



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche

Corso di Dottorato di Ricerca

in

“EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA”

XXIV CICLO

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

*GLI IMMUNOSTIMOLANTI NATURALI: UNA NUOVA PROSPETTIVA PER
L'ALLEVAMENTO BIOLOGICO
DI TELEOSTEI MARINI.*

Settore scientifico disciplinare: BIO/05

Coordinatore: Prof.ssa Laura Zucconi Galli Fonseca

Dottoranda:

Dott.ssa Chiara Bernini

Tutor:

Dott.ssa Simona Picchietti

A.A. 2010-2011

Sommario

Premessa	1
Capitolo I - <i>Introduzione</i>	5
1.1 Sviluppo economico del settore acquacoltura e aspetti critici	5
1.2 Misure profilattiche adottate negli allevamenti ittici per migliorare la resistenza alle infezioni: chemioterapici, vaccini e immunostimolanti	8
1.3 Il biologico: una nuova opportunità per l'acquacoltura	11
1.4 Il sistema immunitario dei Teleostei	13
1.4.1 Immunità innata dei Teleostei	14
1.4.2 Immunità acquisita dei Teleostei	21
1.4.3 Gli organi linfoidi	22
1.5 Gli estratti naturali, ottenuti da piante medicinali, modulano l'immunità innata e adattativa dei pesci Teleostei	23
1.6 Effetti di miscele di estratti naturali sul sistema immunitario dei pesci	26
1.7 Combinazione di estratti vegetali con vaccini	27
1.8 Gli immunostimolanti naturali utilizzati nella mia ricerca: le piante medicinali <i>Aloe arborescens</i> e <i>Myrtus communis</i> e il prodotto commerciale Macrogard	28
1.8.1 Le piante medicinali <i>Aloe arborescens</i> e <i>Myrtus communis</i> e loro proprietà curative	28
1.8.2 Il Macrogard : ruolo dei beta glucani in acquacoltura	32
1.9 Specie ittiche di interesse commerciale oggetto della mia ricerca	34
1.9.1 <i>Sparus aurata</i> (L.) una delle specie più allevate nel Mediterraneo: morfologia e bioetologia	35
1.9.1a I principali agenti patogeni di <i>Sparus aurata</i> : <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> e <i>Listonella anguillarum</i>	36
1.9.1b Il modello di studio: la linea cellulare continua di fibroblasti di orata SAF-1	39
1.9.2 <i>Gadus morhua</i> e <i>Salmo salar</i> due delle specie ittiche più importanti per il settore economico ed industriale della Norvegia: morfologia e bioetologia	41
1.9.2a Il modello di studio: la linea cellulare primaria di derivazione branchiale	43
Capitolo II - <i>Materiali e Metodi</i>	45
2.1 Tecniche di Biologia cellulare e Linee cellulari utilizzate per la sperimentazione <i>in vitro</i>	45
2.1.1 Linea cellulare SAF-1 e mezzi di coltura	45
2.1.2 Allestimento di una coltura primaria costituita da una popolazione di leucociti isolati dalle branchie di merluzzo e salmone atlantico	45

2.2 Estratti di piante medicinali e un prodotto commerciale a base di beta glucani utilizzati per la sperimentazione	46
2.2.1 Preparazione degli estratti di <i>Aloe arborescens</i> e <i>Myrtus communis</i>	46
2.2.2 Macrogard	47
2.3 Esperimenti preliminari condotti su entrambe le linee: saggi di citotossicità <i>in vitro</i>	47
2.3.1 Saggi di citotossicità <i>in vitro</i> condotti sulla linea cellulare SAF-1: ATP lite	48
2.3.2 Saggi di citotossicità <i>in vitro</i> condotti sulla linea cellulare primaria di leucociti: MTT	49
2.3.3 Analisi statistica relativa ai saggi di citotossicità	50
2.4 Sperimentazione <i>in vitro</i> condotta sulla linea cellulare SAF-1	50
2.4.1 Estrazione dell'RNA totale delle SAF-1 a seguito di trattamenti	50
2.4.2 PCR	51
2.4.3 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio	52
2.4.4 Procedure di clonaggio	53
2.4.4 a Vettore utilizzato	53
2.4.4 b Microrganismo utilizzato	53
2.4.4 c Terreni di coltura	54
2.4.4 d Purificazione del DNA da gel d'agarosio	54
2.4.4 e Ligazione di frammenti di DNA	55
2.4.4 f Trasformazione delle cellule competenti	55
2.4.4 g Colture batteriche	56
2.4.4 h Estrazione del DNA plasmidico	56
2.4.4 i Analisi di sequenza	56
2.4.5 Analisi di espressione di tipo quantitativo tramite Real time PCR	56
2.4.5 a Analisi statistica relativa ai saggi di analisi di espressione	58
2.4.6 Saggi antibatterici	58
2.4.6 a Batteri e mezzi di coltura	59
2.4.6 b Antibiogramma: metodo per diffusione con dischetti imbevuti o di Kirby Bauer	59
2.4.6 c Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)	60
2.4.6 d Determinazione della Minima Concentrazione battericida (MBC)	60
2.4.6 e Analisi statistica	60
2.4.7 Microscopia elettronica	60
2.4.7 a Microscopia elettronica a scansione (SEM)	61
2.4.7 b Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	62
2.5 Sperimentazione <i>in vitro</i> condotta sulla linea cellulare primaria di leucociti di derivazione branchiale	63
2.5.1 Trattamenti	63
2.5.2 Estrazione proteine totali, Dosaggio e Purificazione	63
2.5.3 Elettroforesi Bidimensionale	64
Capitolo III - Risultati e Discussione	65
3.1 Risultati ottenuti utilizzando gli estratti di <i>Aloe arborescens</i> e <i>Myrtus communis</i> sulla linea cellulare SAF-1	69
3.1.2 Saggio ATP lite su cellule SAF-1 in seguito a trattamento con estratto di <i>Aloe arborescens</i>	69

3.1.2a Analisi morfologica a seguito del trattamento delle SAF-1 con l'estratto di <i>Aloe arborescens</i>	72
3.1.3 Saggio ATP lite su cellule SAF-1 in seguito a trattamento con estratto di <i>Myrtus communis</i>	74
3.2 Analisi di espressione di tipo quantitativo tramite Real time PCR condotta sulla linea cellulare SAF-1 a seguito del trattamento con Aloe e Mirto: valutazione degli effetti immunomodulatori	76
3.2.1 Effetto immunomodulatorio dell'estratto di <i>Aloe arborescens</i> sulla linea cellulare SAF-1 in seguito a simulata infezione virale	77
3.2.2 Effetto immunomodulatorio dell'estratto di <i>Aloe arborescens</i> sulla linea cellulare SAF-1 in seguito a simulata infezione batterica	81
3.2.3 Effetto immunomodulatorio dell'estratto di <i>Myrtus communis</i> sulla linea cellulare SAF-1 in seguito a simulata infezione batterica	86
3.3 Valutazione della eventuale attività antimicrobica dell'estratto etanolic di <i>Aloe arborescens</i> e <i>Myrtus communis</i> verso i ceppi batterici <i>Listonella anguillarum</i> ATCC 43305 e <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> B07/8	89
3.3.1 Valutazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) delle eventuali modificazioni ultrastrutturali indotte da <i>Myrtus communis</i> su <i>Listonella anguillarum</i> ATCC 43305 e <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> B07/8	94
3.4 Risultati ottenuti utilizzando il prodotto commerciale Macrogard	106
3.4.1 Saggi MTT condotti sulla linea cellulare primaria di leucociti	106
3.4.2 Risultati ottenuti dalla sperimentazione in vitro condotta sulla linea cellulare primaria di leucociti di derivazione branchiale	108
Capitolo IV - Conclusioni	111
Capitolo V - Bibliografia	113
Ringraziamenti	128

Premessa

L'evoluzione del mercato ittico, dal secolo scorso ad oggi, ha portato i governi dei paesi europei ed asiatici a fronteggiare diversi tipi di problemi. Dal depauperamento dell'ambiente e delle specie predate, causa delle vecchie tecniche di pesca, all'avvento dell'acquacoltura sotto forma di allevamenti sempre più intensivi con conseguenti condizioni di sovraffollamento degli animali che, unitamente a temperature inadeguate e sbalzi di salinità, hanno facilitato l'esplosione di patologie infettive, comportando perdite economiche ed inquinamento ambientale. Da qui l'esigenza di riscoprire nuovi approcci di allevamento, con l'obiettivo generale di migliorare il benessere degli animali e la salvaguardia dell'ambiente, aprendo la strada alle nuove tendenze del consumismo verde, dell'allevamento ecosostenibile e alle rigide politiche di controllo che poi sono state seguite dall'unione europea nell'ambito della bioacquacoltura.

In questo contesto, alla luce delle problematiche riguardanti la sicurezza alimentare e l'impatto ambientale, sta crescendo sempre più l'attenzione verso il potenziale espresso dalle sostanze naturali nella gestione sanitaria degli allevamenti ittici, in quanto appare indubbio che il settore dei principi naturali possa avere dei potenziali applicativi estremamente interessanti anche in acquacoltura.

La Cina, ad esempio, leader mondiale nelle produzioni di acquacoltura dolce, ha gestito da più di duemila anni le patologie degli animali acquatici utilizzando principalmente composti ottenuti da erbe e da piante.

La ricerca e l'individuazione di nuovi principi naturali efficaci e sicuri ben si inserisce come principio dell'acquacoltura biologica che prevede preferibilmente l'utilizzo di queste sostanze a quelle di sintesi chimica. In questo ambito si può quindi attingere a studi ed esperienze delle altre medicine cosiddette "non convenzionali" o complementari che impiegano sostanze naturali da centinaia di anni anche nel settore degli organismi acquatici, per i quali l'approccio è basato più sulla prevenzione che sulla terapia. È ormai comprovato che una vasta gamma di sostanze naturali, esibisca un effetto antimicrobico sui patogeni e possa essere quindi considerata una promettente alternativa ai farmaci tradizionali.

I pesci trattati con immunostimolanti di origine naturale mostrano un aumento dell'attività batteriolitica e delle cellule fagocitiche (Chen e Ainsworth, 1992), un aumento dell'attività del complemento e del lisozima e la produzione di anticorpi (Engstad et al., 1993). Anche i linfociti sembrano essere stimolati a seguito della somministrazione di immunostimolanti che aumentano l'attività mitogena indotta da lipopolisaccaridi (Hardie et al., 1991). Infine è stato anche riportato il potenziamento di attività di citochine, come l'interferone, l'Interleuchina 2 e i fattori attivanti i macrofagi (Secombes et al., 1996).

Per queste ragioni, risulta evidente la necessità di condurre studi volti a comprendere quali siano i meccanismi fisiologici e biomolecolari coinvolti nel miglioramento del benessere degli animali trattati con sostanze naturali. Lo studio di tali composti utilizzati come immunostimolanti nell'alimentazione di larve ed adulti, rappresenta un punto importante per incrementare la produttività degli impianti ittici e per lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile e compatibile con l'ambiente.

Sulla base di tali premesse, durante questi tre anni di ricerca, abbiamo deciso di testare due estratti naturali ed un prodotto commerciale, il Macrogard, costituito da betaglucani (polisaccaridi derivanti dalla parete di lieviti). In particolar modo per la sperimentazione svolta presso l'Università degli Studi della Tuscia mi sono avvalsa degli estratti di piante medicinali e per gli studi condotti presso l'Università del Nordland in Norvegia, ho utilizzato il prodotto commerciale Macrogard.

Quindi la mia attività di ricerca è stata suddivisa in due fasi ben distinte e separate ma comunque legate da un unico filo conduttore ovvero lo studio di nuovi approcci per la prevenzione di malattie negli allevamenti attraverso l'impiego di immunostimolanti naturali come terapia adiuvante nei pesci.

Nell'ambito di questa tematica, lo scopo della ricerca svolta presso l'Università della Tuscia, è stato esaminare gli effetti modulatori degli estratti di piante medicinali sul sistema immunitario dei pesci, in particolare, l'attenzione è stata focalizzata verso *Aloe arborescens* (ordine *Liliales*, famiglia *Liliacee*) e *Myrtus communis* (ordine *Myrtales*, famiglia *Myrtaceae*). In bibliografia infatti, emergono molteplici studi che rivelano come, sostanze isolate da tali piante possiedano attività farmaceutiche di tipo antiinfiammatorio (Romani et al., 2004), antiossidativo (Yagi et al., 2003; Rosa et al., 2003), antietà (Lim et al., 2003), antitumorale (Su et al., 2005) antibatterico (Alem et al., 2008; Gunduz et al., 2009), ed immunomodulatorio (Im et al., 2005). Per queste loro caratteristiche, l'Aloe e il Mirto sono già state studiate ed utilizzate da anni nella medicina tradizionale, nei probiotici e cosmetici. Proprio in virtù del fatto che queste piante vengono considerate fonte di biomolecole con prospettive in ambito chimico e farmacologico, l'Aloe e il Mirto potrebbero essere in grado di aumentare significativamente la resistenza alle infezioni delle specie ittiche allevate, con evidenti vantaggi per le aziende, la commercializzazione, l'ambiente ed il consumatore.

Date tali premesse, nella presente tesi di dottorato sono stati esaminati gli effetti immunomodulatori degli estratti vegetali ottenuti dalle piante medicinali *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* su una linea cellulare di fibroblasti di orata (SAF-1) e sono state valutate le

loro proprietà antibatteriche nei confronti di due importanti ceppi patogeni, ossia *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, agenti responsabili rispettivamente di vibriosi e pasteurellosi.

Oltre alle ricerche appena descritte, nell'ambito dell'ultimo anno di dottorato, allo scopo di approfondire la tematica generale alla base del mio dottorato, mi sono recata all'estero al fine di arricchire la mia preparazione con un periodo di formazione presso l'Aquatic Animal Health Research Group Faculty of Biosciences and Aquaculture del Bodø University College University of Nordland, nominata un anno fa l'ottava università della Norvegia. Bodø è una città della Norvegia settentrionale situata oltre il circolo polare artico nella contea di Nordland, della quale è capoluogo amministrativo e si trova a 1200 km dalla capitale Oslo. Questa città è inoltre la meta d'obbligo per chi vuole raggiungere l'arcipelago delle Lofoten, una serie di isole di grande impatto per il mercato ittico. Infatti, la maggiore risorsa economica della popolazione è stata dapprima la pesca e poi l'acquacoltura, in particolar modo di merluzzo che tra l'altro è anche la principale tipologia alimentare delle Isole.

A questo proposito non si può non tenere conto delle interazioni tra acquacoltura e ambiente, argomento di estrema importanza. Per cui allo scopo di salvaguardare la produttività di questo settore essenziale per l'economia del paese è nata, negli anni, l'esigenza di una produzione che tenga conto sia della ecocompatibilità del processo produttivo utilizzato (capacità di non interferire con gli equilibri naturali) che della sua ecosostenibilità (capacità di creare ricchezza senza alterare la rinnovabilità delle risorse biologiche) e con l'obiettivo generale di migliorare il benessere degli animali. Un'acquacoltura ecosostenibile è in grado di procurare benessere economico e sociale, garantendo la preservazione delle risorse e dell'ambiente alle generazioni future.

Ed è proprio nell'ordine di questa tematica che si inserisce il profilo di ricerca dell'Aquatic Animal Health Research Group che si basa sullo studio del sinergismo che esiste tra nutrizione, immunità ed infezione, aspetto questo ben documentato nell'uomo le cui informazioni sulle specie acquatiche sono però piuttosto frammentate. Fondamento della ricerca è l'evidenza che la maggior parte dei pesci allevati viene nutrito con diete formulate ed è naturale che gli aspetti nutrizionali abbiano una diretta influenza sulla loro competenza immunitaria e sulla loro salute. Per questi motivi l'approccio proposto dal Aquatic Animal Health Research Group sulla gestione delle malattie che colpiscono i pesci allevati è innanzitutto basato su una maggiore comprensione dei meccanismi immunitari alla base delle risposte alle infezioni e soprattutto sullo studio di come i nutrienti e le sostanze naturali bioattive possano contribuire alla difesa dalle malattie e al miglioramento della salute degli

animali, rappresentando così un punto importante per incrementare la produttività degli impianti ittici e per lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile e compatibile con l'ambiente.

Quindi nell'ambito di queste tematiche di ricerca durante i quattro mesi lì trascorsi, sotto la supervisione del prof. Kiron Viswanath ho concentrato la mia attenzione su due tra le specie ittiche più comuni e soprattutto più importanti per il settore economico ed industriale della Norvegia ovvero, il Merluzzo ed il Salmone. Gli studi condotti su questi pesci sono di particolare interesse in quanto essi rappresentano le specie più allevate e di conseguenza anche le più soggette alle malattie che colpiscono i pesci negli impianti. Come detto in precedenza, alla base della gestione di queste patologie c'è innanzitutto una maggiore comprensione dei meccanismi immunitari che regolano le risposte alle infezioni. Quindi per gli studi condotti è stato scelto un organo con un ruolo importante a livello immunitario come le branchie che per la loro posizione rappresentano una delle prime vie di ingresso per potenziali patogeni.

Durante il periodo che ho trascorso presso il laboratorio di Aquatic Animal Health, proprio in considerazione della tipologia di cellule a carattere immunitario che sono presenti nelle branchie, ho appreso tecniche di biologia cellulare come l'isolamento di popolazioni cellulari per allestimento di colture primarie che mi hanno permesso di isolare dalla totalità delle cellule solo i leucociti sui quali poi testare l'attività del Macrogard. Quest'ultimo è un prodotto commerciale costituito da beta glucani derivanti dalla parete di *S. cerevisiae*, da diversi anni utilizzato in Norvegia al fine di potenziare il sistema immunitario dei pesci allevati. Tra le varie proprietà benefiche dei beta glucani riportate in letteratura spiccano il potenziamento della protezione contro le infezioni, stimolazione delle risposte immunitarie a vari livelli, modulazione della produzione di citochine e promozione della sopravvivenza a livello cellulare, degli organi e dell'intero animale (Rodriguez et al., 2009).

Non sono presenti però in letteratura lavori che confermino tali proprietà a livello proteomico per cui lo scopo principale del mio lavoro in Norvegia è stato studiare gli eventuali effetti modulatori di beta glucani sull'assetto proteomico di leucociti isolati dalle branchie di merluzzo e salmone, così da poter dare un contributo chiarendo i meccanismi alla base di tali attività.

