3. Analisi citofluorimetrica.

Nella Figura 3a è mostrata la morfologia dei PBL arricchiti mediante Percoll. Nella figura 3c è evidenziata l'immunofluorescenza con l'anticorpo DLT15 e la fluorescenza spontanea nella figura 3b. nella figura 3d si osserva la fluorescenza dei linfociti T marcati con DLT15 dopo 2 settimane di MLR. La barra orizzontale, posta in ogni citogramma, indica i valori della percentuale di cellule positive dopo la sottrazione della fluorescenza spontanea.

Figura 4. RT-PCR.

La figura mostra una porzione di un gel di agarosio all'1 % caricato con i marcatori per i pesi molecolari (corsia di destra in a, b, c) e con 10 µl di soluzione della RT-PCR. La RT-PCR è stata ottenuta usando primers specifici per le Ig (224 bp) e per il TcRβ (503 bp), con 35 cicli di amplificazione (Fig. 4a) e dopo 16 cicli (Fig. 4b e 4c). Gli mRNA sono stati estratti da PBL di controllo Fig. 4a, 4b), e da leucociti di MLR (Fig. 4c).

Figura 5. Attivazione cellulare

La vitalità cellulare dei campioni presi da MLR di 2 settimane è stata testata mediante conta manuale utilizzando il colorante vitale Trypan blue (Fig. 5a cellule vitali). I valori riportati sono il rapporto tra il numero di cellule vitali dopo 2 settimane di MLR e il numero di cellule iniziali. Le colture leucocitarie sono state saggiate per la concentrazione intracellulare di ATP ed i valori rappresentano la media ± deviazione standard del rapporto tra i livelli di ATP nei campioni di MLR ed i livelli di ATP nei campioni di Controllo.

Figura 6. citotossicità.

In tale figura è mostrata l'attività citotossica dei leucociti contro il bersaglio xenogenico rappresentato dalle cellule SAF-1, sono mostrati i valori della concentrazione intracellulare di ATP nelle cellule SAF-1 dopo l'incubazione con le colture di MLR e di controllo; tali valori sono espressi come rapporto ± deviazione standard tra le colture di MLR ed i rispettivi controlli. È stato effettuato il test statistico ANOVA e le differenze sono state considerate statisticamente significative quando il valore di $p < 0.05$. Gli asterischi indicano la differenza statistica di E:T con rapporti di 5:1, 1:1 e 20:1.

Figura 7. Colture leucocitarie da PBL di MLR, Controllo e CsA.

La Figura 6a mostra l'aspetto di una coltura leucocitaria di PBL di controllo dopo 2 settimane di incubazione. L'immagine è stata ottenuta al microscopio ottico con un ingrandimento di 100X (Figura 7a e Figura 7c) ed è possibile notare la quasi assenza di blasti di proliferazione. Nella figura 7b, che rappresenta l'immagine microscopica ottenuta ad un ingrandimento di

40X, di una coltura leucocitaria di MLR dopo 2 settimane di incubazione, è possibile notare un certo numero di blasti.

Nella figura 7c è possibile apprezzare gli effetti inibitori della Ciclosporina-A sulla proliferazione dei linfociti T. È inoltre possibile vedere la mancanza dei blasti di proliferazione cellulare dando alle colture un aspetto simile a quello dei campioni di controllo (Fig. 7b).

Figura 8. Coltura leucocitaria mista (MLR).

In tale figura è mostrato l'aspetto al microscopio ottico di una coltura cellulare di MLR in cui si possono osservare i segni di proliferazione cellulare rappresentati dai blasti cellulari visibili a vari ingrandimenti. Nella Fig.8a è mostrata una coltura di MLR a 40 ingrandimenti, nella Fig.8b è inquadrata un'altra porzione della stessa coltura allo stesso ingrandimento, mentre nella Fig.8c è mostrato un singolo basto di proliferazione ad un ingrandimento di 200X. In quest'ultima figura sono visibili delle cellule, presumibilmente linfociti T, che ricevono lo stimolo da cellule APC, presumibilmente macrofagi, mediante l'interazione dei recettori di superficie rappresentati dal TcR sulle cellule T e l'MHC sui macrofagi.

Figura 9 – 10 - 11. Immunofluorescenza indiretta (IIF).

In questa figura è mostrato l'aspetto tipico delle cellule DLT15 positive al microscopio a fluorescenza provenienti da colture di controllo (Fig.9a), di MLR (Fig.9b) e di MLR con l'aggiunta di Ciclosporina-A (Fig.9c). Per ogni campione è mostrata l'immagine ottenuta in campo chiaro (Immagini a sinistra), in cui si osservano tutte le cellule presenti nel preparato, e l'immagine a fluorescenza, ottenuta con luce ultravioletta (immagini a destra), in cui si vedono solamente le cellule marcate con l'anticorpo DLT15. L'aspetto interessante di questa figura, è la presenza di un numero maggiore di cellule DLT15 positive nel campione proveniente da colture di MLR rispetto ai campioni provenienti da colture di controllo e di MLR + CsA.

Figura 12. Livelli di ATP intracellulare nei leucociti.