Capitolo I

Introduzione

1.1 Sviluppo economico del settore acquacoltura e aspetti critici

Nell'ultimo secolo, ed in particolare negli ultimi 30 anni, l'acquacoltura è sembrata una pratica sostenibile, anzi, necessaria per l'ottenimento di proteine animali che la pesca non è più in grado di assicurare a causa dello sfruttamento indiscriminato delle risorse oceaniche, in passato ritenute abbondanti e riproducibili all'infinito: le tecniche di pesca hanno incrementato la produttività ma sono state spesso incuranti delle conseguenze nel medio-lungo periodo; ciò ha notevolmente impoverito i mari, con gravi conseguenze economiche per i pescatori e con frequenti crisi alimentari per quanti trovano sostentamento dalle proteine di pesci, crostacei e molluschi. La crisi della pesca, la crescente domanda di proteine animali, i progressi tecnico-scientifici hanno quindi favorito l'affermarsi dell'acquacoltura come valido complemento della pesca in ogni parte del mondo (Mounday et al., 1992). L'acquacoltura può essere considerata come una delle attività di produzione alimentare a più alto tasso di crescita a livello mondiale, la produzione dell'acquacoltura, stimata intorno a 65 milioni di tonnellate, non ha invece mai smesso di crescere, sin dai primi anni '50. Nel mondo, oramai, si allevano più di 350 specie diverse d'acqua dolce e marina, con la maggior parte della produzione concentrata nelle regioni asiatiche ed è oggi il comparto della produzione alimentare (di origine animale) che fornisce il 43% del pesce per uso alimentare. Purtroppo, in un crescente numero di casi, le produzioni di acquacoltura sono ben lontane dall'essere sostenibili e possono causare una serie di impatti ambientali e sociali. Gli impatti dell'acquacoltura sugli ambienti naturali sono legati all'intensificazione delle attività produttive che collocano la stessa tra le attività che possono generare danni ambientali (Tancioni e Scardi, 2001). L'inquinamento che l'acquacoltura arreca all'ambiente (fiumi, laghi, mare compresi gli estuari) consiste nell'introduzione diretta od indiretta in esso di sostanze o di energia che causano effetti nocivi quali il danneggiamento di risorse biologiche, rischi per la salute pubblica, ostacoli ad altre attività, compresa la pesca, alterazione della qualità dell'acqua marina dal punto di vista della sua utilizzazione e degrado del suo valore estetico. Le sostanze inquinanti rilasciate dagli impianti di piscicoltura negli ambienti acquatici recettori sono rappresentate prevalentemente da mangime non consumato, per lo più costituito da proteine, carboidrati, vitamine e pigmenti.

I rifiuti provenienti dall'allevamento comprendono, inoltre, composti organici ed inorganici come l'urea, i fosfati ed i composti azotati e residui di sostanze utilizzate a scopi profilattici o terapeutici quali antibiotici e disinfettanti.

Inoltre, per far fronte all'aumentare del consumo procapite e la richiesta di specie ittiche è pratica comune negli impianti allevare organismi in condizione di sovraffollamento. E' noto

che queste condizioni favoriscono la diffusione e l'incremento degli agenti patogeni alcuni dei quali creano numerosi problemi negli allevamenti. Per prevenire e curare le malattie che ne derivano, sono stati introdotti nella routine degli allevamenti alcuni trattamenti antibiotici il cui uso intensivo però ha portato allo sviluppo di ceppi resistenti di batteri. Questa resistenza può essere trasferita ad altri ceppi con conseguente alterazione del genoma o trasferimento di materiale genetico tra le cellule attraverso plasmidi o batteriofagi (Gomez-Gil et al., 2000). Oltre alla comparsa di ceppi batterici antibiotico resistenti, interventi di questo genere sono responsabili anche dell'inquinamento dell'ambiente circostante e della riduzione della capacità produttiva dell'impianto, dato che è necessario rispettare i tempi di sospensione imposti per legge. Per tale ragione l'uso profilattico di questi medicinali può essere considerato un grande pericolo e per questo l'organizzazione mondiale ha posto molta attenzione alla necessaria riduzione nell'utilizzo degli antibiotici (legislazione europea COM (2002) 153-C5-0143/2002-2022/0073 COD).

Le relazioni tra acquacoltura e ambiente sono di estrema importanza, per cui nasce la necessità di una produzione che tenga conto sia della ecocompatibilità del processo produttivo utilizzato (capacità di non interferire con gli equilibri naturali) che della sua ecosostenibilità (capacità di creare ricchezza senza alterare la rinnovabilità delle risorse biologiche). Un'acquacoltura ecosostenibile è in grado di procurare benessere economico e sociale, garantendo la preservazione delle risorse e dell'ambiente alle generazioni future. Il mondo della ricerca si è da tempo messo al lavoro per implementare un modello di sviluppo sostenibile basato sulla conciliazione degli interessi economici e sociali con quelli di conservazione delle risorse naturali, sul lungo periodo.

Le nuove regole comunitarie intendono agevolare l'avvio dell'acquacoltura biologica o la conversione in biologico dall'allevamento convenzionale (Fig. 1-2) (Schiavo, 2008), l'acquacoltura biologica punta infatti ad offrire pesce ed altri prodotti ittici che siano ecologicamente, economicamente e socialmente sostenibili.

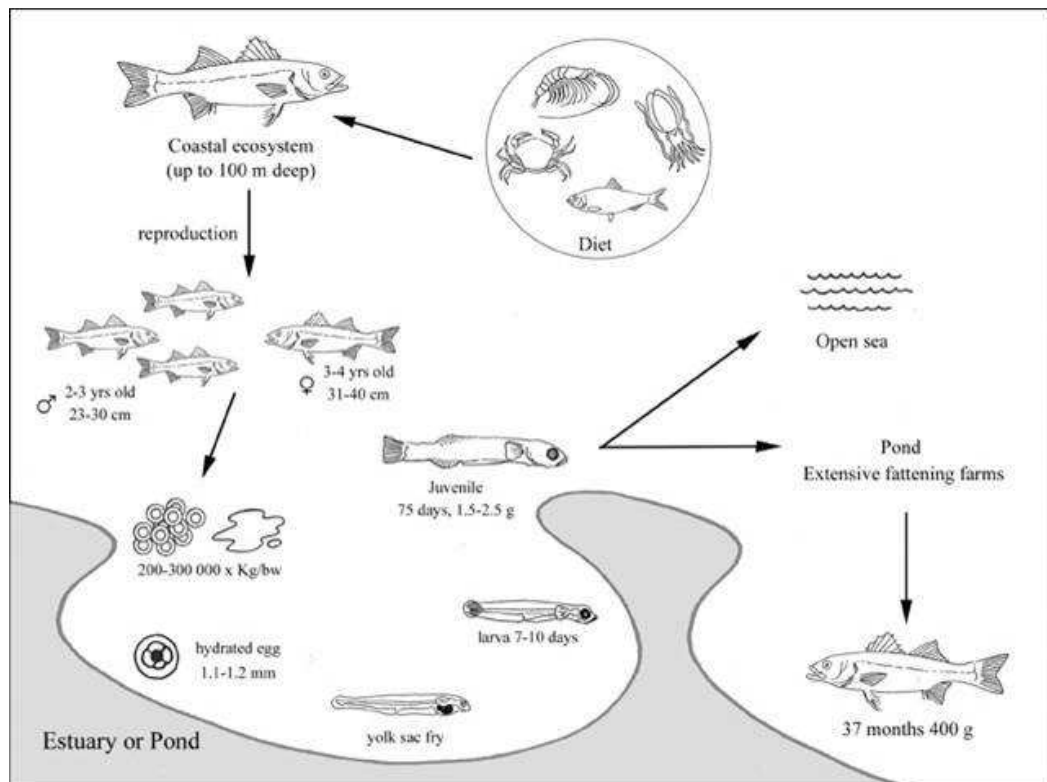


Fig. 1

Esempio di acquacoltura estensiva

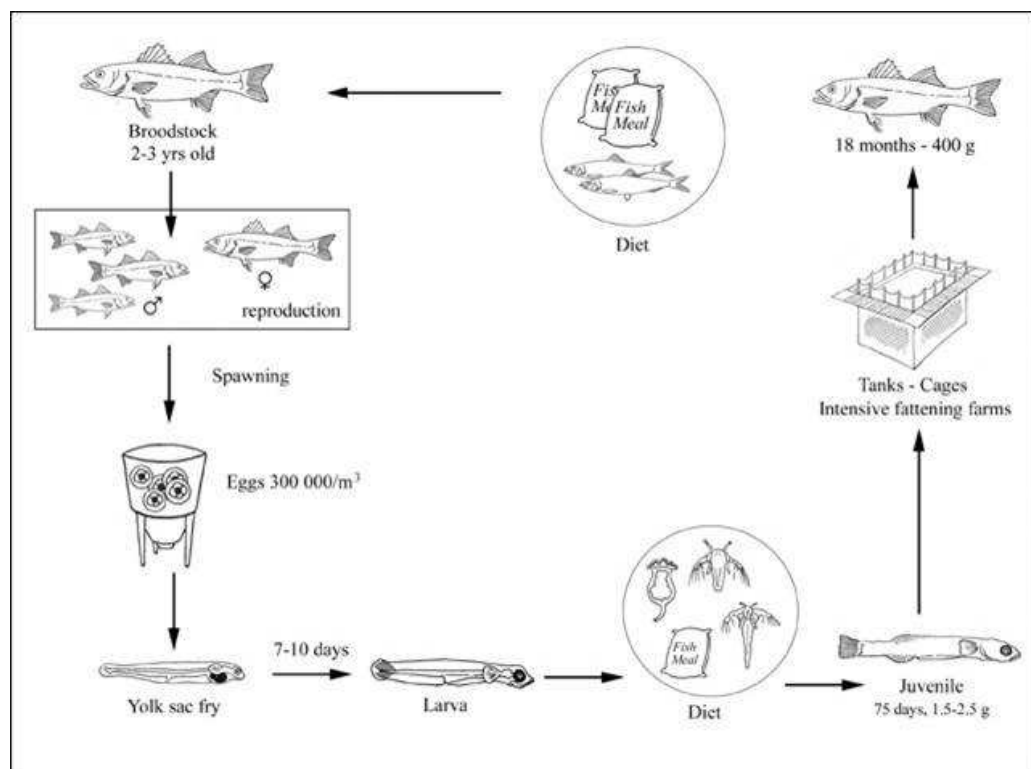


Fig. 2

Esempio di acquacoltura intensiva

1.2 Misure profilattiche adottate negli allevamenti ittici per migliorare la resistenza alle infezioni: chemioterapici, vaccini e immunostimolanti

La maggior parte delle malattie proprie dell'acquacoltura come vibriosi, pasteurellosi, lattococcosi e Yersiniosi, potrebbe essere significativamente ridotta prestando attenzione alla conduzione dell'allevamento e al mantenimento delle condizioni ambientali ottimali per i pesci. Questo però non è sempre economicamente sostenibile per le aziende e rimane comunque la difficoltà di impedire che agenti di malattie si inducano nell'allevamento.

Per limitare l'incidenza di patologie negli allevamenti ittici vengono applicati trattamenti chemioterapici, di vaccinazione o di immunostimolazione. Per quanto riguarda i chemioterapici, interventi di questo genere sono molto costosi, tuttavia la chemioterapia è largamente applicata per controllare e prevenire infezioni di natura parassitaria, batterica e fungina. Vari chemioterapici sono stati usati negli ultimi vent'anni per trattare infezioni batteriche in allevamenti di pesci. La lista di antibiotici utilizzati in Italia include: amoxicillina, clorotetraciclina, flumechina, sulfadiazina, bronopol e ossitetraciclina (Smith et al., 1994; Agnew e Barnes, 2007); tuttavia un eccesso nell'uso di chemioterapici causa un'overdose nell'animale con conseguente morte (Chong e Chao, 1969).

La chemioterapia rimane comunque un'arma efficace nei confronti degli agenti eziologici presenti negli allevamenti ittici.

Nonostante il vasto numero di farmaci potenzialmente idonei per combattere patologie che interessano specie ittiche, è estremamente ristretto il numero di molecole consentite, in quanto è fortemente criticato l'uso di chemioterapici come misura profilattica (Harikishnan et al., 2009). Oltre all'aspetto economico, l'attenzione è rivolta a: 1) problematiche di impatto ambientale dovute alla dispersione di queste sostanze nell'ecosistema acquatico; 2) sicurezza degli alimenti in relazione alla potenziale presenza di residui chimici nei tessuti degli organismi allevati (Rijkers et al., 1980); 3) trasferimento di farmaco-resistenze ai patogeni per l'uomo. Infatti un eccessivo e non controllato uso di microbicidi ha causato lo sviluppo di meccanismi di antibiotico-resistenza in alcune specie di patogeni, con potenziali rischi del passaggio della resistenza all'uomo (Smith et al., 1994; Cabello, 2006).

Pertanto per ovviare a queste difficoltà ed evitare il ricorso all'uso di sostanze inibenti in seguito al divieto sancito dalla Comunità Europea nel 2006 all'utilizzo degli antibiotici come promotori della crescita, recentemente nuovi spazi di ricerca e sperimentazione sono stati volti allo sviluppo di vaccini e di sostanze immunostimolanti con l'obiettivo di potenziare i meccanismi di protezione dell'animale o, nel migliore dei casi, essere sostitutive o integrative all'impiego di antibiotici.

In questa ottica la vaccinazione rappresenta senza dubbio l'approccio più efficace per il controllo di infezioni e malattie e anche per ridurre significativamente l'impiego di antibiotici (Sakai, 1999). I primi successi nella vaccinazione del pesce risalgono a circa 40 anni fa, quando vennero ottenuti i primi risultati positivi nella vaccinazione della trota fario contro l'*Aeromonas salmonicida* (agente eziologico della Foruncolosi). La vaccinazione si colloca nel ciclo produttivo come mezzo capace di fornire all'allevatore migliori condizioni operative. I vaccini commerciabili attualmente disponibili (reperibili sul mercato internazionale) riguardano solamente alcune malattie batteriche quali Vibriosi, Bocca Rossa e Foruncolosi. Diversi vaccini sperimentali sono tuttora in fase di studio: contro malattie virali (Setticemia Emorragica Virale, Necrosi Pancreatica Infettiva etc...); contro malattie batteriche (Eritrodermatite della carpa, Setticemia Enterica, Pasteurellosi e Pseudotubercolosi della seriola etc...) e contro malattie parassitarie (Ictiofitiriasi e Saprolegnosi). I vaccini possono essere somministrati ai pesci per penetrazione forzata o per assorbimento naturale. I principali metodi sono: 1) per iniezione (il vaccino è iniettato per via intramuscolare, intracelomatica o intracardiaca e non è praticabile su soggetti di piccola taglia); 2) per nebulizzazione (consiste nella spruzzatura della soluzione vaccinale sul corpo del pesce momentaneamente estratto dall'acqua); 3) per via orale (il vaccino, mescolato all'alimento, viene assorbito dall'apparato digerente del pesce); 4) per immersione (il metodo si basa sulla naturale capacità del pesce di assorbire acqua, mediante le aperture cutanee e branchiali, dall'ambiente circostante).

La risposta anticorpale indotta dal vaccino è influenzata da diversi parametri quali l'età del pesce (la risposta immunitaria è più intensa e duratura quanto maggiore è l'età del pesce), la tecnica di somministrazione del vaccino (tra le tecniche descritte il bagno normo-osmotico sembra essere quella consigliabile se si vogliono vaccinare molti pesci di piccola taglia), il tempo di contatto tra pesce e la soluzione vaccinale, la temperatura dell'acqua al momento della vaccinazione e il tipo di antigene. In realtà vaccinazioni veramente attive sono disponibili solo per un numero molto limitato di patologie batteriche, data la complessità della struttura antigenica dei patogeni; inoltre lo sviluppo di vaccini contro patogeni intracellulari non ha ancora avuto successo (Kennedy et al., 2006).

Pertanto recentemente la ricerca si sta orientando verso un uso sempre più ampio di sostanze ad azione immunostimolante ossia sostanze in grado di modulare il sistema immunitario andando ad agire sulla funzione di uno o più componenti di quest'ultimo. Somministrare ai pesci sostanze con effetto immunostimolante risulta essere un metodo molto promettente nel controllare le malattie in acquacoltura (Raa et al., 1992; Robertsen, 1999), in alternativa alla chemioterapia e ai vaccini (Secombes, 1994; Anderson, 1999), in quanto presentano un largo

spettro di attività e possono essere usate come trattamento preventivo efficace ed eco-friendly contro patologie (Harikishnan et al., 2011). L'immunomodulazione dei pesci allo stadio larvale, ad esempio, è stato proposto come metodo efficace per aumentare la sopravvivenza agendo sulla risposta innata dell'animale finché i meccanismi di difesa specifici non siano sufficientemente sviluppati all'effettiva risposta al patogeno.

Esistono molte sostanze con effetto immunostimolante ma non sempre la loro attività è chiara o provata; attualmente si stanno conducendo studi per ricercare un valido sistema di valutazione della loro efficacia. La loro azione dipende da dose, modalità di somministrazione e da variabili ambientali e fisiologiche (temperatura, età, fase di crescita etc.). Queste sostanze, utilizzate come additivi nei mangimi, sembrano produrre una maggiore attivazione dei macrofagi ed un potenziamento di molti parametri del sistema immunitario innato come: lisozima, complemento, specie reattive dell'ossigeno e del nitrogeno, antiproteasi, fenolossidasi, glutatione perossidasi etc. (Harikrishnan et al., 2011); inoltre sono in grado di stimolare la risposta anticorpale. L'attivazione di queste funzioni immunologiche si associa ad una migliore protezione da malattie infettive, e resistenza a batteri patogeni come *Listonella anguillarum*, *Aeromonas salmonicidas* e *Yersinia ruckeri* (Sakai et al., 1999). Caratteristica peculiare degli immunomodulatori è di determinare una risposta rapida e di breve durata. Tra le sostanze che possono essere utilizzate come immunostimolanti troviamo: prodotti di derivazione batterica, glucani, vitamine, citochine, farmaci immunostimolanti (levamisolo), lecitine ed estratti vegetali.

Gli immunostimolanti possono essere somministrati ai pesci attraverso iniezione intraperitoneale oppure oralmente attraverso la dieta, metodo quest'ultimo che risulta essere decisamente più pratico (Jeney e Anderson, 1993a, 1993b; Mulero et al., 1998a, 1998b; Sakai, 1999; Yin et al., 2006). Il metodo diretto dell'iniezione intraperitoneale è il metodo di somministrazione più rapido ed effettivo; in acquacoltura gli immunostimolanti sono solitamente somministrati secondo questa metodica sebbene risulti essere fonte di grande stress per l'animale (Ainsworth, 1994; Yoshida et al., 1995; Duncan e Klesius, 1996a, 1996b). Altra caratteristica che fa dell'iniezione il metodo più efficace per la somministrazione di immunostimolanti è la rapidità di assorbimento delle sostanze da parte dell'animale che con la dieta sarebbe notevolmente più lenta (Yoshida, 1995). Sebbene l'iniezione diretta di sostanze possa presentare questi vantaggi, è un metodo stressante per l'animale e che richiede tempo, inoltre diventa impraticabile fino a quando il peso dei pesci non supera i 15 grammi. È per questo che la somministrazione di sostanze per via orale rappresenta un'utile alternativa all'iniezione nella somministrazione di massa ai pesci di tutte le taglie (Selvaraj et al., 2005).

Infatti l'incorporazione nella dieta di immunostimolanti non richiede molto tempo, è semplice ma soprattutto non prevede uno stress nell'animale e permette ad un gran numero di esemplari di poter essere trattati con il minimo costo e sforzo (Blazer, 1992; Anderson, 1992; Siwicki et al., 1994; Esteban et al., 2001).

Gli effetti degli immunostimolanti in l'acquacoltura dipendono da vari fattori come il tempo, il dosaggio, il metodo di somministrazione e le condizioni fisiologiche in cui si trovano i pesci. Inoltre l'effetto è dosaggio dipendente per cui ci sono stati casi di overdose (Kajita et al., 1990) ma anche casi in cui la sostanza immunoprotettiva non è efficace in tutti gli stadi di sviluppo del pesce (Huttenhuis, 2006). Ad esempio Kajita e collaboratori (1990) hanno dimostrato sperimentalmente che iniettando levamisole nel salmone alle concentrazioni di 0,1/0,5 mg/kg, si osserva un incremento delle cellule fagocitiche. Inoltre si è visto che somministrando nella dieta di salmone infettato da *L. anguillarum* una certa concentrazione di peptidoglicano per un periodo di 30 giorni, l'animale mostrava un potenziamento del sistema immunitario che però non è riscontrabile se la sostanza viene somministrata per un periodo più lungo (Matsuo e Miyazano, 1993). Non è ancora chiara la ragione per cui la somministrazione a lungo termine di sostanze immunostimolanti riduca la loro efficacia, è per questo che la dose e la durata del periodo di somministrazione debbano essere chiaramente definiti per ogni tipo di immunostimolante.

1.3 Il biologico: una nuova opportunità per l'acquacoltura

La FAO prevede che nel 2030 la produzione globale di pesce dovrà aumentare di altri 40 milioni di tonnellate, per soddisfare l'eccezionale aumento della domanda. Ciò comporterà un raddoppiamento della produzione di pesce da allevamento, con conseguente aumento della contaminazione ambientale, che rappresenta uno dei maggiori problemi delle attività di acquacoltura: acque reflue, deiezioni animali, mangime non consumato e residui di farmaci o disinfettanti eventualmente utilizzati che possono rimanere sia nell'ambiente che nei tessuti dei pesci; inoltre, il mangime, se non adeguatamente controllato, può veicolare contaminanti chimici ambientali, come metalli pesanti, e diossine. L'acquacoltura implica anche uno sfruttamento consistente delle risorse idriche sia per via diretta, come nel caso degli impianti off-shore in cui la popolazione ittica è allevata direttamente in mare, sia per via indiretta, come nel caso degli impianti a terra in cui l'allevamento avviene in vasche artificiali alimentate attraverso sistemi di captazione dell'acqua a mare. Da non dimenticare è il rischio di interazione genetica di animali fuoriusciti dalle gabbie con le popolazioni selvatiche della stessa specie. Una possibile soluzione agli impatti ambientali esercitati dalle attività di

allevamento di specie ittiche è l'acquacoltura biologica, che, oltre a tutelare maggiormente l'ambiente marino, offre al consumatore garanzie sulla qualità organolettica del prodotto. Il sistema si basa infatti su un rigoroso controllo di tutte le fasi di produzione del pesce, in impianti strutturati in modo da mantenere inalterate le caratteristiche del territorio circostante, mantenendo un alto livello di salute e benessere degli organismi allevati e interferendo il meno possibile sul comportamento naturale degli animali. Attualmente, sia in Italia che in Europa si sta verificando una crescente attenzione dei piscicoltori verso le problematiche della produzione biologica. Il Reg. (CE) n. 834/2007, Titolo II, Articolo 3 stabilisce che l'agricoltura biologica, in via di principio, "rispetta i sistemi ed i cicli della natura, sostiene e migliora la salute di suolo, acqua, piante e animali e l'equilibrio tra loro". Inoltre, il regolamento (CE) n. 710/2009, nel Recital 5, evidenzia il bisogno di sviluppare una sensibilità ambientale nell'acquacoltura e richiama la legislazione ambientale a cui l'acquacoltura biologica è sottoposta. Le principali caratteristiche dell'acquacoltura biologica sono (Biao, 2008):

- Sistema di produzione estensivo, allevamenti a bassa densità
- Monitoraggio ambientale e utilizzo del management ambientale per migliorare i processi tenendo conto dell'ecosistema naturale
- Minimizzazione di inquinamento chimico o dovuto ai mangimi
- Riciclaggio e rigenerazione dei nutrienti
- Allevamento di specie acquatiche endemiche, favorendo anche la policoltura, ovvero l'allevamento nella stessa unità di coltura di specie che appartengono a differenti livelli trofici
- Proibizione dell'uso di additivi chimici e antibiotici
- Piano di produzione a lungo termine per uno sviluppo sostenibile dell'allevamento
- Mantenere l'allevamento entro i limiti della sostenibilità dell'area naturale.

Oggi, quindi, sempre più attenzione viene data alla produzione dell'acquacoltura biologica e ai principi su cui si fonda: la salvaguardia dell'ambiente, un elevato livello di biodiversità, la tutela del benessere dei pesci allevati e la più accentuata protezione del consumatore (Fig. 3).

Proprio in accordo con questi principi ed alla luce delle problematiche e dei limiti dell'acquacoltura convenzionale descritti, appare chiaro il perché negli ultimi anni sia cresciuta l'attenzione verso il potenziale espresso dalle sostanze naturali come immunostimolanti per le loro possibili applicazioni in acquacoltura.

**Fig. 3**

Un impianto di acquacoltura biologica nell'Oceano Atlantico

Questi trattamenti si basano sul principio che una delle possibili strategie attuabili per contribuire alla difesa dalle malattie e al miglioramento della salute degli animali è quella di potenziare il sistema immunitario dei pesci allevati relativamente al quale farò una sintetica descrizione.

1.4 Il sistema immunitario dei Teleostei

Il sistema immunitario dei pesci Teleostei è in grado di difendere l'organismo contro agenti infettivi o patogeni mediante l'interazione di popolazioni linfocitarie e l'espressione di molecole specifiche. Esso mostra tutti gli aspetti di base che verranno poi sviluppati nei Vertebrati più evoluti e comprende organi e tessuti linfoidei come il timo, il rene, la milza, i tessuti mucosali associati alla pelle, alle branchie e all'intestino (Tatner, 1996); Zapata et al., 1996; Abelli et al., 1996). Come nei Mammiferi lo sviluppo e l'attivazione funzionale dei linfociti dei pesci sembra avvenire in microambienti specializzati a partire da cellule staminali progenitrici. Le sottopopolazioni leucocitarie comprendono le cellule B e le plasmacellule (Irwin et al., 1986), le cellule T (Lin et al., 1992; Scapigliati et al., 1995; Abelli et al., 1996), i granulociti (Ainsworth, 1992; Hine, 1992; Verburg-van Kemenade et al., 1995), i monociti/macrofagi (Mesenguer et al., 1991; Hardie et al., 1994; Sveinbjornsson et al., 1994),

le cellule citotossiche non specifiche (NCC) (Evans et al., 1992; Hogan et al., 1996) e i trombociti (Esteban et al., 1989; Rombout et al., 1996). Monociti/macrofagi, trombociti, granulociti neutrofili ed in parte le NCC, rappresentano il sistema immunitario che agisce in maniera aspecifica. In particolare, i monociti/macrofagi e i neutrofili sono deputati all'attività di fagocitosi (Mac Artur and Fletcher, 1985), mentre alle NCC è affidato il compito di svolgere attività cellulare tossica non specifica (Jaso-Friedman e Evans, 1999). I linfociti B e T sono, invece, le popolazioni cellulari che sono attivate in modo differenziato da specifici antigeni e rappresentano la linea di difesa immunitaria di tipo specifico. I linfociti T costituiscono, inoltre, la popolazione cellulare che riconosce componenti propri dell'organismo rispetto agli estranei, risultando importanti nella regolazione della risposta immunitaria di tutti i Vertebrati, compresi i pesci (Nakanishi et al., 2001; Nam et al., 2002).

I Teleostei presentano due tipi principali di immunità: innata (non specifica) e adattativa (risposte cellulari ed umorali indotte dall'antigene, con caratteristiche di specificità e memoria) (Scapigliati et al., 2000). Tale divisione tra i due sistemi non è così netta in quanto il sistema immunitario innato, oltre ad essere di primaria importanza nel combattere le infezioni nei pesci, è anche importante nell'attivazione della risposta immunitaria acquisita (Fearon et al., 1997; Carrol et al., 1998; Vilmos et al., 1998). La stretta relazione tra sistema innato ed acquisito ha ricevuto una particolare attenzione nella ricerca sui Mammiferi. L'attivazione dei componenti del sistema di riconoscimento innato come la stimolazione di fagociti, la produzione di citochine e chemochine, l'attivazione del sistema del complemento e di vari recettori, stimolano le cellule T e B e le cellule presentanti l'antigene (Lo et al., 1999). Sebbene nei pesci siano stati effettuati limitati studi a riguardo, si pensa sia presente in essi una simile comunicazione tra sistema innato ed acquisito (Dixon et al., 2001).

1.4.1 Immunità innata dei Teleostei

Per definizione la risposta immunitaria di tipo innato opera sulla base di recettori specifici denominati PRRs (pattern- recognition receptors) che riconoscono motivi microbici conservati conosciuti come PAMPs ovvero pathogen associated molecular patterns (Akira e Takeda 2004). Queste molecole includono polisaccaridi, lipopolisaccaridi (LPS), peptidoglicani, DNA batterico, RNA virale a doppio filamento e altre molecole, tutti motivi essenziali per la biologia degli agenti patogeni che di conseguenza sono altamente conservati (Medzhitov et al., 2002; Elward et al., 2003). Nei mammiferi ed anche nei pesci, il riconoscimento di queste strutture induce segnali che risultano nella produzione di citochine pro infiammatorie e radicali dell'ossigeno. I recettori Toll-like (TLRs) sono i maggiori PRRs

nel riconoscimento dei componenti microbici e nell'induzione della risposta immune. E' stato recentemente dimostrato in vari lavori (Oshiumi et al., 2003; Jault et al., 2004; Meijer et al., 2004; Sepulcre et al., 2006) come anche nei pesci (Takifugu, zebrafish, orata) in seguito a stimolazione attraverso simulatori di infezioni virali (poly I:C) o batteriche (LPS) si innescano tutta una serie di risposte che coinvolgono il sistema immunitario e che ricalcano quelle già osservate nei mammiferi.

Nei pesci, il sistema immunitario innato consiste di barriere superficiali, di componenti cellulari e di parametri umorali, che possono essere o recettori associati a cellule o molecole solubili del plasma o di altri fluidi del corpo.

Le cellule coinvolte nella risposta innata sono i fagociti (granulociti neutrofili, monociti e macrofagi), le cellule natural-killer (NK) e le cellule citotossiche non-specifiche (NCCs) ma anche altre tipologie cellulari che producono molecole immunoregatorie coinvolte nell'immunità innata, come le cellule epiteliali dendritiche (Guery et al., 1995) e i fibroblasti (Elbe et al., 1995). La fagocitosi di particelle estranee compiuta da neutrofili, monociti e macrofagi, è un'attività innata fisiologica compiuta da alcune tipologie cellulari appartenenti a tutte le specie di Metazoi finora investigate (Randelli et al., 2008). Essa è di particolare importanza nell'immunità innata per l'eliminazione di particelle opsonizzate e non (Verho et al., 2005), inoltre gioca un ruolo nell'immunità acquisita nella presentazione di antigeni, derivati da patogeni fagocitati e processati, ad altre cellule del sistema immunitario (Savina et al., 2007). Da studi condotti sulla spigola è emerso che i macrofagi peritoneali hanno maggiore capacità di fagocitare i batteri rispetto ai monociti isolati dal sangue, che a loro volta hanno maggiori capacità fagocitiche rispetto alle cellule isolate dal rene cefalico. Di particolare interesse è la recente scoperta che le cellule B dei pesci possono compiere fagocitosi, attribuendo un nuovo ruolo ai linfociti nell'immunità innata (Li et al., 2006). Anche i granulociti possono effettuare la fagocitosi, se pure ridotta rispetto a quella dei macrofagi. Nei granulociti di molti pesci sono state evidenziati i seguenti enzimi: fosfatasi alcalina e acida, cloro acetato esterasi, perossidasi e lisozima. Le cellule non specifiche che presentano citotossicità (NCC) invece sono capaci di uccidere i loro bersagli inducendo necrosi e apoptosi in modo molto simile a come fanno le cellule citotossiche dei Mammiferi (Mesenguer et al., 1996). Sia le cellule NK di questi ultimi che le NCC sono attivate da linfocine (Ruiz et al., 2001), necessitano del contatto diretto con la cellula bersaglio (Evans e Cooper, 1990) e, come conseguenza di questa interazione, presentano cambiamenti ultrastrutturali nell'area di contatto tra le cellule (Mulero et al., 1994). Una differenza tra le NK e le NCC è emersa da studi sulla cinetica della lisi di cellule tumorali condotti sull'orata,

da cui si evince che la velocità di azione delle NCC è inferiore a quella con cui agiscono le NK (Cuesta et al., 2002). Nei Teleostei tutte le NCC hanno mostrato esprimere sulla loro superficie un recettore, NCCRP-1, che determina il contatto fra la cellula citotossica ed il suo target (cellula tumorale o protozoo parassita) per indurre il ciclo litico dello stesso target (Jaso-Friedman et al., 1997).

Le molecole coinvolte nell'immunità innata invece sono le citochine, le chemochine, il complemento, gli inibitori della crescita come la transferrina, e l'interferone, gli enzimi litici (lisozima, catepsina e chitinasi), le lectine e i recettori Toll-like (Magor e Magor, 2001). Tra queste molecole una fondamentale classe è rappresentata dalle citochine che svolgono un ruolo centrale nei sistemi di difesa sia innato che acquisito. L'elevato grado di conservazione delle loro proprietà tra i vari gruppi animali indica come tali proteine siano fattori altamente conservati nel corso dell'evoluzione. Sono molecole proteiche prodotte da vari tipi di cellule secrete nel mezzo circostante di solito in risposta ad uno stimolo, ed in grado di modificare il comportamento di altre cellule inducendo nuove attività come crescita, differenziazione e morte. Tra le citochine secrete nei pesci ricordiamo: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α . Le chemochine invece sono una piccola famiglia di proteine inducibili pro-infiammatorie che dirigono la migrazione e l'attivazione di specifici tipi cellulari mediante l'interazione con i loro recettori. Le varie classi di chemochine vengono divise in base alla disposizione lungo la sequenza dei residui di cisteina. I recettori delle chemochine appartengono ad una classe ben nota di proteine trans-membrana, definite anche "serpentine" o recettori multipasso, che presentano sette domini trans-membrana e sono accoppiate a proteine G intracellulari. Ci sono evidenze che mostrano che vi è una considerevole ridondanza nelle interazioni chemochina-recettore: la maggior parte dei recettori può legare più di una chemochina e viceversa. Tra le chemochine e i recettori clonati nei pesci ricordiamo: CK-1 (Dixon et al., 1998; Fijiki et al., 2000), CC, CCR-7 (Daniel et al., 1999), CXC (Nam et al., 2000), CXCR-4 (Daniel et al., 1999), CXCR-1/CXCR-2 (Fijiki et al., 2000). Anche il complemento è un sistema biologico di difesa aspecifico che assicura un'efficace protezione contro infezioni sostenute da vari microorganismi; è una parte essenziale dell'immunità innata responsabile della mediazione delle risposte infiammatorie, dell'attivazione delle cellule fagocitarie, dell'opsonizzazione delle particelle e la lisi della membrana cellulare. L'attivazione del complemento può avvenire secondo tre vie: la via classica la via alternativa e la via delle lectine. I Teleostei possiedono un efficiente sistema del complemento (Sunyer e Tort, 1994), capace di lisare, in alcune specie di pesci, una varietà di eritrociti (di pecora, di coniglio, di cane e di capra), attraverso la via alternativa (Sunyer e

Tort, 1995). Una delle proprietà più interessanti del complemento dei Teleostei è che alcune delle sue componenti (C3 e fattore B) sono presenti in isoforme multiple, prodotte da geni differenti, e che queste differiscono nella struttura e nella funzione, aumentando così il numero dei potenziale patogeni che può riconoscere (Nakao et al., 2000; Zarkardis et al., 2001). Un altro parametro importante del sistema innato è la transferrina che agisce come inibitore di crescita dei batteri legando il ferro libero nel sangue essenziale per la vita dei batteri (Langston et al., 2001). La transferrina è anche una proteina della fase acuta richiesta durante le risposte infiammatorie per rimuovere il ferro dai tessuti danneggiati (Bayne et al., 2001) e un attivatore dei macrofagi dei pesci (Stafford et al., 2001). L'interferone (IFN) è un altro inibitore della crescita. La sua importanza antivirale è stata dimostrata nella carpa e nella trota iridea. Nei pesci sono stati isolati: l'IFN α , l'IFN β e l'IFN γ . In particolar modo la risposta mediata da Interferone α/β , citochina prodotta da leucociti e fibroblasti, è critica per la protezione dell'ospite contro la replicazione diffusa di vari virus, soprattutto grazie all'attivazione trascrizionale di geni che codificano per proteine antivirali (ISGs) (Der et al., 1998; de Veer et al., 2001). L'attività antivirale indotta da l'interferone α/β rappresenta un meccanismo tramite il quale le cellule che espongono tali interferoni sono difese dal virus che penetra nel citoplasma, producendo proteine antivirali che in parte favoriscono la degradazione degli RNA messaggeri del virus ed in parte inibiscono la sintesi delle proteine virali. Contemporaneamente all'induzione dell'attività antivirale l'interferone α/β esercita molteplici effetti modulatori sulla risposta immune innata e acquisita, aumentando il potenziale delle cellule NK di individuare e uccidere le cellule infette (Biron et al., 1999), aumentando l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I promuovendo la presentazione dell'antigene (Fellous et al., 1982), promuovendo la sopravvivenza delle cellule T (Marrack et al., 1999), stimolando la maturazione delle cellule dendritiche (Buelens et al., 2002), mediando l'apoptosi di cellule infettate da virus (Samuel 2001) ed inibendo la proliferazione cellulare (Stark et al., 1998). La myxovirus resistance protein (MX) è una proteina indotta da IFN in grado di prevenire la crescita sia *in vitro* che *in vivo* di certe classi di virus. Si è ipotizzato che le proteine MX prevengano la replicazione virale inibendo il passaggio intracellulare dei nucleocapsidi virali (Haller et al., 2004).

Per quanto riguarda invece la protezione dell'ospite contro la replicazione diffusa di batteri, è importante ricordare che le infezioni di natura batterica nei Teleostei, così come nei Mammiferi, sono uno degli stimoli più comuni per l'insorgenza dell'infiammazione. L'infiammazione è un meccanismo di difesa non specifico innato, che costituisce una risposta protettiva, il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa iniziale di danno cellulare o

tissutale. È indotta dai recettori Toll-like, che sono in grado di riconoscere organismi estranei (*non-self*) e scatenare la risposta immunitaria con conseguente infiammazione.

Le fasi effettrici dell'immunità innata che si esprimono nella risposta a carattere *sistemico* al danno cellulare o alla presenza di patogeni e nella risposta infiammatoria, sono in larga misura mediate dalle citochine, messaggeri polipeptidici di piccole dimensioni del peso molecolare che va dagli 8 agli 80 kD. Le citochine vengono secrete da cellule (endoteli, linfociti, macrofagi, fibroblasti ecc.) attivate da stimoli infiammatori, ed esplicano la loro azione mediante legame con specifici recettori di membrana. Tale legame determina la trasduzione del segnale dal citoplasma al nucleo influenzando l'espressione genica. Le prime fasi dell'infiammazione sono caratterizzate dalla sintesi e liberazione di peculiari citochine. Esse sono in grado di attivare ed orchestrare i vari meccanismi difensivi dell'organismo e preparare i fenomeni riparativi. Tali citochine sono l'Interleuchina-1 β (IL-1 β), il Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) l'interleuchina-6 (IL-6) che costituiscono la cosiddetta "*triade pro-infiammatoria*" ed altri mediatori dell'infiammazione, come l'enzima COX-2 e molecole anti-infiammatorie (IL-10, TGF- β). Tali citochine, conosciute da tempo nei mammiferi sia sotto il profilo biochimico-molecolare sia sotto quello funzionale, sono state recentemente identificate e clonate anche nei pesci. Negli ultimi anni infatti, gli studi condotti sui pesci hanno permesso di individuare e chiarire il ruolo del network di citochine prodotte in questi animali (Bird et al., 2006; Savan et al., 2006).