Le barre mostrano i livelli di ATP intracellulare misurato "*in vitro*" in colture leucocitarie derivanti da campioni trattati con PBS ossia i pesci di controllo (barre nere) e da individui trattati con VERv (barre grige). Ai leucociti in coltura è stata aggiunta una preparazione di

VERv inattivato con formalina. I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SD}$ relativi ai valori di luminescenza (RLU) ottenuti da analisi effettuate in triplicato di 5 pesci per gruppo avendo sottratto la luminescenza di fondo ottenuta da campioni di controllo (trattati con PBS). Gli asterischi indicano $P < 0,05$ (ANOVA) in pesci trattati con VERv comparati con quelli di controllo.

Figura 13. ELISA

La figura mostra i valori di assorbanza tramite la tecnica ELISA su sieri di pesci di controllo (linea con triangoli) e di pesci trattati con VERv (linea con punti). Sono mostrate 2 diluizioni di siero: una bassa (1:200) Fig.13a ed una più alta (1:3200) Fig.13b relative a 43 giorni dopo l'infezione e dopo boosting a 43+i giorni indicati. I valori di assorbanza a 492nm per ogni campione indicato sono espressi come $\text{media} \pm \text{SD}$ e i campioni sono stati analizzati in triplicato saggiando 10 sieri per gruppo. L'analisi statistica dimostra differenze significative tra pesci trattati con VERv rispetto a quelli di controllo $P < 0,05$ (ANOVA) alla diluizione di 1:3200

Figura 14. qPCR

In figura sono riportati i livelli di espressione genica in pesci trattati con PBS (Controllo), trattati con VERv (barre nere) e trattati con VERv e dopo boosting (barre grige) relativa ai geni per IFN, proteina Mx, $\text{TGF}\beta$, IL-10, COX-2, IL-1 (Fig.14a) e IgM, $\text{TCR}\beta$, CD4, CD8 α (Fig.14b). sull'asse delle Y è mostrata l'espressione del gene normalizzatore (RNA ribosomiale 18S) e, l'espressione basale dei livelli relativi ai trascritti nei pesci di controllo è indicata per ciascun gene da una linea continua. L'amplificazione della qPCR è stata ottimizzata mediante PCR-arrays ed ogni punto rappresenta la $\text{media} \pm \text{SD}$ delle letture effettuate in triplicato dei 4 pesci di ciascun gruppo analizzato. I dati numerici sono stati analizzati con il metodo ANOVA one-way e con il test di Bonferroni. Gli asterischi indicano la significatività di * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

X. BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S.** 1991. In: Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Company, PA, USA., pp 320-323.
- Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L and Scapigliati G.** (1997). Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish and Shellfish Immunology* 7: 235-246.
- Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L, and Scapigliati G.** (1996). Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish and Shellfish Immunology* 6: 493-505.
- Abelli L., Baldassini, M. R., Mastrolia, L. and Scapigliati G.** 1999. Immunodetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a teleost, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell. Immunol.* 191: 152-160.
- Agrawal A, Eastman Q M, Schatz D G.** (1998). Transposition mediated by RAG1 and Rag2 and its implication for the evolution of the immune system. *Nature.* 394: 744.
- Ainsworth A J.** (1992). Fish granulocytes: morphology, distribution and function. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2: 123.

Alberdi Jr F, Alderton M R, Korolik V, Coloe P J, Smith S C. (1995).Antibacterial proteins from piscine polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Cell. Biol.* **73**: 38-43.

Andrus L, Lafferty KJ. Inhibition of T-cell activity by cyclosporin A. *Scand J Immunol.* 1981 May;15(5):449-58.

Azumi K, De Santis R, De Tomaso A, Rigoutsos I, Yoshizaki F, Pinto MR, Marino R, Shida K, Ikeda M, Ikeda M, Arai M, Inoue Y, Shimizu T, Satoh N, Rokhsar DS, Du Pasquier L, Kasahara M, Satake M, Nonaka M. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". *Immunogenetics* 2003; 55:570-581.

Babbitt B. P., Allen P. M., Matsueda G., Haber E. and Unanue E.R. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317: 359-361.

Bakopoulos V., Volpatti D., Adams A., Galeotti M. and Richards R. 1997 Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L to *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 161-174.

Barlow EH, Cohen N. Effect of skin allograft immunization on the mixed leukocyte reaction of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Transplantation.* 1981 Oct;32(4):282-5.

Bartl S., Baltimore D. and Weissman I. 1994. Molecular evolution of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10769-10770.

Benacerraf B. (1978). A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I-region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. *J. Immunol.* 120: 1809-1812.

Bengten E., Wilson M., Miller N., Clem L., Pilstrom L. and Warr G. 2000. Immunoglobulin isotypes: structure, function and genetics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 248: 189-219.

Bidel D J. (1988). *Milestones in immunology: a historical exploration.* Madison, WI: Science Tech. Publishers.

Bielek E. (1981). Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio*; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell and Tissues Research.* **220**: 163-180.

Bluestone J.A, Cron R. Q., Cotterman M., Houlden B. A. and Matis L. A. 1988. Structure and specificity of T cell receptor gamma/delta on major histocompatibility complex antigen-specific CD3+, CD4-, CD8- T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168: 1899-1916.

Blumbach, B., Diehl-Seifert, B., Seack, J., Steffen, R., Muller, I. and Muller, W. 1999. Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* 49: 751-763.