Per quanto riguarda l'IL-1 β questa citochina viene prodotta in risposta a infezioni batteriche, stimolata soprattutto dall'LPS, ma è anche prodotta in presenza di TNF e per l'interazione delle cellule produttrici con linfociti T CD4⁺.

L'IL-1 β è stata una delle prime ad essere clonata e studiata dal punto di vista biochimico in diverse specie di pesce (Zou et al., 1999; Pelegri et al., 2004; Hong et al., 2004; Wang et al., 2009) inclusi i pesci cartilaginei (Bird et al., 2002); essa mostra in parte una certa omologia con quella di animali superiori, infatti presenta il 25-30% di identità strutturale con le corrispondenti Interleuchine dei Mammiferi. Tuttavia anche la percentuale di identità molecolare tra diverse specie ittiche risulta piuttosto bassa (circa 30%), mentre la struttura tridimensionale della molecola è molto conservata sia tra le specie ittiche che tra queste e le IL-1 di mammifero.

Attualmente si conoscono due forme di IL-1 β nei pesci: IL-1 β I e IL-1 β II, osservate in varie specie tra cui la carpa e la trota (Pleguezuelos et al., 2000; Engelsma et al., 2003). Nella trota arcobaleno sono stati sequenziati anche i recettori IL-1 β -RI e IL-1 β -RII (Sangrado et al., 2000; Metz et al., 2006).

Le funzioni del tumor necrosis factor alfa (TNF α) si sovrappongono largamente a quelle dell'IL-1 con la quale spesso agisce sinergicamente. Il TNF α viene definita come una potente citochina pro-infiammatoria rilasciata da diverse cellule immuni durante un'infezione o un danno tissutale che è coinvolta in molte condizioni infiammatorie ed infettive. Probabilmente una delle principali funzioni del TNF α è il reclutamento leucocitario ovvero la regolazione delle interazioni tra l'endotelio ed i leucociti attraverso l'up-regolazione delle molecole di adesione endoteliale (selectine P ed E; ICAM-1) che agiscono riducendo la velocità dei leucociti durante il rolling nelle venule postcapillari promuovendone la fuoriuscita dal vaso e la seguente migrazione verso il sito di infiammazione (Mulligan et al., 1993; Henninger et al., 1997; Jung et al., 1997).

Si conoscono 2 recettori per il TNF (TNF-R1 e TNF-R2) che attivano segnali intracellulari differenti: gli effetti biologici del TNF-R1 inducono l'apoptosi mediante l'attivazione dei fattori di trascrizione NF-kB.

Il TNF- α è stato recentemente sequenziato in varie specie di pesce (Zou et al., 2003); in alcune di esse presenta una omologia strutturale del 25-30% rispetto al TNF- α di mammifero, e tra loro un'identità strutturale del 50%.

Recenti studi condotti su zebrafish e orata hanno aiutato a capire il principale ruolo del TNF- α nella risposta infiammatoria. Questo consiste nell'attivare le cellule endoteliali, promuovendo l'espressione di E-selectina e di chemochine e nel reclutare ed attivare le cellule fagocitiche (Roca et al., 2008). Inoltre questa citochina è in grado di stimolare l'espressione di MHC di classe I e II e di CD48 nelle cellule endoteliali, il che farebbe ipotizzare un eventuale ruolo di questa popolazione cellulare, stimolata dal TNF- α , nella presentazione dell'antigene (Roca et al., 2008).

Insieme all'IL-1 ed al TNF- α svolge un ruolo importante nel modulare la risposta infiammatoria e nell'indurre la sintesi delle proteine di fase acuta da parte degli epatociti. Concorre alla differenziazione dei linfociti T helper, diminuisce il reclutamento di neutrofili nel sito infiammato e incrementa quello dei macrofagi.

Recentemente un omologo della molecola è stato clonato nei teleostei (*Fugu rubripes*). In tale specie, la molecola presenta una bassa omologia strutturale con altre IL-6 conosciute (26% circa); in corso di flogosi è prodotta anche a livello branchiale, intestinale e splenico.

Altro componente responsabile dell'infiammazione è l'acido grasso ciclossigenasi (COX) o "prostaglandina endoperossido sintasi 2" (PGH sintasi) ovvero il primo enzima coinvolto nella sintesi delle prostaglandine che catalizza la trasformazione dell'acido arachidonico negli intermedi endoperossidi instabili PGG₂ e PGH₂ che sono precursori di vari eicosanoidi

(prostaglandine, leucotrieni, trombossani) infiammatori. La COX-2 rappresenta la forma inducibile dell'enzima che viene prodotto occasionalmente nelle cellule coinvolte nella risposta infiammatoria o immunitaria. Essa causa dolore e gonfiore in risposta ad un danno fisico o ad un'infezione, aumenta la permeabilità delle pareti dei vasi sanguigni e fa giungere le cellule del sistema immunitario al tessuto danneggiato. La ciclossigenasi aggiunge due molecole di ossigeno all'acido arachidonico, cominciando una serie di reazioni che produrranno, alla fine, una varietà di prostaglandine diverse, il rilascio di citochine e fattori di crescita che porteranno ad una severa infiammazione (Ishikawa et al., 2007).

Sfortunatamente non si conosce ancora molto circa le funzioni dell'enzima COX-2 in Vertebrati non Mammiferi inclusi i pesci. I cDNA di COX-2 sono stati clonati in Teleostei come la trota (*Onchorynchus mykiss*) (Zou et al., 1999) e lo zebrafish (*Danio rerio*) (Grosser et al., 2002), dimostrando che anche i Teleostei possono produrre l'enzima (Jarving et al., 2004) geneticamente e funzionalmente correlato al gene ortologo di mammifero.

Durante i processi infiammatori vengono anche prodotte citochine ad attività antinfiammatoria ed immunosoppressiva come IL-10 e TGF- β , il cui principale ruolo è quello di inibire i processi infiammatori consentendo l'angiogenesi e facilitando i processi riparativi attraverso il rilascio di vari mediatori. Queste citochine ostacolano il differenziamento dei linfociti T verso il fenotipo protettivo inducendo, viceversa, la differenziazione dei linfociti Th2 e/o di cellule T regolatorie, una sottopopolazione di linfociti T immunosoppressivi che si originano in presenza di TGF- β (Mills 2008.).

La citochina TGF- β viene prodotta anche nei pesci, espresso soprattutto a livello dell'epidermide, del rene cefalico e della milza. Si è visto che la sua espressione può venire up-regolata nei macrofagi trattati con LPS (Haddad et al., 2008). Nei pesci il TGF- β , gioca un ruolo importante nella proliferazione linfocitaria (Yang et al., 2008), attiva la risposta rigenerativa e proliferativa a seguito di un danno tissutale ed è in grado di down-regolare la produzione di ossido nitrico nei macrofagi stimolati con TN-F α (Haddad et al., 2008).

Tra le molecole coinvolte nell'immunità innata ricordiamo anche vari enzimi litici, che possono agire singolarmente oppure a cascata, sono importanti elementi di difesa specialmente contro i batteri. Nei pesci sono stati identificati il lisozima, la catepsina, la chitinasi e altri enzimi batteriolitici trovati nei tessuti e nei fluidi del loro corpo (Alexander et al., 1992). In particolare il lisozima è un importante parametro della difesa immunitaria. È un battericida, ossia idrolizza il legame β -glicosidico dei peptidoglicani della parete cellulare dei batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi, provocandone la lisi (Medzhitov et al., 1998). Il lisozima attiva il sistema del complemento e i fagociti (Grinde, 1989), è presente nel muco,

nei tessuti linfoidei, nel plasma e negli altri fluidi del corpo della maggior parte delle specie di pesci (Grinde, 1989; Yousif et al., 1994). Anche le lectine sono glicoproteine importanti per la neutralizzazione delle componenti batteriche; esse partecipano all'agglutinazione dei microrganismi e alla precipitazione di sostanze solubili (Van Muiswinkel, 1995). Le lectine di tipo C presentano una specificità per diversi carboidrati; l'interazione di tali proteine con i carboidrati determina l'opsonizzazione, la fagocitosi e l'attivazione del sistema del complemento. Diverse tipologie di lectine sono state isolate nel siero di differenti specie di pesce; alcune mostrano affinità per i carboidrati e struttura molecolare e funzione simili a quelle dei Mammiferi (Ottinger et al., 1999; Nagai et al., 2000), mentre altre presentano una differente specificità nel legame con i carboidrati e sequenze eterologhe (Fock et al., 2000; Honda et al., 2000). Ad esempio le pentraxine (la proteina C-reattiva e la proteina amiloide del siero) sono lectine presenti nei fluidi del corpo e sono comunemente associate con la risposta della fase acuta (Bayne et al., 2001; Wu et al., 2003).

1.4.2 Immunità acquisita dei Teleostei

L'immunità acquisita o adattativa consiste di meccanismi di difesa più evoluti rispetto a quelli dell'immunità innata. Le caratteristiche principali dell'immunità acquisita sono una specificità ristretta per le molecole antigeniche ed una memoria che permette una più intensa risposta ad esposizioni ripetute allo stesso agente patogeno ed una maggiore efficienza nell'espressione delle funzioni effettrici (Rocha B. e Tanchot C., 2004).

I componenti basilari dell'immunità acquisita sono i linfociti ed il loro prodotto principale: una molecola capace di riconoscere l'antigene che viene o secreta (linfociti B) o esposta sulla membrana (linfociti T). Le risposte adattative immunomodulatorie sono classificabili in due tipi: immunità umorale ed immunità cellulo-mediata.

Le cellule responsabili dell'immunità acquisita umorale sono i linfociti B che producono citochine, molecole di tipo ormonale necessarie per la crescita e la differenziazione. L'immunità cellulare consiste invece di cellule che presentano l'antigene (APC, quali macrofagi, cellule dendritiche, cellule endoteliali, fagociti mononucleati) e di linfociti Th produttori di citochine per l'attivazione di macrofagi e di linfociti T citotossici (Tc) i quali uccidono le cellule tumorali, infettate da virus o da altri patogeni endocellulari.

Una componente umorale importante dell'immunità specifica è rappresentata dagli anticorpi prodotti dai linfociti B rintracciati a livello di molti fluidi tissutali (plasma, linfa, bile, muco della cute, muco intestinale). Studi molecolari e biochimici hanno evidenziato che le Ig dei Teleostei appartengono ad una sola classe (IgM-simile) con un singolo tipo di catena pesante

(μ) (Warr, 1995). Tuttavia, recentemente nei pesci sono stati trovati altri isotopi di IgM nominate IgD (Wilson et al., 1997; Stenvik et al., 2000), IgT (Hansen et al., 2005) e IgZ (Danilova et al., 2005).

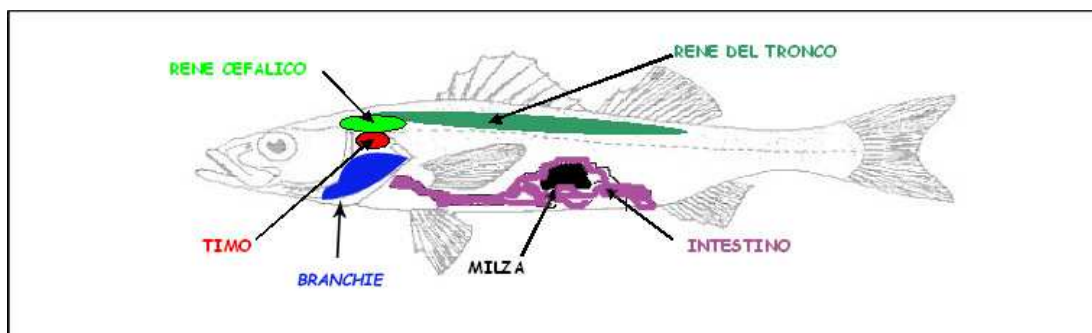
È stato inoltre dimostrato che le IgM di superficie si associano ad altre molecole per formare il complesso del “recettore specifico per l’antigene dei linfociti B” (BCR). Il BCR ha la funzione di attivare i linfociti B che si trasformano in plasmacellule, iniziando la secrezione di interleuchine ed immunoglobuline. La struttura del recettore di membrana delle immunoglobuline è capace di attivare un secondo messaggero intracellulare in risposta al cross-linking (Van Ginkel et al., 1994) con l’immunoglobulina e al legame con l’antigene (MacDougall et al., 1999).

È stata inoltre dimostrata la presenza di Ig e di molecole Ig-simili sia nelle uova che negli avannotti di alcune specie di pesce, e l’uptake delle Ig è stato studiato in dettaglio nelle uova dell’orata e della spigola (Picchiotti et al., 2004; 2006).

Nell’immunità di tipo cellulo-mediata la fase effettrice è attivata dal legame specifico e la risposta al peptide associato all’antigene mediante le molecole di *MHC* ai linfociti T effettori di memoria, i quali sono localizzati in prossimità delle cellule che recano sulla loro superficie gli antigeni estranei; per questo motivo le reazioni cellulo-mediate sono le più importanti per eliminare batteri o virus che si replicano all’interno delle cellule. La prima evidenza della presenza delle cellule T nei Teleostei risale agli anni ’70, con la dimostrazione *in vitro* della proliferazione indotta con mitogeni (Etlinger et al., 1976; Sizemore et al., 1984) e da antigeni non-self (Marsden et al., 1996), delle risposte nella reazione dei linfociti mescolati (Miller et al., 1985) e della funzione come cellule helper nella produzione di anticorpi contro antigeni timo-dipendenti (Miller et al., 1987).

1.4.3 Gli organi linfoidei

I Teleostei sono molto importanti per lo studio dell’evoluzione del sistema immunitario dei Vertebrati poiché mostrano organi linfatici specializzati (Fig.4). Nei mammiferi, il sistema linfoide è suddiviso in organi linfoidei primari o centrali e secondari o periferici. I linfociti vengono prodotti negli organi linfoidei primari, quali midollo osseo e timo, cominciano a esprimere i recettori specifici per l’antigene, solo in seguito acquisiscono la maturità fenotipica e funzionale. Le cellule linfocitarie mature, fuoriescono attraverso i vasi sanguigni e migrano verso gli organi secondari, quali milza, linfonodi e tessuto associato alle mucose (MALT), dove si attivano, in seguito al contatto con l’antigene specifico, e avviano la risposta immunitaria.

**Fig.4**

Rappresentazione schematica degli organi linfomieloidi nei teleostei

Gli organi e i tessuti linfoidei, deputati a svolgere funzioni legate al sistema immunitario nei pesci, sono il timo, la milza, il rene cefalico, l'intestino, le branchie (Tatner, 1996), e il tessuto linfoide associato alle mucose (MALT). Nei Teleostei, a differenza dei Mammiferi, gli organi linfoidei possono essere considerati a funzione mista, ossia in grado di produrre sia cellule linfocitarie (cellule T e B), che mielocitarie (granulociti, monociti, eritrociti, trombociti) e per questo vengono definiti come organi linfomieloidi (Fange, 1982; Rombout et al., 1993) (Figura 4). L'anatomia del sistema linfoide presenta alcune differenze notevoli con quella dei mammiferi. I pesci non possiedono midollo osseo, i linfonodi e le placche del Peyer; hanno due reni non simmetrici: un rene anteriore, cefalico, situato dietro la testa, e un rene medio affiancato alla faccia ventrale della colonna vertebrale. Come il midollo osseo dei mammiferi, i reni dei pesci producono tutti i tipi di leucociti, eccetto i linfociti T, prodotti nel timo (Levraud Jean-Pierre, Boudinot Pierre; 2009). Quindi possiamo affermare che il rene cefalico è l'analogo del midollo osseo (Zapada, 1979; Lamers, 1985), mentre la milza sembra essere principalmente coinvolta nell'eritropoiesi nella maggioranza delle specie sinora studiate (Rowley et al., 1988; Van Muiswinkel et al., 1991; Romano et al., 1997 b, 2000, 2004).

Dopo questa breve descrizione del sistema immunitario dei teleostei è mio interesse introdurre un paragrafo che ha lo scopo di chiarire come gli estratti di piante medicinali e i beta glucani siano in grado di modulare l'immunità innata ed adattativa dei pesci.

1.5 Gli estratti naturali, ottenuti da piante medicinali, modulano l'immunità innata e adattativa dei pesci Teleostei

Molti ricercatori hanno riportato che le erbe medicinali possono incrementare negli animali acquatici molti fattori dell'immunità come il livello del lisozima nel sangue, l'attività fagocitica e la produzione di ossido nitrico, che viene prodotto da alcune cellule del sistema

immunitario, le quali lo utilizzano per difendersi dalle aggressioni di antigeni. In particolare viene sfruttata la sua azione ossidante e la conseguente capacità di liberare radicali liberi in grado di distruggere la membrana plasmatica degli agenti microbici.

Sembra che il beneficio che i pesci di allevamento ricavano arricchendo la dieta con erbe medicinali sia dovuto soprattutto al rafforzamento del sistema immunitario aspecifico (Seung-Cheol et al., 2007). Infatti le piante medicinali influenzano molti fattori di crescita e la risposta immunitaria innata, inducendo un aumento di parametri quali:

- proteine del siero
- eritrociti
- capacità di fagocitosi dei leucociti
- burst ossidativo dei leucociti
- attività del lisozima del siero
- attività della perossidasi del siero (meloperossidasi, fenolossidasi, glutatione perossidasi)
- attività delle antiproteasi del siero
- attività del complemento
- espressione di citochine

Tra questi un importante parametro che viene incrementato notevolmente dai trattamenti naturali è il lisozima. Si è visto infatti che alimentando la carpa e l'orata con erbe medicinali si verifica un chiaro aumento nel sangue del livello di lisozima (Xie et al., 2008; Ji et al., 2009).

Anche gli enzimi antiossidanti vengono prodotti in maggior numero dall'animale la cui dieta è arricchita dagli estratti vegetali. La risposta allo stress nell'organismo dei pesci incrementa la produzione di radicali liberi; questi possono portare alla perossidazione dei lipidi che vengono direttamente ossidati dall'ossigeno molecolare e il danno è in grado di propagarsi mediante una reazione a catena. Il sistema degli enzimi antiossidanti, composto da superossido dismutasi e catalasi, può giocare un importante ruolo nella resistenza al danno ossidativo.

Esistono prove sperimentali che mostrano un incremento della risposta immunitaria innata da parte di un grande numero di specie vegetali, come *Mentha piperita* (Yadegarinia et al., 2006), *Allium sativum* e *Zingiber officinale* (Nya e Austin, 2009)

Si è visto in *Labeo rohita* che una dieta arricchita con *Allium sativum* e *Curcuma longa* incrementa l'attività battericida e fagocitica delle cellule immunitarie (Sahu et al., 2007).

La trota alimentata con estratto di *Zingiber officinale* innalza significativamente l'attività extracellulare delle cellule fagocitiche nel sangue (Dugenci et al., 2003), infatti, l'utilizzo di

estratti di erbe come immunostimolanti antimicrobici aumenta significativamente l'attività fagocitica in varie specie di pesci (Jang et al., 1995; Sharifpour, 1997; Kim et al., 1999; Logambal et al., 2000; Logambal e Michal, 2001; Venkatalakshmi e Michael, 2001; Rao e Chakrabarti, 2005; Chakrabarti e Rao, 2006; Gopalakannan e Arul, 2006).

In *yellowtail* trattato oralmente con glicirrizina si osserva un incremento della protezione contro infezione da *E. seriola* sebbene il livello nel sangue di lisozima e l'attività fagocitica dei macrofagi non siano incrementati (Edahiro et al., 1991).

Gli immunostimolanti ricavati dagli estratti di erbe medicinali sono in grado di potenziare non solo il sistema immunitario aspecifico ma anche quello adattativo (Logambal et al., 2000; Logambal e Michal, 2001; Venkatalakshmi e Michael, 2001; Chakrabarti e Rao, 2006) e di stimolare organi come il timo e la milza (Gao e Wu, 1994). Inoltre gli estratti naturali possono aumentare la produzione di monossido di azoto, che sembra avere effetti benefici sulla proliferazione cellulare dei linfociti T e B durante la risposta immunitaria. Gli immunostimolanti vegetali sono anche in grado di stimolare significativamente le opsonine (Xue et al., 2008) ed aumentare la produzione di anticorpi (Engstad et al., 1993; Kolman, 2001).

Aakre et al. (1994) hanno riportato che se si inietta nel salmone atlantico una mistura del batterio *Aeromonas salmonicida* con glucano si osserva un innalzamento della risposta anticorpale.

Nel pesce gatto invece si è visto che iniettando glucano nell'animale, esso risponde ad una successiva immunizzazione con *E. ictaluri* con un alto titolo di anticorpi nel siero rispetto al controllo (Chen e Ainsworth, 1992).

Dati ottenuti utilizzando l'*Ocimum sanctum* hanno dimostrato che tale pianta ha un forte effetto immunostimolante in *Oreochromis mossambicus*, in quanto è in grado di rafforzare la risposta anticorpale e la resistenza alla infezione da *Aeromonas hydrophyla* (Logambal et al., 2000). In particolare, un certo numero di sostanze come la saponina (Ninomiya et al., 1995), la glicirrizina (Jang et al., 1995) e l'azadiractina (Logambal e Michael, 2000, 2001; Harikrishnan et al., 2009a, 2009b) sembrano potenziare proprio il sistema immunitario adattativo dei pesci. Si è infatti osservato che la somministrazione orale della saponina Quil A incrementa la migrazione leucocitaria in *yellowtail* (Ninomiya et al., 1995). Inoltre Kim e altri (1998) hanno riportato che il trattamento con glicirrizina aumenta il *burst* respiratorio dei macrofagi e la risposta proliferativa dei linfociti in alcune specie di salmone. Infine è stato anche riportato che gli estratti di piante possono potenziare l'attività di citochine, come l'interferone, l'Interleuchina 2 e i fattori attivanti i macrofagi (Secombes et al., 1996).

Nella seguente tabella sono riportati alcuni dati relativi ad un miglioramento nella risposta adattativa e innata in differenti tipi di pesci, in seguito a somministrazione orale di varie erbe (Harikrishnan et al., 2010).

<u>Tipo di erbe</u>	<u>Modalità di somministrazione</u>	<u>Specie ittica</u>	<u>Patogeno</u>	<u>Effetti sui pesci</u>	<u>Bibliografia</u>
<i>A.sativum</i>	dieta	<i>O.mykiss</i>	<i>A.hydrophyla</i>	Stimolazione eritrociti, leucociti fagocitosi, lisozima, antiproteasi	Nya et Austin, 2009
<i>W.somnifera</i>	dieta	<i>L.rohita</i>	<i>A.hydrophyla</i>	Stimolazione attività fagocitica, immunoglobuline, lisozima	Sharma et al., 2010
<i>A.sativum</i>	dieta	<i>L.rohita</i>	<i>A.hydrophyla</i>	Produzione anione superossido, lisozima	Sahu et al, 2007
<i>E.senticosus</i>	dieta	<i>P.olivaceus</i>	<i>V.anguillarum</i>	Stimolazione attività fagocitica, lisozima e produzione muco	Won et al., 2008

È grazie agli esiti di questi esperimenti che l'applicazione di sostanze fitochimiche in acquacoltura ha cominciato ad avere un importante interesse commerciale ed è per questo che negli ultimi anni sono stati pubblicati molti lavori che hanno avuto per oggetto i pesci e gli effetti degli estratti vegetali su di essi (Babu e Marian, 2001; Citarasu et al., 2002; Jian e Wu, 2003, 2004). Negli esperimenti condotti sui pesci riportati nei paragrafi successivi, si pone l'attenzione sulla possibilità di potenziare il sistema immunitario e quindi di permettere alle specie ittiche di resistere meglio alle infezioni, sperimentando somministrazioni di una vasta gamma di piante in una miscela, oppure combinando gli estratti vegetali con vaccini.

1.6 Effetti di miscele di estratti naturali sul sistema immunitario dei pesci

È stato osservato che somministrando non un estratto bensì una miscela di estratti vegetali con proprietà immunostimolanti si verifica un potenziamento del sistema immunitario dei pesci, per l'azione sinergica di più componenti attive presenti nei diversi estratti vegetali (Harikrishnan et al., 2011). Nel 2005, Minomol e collaboratori hanno dimostrato per la prima volta che somministrando con la dieta estratti metanolici di una miscela di erbe come *Embllica officinalis*, *Cynodon dactylon* e *Adathoda vasica*, le infezioni microbiche in *Carassius auratus* si riducevano significativamente. Studi successivi hanno confermato l'efficacia di questo trattamento. Tra le miscele vegetali somministrate ai pesci troviamo estratti metanolici di *Ocimum sanctum*, *Withania somnifera* e *Myristica fragans*; questi sembrano stimolare

significativamente diversi parametri dell'immunità come l'attività fagocitica, l'attività battericida ed il livello di leucociti in *Epinephelus tauvina*, precedentemente infettato con il patogeno *Vibrio harveyi* (Sivaram et al., 2004).

Inoltre, la miscela ottenuta dagli estratti di *Viscum album*, *Urtica dioica* e *Zingiber officinale*, sembra avere un importante effetto benefico sul sistema immunitario dei pesci che presentano infezioni batteriche (Dugenci et al., 2003). Gli estratti sono stati somministrati alla trota per un periodo di tre settimane; alla fine del trattamento, l'animale ha mostrato un significativo aumento della risposta immunitaria aspecifica. I gruppi di pesci trattati hanno esibito un'attività fagocitica e di burst respiratorio piuttosto elevata, rispetto ai gruppi non trattati. Gli estratti delle piante hanno aumentato inoltre il livello di proteine totali del plasma. Il medesimo effetto lo si osserva somministrando ai pesci estratti miscelati di *Radix astragalus* e *Radix angelicae*, *Astragalus radix* e *Ganoderma lucidum*, oppure di *Astragalus radix* e *Scutellaria radix* (Jian e Wu, 2003, 2004; Yin et al., 2006, 2009). Gli effetti di queste erbe sono stati investigati su più specie di pesce tra cui la carpa, in cui la somministrazione delle piante è avvenuta per un periodo di cinque settimane. Al termine del trattamento si è assistito anche in questo caso ad un innalzamento di alcuni parametri dell'immunità: burst respiratorio, fagocitosi e livello di lisozima.

Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che sono molte le combinazioni di estratti di erbe aventi effetti benefici sul sistema immunitario dei pesci, come *Rheum officinale*, *Andrographis paniculata*, *Isatis indigotica* e *Lonicera japonica* che aggiunti alla dieta, incrementano l'attività fagocitica e il numero di leucociti in *Carassius auratus gibelio* (Chen et al., 2003).

1.7 Combinazione di estratti vegetali con vaccini

Nel 1993 Jeney e Anderson hanno proposto di combinare l'uso di immunostimolanti con la somministrazione di vaccini a basse dosi. Gli effetti riscontrati sono stati un potenziamento dell'attività fagocitica e un aumento dei livelli di lisozima e di immunoglobuline nonché un potenziamento dell'attività del complemento. In particolare è stato possibile osservare che combinando *Ganoderma* e *Astragalus* con un vaccino contro l'*Aeromonas hydrophila* si è assistito nella carpa ad un aumento dell'attività di burst respiratorio, dei livelli di lisozima e di fagociti con una conseguente riduzione della mortalità in individui infettati da *Aeromonas hydrophila* (Yin et al., 2009). Anche la somministrazione di estratti di *Ocimum sanctum* in seguito a vaccinazione sembra incrementare il livello di anticorpi e quindi la protezione di *Oreochromis niloticus* contro un'infezione sperimentale da *Aeromonas hydrophila*.

(Logambal et al., 2000). È stato anche riportato però che alte dosi di estratti di erbe combinate con vaccini possono anche avere un effetto immunosoppressivo in *Oreochromis mossambicus* (Logambal e Michael, 2001).

1.8 Gli immunostimolanti naturali utilizzati nella mia ricerca: le piante medicinali *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* e il prodotto commerciale Macrogard

1.8.1 Le piante medicinali *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* e loro proprietà curative

Come già detto le piante medicinali stanno riscuotendo un crescente interesse nel settore della bioacquacoltura in quanto rappresentano una possibile strategia per la messa a punto di trattamenti immunostimolanti volti a migliorare la salute degli animali allevati nel rispetto dell'ambiente.

Tra le possibili piante note nella medicina tradizionale per il loro potere curativo abbiamo deciso di utilizzare per la sperimentazione oggetto della mia tesi di dottorato l'*Aloe arborescens* ed il *Myrtus communis* due importanti piante medicinali largamente utilizzate come ingredienti per cibi salutari e cosmetici, considerate fonte di biomolecole con prospettive future in ambito chimico-farmacologico (Lewis and Ausubel, 2006). Anche se le conoscenze sugli effetti degli estratti di Aloe e Mirto sui pesci sono veramente scarse, la comprovata attività immunomodulatoria di tali piante sui mammiferi ci ha spinto a testarne le proprietà anche sui teleostei.

L'Aloe (Fig. 5) è una pianta sempreverde, denominata xerofita o succulenta. Ha la capacità di vivere in ambienti aridi e in periodi di lunga siccità riuscendo, grazie alla resistente cuticola, ad evitare l'eccessiva traspirazione dalla superficie fogliare. La mucillagine contiene inoltre, nello spessore del parenchima, una sorta di tessuto spugnoso capace di trattenere l'acqua filtrata dalle radici e dalle foglie. Pianta angiosperma recentemente assegnata alla famiglia delle Liliaceae, comprendente circa 350 varietà distinte per tipologie e luogo d'origine, raggiunge la maturazione, dopo 3-4 anni di vita. Tra le numerose specie di Aloe quella che richiama di più l'attenzione della ricerca scientifica è sicuramente l'*Aloe arborescens*. Originaria del Sudafrica e coltivata in varie zone tropicali, ha trovato nel bacino del Mediterraneo un habitat ideale. In Italia è coltivata in varie zone costiere temperate, specialmente in Calabria e in Sicilia, dove sembra essere stata importata dai Fenici. Si presenta come un arbusto assai ramificato fin dalla base, i fusti non sono molto robusti ma numerosi e questo conferisce alla pianta un aspetto eretto-ricadente, contorto e ramificato.

**Fig. 5***Aloe arborescens*

Le foglie sono arcuate, verdi, lunghe e strette ma molto voluminose, ornate di denti spinosi, robuste nella parte più alta della pianta che tende ad eliminare quelle secche nella parte bassa. L'*Aloe arborescens* miller è la più ricca dei principi attivi caratteristici della pianta. (A. Bassetti e S. Sala: “ Il grande libro dell’aloe”. ediz. zuccari, 2001).

Per quanto riguarda le proprietà curative di Aloe basta una semplice ricerca bibliografica per comprendere le innumerevoli proprietà farmaceutiche possedute dalle sostanze isolate da tale pianta. Molteplici sono gli studi che confermano le proprietà curative di tipo antiinfiammatorio (Yagi et al., 2002), antiossidativo (Yagi et al., 2003), ansietà (Lim et al., 2003), antitumorale (Su et al., 2005) ed immunomodulatorio (Im et al., 2005) che l’Aloe possiede.

In particolare dal punto di vista della composizione chimica l’Aloe risulta piuttosto complessa. Al suo interno troviamo consistenti quantità di polisaccaridi, concentrati prevalentemente nel gel interno della foglia, gli antrachinoni, racchiusi nell’epidermide e nel succo e sostanze nutritive di vario tipo, come vitamine, Sali minerali, aminoacidi, acidi organici, fosfolipidi, enzimi, saponine e lignine (Femenia et al., 1999). L’acemannano è il mucopolisaccaride più attivo ed importante tra quelli presenti nell’aloe (Reynolds et al., 1999). Gli antrachinoni sono una classe di composti fenolici secondari che caratterizza la

classe delle Liliacee e in particolar modo il genere Aloe (Izhaki 2002). I principali antrachinoni finora identificati nell'Aloe sono l'aloina (barbaloina), aloë-emodina, acido-aloeico, acido cimanico, acido crisofanico e l'aloenina (Kuzuya et al., 2001; Rebecca et al., 2003). Le proprietà immunostimolanti dell'Aloe di particolare interesse per questo studio sono imputabili soprattutto a due composti: l'alocina A e l'acemannano. La prima, purificata dalle foglie di *Aloe arborescens* induce *in vitro* un aumento dell'attività mitogenica in linfociti di topo (Koike et al., 1995) mentre la sua somministrazione intravena induce un aumento dell'attività delle cellule natural killer murine (Imanishi e Suzuki 1984). Ha la capacità di attivare il complemento per via alternativa ed inoltre è un potente immunomodulatore, in grado di stimolare la produzione di linfocine da parte delle cellule T (Imanishi et al., 1993). L'acemannano, rappresenta la maggior frazione carboidratica dell'Aloe, è in grado di stimolare la produzione di citochine, il rilascio di ossido nitrico e l'espressione di molecole di superficie (Rammamoorthy et al., 1996). Inoltre l'acemannano possiede proprietà antibatteriche, antivirali e antitumorali (Raynolds et al., 1999), è risultato essere molto efficace nel trattamento delle infezioni da candida e di coliti ulcerose (Stuart et al., 1997) e ha mostrato un'evidente azione antibatterica su *Pseudomonas aureginosa* (Cera et al., 1980). Si è inoltre rivelato in grado di bloccare la replicazione virale in linfociti umani infettati da HIV, inibendo la glicosilazione delle proteine virali e aumentando così la sopravvivenza cellulare (Raynolds et al., 1999; Khalon et al., 1991). La somministrazione di acemannano stimola i macrofagi a rilasciare TNF, interleuchina e interferone e si è rivelato efficace nel combattere infezioni virali sia negli animali che nell'uomo (Harris et al., 1988). Come per l'Aloe anche nei confronti del Mirto è stata condotta un'attenta ricerca bibliografica. Infatti, dalla letteratura emergono numerosi articoli che rivelano che, come per Aloe, anche le sostanze isolate dal Mirto possiedono attività farmaceutiche di tipo antiinfiammatorio (Romani et al., 2004), antiossidativo (Rosa et al., 2003), antibatterico (Alem et al., 2008; Gunduz et al., 2009) ed immunomodulatorio (Ines et al., 2011).

Il Mirto (*Myrtus communis* L.1753) è una sclerofilla spontanea, della famiglia delle Myrtaceae, tipica della macchia mediterranea (Fig. 6). Raramente la si rinviene in popolamenti puri naturali ma più spesso la si ritrova associata ad altre specie arbustive come querce, lentisco e corbezzolo (Pignatti et al., 1998; Tattini et al., 2006).

**Fig. 6***Myrtus communis*

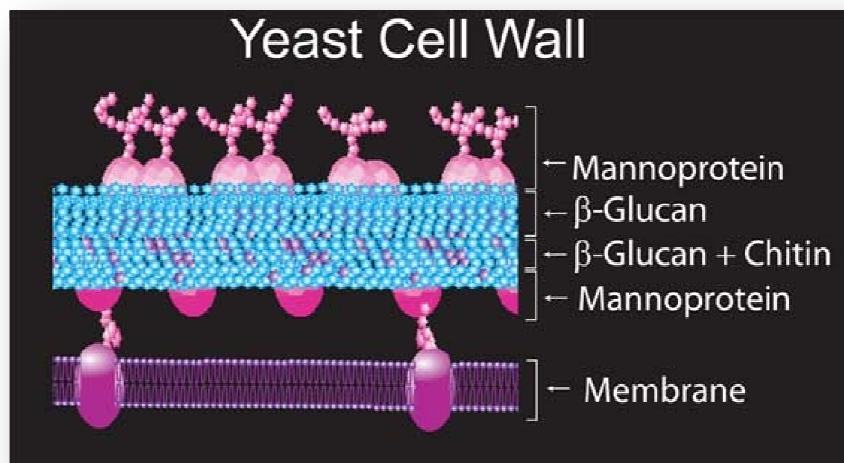
E' diffusa dalle aree costiere e sub-costiere del bacino del Mediterraneo fino ad ambienti interni più umidi e freddi denotando una certa plasticità ecologica. Si adatta abbastanza ai terreni poveri e siccitosi ma trae vantaggio sia dagli apporti idrici estivi sia dalla disponibilità d'azoto manifestando in condizioni favorevoli uno spiccato rigoglio vegetativo e un'abbondante produzione di fiori e frutti. Vegeta preferibilmente nei suoli a reazione acida o neutra, in particolare quelli a matrice granitica, mentre soffre i terreni a matrice calcarea.

La sua importanza è legata al valore alimentare, ornamentale e medicamentoso, per le note proprietà antisetliche ed antiinfiammatorie (Holcomb et al., 1992; Milhau et al., 1997; Romani et al., 2004). Infatti il mirto ha una storia nella medicina popolare e tradizionale: l'olio essenziale ottenuto dalle foglie e a volte dai fiori e dalle bacche è stato da sempre utilizzato per le sue proprietà ricostituenti e balsamiche ed anche nell'industria dei profumi come fragranza. Negli ultimi anni, i liquori preparati con le bacche della pianta sono diventati sempre più popolari, mentre le sue foglie sono state utilizzate come sostituto del luppolo nella produzione della birra e come ingrediente nella cosmetica di prodotti per la cura della forfora (Puybaret et al., 1990). Tutto ciò ha portato ad un rinnovato interesse per la pianta, in special

modo per la sua coltivazione, considerato che la presenza di piante selvatiche stava diventando insufficiente per soddisfare la crescente domanda. Dal punto di vista fitochimico il mirto contiene composti unici, correlati al myrtocommulone A dalle notevoli proprietà antibatteriche (Appendino et al., 2006; Alem et al., 2008; Gunduz et al., 2009) ed antiinfiammatorie (Feisst et al., 2005), mentre un composto dotato di minore omologia il semimyrtocommulone ha una potente attività antiossidante (Rosa et al., 2003). Dalla letteratura emergono numerosi studi sulle attività biologiche dei composti bioattivi presenti nel mirto tra cui oltre ai composti appena descritti anche i tannini dalle attività antiossidanti ed anticancro (Romani et al., 2004).

1.8.2 Il Macrogard: ruolo dei beta glucani in acquacoltura

Come ho già detto per la sperimentazione oggetto della mia ricerca di dottorato abbiamo deciso di testare due tipologie di immunostimolanti naturali. Oltre alle piante medicinali Aloe e Mirto di cui vi ho appena parlato abbiamo scelto il Macrogard un prodotto commerciale costituito da beta glucani (Fig. 7) derivanti dalla parete di *S. cerevisiae*, da diversi anni utilizzato in Norvegia (nazione in cui ho svolto parte del dottorato) al fine di potenziare il sistema immunitario dei pesci allevati. Numerosi studi propongono i beta glucani come polisaccaridi utili in acquacoltura per limitare l'incidenza di infezioni in quanto risultano essere estremamente utili nel ridurre la mortalità dovuta a patogeni opportunisti nel trattamento di novellame e nella prevenzione delle malattie virali, nel migliorare la resistenza alle malattie e ai parassiti e per aumentare l'efficacia di sostanze antimicrobiche e vaccini (Raa J., 2000). Esperimenti di supplementazione della dieta con alimenti naturali e prodotti commerciali a base di beta glucani hanno dimostrato un miglioramento della salute, della crescita e delle prestazioni generali di gruppi di animali diversi, tra cui gamberi di allevamento, pesci e altri animali terrestri. In particolare la crescita di pesci allevati è stata migliorata con: l'uso di EcoActiva (un prodotto disponibile in commercio ricco in beta glucani) somministrato per via orale in *Pagrus auratus* (Cook et al., 2003); l'uso di beta glucano in *Labeo rohita* (Misra et al., 2006); e l'uso di beta (1,3) glucano in *Pseudosciaena crocea* (Ai et al., 2007). L'uso di Macrogard come supplemento nella dieta di *D. labrax* ha portato ad un'attivazione di risposte di tipo innato che hanno aiutato gli animali ad affrontare meglio particolari condizioni di elevato stress ambientale rispetto ai gruppi controllo (bagni et al., 2005).