- Bly J E, Miller N W, and Clem L.** (1990). A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **14**: 211.
- Boesen H T, Pedersen K, Koch C, Larsen J L.** (1997). Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic preparations from *Vibrio anguillarum* serogroup 01. *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 543.
- Boll G., Rudolphi A., Spiess S. and Reimann J.** 1995. Regional specialization of intraepithelial T cells in the murine small and large intestine. *Scand. J. Immunol.* **41**: 103-113.
- Borelli V, Banfi E, Perrotta M G, Zabucci G.** (1999). Myeloperoxidase exerts microbicidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immunol.* **67**: 4149-52.
- Botham J W and Manning M J.** (1981). The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J. Fish Biol.* **19**: 403-414.
- Bourmaud C. A. F., Romestand B. and Bouix G.** 1995. Isolation and partial characterization of IgM-like sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) immunoglobulins. *Aquaculture* **132**: 53-58.

Buonocore F, Prugnoli D, Falasca C, Secombes C J, Scapigliati G. Peculiar gene organisation and incomplete splicing of sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.) Interleukin-1 β . *Cytokine*, 21, 257-264, 2003.

Buonocore F, Secombes C J, Scapigliati G. Cyclooxygenase-2 of sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.) Interleukin-1 β . *Aquaculture*, 2004.

Cammarata M, Vazzana M, Cervello M, Arizza V, Parrinello N. (2000). Spontaneous cytotoxic activity of eosinophilic granule cells separated from the normal peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 143-54.

Caspi RR, Avtalion RR Evidence for the existence of an IL-2-like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish, *Cyprinus carpio*. *Dev Comp Immunol.* 1984 Winter;8(1):51-60.

Caspi RR, Avtalion RR. The mixed leukocyte reaction (MLR) in carp: bidirectional and unidirectional MLR responses. *Dev Comp Immunol.* 1984;8(3):631-7.

Castro H. and Gonzalez S. 2001. Microorganisms and man: enemies or friends? *Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana* 35: 37-61.

Chantanachookhin C, Seikai T and Tanaka M. (1991). Comparative study on the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Acquaculture* **99**: 143-156.

- Charlemagne J, Fellah J S, De Guerra A, Kerfourn F, Partula S.** (1998). T-cell receptors in ectothermic vertebrates. (Review) *Immunol. Rev.* **166**: 87.
- Chilmonczyk S.** (1983). The thymus of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. Light and electron microscopy study. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 59-68.
- Chilmonczyk S.** (1992). The thymus in fish: developmental and possible function in the immune response. *Ann. Rev. Fish Disease* **2**: 181-200.
- Chretien I., Marcuz A., Fellah J., Charlemagne J. and Du Pasquier L.** 1997. The T-cell receptor beta genes of *Xenopus*. *Eur. J. Immunol.* **27**: 763-771.
- Coeurdacier J. L., Pepin J. F., Fauvel C., Legall P., Bourmaud A. F. and Romestand B.** 1997. Alterations in total protein, IgM and specific antibody activity of male and female sea bass (*Dicentrarchus labrax* L, 1758) sera following injection with killed *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 151-160.
- Cuchens M A, Clem L W.** (1977). phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell. Immunol.* **43**: 219.
- Dec C, Angelidis P. and Baudin-Laurencin F.** 1990. Effects of oral vaccination against vibriosis in turbot, *Scophthalmus maximus* L., and sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *J. Fish Dis.* **13**: 369-376.

Dos Santos N. M., Taverne-Thiele J. J., Barnes A. C., Ellis A. E. and Rombout J. H.

2001. Kinetics of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) systemic and mucosal antibody secreting cell response to different antigens (*Photobacterium damsela* spp. piscicida, *Vibrio anguillarum* and DNP). Fish Shellfish Immunol. 11: 317-331.

Dos Santos NM, Hermesen T, Rombout JH, Pilstrom L, Stet RJ. Ig light chain variability in DNP(494)-KLH immunised sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): evidence for intra-molecular induced suppression. Dev Comp Immunol. 2001 Jun-Jul;25(5-6):387-401.

Du Pasquier L. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 129B: 1-15.

Du Pasquier L. The phylogenetic origin of antigen-specific receptors. Curr Top Microbiol Immunol. 2000; 248:160-85.

Du Pasquier, L. 2000. The phylogenetic origin of antigen-specific receptors. Curr. Top. Microbiol. 248: 159-185.

Duff D C B. (1942). The oral immunisation of trout against *Bacterium salmonicida*. J. Immunol. 44: 87.

- El Deeb S, Saad AH.** Ontogeny of con A responsiveness and mixed leucocyte reactivity in the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Dev. Comp. Immunol.* 1987 Summer;11(3):595-604.
- Ellis A E.** (1977). The leukocytes of fish: a review. *J.fish Biol.* **11**: 435-491.
- Ellis A E.** (1989). The immunology of teleosts. In: Roberts R J, editor. *Fish pathology*, 2nd ed. London: Bailliere Tindal, p. 135-53.
- Elsaesser C F, Bly J E and Clem L W.** (1988). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 787-799.
- Esteban M A, Meseguer J, Garcia Ayala A and Agulleiro B.** (1989). Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* **52**: 407.
- Esteban M A, Meseguer J.** (1997). Factors influencing phagocytic response of macrophages from the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural and quantitative study. *Anat. Record.* **248**: 533-41.
- Esteban MA, Rodriguez A, Ayala AG, Meseguer J.** Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata* L.). *Gen Comp Endocrinol.* 2004 May 15;137(1):89-98.