**Fig. 7**

Rappresentazione schematica della presenza di beta-glucani nella parete di lieviti

Diversi tipi di beta glucani hanno migliorato la protezione contro le infezioni nel caso di *Pseudosciaena crocea* contro *Vibrio harveyi* (Ai et al., 2007), in *Clarias batrachus* ed in *Cyprinus carpio* contro *Aeromonas hydrophila* (Kumari et al., 2006 e Selvaraj et al., 2006).

Molti lavori scientifici hanno mostrato che il beta glucano, come integratore alimentare è in grado di migliorare il tasso di sopravvivenza contro la White Spot Syndrome nei gamberi Black tiger (Citarasu et al., 2006) ed in *Salmo salar* come adiuvante per vaccini (Rørstad et al., 1993), ha dimostrato lo stesso effetto anche in studi in cui il beta glucano è stato somministrato mediante iniezione intraperitoneo in *Salmo salar* (Kawakami et al., 1998) ed in *Catla catla* (Kamilya et al., 2006) aumentando palesemente la risposta anticorpale.

La proprietà dei beta glucani di migliorare la resistenza ad agenti patogeni è stata studiata anche nei pesci immunocompromessi, come nel caso di *Labeo rohita* in cui la supplementazione del mangime con beta (1,3) glucani ha indotto in pesci immunocompromessi una risposta immunitaria significativamente maggiore rispetto ai controlli contro *Edwardsiella ictaluri* (Sahoo et al., 2001), e con gli stessi risultati anche in *Oreochromis niloticus* contro il *S. iniae* (El-boshy et al., 2008). In conclusione i beta glucani aumentano l'attività fagocitaria, l'emoagglutinazione, il numero dei leucociti del sangue, la risposta anticorpale, il lisozima e la produzione di ROS nei pesci quando è integrato nel mangime.

La modalità d'azione dei beta glucani si basa sull'interazione con recettori Toll-like di membrana delle macrofagi, neutrofili e cellule NK. I macrofagi hanno un ruolo cruciale in

tutte le fasi della difesa dell'ospite sia nella risposta immunitaria innata che adattativa in caso di infezione da patogeno che attraversa una barriera epiteliale. Quando i recettori Toll-like legano i beta glucani, le cellule che espongono questi recettori aumentano la loro capacità di fagocitosi, uccidendo e digerendo i batteri e contemporaneamente secernendo molecole segnale, citochine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- β) che stimolano l'attivazione di altre cellule dell'immunità innata ed acquisita ed il rilascio di altri mediatori infiammatori (NO e H₂O₂). In tal modo l'attivazione delle funzioni dei macrofagi da parte dei beta glucani aumenta le difese immunitarie dell'ospite a più livelli. In conclusione i fagociti attivati producono citochine, che attivando la risposta immunitaria adattativa portano ad un aumento della produzione di anticorpi, migliorando anche l'efficacia di vaccini (Kim et al., 2004).

1.9 Specie ittiche di interesse commerciale oggetto della mia ricerca

La scelta dell'orata, del merluzzo e del salmone, come specie modello della ricerca, è stata dettata dall'importanza che tali specie ricoprono nel settore economico ed industriale della itticultura europea in quanto sono le specie più allevate e quindi più soggette alle malattie che colpiscono i pesci negli impianti.

Lo studio dei composti naturali come estratti di erbe medicinali e beta glucani utilizzati come immunostimolanti nell'alimentazione di larve ed adulti, rappresenta infatti un aspetto importante per incrementare la produttività degli impianti ittici e per lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile e compatibile con l'ambiente. E' noto infatti, come già ampiamente descritto, che tali composti esibiscono un'attività antimicrobica e possano migliorare la crescita e lo sviluppo delle specie allevate in impianti di acquacoltura. Differenti studi hanno riportato che le malattie che si manifestano nei pesci di interesse commerciale, come le specie oggetto di questa tesi, possono essere controllate attraverso la somministrazione di immunostimolanti naturali di origine vegetale ma anche derivanti da lieviti in quanto sono in grado di potenziare la risposta immunitaria sia innata che adattativa (Sakai et al., 1991; Anderson et al., 1992; Ainsworth et al., 1994 e Verlhac et al., 1996; Sakai, 1999; Kamilya et al., 2006; El-boshy et al., 2008).

Di seguito viene riportata una breve presentazione dell'orata, i principali patogeni che ne minacciano la salute e la linea cellulare di cui ci siamo serviti per gli studi *in vitro* condotti su questa specie. A seguire vengono introdotte le altre due specie oggetto della ricerca, il merluzzo ed il salmone.

1.9.1 *Sparus aurata* (L.) una delle specie più allevate nel Mediterraneo: morfologia e bioetologia

L'orata è pesce di mare molto apprezzato a livello internazionale ed è oggetto di pesca sportiva e commerciale su tutte le coste mediterranee. Il suo allevamento in acquacoltura (sia in vasche a terra che in gabbie in mare) rappresenta un'importante voce dell'economia di molte località costiere lungo tutta la costa europea mediterranea e in Italia è particolarmente rinomato nelle lagune adriatiche e lungo le coste toscane soprattutto nella Laguna di Orbetello e nella zona di Capalbio e Ansedonia. L'allevamento di orata in impianti di acquacoltura è ormai considerata una realtà produttiva autonoma che va ad integrarsi con l'attività della pesca e rappresenta un settore destinato a crescere in quanto i consumi di pesce aumentano mentre la pesca diminuisce a causa dello sfruttamento selvaggio che ha impoverito le risorse naturali dei mari. Da un punto di vista qualitativo il prodotto ottenuto da un allevamento di orate ed offerto ai consumatori è eccellente visto che il mercato italiano è costantemente controllato; inoltre, grazie a regolamenti rigidi per chi produce e commercia questo prodotto, sono garantiti determinati requisiti con elevati standard di igiene e di freschezza.

L'orata (*Sparus aurata*) (Fig. 8) è un pesce osseo di mare e di acque salmastre, appartenente alla famiglia degli Sparidi. Il nome deriva dalla caratteristica striscia di color oro che il pesce mostra fra gli occhi. L'orata è presente in tutto il bacino del mar Mediterraneo e nell'Atlantico orientale, dall'estremo sud delle isole Britanniche a Capo Verde.

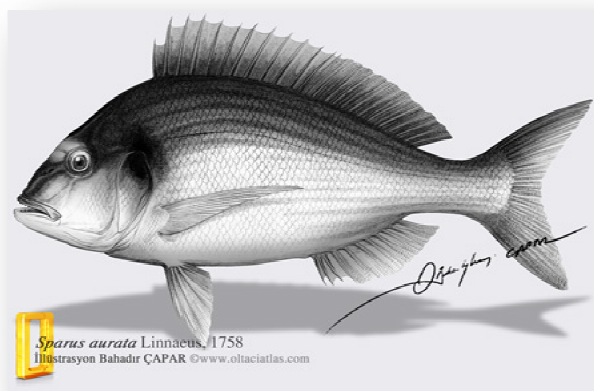


Fig. 8

Rappresentazione di *Sparus aurata*

È un pesce strettamente costiero e vive tra i 5 e i 150 m dalla costa; normalmente conduce una vita solitaria o a piccoli gruppi. E' una specie eurialina poiché il suo ciclo vitale si svolge in

gran parte in ambiente ipo o iper-salino quale quello all'interno di lagune o stagni costieri salmastri dove durante il periodo estivo o autunnale risiede a scopi trofici. Questo habitat viene abbandonato nei mesi da ottobre a dicembre nei quali l'animale si sposta in mare aperto. Il cambiamento dei parametri chimico-fisici (salinità, temperatura, ossigeno etc.) in tali migrazioni stagionali, molto probabilmente favorisce il completamento della maturazione delle uova e la loro deposizione. Si distingue per avere il profilo del capo assai convesso e la mandibola leggermente più breve della mascella superiore. Il corpo è ovale elevato e depresso e la pinna dorsale è unica con 11 raggi spinosi e 12-13 molli. Il dorso è grigio azzurrognolo ed i fianchi argentei con sottili linee grigie longitudinali. La regione scapolare è nera, questo colore continua sulla parte superiore dell'opercolo, il cui margine è rossastro. La lunghezza massima dell'orata è 70 cm, ma la più comune è tra i 20 e 50 cm; può raggiungere un peso di 10 kg circa. Le orate sono ermafrodite proterandriche: la maggior parte degli individui subiscono l'inversione sessuale all'età di 2 anni (33-40 cm di lunghezza). La riproduzione (con più cicli di ovodeposizione) avviene tra ottobre e dicembre. L'alimentazione in natura consiste prevalentemente di molluschi e crostacei a cui sminuzza il guscio con le forti mascelle provviste di denti.

1.9.1a I principali agenti patogeni di *Sparus aurata*: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Listonella anguillarum*

In questo paragrafo verranno presentate due tra le più comuni patologie responsabili di gravi perdite economiche negli allevamenti ovvero la Pasteurellosi e la Vibriosi. In particolare verranno presentati come agenti patogeni responsabili di queste malattie i ceppi che colpiscono *Sparus aurata* e che sono oggetto degli studi condotti nella sperimentazione presentata in questa tesi.

A questo proposito è comunque mio interesse ribadire che queste patologie ed in particolare la Vibriosi, interessano anche i salmonidi ed i gadidi (famiglie a cui appartengono le altre due specie da me prese in esame nel corso del dottorato) in quanto specialmente la vibriosi colpisce un vario range di animali, che vivono in acqua di mare, in acque dolci e salmastre e gli stessi pesci d'acquario. Ed è in grado di colpire anche specie che vivono in acque a temperature fredde per mezzo di un diverso agente eziologico *Vibrio salmonicida* responsabile della vibriosi d'acqua fredda che è tipica degli allevamenti dell'atlantico nord-occidentale, in Scozia, Norvegia, Canada e Stati Uniti.

I ceppi *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Listonella anguillarum* sono entrambi batteri gram-negativi, tra i più comuni patogeni causa di infezioni che hanno una grande

incidenza nell'allevamento ittico di *Sparus aurata* e di molti pesci di interesse commerciale allevati nel mediterraneo.

Il *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Gauthier et al., 1995) è un coccobacillo Gram negativo alofilo bipolare, non flagellato e quindi privo di motilità (Janssen e Surgalla, 1968). Nella fase logaritmica della crescita assume una conformazione più allungata che nella fase tardiva (Hawke, 1996). Fu isolato per la prima volta nel 1963 negli Stati Uniti, come responsabile dell'alta mortalità che stava colpendo molte popolazioni di pesci. Fu inizialmente classificato nel genere *Pasteurella* per le caratteristiche fisiche e biochimiche (Snieszko et al., 1964). Studi successivi suggerirono il nome di *Pasteurella piscicida* o di pesce killer. Dal punto di vista morfologico il batterio presenta una esostruttura costituita da glicoproteine, LPS e da una serie di molecole come adesine ed invasine che contribuiscono all'adesione del batterio all'ospite (Magarinos et al., 1996), insieme ad appendici filamentose denominate fimbrie (Ahmad e Elkamel, 1993). Osservazioni al microscopio elettronico hanno rivelato inoltre la presenza di una capsula esterna sulla superficie del batterio ma in condizioni di limitata presenza di ferro (importante per la vita del batterio) il patogeno smette di sintetizzare il materiale capsulare (Tae et al., 2008). Gioca un ruolo importante nella virulenza del batterio l'esocitosi di una serie di proteine come: integrine, caderine ed emoagglutinine (Magarinos, 1996). Trattandosi di un endobatterio è in grado di entrare negli organi interni tramite un meccanismo di penetrazione in cellule endoteliali ed epiteliali che non rappresenta una normale fagocitosi (Ahmad e Elkamel, 1993). Provoca importanti infezioni come la pasteurellosi, anche descritta come fotobatteriosi o pseudotubercolosi. Questa patologia (Fig. 9A) si caratterizza per la presenza di necrosi di gruppi di cellule del sangue localizzate nella milza, nella zona focale e delle branchie, dove si possono riscontrare ampie colonie di batteri. La zona maggiormente colpita è il fegato dove è comune ritrovare, in caso di pasteurellosi, aree di acuta necrosi multifocale con prominente carioressi (Hawke, 1987).

Listonella anguillarum (Holt, 1970; Ellis, 1989), appartenente alla famiglia delle *Vibrionaceae*, causa di significative perdite economiche negli allevamenti, è un batterio Gram-negativo, con morfologia a bastoncello leggermente curvato, margini arrotondati e bipolare. Nella membrana esterna del batterio si osservano porine con struttura secondaria fatta da β -sheet e β -turn che incrementano la conducibilità di membrana e rendono la superficie batterica moderatamente carica (Simon, 1996). Sono inoltre presenti dei flagelli, agenti responsabili della motilità del batterio (Anders, 1993; Debra, 1996; Karen McGee, 1996). *L. anguillarum* mostra una membrana esterna ricoperta da vescicole contenenti: proteine di membrana, lipopolisaccaride, fosfolipidi e proteine periplasmatiche che ricoprono un ruolo importante

all'inizio dell'infezione (Gyeong-En Hong, 2009). I fattori di virulenza del batterio sono rappresentati dalla capacità di sequestrare il ferro alle proteine dell'ospite e dalla produzione di sostanze citotossiche extracellulari quali: proteasi, emolisina, metalloproteasi, dermatotossine, emoagglutinine e citotossine. Queste ultime stimolano nell'ospite la produzione di citochine pro-infiammatorie (Gyeong-En Hong, 2009).

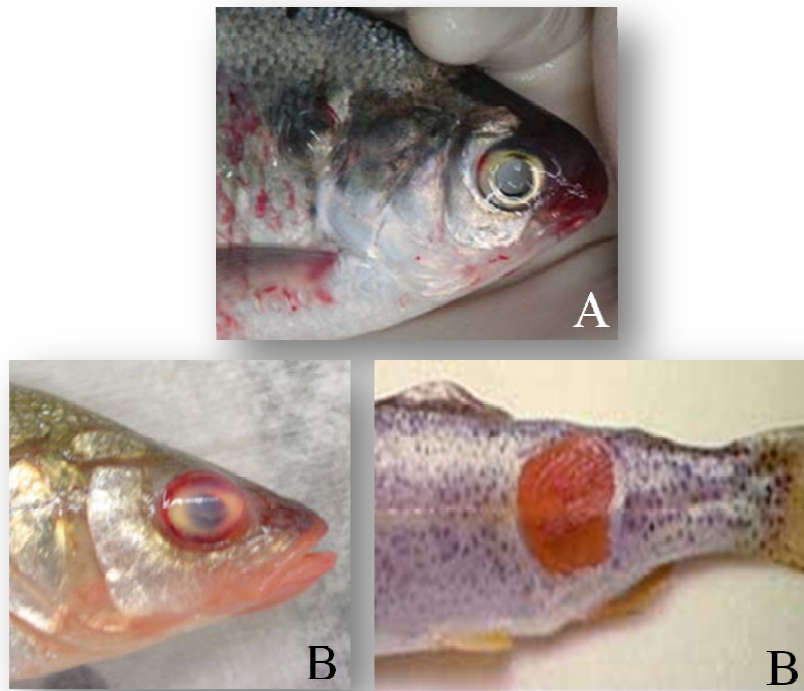


Fig. 9

Immagini relative alle malattie vibriosi e pasteurellosi:

in A) si può osservare un pesce affetto da pasteurellosi,

in B) si può osservare l'epitelio danneggiato di un pesce affetto da vibriosi.

L. anguillarum ricopre una certa importanza nella gestione sanitaria degli allevamenti ittici, in quanto è l'agente eziologico della setticemia emorragica conosciuta con il nome di vibriosi. Questa grave patologia dei pesci si manifesta con la comparsa di aree emorragiche e gonfiore. Attorno alle lesioni l'epitelio risulta danneggiato (Fig.9B). L'emorragia si può estendere anche al fegato e all'intestino e può esserci un riversamento di fluidi a livello cardiaco (Ahmad e Elkamel, 1993). Dal punto di vista istopatologico, le fibre muscolari sono separate ed il tessuto connettivo copre solamente pochi spazi mentre nel resto si ha un riversamento di fluidi (Roberts, 2001). A livello dei tessuti intermuscolari è stata riscontrata un'abbondante presenza di eritrociti e leucociti.

1.9.1b Il modello di studio: la linea cellulare continua di fibroblasti di orata SAF-1

Come detto in precedenza, alla base della gestione delle patologie che minacciano la produttività degli allevamenti con grosse perdite economiche c'è innanzitutto una maggiore comprensione dei meccanismi immunitari che regolano le risposte alle infezioni. Proprio da qui nasce l'esigenza di utilizzare modelli *in vitro* adatti ed utili per studi di tipo immunologico, che sono alla base della messa a punto di possibili strategie utili ad arginare lo svilupparsi di malattie negli impianti con evidenti vantaggi per la produttività delle aziende.

I pesci Teleostei, che rappresentano il 48% delle specie di vertebrati conosciuti (Altman e Dittmer, 1972), hanno da sempre suscitato grande interesse in quanto costituiscono un'enorme risorsa per lo studio di cellule di Vertebrati; essi mostrano il vantaggio di poter essere utilizzati come tessuti modello per studi di vario tipo nell'ambito delle scienze biomediche. Ciò è possibile perché la fisiologia e i costituenti del sangue dei pesci Teleostei sono abbastanza simili a quelli dei vertebrati terrestri e le metodologie usate per tenere in coltura questi due tipi cellulari sono pressoché le stesse.

La disponibilità di linee cellulari di pesce dal 1960 ha avuto un impatto positivo nella ricerca scientifica. L'utilizzo di queste linee ha dato importanti contributi negli studi relativi alla tossicologia, alla carcinogenesi, alla replicazione, espressione e riparazione del DNA. In almeno 50 anni da allora, le linee cellulari di pesce sono cresciute di numero coprendo un'ampia varietà di specie e tessuti di origine e una serie di applicazioni. L'immunologia dei pesci (Bols et al., 2001), la tossicologia (Bahich e Borenfreund, 1991), l'ecotossicologia (Schirmer, 2006), l'endocrinologia (Bols e Lee, 1991), la virologia (Wolf, 1988), la ricerca biomedica (Hightower e Renfro, 1988), il controllo di malattie (Villena, 2003), la biotecnologia e l'acquacoltura (Bols e Lee, 1991), la radiobiologia (Ryan et al., 2008), sono alcune delle aree in cui l'uso di linee cellulari di pesce ha dato importanti contributi.