- Estévez J, Leiro J, Santamarina M T, Dominguez J & Ubeira F M.** (1994). Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **41**: 353.
- Etlinger H. M., Hodgins H. O. and Chiller J. M.** 1976. Evolution of the Lymphoid System. Evidence for Lymphocyte Heterogeneity in Rainbow Trout Revealed by the Organ Distribution of Mitogenic Responses. *J. Immunol.* 116: 1547-1553.
- Etlinger HM, Hodgins HO, Chiller JM.** Evolution of the lymphoid system. II. Evidence for immunoglobulin determinants on all rainbow trout lymphocytes and demonstration of mixed leukocyte reaction. *Eur J Immunol.* 1977 Dec;7(12):881-7.
- Evans D L & Jaso-Friedmann, L.** (1992). Non specific cells as effectors of immunity un fish. *Annual Review of Fish Disease.* **2**: 109-121.
- Evans D L, Harris D T, Jaso-Friedmann L.** (1992) Function associated molecules on nonspecific cytotoxic cells: role in calcium signalling, redirected lysis, and modulation of cytotoxicity. *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 383-94.
- Evans D L, Hogan K T, Graves S S, Carlson R L, Floyd E, Dawe D L.** (1984). Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*) III. Biophysical and biochemical properties affecting cytolysis. *Dev. Comp. Immunol.* **8**: 599.
- Fange R.** (1982). A comparative study of limphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **2**: 23.

- Fatima M., Ahmad I. I., Sayeed I. I., Athar M. and Raisuddin S.** 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat Toxicol.* 49: 243-250.
- Feng S, Woo P T.** (1996). Cell-mediated immune response and T-like cells in thymectomized *Oncorhynchus mykiss* (walbaum) infected with or vaccinated against the pathogenic haemoflagellate *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *Parasitol. Res.* **82**: 604.
- Finn J.P. and Nielsen N.O.** (1971). The inflammatory response in rainbow trout. *Journal of Fish Biology.* **3**: 463-478.
- Fletcher T C.** (1982). Non-specific defense mechanisms of fish. *Dev. Comp. Immunol.* (suppl 2): 123-32.
- Frederick M, Grimm E, Krohn E, Smid C, Yu K T.** (1997). Cytokine induced cytotoxic function expressed by lymphocytes of the innate immune system: distinguishing characteristics of NK and LAK based on functional and molecular markers. *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 435-47.
- Frimodt C.** 1995. Multilingual illustrated guide to the world's commercial warmwater fish. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. 215 p.

- Fujihashi K., Taguchi T., Aicher W. K., McGhee J. R., Bluestone J. A., Eldridge J. H. and Kiyono H.** 1992. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: gamma/delta T cell receptor-positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance, while alpha/beta TCR+ T cells provide B cell help. *J Exp Med.* 175: 695-707.
- Gabay C, Kushner I.** (1999). Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England J. Med.* **340**: 448-53.
- Gabay J E, Almeida R P.** (1993). Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 97-102.
- Galeotti M., Volpatti D. and Rusvai M.** 1999. Mitogen induced in vitro stimulation of lymphoid cells from organs of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 9: 227-232.
- Ganz T, Lehrer R I.** (1997). Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **4**: 53-58.
- Giacopini L., Marchesini B. B., Rustico L.** 1994. L'itticoltura nell'antichità, Istituto Grafico Editoriale Romano (Ed.), Roma, Italy.
- Gorgollon P.** (1983). Fine structure of the thymus in the adult cling fish *Sicyases sanguineus* (Pisces, Gobiesocidae). *J. Morphol.* **177**: 25-40.

- Grondel J L, Harmsen E G.** (1984). Phylogeny of interleukins: growth factors produced by leucocytes of the cyprinid fish, *Cyprinus carpio* L. *Immunology*. **52**: 477.
- Haire R. N., Kitzan Haindfield M.K., Turpen J.B. and Litman G.W.** 2002. Structure and diversity of T-lymphocyte antigen receptors alpha and gamma in *Xenopus*. *Immunogenetics* **54**: 431-438.
- Halaby, D. and Mornon, J.** 1998. The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species and functional diversity. *J. Mol. Evol.* **46**: 389-400.
- Hansen J. D. and Strassburger P.** 2000. Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 α , in rainbow trout. *J. Immunol.* 3132-3139.
- Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J.** (1994). Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **41**: 113.
- Hardie L J, Laing K J, Daniels G D, Grabowski P S, Cunningham C, Secombes C J.** (1998). Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine*. **10**(8): 555-63.

- Hebert P., Ainsworth A. J. and Boyd B.** 2002. Histological enzyme and flow cytometric analysis of channel catfish intestinal tract immune cells. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 53-62.
- Hedrick S. M., Cohen D. I., Nielsen E. A. and Davis M. M.** 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308: 149-153.
- Heilig J. S. and Tonegawa S.** 1986. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 322: 836-840.
- Henkart P A.** 1985. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 3 : 31-58.
- Hine P M.** (1992). The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 79.
- Hirano I., Nam B., Enomoto J., Uchino K. And Aoki T.** 2003. Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol.* 14: 405-421.
- Hogan R J, Stuge T B, Clem L W, Miller N and Chinchar V G.** (1996). Anti-viral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 20: 115.

Holland P. and GarciaFernandez J. 1996. Hox genes and chordate evolution. *Dev. Biol.* 173: 382-395.

Holland P., GarciaFernandez J., Williams N. and Siwow A. 1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Development (Suppl.)*: 125-133

Hordvik I., Thevarajan J., Samdal I., Bastani N. and Krossoy B. 1999. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand. J. Immunol.* 50: 202-210.

Hughes A. and Pontarotti P. 2000. Gene duplication and MHC origins. *Immunogenetics* 51: 982-983.

Ingram G. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. *J. Fish Biol.* **16**: 23-60.

Irwin M J and Kaattari S L. (1986). Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 39-45.

Israelsson O, Petersson A, Bengten E, Wiersma E J, Andersson J, Gezelius G, Pilstrom L. (1991). Immunoglobulin concentration in Atlantic cod *Gadus morhua*. Serum and

cross-reactivity between anti-cod antibodies and immunoglobulins from other species.
J. Fish Biol. **39**: 265.

Joosten E. P. H. M. 1997a. Immunological aspects of oral vaccination in fish. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Kaastrup P, Nielsen B, Horlyck V, Simonsen M. Mixed lymphocyte reactions (MLR) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sibling. *Dev Comp Immunol.* 1988 Fall;12(4):801-8.

Kaplan S S, Heine R P, Simmons R L. (1999). Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. *Infect. Immunol.* **67**: 1640-5.

Kappler J. W., Skidmore B., White J. and Marrack P. 1981. Antigen-inducible, H-2 restricted, interleukin-2 producing T-cell hybridomas: lack of independent antigen and H-2 recognition. *J. Exp. Med.*, 153: 1198-1214.

Klein J. 1989. Are invertebrates capable of anticipatory immune response? *Scand. J. Immunol.* 29: 499-505.

Klein J. R. 1997. Mapping of MHC class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* 46: 129-134.

Koning F., Kruisbeek A. M., Maloy W. L., Marusic-Galesic S., Pardoll D. M., Shevach E. M., Stingl G., Valas R., Yokoyama W. M. Coligan J. E. 1988. T cell receptor gamma/delta chain diversity. *J. Exp. Med.* 167: 676-681.

Koumonas-van Diepen J C E, Egberts E, Peixoto B R, Taverne N, Rombout J H W M. (1995). B cells and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.): an immuno (cyto) chemical study. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 97.

Koumonas-van Diepen J C E, Taverne-Thiele J J, van Rens B T T M, Rombout J H W M. (1994). Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.); an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 19-28.

Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, Waldmann TA, Greene WC. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Aug;81(16):5214-8.

Laemmli U K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

Laing K J, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N, Hirono I, Aoki T, Secombes C J. (2001). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Biochem.* **268**(5): 1315-22.

- Lamers C H J.** (1985). The reaction of the immune system of fish to vaccination. *Tesi di Dottorato*, Agricultural University Wageningen Olanda.
- Lehtonen L, Vainio O, Toivanen P.** Ontogeny of alloreactivity in the chicken as measured by mixed lymphocyte reaction. *Dev Comp Immunol.* 1989 Spring;13(2):187-95.
- Leslie G A, Clem L W.** (1969). Production of anti-hapten antibodies by several classes of lower vertebrates. *J. Immunol.* **103**: 613.
- Levy O, Ooi C E, Elsbach P, Doerfler M E, Lehrer R I, Weiss J.** (1995). Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin. Comparison of bactericidal/permeability-increasing protein, p15s, and defensins. *J. Immunol.* **154**: 5403-10.
- Lichtenstein A K, Ganz T, Selsted M E, Lehrer R I.** (1988). Synergistic cytotoxicity mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins. *Cell. Immunol.* **114**: 104-16.
- Lin G L, Ellsaesser C F, Clem L W and Miller N W.** (1992). Phorbol ester/ calcium ionophore activate fish leucocytes and induce long-term cultures. *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 153.
- Lin G L, Liu T Y.** (1993). Isolation and characterization of C-reactive protein (CRP) cDNA from *Xenopus laevis*. A species representing an intermediate stage in CRP evolution. *J. Biol. Chem.* **268**: 6809-15.

- Luebke R. W., Hodson P. V., Faisal M., Ross P. S., Grasman K. A. and Zelikoff J.** 1997. Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundam. Appl. Toxicol.* 37: 1-15.
- Manning J M.** (1994). Fishes. In: Turner R J, Ed. *Immunology: a Comparative Approach*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 69.
- Manning M. J.** 1994. Fishes. In: Turner R.J. (ed.). *Immunology: a comparative approach*. Edited by R. J. Turner, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 69-100.
- Marchalonis J. and Schluter S.** 1990. On the relevance of invertebrate recognition and defense-mechanisms to the emergence of the immune-response of vertebrates. *Scand. J. Immunol.* 32: 13-20
- Marchalonis J., Bernstein R., Shen S. and Schluter S.** 1996. Emergence of the immunoglobulin family: Conservation in protein sequence and plasticity in gene organization. *Glycobiology* 6: 657-663.
- Marsden M J, Vaughan L M, Foster T J, Secombes C J.** (1996). A live (Δ -aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infect. Immunol.* 64: 3863.

Matsunaga T, Rahman A. What brought the adaptive immune system to vertebrates? The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol Rev* 1998; 166:177-186.

Matsunaga T. (1998). did the first adaptive immunity evolve in the gut of jawed fish? (Review) *Cytogenet. Cell Genet.* **80**: 138.

Matsunaga T. and Andersson E. 1994. Evolution of vertebrate antibody genes. *Fish Shellfish Immunol.* 4: 413-419.