Per le sperimentazioni effettuate in questa tesi è stato utilizzato come modello di studio la linea cellulare continua di fibroblasti di orata SAF-1 (*Sparus aurata Fibroblasts*) (Fig. 10) che risulta dalla letteratura essere un buon modello largamente utilizzato in studi su patogeni di pesci marini e per indagini sull'immunologia dei Teleostei (Bejar et al., 1997; Perez-prieto et al., 1999; Tafalla et al., 2004; Garcia Rosado et al., 2007). La linea cellulare SAF-1 è stata originata a partire da tessuto di orata adulta senza il trattamento di immortalizzazione. Le cellule hanno la morfologia propria dei fibroblasti, mostrano un efficiente adattamento alle condizioni di crescita *in vitro*, infatti raddoppiano il loro numero dopo solo due giorni di incubazione (rispettando le condizioni di crescita ottimali) e mostrano un buon livello di

sopravvivenza dopo il congelamento. Una caratterizzazione genetica ha mostrato un normale cariotipo delle cellule, indicando una stabilità genetica (Bejar et al., 1997), caratteristica indispensabile per rendere la linea un buon modello sperimentale.

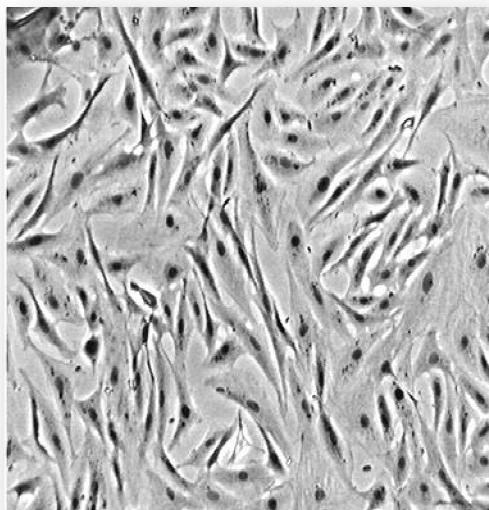


Fig. 10

Immagine al microscopio ottico invertito raffigurante
la linea cellulare continua SAF-1

Le SAF-1 mostrano anche alti livelli di attività telomerasica, correlati con un incremento della proliferazione cellulare, necessaria per il mantenimento di una linea cellulare permanente (Bejar et al., 1997). La linea cellulare suscita inoltre notevole interesse perché è sensibile a diversi virus di pesce come LDV, VHSV, IHNV e IPNV che causano lisi nelle cellule (Perez-prieto et al., 1999) e a patogeni o prodotti batterici extracellulari che scatenano nelle cellule una serie di effetti citopatici (Bejar et al., 1997). Il suo interesse come sistema modello per studi immunologici è in continua crescita. A tal proposito Fierro-Castro et al., e Ingerslev et al., rispettivamente nel 2009 e nel 2010 presentano nei loro studi le colture cellulari di pesce di derivazione non immune (tra cui i fibroblasti), come modelli di successo per lo studio di risposte di tipo immunitario in seguito alla stimolazione con PAMP's (come LPS). Infatti i fibroblasti, possono essere descritti come un tipo cellulare con proprietà di immunoregolazione dovute alla presenza di PRR's (pattern-recognition receptors) sulla loro superficie che reagiscono alla stimolazione portando all'espressione di un vario range di citochine (Ingerslev et al., 2010).

In particolare la linea in oggetto SAF-1 è stata utilizzata in recenti lavori per investigare il ruolo di proteine indotte da IFN nei meccanismi di difesa di tipo innato contro diversi virus di pesce. Tafalla et al., nel 2002 hanno clonato e analizzato l'espressione del gene Mx a seguito di stimolazione con Poly I:C, nella linea SAF-1 (Bandìn et al., 2006; Garcia-Rosado et al., 2008). Sempre le SAF-1 hanno rappresentato un buon modello per studiare la produzione ed il meccanismo di secrezione dell'IL-1 β che ha un ruolo chiave nella risposta infiammatoria (Pelegrin et al., 2001; 2003), per analizzare l'effetto di probiotici in ambito infiammatorio (Salinas et al., 2007) e per investigare sulle citochine quali agenti pro-infiammatori nei pesci (Mulero et al., 2005).

1.9.2 Gadus morhua e Salmo salar due delle specie ittiche più importanti per il settore economico ed industriale della Norvegia: morfologia e bioetologia

Il merluzzo bianco (*Gadus morhua*) (Fig. 11), è un pesce d'acqua salata, appartenente alla famiglia dei Gadidae. È un pesce tipico dell'oceano atlantico settentrionale, della parte occidentale nella zona compresa tra la Groenlandia fino alla Carolina del Nord, e della parte orientale (Mare di Norvegia fino all'Islanda e lo Spitzbergen, Mare del Nord, Mare di Barents. Ha una forma moderatamente allungata, con testa piuttosto grande ed un vistoso barbiglio chiaro sotto il mento. Ha tre pinne dorsali, due anali, pinne ventrali in posizione giugulare e pinna caudale tronca. La livrea è variabile dal marrone al verdastro grigio sul dorso, che è cosparso di macchie arancio o brune, talvolta biancastre, mentre diventa più sfumato sul ventre. La testa è spesso coperta di piccole macchie più scure dall'apparenza di "lentiggini". La linea laterale è chiara e ben visibile, con una curva all'altezza della seconda dorsale. Può raggiungere i due metri di lunghezza e i 96 kg di peso. Il merluzzo è un pesce predatore che si nutre



Fig. 11

Rappresentazione di *Gadus morhua*

principalmente di aringhe ma anche di un gran numero di altri pesci e di invertebrati bentonici. Tale specie, avente riproduzione a fecondazione esterna con dimensione delle uova

piccole e molto numerose, riconosce il suo ciclo biologico riproduttivo nel periodo primaverile: è gregaria e si muove in banchi molto numerosi proprio cercando durante tale periodo acque con temperature variabili generalmente dai 3 ai 6 °C. I soggetti femmine depongono un numero elevato di uova variabile dalle 60.000 alla 300.000 alla volta, non giornalmente ma ad intervallo di 2-3 giorni per circa 60 giorni: queste vengono fecondate e si sviluppano nelle condizioni ambientali migliori del luogo in cui sono state deposte. Pur essendo un pesce molto fecondo raggiunge la maturità sessuale solo dopo 6 o 7 anni caratteristica questa che lo ha portato quasi all'estinzione a causa del collasso della specie per esaurimento degli stock selvatici in seguito ad un'eccessiva sovrapesca prima dello sviluppo dell'acquacoltura.

Il Salmone (*Salmo salar*) (fig. 12), l'altra specie oggetto della ricerca da me svolta in Norvegia, appartiene alla famiglia dei salmonidi tipico dei mari freddi, è diffuso nel Pacifico e nell'Atlantico. Il salmone ha corpo affusolato, testa piccola, colorazione argentea con dorso grigio-blu e ventre bianco con macchie nere sul capo e sugli opercoli, che all'epoca della riproduzione assume toni rossi e verdi sui fianchi, rosa sul ventre e ramata sugli opercoli. Raggiunge la lunghezza massima di 1,50 metri per un peso anche di 20 Kg e vive una decina di anni durante i quali si riproduce tre o quattro volte.

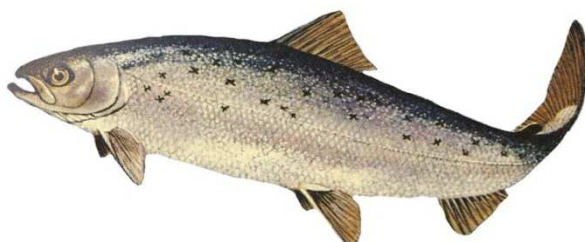


Fig. 12

Rappresentazione di *Salmo salar*

Nel periodo riproduttivo, mentre risale i fiumi, superando rapide e cascate, non si nutre. Giunto ai freddi corsi d'acqua montani, depone le uova che si schiudono, durante l'inverno, dopo circa tre mesi di incubazione e gli avannotti occupano il medesimo habitat delle trote. Nel giro di 24-36 mesi il salmone raggiunge una lunghezza di 12-18 cm ed un peso di circa 50 gr; a questo punto si trasferisce al mare dove per un po' resta alla foce del fiume e poi si allontana percorrendo anche migliaia di Km. Dopo la deposizione delle uova e la loro fecondazione i salmoni adulti tentano di riportarsi al mare, ma molti soccombono nel lungo viaggio; gli altri ripeteranno ancora il ciclo insieme con le altre generazioni.

Per lungo tempo pesce molto abbondante, oggi invece il salmone scarseggia a causa della pesca intensiva, della costruzione di dighe e dell'inquinamento: il salmone dell'Atlantico è stato il primo a rischiare l'estinzione.

1.9.2a Il modello di studio: la linea cellulare primaria di derivazione branchiale

Come già detto in precedenza, la scelta del merluzzo e del salmone, come specie oggetto della ricerca, è stata dettata dall'importanza che tali specie ricoprono nel settore economico ed industriale della Norvegia in quanto sono le specie più allevate e quindi più soggette alle malattie che colpiscono i pesci negli impianti. Inoltre è ormai noto che alla base della gestione di queste patologie c'è innanzitutto una maggiore comprensione dei meccanismi immunitari che regolano le risposte alle infezioni. Quindi per gli studi condotti è stato scelto un organo con un ruolo importante a livello immunitario come le branchie dalle quali è stata isolata una linea cellulare primaria che ho utilizzato per la sperimentazione *in vitro* condotta su merluzzo e salmone.

Le branchie hanno da sempre suscitato molto interesse in quanto organi unici coinvolti nello scambio di gas per la respirazione, nell'osmoregolazione, nelle risposte del sistema immunitario ed altre funzioni vitali (Evans et al. 2005) essenziali per la sopravvivenza dei pesci. Proprio da queste evidenze nasce l'esigenza di voler studiare le risposte che le cellule immunitarie derivanti da tale organo sono in grado di dare in seguito a specifici trattamenti. In particolare, le linee cellulari di derivazione branchiale possono costituire un validissimo modello per monitorare vari aspetti della salute dei pesci, nel campo dell'immunologia (Clem et al. 1996; Bols et al. 2001), della tossicologia (Babich and Borenfreund 1991; Segner 1998), dell'endocrinologia (Bols and Lee 1991), della virologia (Wolf 1988), della ricerca biomedica (Hightower and Renfrow 1988), del controllo delle malattie (Villena 2003), della biotecnologia ed acquacoltura (Bols 1991), con contributi significativi.

Tali linee cellulari primarie hanno il vantaggio di essere stabili e di dare risultati riproducibili permettendo la valutazione di meccanismi cellulari, di condizioni e funzioni specifiche grazie all'uso di cellule funzionali direttamente isolate dall'organo (Lee et al., 2009).

Oltre ai vantaggi appena descritti ci sono anche molti problemi legati a questo tipo di procedure, non è infatti facile ottenere una coltura primaria stabile a partire da un organo estratto da un animale. Lo sviluppo di linee cellulari semi permanenti è un lungo processo che prevede molti passaggi che sono causa di stress per le cellule (come descritto in dettaglio nei materiali e metodi).

Le colture cellulari primarie sono usualmente a breve termine, spesso richiedono specifiche condizioni per il mantenimento in coltura ed inoltre sono più suscettibili a contaminazioni

microbiche. Le difficoltà riportate in letteratura si riferiscono anche a problemi relativi ad ottenere adeguate quantità di tessuto dal quale isolare un adeguato numero di cellule vitali, per queste ragioni spesso i ricercatori si indirizzano su linee cellulari permanenti che costituiscono una risorsa di cellule facile ed abbondante ma che molto spesso derivano da cellule trasformate (tumoriali) il che pone dei limiti sull'attendibilità dei risultati e sulla loro vicinanza alla realtà dei sistemi studiati.

A questo punto, dopo aver ampiamente descritto le conoscenze alla base della problematica di mio interesse risulta chiaro, come le sostanze naturali bioattive, possano al momento suscitare particolare interesse in quanto potenzialmente in grado di contribuire alla difesa dalle malattie e al miglioramento della salute dei pesci, rappresentando così uno strumento importante per incrementare la produttività degli impianti ittici e per lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile e compatibile con l'ambiente. A tal fine sono stati condotti una serie di esperimenti, volti a valutare il potenziale immunomodulatorio di due estratti di piante medicinali (Aloe e Mirto) e di un prodotto commerciale a base di beta glucani (Macrogard), che verranno presentati in dettaglio nel capitolo successivo.

Capitolo II

Materiali e Metodi

2.1 Tecniche di Biologia cellulare e Linee cellulari utilizzate per la sperimentazione in vitro

Per le indagini *in vitro*, descritte in questa tesi, volte a comprendere i meccanismi alla base di una possibile attività immunomodulatoria di immunostimolanti naturali, sono state utilizzate due linee cellulari differenti. Attraverso una linea cellulare continua di fibroblasti di orata (SAF-1) ho condotto tutta la sperimentazione volta a testare le proprietà immunostimolanti di piante medicinali, in particolar modo Aloe e Mirto che ho svolto in Italia presso l'Università degli Studi della Tuscia. Attraverso una linea cellulare primaria di leucociti isolata dalle branchie di merluzzo e salmone atlantico ho condotto invece tutta la sperimentazione volta a testare le proprietà immunomodulatorie di un prodotto commerciale a base di beta glucani (Macrogard) in ambito proteomico che ho svolto in Norvegia presso il Bodø University College.

2.1.1 Linea cellulare SAF-1 e mezzi di coltura

Le colture di SAF-1 sono state mantenute a 25°C in L-15 (Leibovitz), supplementato con 15% siero bovino fetale, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina e 2% di L-glutammmina (SIGMA Aldrich).

2.1.2 Allestimento di una coltura primaria costituita da una popolazione di leucociti isolati dalle branchie di merluzzo e salmone atlantico

Le colture cellulari primarie si differenziano dalle colture cellulari permanenti in quanto a differenza di queste ultime sono cellule estratte dall'organo fresco e non permangono a lungo in coltura subendo molti passaggi *in vitro*. L'organo dal quale abbiamo deciso di isolare la popolazione di leucociti di nostro interesse sono le branchie organi unici coinvolti nello scambio di gas per la respirazione, nell'osmoregolazione, ed altre funzioni vitali (Evans et al. 2005) essenziali per la sopravvivenza dei pesci. Infatti, eventuali danni alle branchie possono causare problemi al funzionamento dell'organismo provocandone anche la morte. Proprio da queste evidenze nasce l'esigenza di voler studiare le risposte che le cellule derivanti da tale organo sono in grado di effettuare in seguito a specifici trattamenti.

Sulla base di quanto già detto il primo obiettivo della ricerca svolta in Norvegia è stato studiare e mettere a punto un protocollo adatto ad isolare la popolazione di leucociti dalle branchie del merluzzo e del salmone, tali cellule che sono state poi mantenute in coltura ed utilizzate per tutta la sperimentazione della ricerca.

A tale scopo gli animali, (8 per ogni specie) prelevati dalle vasche dello stabulario del dipartimento di Aquatic Animal Health sono stati dapprima anestetizzati e dissanguati per

limitare al minimo la contaminazione da eritrociti, dopodiché, in seguito a soppressione, sono state rimosse le branchie nella loro interezza (arco branchiale e lamelle) e sono state poste in una soluzione composta da PBS 1 X osmolare addizionato con antibiotici ed eparina per almeno 15 minuti.

A questo step sono seguiti dei lavaggi mediante centrifugazione con solo PBS 1X osmolare utili non solo ad eliminare tracce di sangue coagulato ma anche tracce di muco ed eventuale grasso.

Dopo i lavaggi le lamelle sono state separate dalle strutture cartilaginee che costituiscono le branchie e sono state poste in una piastra petri sterile all'interno della quale il tessuto è stato ridotto in pezzi molto piccoli per mezzo di bisturi sterili. Al termine di tale processo si è ottenuta una sospensione grazie anche all'impiego di miscele enzimatiche (Accutase®) aggiunte durante lo sminuzzamento. Tale sospensione è stata tenuta in agitazione per 1 ora circa in modo che gli enzimi potessero agire e disgregare le strutture che compongono il tessuto branchiale che è molto resistente. Al termine di tale fase la sospensione è stata passata più volte attraverso cestelli per teasing sterili così da ottenere una sospensione composta da singole cellule e non aggregati di esse aggiungendo sempre terreno L-15 con FBS così da bloccare l'azione degli enzimi. A questo punto sono stati fatti altri lavaggi con solo terreno tramite centrifugazione e la sospensione cellulare ottenuta è stata caricata su un gradiente a tre densità di percoll (21%, 46% e 71%) così da poter separare ed isolare la popolazione leucocitaria di nostro interesse mediante raccolta della seconda interfaccia. Le cellule sono state nuovamente lavate con solo terreno e seminate in fiasca con l'aggiunta di terreno completo di antibiotici ed FBS e mantenute in incubatore alla temperatura di 15 gradi.

2.2 Estratti di piante medicinali e un prodotto commerciale a base di beta glucani utilizzati per la sperimentazione

2.2.1 Preparazione degli estratti di Aloe arborescens e Myrtus communis

Gli estratti sono stati forniti dal laboratorio di Citologia e Biotecnologie Vegetali (Dipartimento per le innovazioni nei sistemi biologici, agroalimentari e forestali, Università degli Studi della Tuscia).

Per le indagini relative alla sperimentazione svolta presso l'Università della Tuscia descritte in questa tesi abbiamo scelto di utilizzare un estratto fresco della pianta di Aloe e Mirto, nell'intento di sfruttare al meglio i composti bioattivi ai quali è imputabile l'attività immunostimolante. Infatti è riportato in letteratura che tali sostanze sono molto sensibili a

variazioni climatiche e stagionali e la loro attività può essere persa durante le fasi di purificazione utilizzate per ottenere i corrispondenti prodotti commercializzati. La scelta di effettuare l'estrazione in etanolo assoluto non è casuale: innanzitutto l'estrazione alcolica ci ha permesso di eliminare dall'estratto le proteine e gli acidi nucleici e al tempo stesso di portare in soluzione piccole molecole di basso peso molecolare quali polisaccaridi, metaboliti secondari nonché lipidi con basso tenore di idrofobicità, ovvero quei principi attivi che risultano avere maggior effetto nei saggi di tipo biologico. In aggiunta l'alcol ha fornito un effetto sterilizzante nei confronti di funghi e spore fungine che spesso vivono incuneati sotto la cuticola fogliare negli interstizi tra le cellule contigue.

Le foglie di *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* sono state lavate con acqua distillata e pesate, in seguito è stato aggiunto un volume di etanolo pari al loro peso, si è proceduto all'omogenizzazione e all'estrazione per circa 20 minuti dei principi biologicamente attivi di basso peso molecolare. Il liquido risultante è stato centrifugato per 3 min. a 2500 rpm a temperatura ambiente e poiché è stato riportato in letteratura che eventuali tracce di etanolo possono risultare tossiche, il soprannatante è stato concentrato per evaporazione per mezzo di flusso di azoto e portato a secco completamente al fine di eliminare l'alcol. Per effettuare i saggi biologici, l'estratto è stato ridisciolti in terreno fresco utilizzato per la coltura delle SAF-1 e nuovamente centrifugato; dopodiché prima di somministrarlo alle cellule l'estratto etanologico risospeso è stato filtrato allo scopo di eliminare eventuali fonti di inquinamento cellulare tramite filtri con pori di diametro di 0,22 micron. Per la preparazione del controllo etanolo si è partiti da una soluzione al 30% di etanolo/acqua che poi è stata concentrata per evaporazione e nella stessa eppendorf è stato inserito il terreno fresco. Si è così ottenuta una soluzione corrispondente, in termini di eventuale contenuto di etanolo, all'estratto utilizzato per i saggi, allo scopo di valutare l'eventuale effetto dell'alcol utilizzato come solvente per l'estrazione. Tale soluzione è stata utilizzata negli esperimenti per trattare le cellule del cosiddetto "controllo etanolo".