Matsuyama H, Mangindaan R E P, Yano T. (1992). Protective effect of shizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture.* **101**: 197-203.

Medzhitov R, Janeway C A Jr. (1998). An ancient system of host defense. (Review) *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 12.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394.

Meloni S. and Scapigliati G. 2000. Evaluation of immunoglobulins produced in vitro by head kidney leucocytes of sea bass *Dicentrarchus labrax* by immunoenzymatic assay. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 95-99.

- Meseguer J, Esteban M A, Agulleiro B.** (1991). Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) an ultrastructural study. *Arch Histol. Cytol.* **54**: 299-309.
- Meseguer J, Esteban M A, Mulero V.** (1996). The non-specific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanisms. *Anat. Rec.* **244**: 499-505.
- Miller N W, Van Ginkel J, Ellsaesser F and Clem L W.** (1987). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* **11**: 739.
- Miller N. W., Ryczyn M. A., Wilson M. R., Warr G. W., Naftel J. P. and Clem L.W.** 1994a. Development and Characterization of Channel Catfish Long Term B Cell Lines. *J. Immunol.* **152**: 2180-2189.
- Miller N., Chinchar V. and Clem L. W.** 1994b. Development of leucocyte cell lines from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Tiss. Culture Meth.* **16**: 117-123.
- Miller NW, Deuter A, Clem LW.** Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for the mixed leucocyte reaction with channel catfish. *Immunology.* 1986 Sep;59(1):123-8.

- Mokady O.** 1996. Occam's Razor, invertebrate allorecognition and Ig superfamily evolution. *Res. Immunol.* 147: 241-246.
- Mulero V, Esteban M A, Muñoz J, Meseguer J.** (1994). Non-specific cytotoxic response against tumor target cells mediated by leucocytes from seawater teleosts, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. *Arch Histol. Cytol.* 57: 351-8.
- Muñoz J, Sitja-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P.** (2000). Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* Myxosporea: Bivalvulida). *Parasitology.* 120: 465-77.
- Nakanishi T, Ototake M.** The graft-versus-host reaction (GVHR) in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev Comp Immunol.* 1999 Jan-Feb;23(1):15-26.
- Nakanishi T. and Ototake M.** 1997. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Dev. Biol. Stand.* 90: 59-68.
- Nam B. H., Hirono I. and Aoki T.** 2003a. The four genes of Teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR alpha-, beta, gamma-, and delta-chains. *J. Immunol.*, 170: 3081-3090.
- Nelson J.** 1994. *Fishes of the world.* 3rd Edn. Wiley, New York.

Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P. (1996). Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 81.

Pancer Z., Skorokhod A., Blumbach B. and Muller, W. 1998. Multiple Ig-like featuring genes divergent within and among individuals of the marine sponge *Geodia cydonium*. *Gene* 207: 227-233.

Park H., Zhou H., Bengten E., Wilson M., Chinchar V. G., Clem L. W. and Miller N. W. 2002. Activation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) T cells involves NFAT-like transcription factors. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 775-784.

Parnes J. R. 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.* 44: 265-312.

Partula S., De Guerra A., Fellah J. S. and Charlemagne J. 1995. Structure diversity of the T cell antigen receptor β -chain in a teleost fish. *J. Immunol.* 155: 699-706.

Partula S., De guerra A., Fellah J. S. and Charlemagne, J. 1996. Structure and diversity of the TCR β -chain in a teleost fish. *J. Immunol.* 157: 207-212.

Passer B J, Chen C H, Miller N W, Cooper M D. (1996). Identification of a T cell lineage antigen in the catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **20**: 441.

Peleteiro M C and Richards R M. (1985). Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. of Fish Dis.* **8**: 161-172.

Perez-Prieto SI, Rodriguez-Saint-Jean S, Garcia-Rosado E, Castro D, Alvarez MC, Borrego JJ. Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream. *Dis Aquat Organ.* 1999 35:149-153.

Picchietti S, Terribili F R, Mastrolia L, Scapigliati G and Abelli L. (1997). Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing GALT of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anatomy and Embriology.* **196**: 457-463.

Picchietti S. (1993). Analisi istologica e citologica dello sviluppo del timo nella spigola *Dicentrarchus labrax* L. *Tesi di laurea*, Facoltà di Scienze M.M. F.F. N.N. dell'Università della Tuscia.

Pickering A.D. and Richards R.H. (1980). Factors influencing the structure, function and biota of the salmonid epidermis. *Proceedings of the Royal Society, Edinburgh* **79B**, 93-104.

Pilström L. and Petersson A. 1991. Isolation and partial characterization of immunoglobulin from cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **15**: 143-152.

- Pretti C., Milone M. T. A., Cognetti Varriale A. M.** 1999. Fish pasteurellosis: Sensitivity of Western blotting analysis on the internal organs of experimentally infected sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 19: 120-122.
- Radman DP, McCudden C, James K, Nemeth EM, Wagner GF.** Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Jan 15;186(1):111-9.
- Rijkers G T, Frederix-Wolters E M H, Van miuswinkel W B.** (1980). The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunol.* **41**. 91.
- Ristow S; Evans D L, Jaso-Friedmann L.** (2000). Analyzing nonspecific cytotoxic cells in fish. *Methods. Mol. Biol.* **121**: 347-57.
- Roberts R. J.** (1989) In: *Fish Pathology*, 2nd ed., London: Baillière Tindall.
- Romano N, Abelli L, Mastrolia L and Scapigliati G.** (1997). Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Tissue Res.* **289**: 163-171.
- Rombout J H W M, Joosten P H M, Engelsma M Y, Vos N, Taverne N Taverne-Thiele J** (1998). Indication of a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp. *Dev. Comp. Immunol.* **22**: 63.

- Rombout J H W M, Koumans-van Diepen J C E K, Emmer P M, Tavernethiele J J and Taverne N.** (1996). Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *J. Fish. Biol.* **49**: 521.
- Rombout J H W M, Taverne-Thiele A J & Villena M I.** (1993). The gut associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 453.
- Rombout J H W M, van de Wal J W, Companjen A, Taverne N, Taverne-Thiele J J.** (1997). Characterization of a T cell lineage marker in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **22**. 63.
- Romestand B, Breuil G, Bourmaud C, Coeudacier J L, Bouix G.** (1995). Development and characterization of monoclonal antibodies against sea bass immunoglobulins *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 347.
- Rowley A F, Hunt T C, Page M & Mainwaring G.** (1988). Vertebrate blood cells. A F Rowley & N A Ratcliffe Eds., Cambridge University press, 18-127.
- Sanchez C & Dominiguez J.** (1991). Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **28**: 1271.
- Scapigliati G, Mazzini M, Mastrolia L, Romano N, Abelli L.** (1995). Production and characterization of a monoclonal antibody against thymocytes of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shallfish Immunol.* **5**: 393.

Scapigliati G, Romano N, Abelli L, Meloni S, Ficca A G, Buonocore F, Bird S, Secombes C J. (2000). Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.***10**: 329-341.

Scapigliati G, Romano N, Picchietti S, Mazzini M, Mastrolia L, Scalia D and Abelli L. (1996). Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immuniassay. *Fish and Shellfish Immunology* **6**: 383-401.

Schluter S., Bernstein R., Bernstein H. and Marchalonis J. 1999. 'Big Bang' emergence of the combinatorial immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 107-111.

Secombes C J & Fletcher T C. (1992). The role of phagocytes in the protective mechanism of fish. *Ann. Rev. Fish Des.* **2**: 53-71.

Secombes C J, Hardie L J, Daniels G. (1996). Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 291.

Secombes C J, Zou J, Daniels G, Cunningham C, Koussounadis A, Kemp G. (1998). Rainbow trout cytokine and cytokine receptor genes. (Review) *Immunol. Rev.***166**: 333.

Secombes C J. (1991). The phylogeny of cytokines. In *The cytokine handbook* (Thomson A W ed), 387-413. London: Academic press, (UK).

Secombes C. 1998a. The phylogeny of cytokines. In: The cytokine Handbook. 3rd Edn. Ed: Thomson, A. pp. 953-993. Academic Press, London

Secombes C. J., Bird S., Hong S., Laing K. J. and Zou J. 2001. Phylogeny of vertebrate cytokines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 484: 89-94.

Siegel M M, Hamby B A & Huggins E M Jr. (1986). Phylogenetic studies on lymphokines. Fish lymphocytes respond to human IL-1 and epithelial cells produce an IL-1-like factor. *Vet. Immunol. Immunopath.* **12**: 47-54

Sigel M M, Clem L W. (1965). Antibody response of fish to viral antigens. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1965 **126**: 662.

Sitja-Bobadilla A, Pérez- Sachéz J. (1999). Diet related changes in non specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* **9**: 637-40.

Sizemore R. G., Miller N. W., Cuchens M. A., Lobb C. J. and Clem L. W. 1984. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 133: 2920-2924.

Slierendrecht W J, Lorenzen N, Glamann J, Koch C and Rombout J H W M. (1995). Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **46**: 113.

Smith C. L. 1990. Moronidae. p. 692-694. In J.C. Quéro, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2.

Somamoto T, Sato A, Nakanishi T, Ototake M, Okamoto N. Specific cytotoxic activity generated by mixed leucocyte culture in gibel carp. *Fish Shellfish Immunol.* 2004 Aug;17(2):187-91.

Sorensen O, Bratt T, Johnsen A H, Madsen M T, Borregaard N. (1999). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J. Biol. Chem.* **274**: 22445-51.

Sowder J. T., Chen C. L., Ager L. L., Chan M. M. and Cooper M. D. 1988. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J. Exp. Med.* **167**: 315-322.

Stafford J. L., McLauchlan P. E., Secombes C. J., Ellis A. E, and Belosevic M. 2001. Generation of primary monocyte-like cultures from rainbow trout head kidney leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 447-459.

- Stenvik J. and Jörgensen T. O.** 2000. Immunoglobulin D (IgD) of atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics* 51: 452-461.
- Stet R J, Kruiswijk C P, Saeij J P, Wiegertjes G F.** (1998). Major histocompatibility genes in cyprinid fishes: theory and practice. (Review) *Immunol. Rev.* **166**: 301.
- Stolen S. S and Makela O.** 1975. Carrier preimmunisation in the anti-hapten response of a marine fish. *Nature*. 254: 718-719.
- Stromsheim A., Eide D. M., Hofgaard P. O., Larsen H. J. S., Refstie T. and Roed K. H.** 1994. Genetic variation in the humoral immune response against *Vibrio salmonicida* and in antibody titre against *Vibrio anguillarum* and total IgM in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 85-95.
- Suetake H, Araki K, Suzuki Y.** Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics*. 2004 Aug;56(5):368-74. Epub 2004 Jul 28.
- Sunyer J O, Tort L.** (1994). The complement system of the teleost fish *Sparus aurata*. *Ann. NY acad. Sci.* **712**: 371-3.

Sunyer J O, Tort L. (1995). Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream (*Sparus aurata*) are effected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**: 333-45.

Sveinbjorsson B, Seljelid R. (1994). Aminated (b)-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **41**: 113.

Sweet L. I. And Zelikoff J. T. 2001. Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans. *J Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **4**: 161-205.

Sydora B. C, Mixter P. F., Houlden B., Hershberg R., Levy R., Comay M., Bluestone J. and Kronenberg M. 1993. T-cell receptor gamma delta diversity and specificity of intestinal intraepithelial lymphocytes: analysis of IEL-derived hybridomas. *Cell Immunol.* **152**: 305-322.

Tatner M F and Manning M J. (1983). The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 93-105.

Thibault PM, Main RK, Kountz SL. Detection of antigenic differences with the MLR and MSLR between skin, leukocytes, and kidney in rats. *Transplant Proc.* 1973 Mar;**5**(1):397-400.

- Thuvader A, Fossum C, Lorenzen N.** (1990). Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: characterization and applicability in immunoassays. *Dev. Comp. Immunol.* **14**: 415.
- Tortonese E.** 1986. Moronidae. pp. 793-796. In P.J.P. Whitehead, M.-L. Bauchot, J.-C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.) *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris. vol. 2.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI.** The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 2004 Apr;20(4):367-79.
- Tsoukas C. D., Landgraf B., Bentin J., Valentine M., Lotz M., Vaughan J. H. and Carson D. A.** 1985. Activation of resting T lymphocytes by anti-CD3 (T3) antibodies in the absence of monocytes. *J. Immunol.* **135**: 1719-1723.
- Vallejo A. N., Miller N. W. and Clem L. W.** 1991. Phylogeny of immune recognition: role of alloantigens in antigen presentation in channel catfish immune responses. *Immunology* **74**: 165-168.
- Van den Berg TK, Yoder JA, Litman GW.** On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale. *Trends Immunol.* 2004 Jan;25(1):11-6.

- Van der Heijden M H T, Rooijakkers J, Booms G, Rombout J, Boon J H.** (1995). Production, characterization and applicability in immunoassays of monoclonal antibodies to european eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) immunoglobulin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**: 151.
- Van Ginkel F. W, Miller N. W., Cuchens M. A. and Clem L. W.** 1994. Activation of channel catfish B cells by membrane immunoglobulin cross-linking. *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 97-107.
- Van Muiswinkel W B, Lamers C H J & Rombout J H W.** (1991). Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Research Immunol.* **142**: 362-366.
- Van Muiswinkel W B.** (1995). The piscine immune system: innate and acquired immunity. In: Woo PTK, editor. *Fish diseases and disorders. Volume I*: protozoan and metazoan infections. Canada: Department of Zoology, University of Guelph. p. 729-49.
- Van Muiswinkel W.B. and Jagt L.P.** (1984). Host-parasite relationships in fish and other ectothermic vertebrates. *Dev. and Comp. Immunol. Suppl* **3**: 205-208.
- Van Wauwe J. P., Gossens J. and Van Nyen G.** 1984. Inhibition of lymphocyte proliferation by monoclonal antibody directed against the T3 antigen on human T cells. *Cell Immunol.* **86**: 525-534.

- Verburg van Kemenade B M L, Weyts F A A, Debets R & Flik G.** (1995). Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 59-70.
- Volpatti D., Rusvai M., D' Angelo L., Manetti M, and Galeotti M.** 1996. Evaluation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) lymphocytes proliferation after in vitro stimulation with mitogens. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* 8: 22-26.
- Warr G.** 1995. The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 1-12.
- Weiss A. and Imboden J.B.** 1987. Cell surface molecules and early events in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* **41**: 1-38.
- Wendelaar Bonga SE.** The stress response in fish. *Physiol Rev.* 1997 Jul;77(3):591-625.
- Wermenstam N. and Pilstrom L.** 2001. T-cell antigen receptors in atlantic cod (*Gadus morhua* L.): structure, organisation and expression of TCR and genes. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 117-135.
- Wester P. W., Vethaak A. D. and van Muiswinkel W. B.** 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology* **86**: 213-232.

- Wilson M., Bengten E., Miller N. W., Clem L. W., Du Pasquier L. and Warr G. W.** 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4593-4597.
- Wilson M., Zhou H., Bengten E., Clem L., Stuge T., Warr G. and Miller N.** 1998. T-cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR alpha and beta genes. *Mol. Immunol.* 35:1219-1219.
- Yamaguchi K, Kodama H, Miyoshi M, Nishi J, Mukamoto M, Baba T.** (1996). Inhibition of cytotoxic activity carp lymphocytes (*Cyprinus carpio*) by anti-thymocyte monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **51**: 211.
- Zapata A, Chibà A, Varas A.** (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama Q, Nakanishi T, editors. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. San Diego: Academic Press. 1-62.
- Zapata A.** (1979). Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* **3**: 55.
- Zhou H, Stuge TB, Miller NW, Bengten E, Naftel JP, Bernanke JM, Chinchar VG, Clem LW, Wilson M.** Heterogeneity of channel catfish CTL with respect to target recognition and cytotoxic mechanisms employed. *J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1325-32.