2.2.2 Macrogard

Prodotto commerciale a base di beta glucani 1-3 ed 1-6 derivanti dalla parete di *Saccharomyces cerevisiae* (Macrogard Biotec-Mackzymal, Norway)

2.3 Esperimenti preliminari condotti su entrambe le linee: Saggi di citotossicità in vitro

Al fine di individuare la dose biocompatibile, ovvero la massima concentrazione di immunostimolante naturale somministrabile alle cellule che si discostasse il meno possibile in

termini di vitalità cellulare dal controllo (cellule non trattate), sono stati condotti dei saggi di citotossicità.

Per testare le differenti concentrazioni di estratto di Aloe o Mirto sulla linea cellulare SAF-1 è stato utilizzato il saggio ATP lite, mentre per testare le diverse concentrazioni di Macrogard sulla linea cellulare primaria di derivazione branchiale è stato utilizzato il saggio MTT.

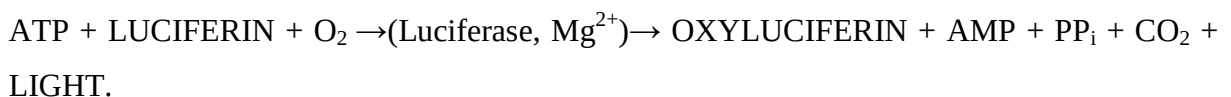
2.3.1 Saggi di citotossicità in vitro condotti sulla linea cellulare SAF-1: ATP lite

E' stata realizzata una serie di esperimenti che prevedevano trattamenti con estratto di foglie in toto di *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* somministrati a differenti concentrazioni (per Aloe 0,15 mg/ml - 0,3 mg/ml - 0,6 mg/ml - 1,2 mg/ml - 2,4 mg/ml - 4,8mg/ml e per Mirto 0,8 mg/ml - 0,4 mg/ml - 0,2 mg/ml) per vari tempi (12, 24, 48 e 72 ore) al fine di individuare la massima concentrazione di estratto somministrabile alle cellule SAF-1 che si discostasse il meno possibile in termini di vitalità cellulare dal controllo (cellule non trattate).

Le cellule SAF-1 sono state seminate in 4 piastre da 96 pozzetti (circa 10.000 per pozzetto) una per ogni tempo.

In seguito all'adesione delle cellule sul fondo dei pozzetti, la sperimentazione è stata effettuata nel seguente modo: al medium di coltura è stato aggiunto: a) l'estratto (di Mirto o Aloe) a concentrazione crescente; b) lo stesso terreno di coltura fresco, nel controllo; c) sodioazide allo 0,2%, nel controllo positivo e d) nel controllo etanolo la soluzione preparata secondo le modalità descritte nel paragrafo 2.2.1.

Le piastre così ottenute sono state incubate a 25°C per vari tempi (12, 24, 48 e 72 ore), al termine dei quali i pozzetti sono stati delicatamente lavati con PBS 1x in modo da eliminare tutte le cellule in sospensione. La determinazione della percentuale di sopravvivenza delle cellule è stata effettuata mediante il kit ATP-Lite (PerkinElmer). 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 ATP e D-luciferina secondo la seguente reazione:



Alle piastre contenenti le cellule sono stati aggiunti i reagenti che costituiscono il kit secondo le istruzioni riportate. L'intensità della luce emessa, correlata linearmente con la concentrazione di ATP, è stata misurata mediante un luminometro (Victor II).

2.3.2 Saggi di citotossicità in vitro condotti sulla linea cellulare primaria di leucociti: MTT

Il saggio di citotossicità cellulare mediante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromide) è un metodo semplice per la determinazione del tasso di vitalità delle cellule. Il test con MTT si basa sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (SDH) in cristalli di un prodotto bluastro denominato formazano. La reazione pertanto può avvenire solo nelle cellule metabolicamente attive e il valore della densità ottica (O.D.), ottenuta mediante lettura spettrofotometrica, può essere correlata al quantitativo di cellule vitali presenti.

Sono state realizzate due serie di esperimenti suddivisi per animale (salmone e merluzzo) che prevedevano trattamenti con il Macrogard somministrato a differenti concentrazioni (480 µg/ml - 240 µg/ml - 120 µg/ml - 60 µg/ml - 30 µg/ml - 15 µg/ml) per 24 ore al fine di individuare la maggiore concentrazione di beta glucani somministrabile alle cellule isolate dalle branchie che si discostasse il meno possibile in termini di vitalità cellulare dal controllo (cellule non trattate).

L'esperimento di seguito riportato è stato ripetuto per 8 salmoni ed 8 merluzzi ed i risultati ottenuti sono stati poi mediati ed analizzati statisticamente.

I leucociti isolati dalle branchie sono stati seminati in 1 piastre da 96 pozzetti (circa 10.000 per pozzetto).

In seguito all'adesione delle cellule sul fondo dei pozzetti, è stato aggiunto al medium di coltura:

in alcune file di pozzetti, il Macrogard a concentrazione decrescente; nel controllo, lo stesso terreno di coltura fresco; nel controllo positivo, sodioazide allo 0,2%.

Per la rilevazione della vitalità cellulare, una soluzione di MTT (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania) 0,5mg/ml in PBS 1x osmolare è stata dispensata 25 µl per pozzetto e lasciata incubare 1 ora a 15°C al buio in incubatore. Il formazano è stato poi solubilizzato grazie alla somministrazione di 100 µl per pozzetto di DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania) e 25 µl di buffer di glicina (glicina 0,1 M e NaCl 0,1 M a pH 10.5) e lasciato incubare per 10 minuti.

La vitalità cellulare è stata determinata mediante misurazione dell'O.D. a 570 nm utilizzando il lettore FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). I dati sono stati ottenuti con il programma associato e analizzati mediante Excel. Per ogni trattamento di ogni esperimento è stata effettuata una semina in ottuplicato, quindi dai valori di O.D. ottenuti è stato ricavato un valore medio che è stato normalizzato sul non trattato, la cui O.D. è stata valutata pari a 100.

2.3.3 *Analisi statistica relativa ai saggi di citotossicità*

I risultati numerici sono stati espressi come la media $\pm$ SD. I dati ottenuti in seguito ai saggi di citotossicità ATP lite e MTT, sono stati analizzati attraverso l'analisi di varianza ad una via (ANOVA), seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni. Inoltre, l'analisi dei dati è stata compiuta utilizzando il software GraphPad Prism 3.0. Il livello di significatività accettato è stato $p < 0.05$.

2.4 *Sperimentazione in vitro condotta sulla linea cellulare SAF-1*

2.4.1 *Estrazione dell'RNA totale delle SAF-1 a seguito di trattamenti*

Al fine di investigare l'eventuale effetto modulatore dell'estratto di Aloe o Mirto, su alcuni geni coinvolti nella risposta immunitaria sia in seguito a stimolazione antivirale o antibatterica che non, le cellule SAF-1 sono state seminate in fiasche da 75 ml ciascuna (400000 cellule per fiasca), in seguito una fiasca per ogni esperimento è stata utilizzata per il campione di controllo al tempo zero che è stato mantenuto in L-15 senza subire alcun trattamento, le fiasche rimanenti sono state incubate con differenti trattamenti a seconda dello scopo:

- Per gli studi condotti al fine di investigare su una possibile attività immunomodulatoria di tipo antivirale alcune fiasche contenenti le cellule SAF-1 sono state incubate con estratto di *Aloe arborescens* alla dose biocompatibile (1,2 mg/ml) in presenza di 10 μ g/ml di poly I:C (SIGMA Aldrich) un poliribonucleotide in grado di mimare l'infezione virale, altre fiasche sono state incubate con solo poly I:C ed altre ancora con il solo estratto di Aloe, il tutto a 25°C e a vari tempi (12, 24, 48, 72 ore).
- Per gli studi condotti al fine di investigare su una possibile attività immunomodulatoria di tipo antibatterica alcune fiasche contenenti le cellule SAF-1 sono state incubate con estratto alla dose biocompatibile (*Aloe arborescens* (1,2 mg/ml) o *Myrtus communis* (0,2 mg/ml)) in presenza di 5 μ g/ml di LPS (SIGMA Aldrich) lipopolisaccaride in grado di mimare l'infezione batterica, altre fiasche sono state incubate con solo LPS, ed altre ancora con il solo estratto di Aloe o Mirto (alla dose biocompatibile), il tutto a 25°C e a vari tempi (4, 8, 12, 24 ore). Per i tempi e modi di somministrazione dell'LPS sono state seguite le indicazioni specificate dalla bibliografia (Ingerslev et al., 2010) e della casa produttrice.

A tale procedura è seguita l'estrazione dell'RNA totale mediante il kit QIAshredder in combinazione con l'RNeasy mini kit (QIAGEN). In seguito alle procedure di estrazione su colonnina, gli RNA totali sono stati quantificati e convertiti in cDNA.

2.4.2 PCR

Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando The Minicycler™ Model PTC-150-16 (MJ Reserch, USA).

In primo luogo si è proceduto al controllo della qualità dei cDNA tramite primers specifici per il gene della β -actina, indicati di seguito:

ACT1F : 5'-ACTGTGGGGCGCCCCAGGCACC-3'

ACT1R : 5'-CTCCTTAATGTGACGCACGATTTC-3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- | | |
|---------------------------------------|----------------|
| - denaturazione per 45 secondi a 94°C | } per 35 cicli |
| - annealing per 45 secondi a 55°C | |
| - estensione per 45 secondi a 72°C | |
| - Estensione finale: 10 minuti a 72° | |

Sono stati poi utilizzati primers specifici per ciascun gene analizzato: Interferon, Mx, MHCI- α e IL-1 β , TNF α , COX-2 e TGF β .

- INTERFERON di tipo I

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante dell' IFN di tipo I di *Sparus aurata*. La sequenza di tali primers, chiamati IFNoraR1 e IFNoraF1, è la seguente:

IFNoraR1 5'-GTGGCCCATCTCTTGAG -3'

IFNoraF1 5'- CCAAAGCATCAGCTGAGG-3'

- MX

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante dell' MX di *Sparus aurata*. La sequenza di tali primers, chiamati MXrev e MXfor, è la seguente:

MXrev 5'-GTGGATCCTGATGGAGA-3'

MXfor 5'-GTCTGGAGATCGCCTCT-3'

- MHCI- α

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la catena α dell'MHCI di *Dicentrarchus labrax*. La sequenza di tali primers, chiamati MHCI-sbaR e MHCI-sbaF , è la seguente:

MHCI-sbaR: 5'-CTCCATCTTTCCTCCAGAT-3'

MHCI-sbaF: 5'-AA(G/A)(A/C)A(C/A)TACCTCACCCAG(G/A)-3'

- IL-1 β

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante dell' IL-1 β di *Sparus aurata*. La sequenza di tali primers, chiamati IL-1oraR1 e IL-1oraF1, è la seguente:

IL-1oraR1 5'-TGTCCTTGATGCACAGAGTC -3'

IL-1 α F1 5'–CACATACAACTTCCAGAGCC–3'

- TNF- α

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante dell' TNF α di *Sparus aurata*.

La sequenza di tali primers, chiamati TNFrev e TNFfor, è la seguente:

TNFrev 5'-TCGTCTTCATCATAGCTACC-3'

TNFfor 5'-CGCAGCACTTTGCTTCG-3'

- COX-2

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la la regione costante della COX-2 di *Sparus aurata*. La sequenza di tali primers, chiamati COXoraR e COXoraF , è la seguente:

COXoraR: 5'-GATATCACTGCCGCCTGA-3'

COXoraF: 5'-GAGTACTGGAAGCCGAG3'

- TGF- β

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante dell' TGF β di *Sparus aurata*.

La sequenza di tali primers, chiamati TGForaR1 e TGForaF1, è la seguente:

TGForaR1 5'–CTGCTCATCAAGTATCGTGG–3'

TGForaF1 5'–CTGAGGTCCAGACAGAC–3'

Per i primers sopra descritti è stato utilizzato il medesimo programma:

- | | |
|---------------------------------------|----------------|
| - denaturazione per 45 secondi a 94°C | } per 35 cicli |
| - annealing per 45 secondi a 55°C | |
| - estensione per 45 secondi a 72°C | |
| - Estensione finale: 10 minuti a 72°C | |

I prodotti amplificati tramite le serie di PCR sono stati separati e identificati mediante elettroforesi su gel d'agarosio ed in seguito clonati e sequenziati per verificare l'effettiva specificità dei primers utilizzati. Queste procedure sono descritte di seguito.

2.4.3 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio

La separazione e l'identificazione dei frammenti di DNA è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'agarosio, utilizzando un gel a diverse concentrazioni a seconda dei pesi molecolari delle bande da visualizzare.

Per la preparazione di un gel al 1% (w/v) si è preso: 1 g d'agarosio, disciolto in 100 ml di tampone TBE (0,89 M Tris-Borato, 20 mM EDTA, pH 8.3), utilizzato anche come tampone della corsa elettroforetica. Le molecole di DNA sono state identificate aggiungendo al gel Gel Red (Biotium), una sostanza in grado d'intercalarsi fra le basi della doppia elica di DNA,

rendendolo così visibile in seguito ad esposizione alla luce ultravioletta. Le elettroforesi sono state eseguite ad un voltaggio costante di 100 V, utilizzando l'apparato per elettroforesi Power-Pac 300 (BIO-RAD).

2.4.4 Procedure di clonaggio

I prodotti amplificati tramite le serie di PCR sono stati clonati e sequenziati per verificare l'effettiva specificità dei primers utilizzati.

2.4.4 a Vettore utilizzato

Per il clonaggio in *E. coli* è stato utilizzato il vettore pGEM-T Easy (Promega) che ci ha permesso l'identificazione diretta dei trasformanti mediante Red-White screening in MacCONKEY Agar (Sigma) .

2.4.4 b Microrganismo utilizzato

Con i prodotti di ligazione sono state trasformate cellule competenti di *E. coli* JM109 (Promega) il cui genotipo è: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k^-, m_k^+), relA1, supE44, λ^- , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZ Δ 15]. È un ceppo permissivo per vettori che portano doppie mutazioni e viene usato per lo screening di ricombinanti ottenuti in vettori che portano il gene lacZ (gene che codifica per la β -galattosidasi).

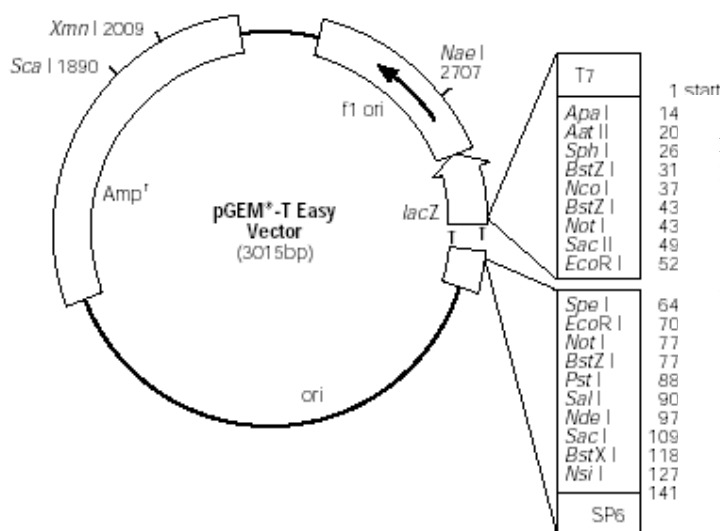


FIG. 1: MAPPA DEL VETTORE pGEM-T EASY: ori- origine di replicazione batterica, lacZ- regione codificante l' α -peptide della β -galattosidasi, lacO- operatore lac, SP6- promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi SP6, MCS- sito multiplo di clonaggio, T7- promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi T7, f1 ori- origine di replicazione del fago f1, Amp- resistenza all'ampicillina.

2.4.4 c Terreni di coltura**SOC Medium**

Composizione per litro di terreno

Tryptone	gr. 20
Estratto di lievito	gr. 10
NaCl 1M	ml 10
KCl 1M	ml 2,5
Mg ²⁺ 2M	ml 10
Glucosio 1M	ml 10

Acqua distillata fino a ml 1000

La soluzione stock di Mg²⁺ 2M è composta di 20.33% (w/v) MgCl₂ e 24.65% (w/v) MgSO₄, sterilizzata su filtri 0.2µm.

La sterilizzazione dei terreni di coltura è stata effettuata mediante trattamento in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121°C.

LB (Luria-Bertani)

Composizione per litro di terreno:

Tryptone	gr. 10
Estratto di lievito	gr. 5
NaCl	gr.10
Acqua distillata	ml 1000

2.4.4 d Purificazione del DNA da gel d'agarosio

Le bande relative ai frammenti d'interesse sono state purificate dal gel utilizzando il kit della QIAGEN (QIAquick Gel Extraction) seguendo le informazioni fornite dalla casa produttrice. Questo protocollo può essere impiegato per la purificazione di frammenti di DNA di lunghezza compresa tra le 70 bp e le 10 kb.

I frammenti di DNA, dopo essere stati visualizzati con luce ultravioletta, sono stati ritagliati dal gel cercando di minimizzare la quantità d'agarosio prelevata. Le porzioni di gel sono state trasferite in un tubo da 1.5 ml e pesate; si è poi aggiunto un volume di Buffer QG pari a tre volte il volume del gel (considerando 100 mg~100 µl) e si è lasciato incubare il campione a 50°C per 10 minuti, per dissolvere il gel. A questo punto si è caricato il campione su una colonnina cromatografica, fornita dalla casa produttrice del kit, a cui si lega il DNA e si è centrifugato per 1 minuto a 13000 rpm.. Il lavaggio finale è stato effettuato aggiungendo 0.75

ml di Buffer PE contenente etanolo e centrifugando per 1 minuto a 13000 rpm. Poi è stata effettuata un'ulteriore centrifugazione per eliminare tutto il buffer PE e, per eluire il DNA, si è trasferita la colonnina cromatografica in un nuovo tubo da 1.5 ml, a cui sono stati aggiunti 50 µl di acqua Nuclease-free. Il purificato è stato poi caricato su un gel d'agarosio per determinarne la concentrazione.

2.4.4 e Ligazione di frammenti di DNA

Gli inserti sono stati miscelati con 50 ng del vettore di clonaggio pGEM-T Easy, con la T4 DNA Ligasi, 2X Rapid Ligation Buffer (Tris-HCl 60mM, pH 7.8, MgCl₂ 20mM, DTT 20mM, ATP 2mM, 10% polietilen glicole) specifico per questo enzima e con acqua sterile, fino ad un volume totale di 10 µl. La reazione è stata realizzata utilizzando un rapporto vettore:inserto di 1:3 e lasciando i campioni per 16 ore a 4°C.

Per calcolare la giusta quantità d'inserto da aggiungere nella reazione di ligazione è stata applicata la seguente equazione:

$$\frac{\text{ng vettore} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vettore}} \times \frac{3}{1} = \text{ng inserto}$$

2.4.4 f Trasformazione delle cellule competenti

Ad un'aliquota di 50 µl di cellule competenti JM109 (Promega) sono stati aggiunti 3 µl (5ng/µl) dei prodotti della reazione di ligazione descritta precedentemente. Il campione, dopo essere stato lasciato in ghiaccio per 20 minuti, è stato sottoposto ad uno "shock" termico a 42°C per 50 secondi e quindi, posto nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. A questo punto è stato aggiunto il terreno di crescita per i batteri, il SOC medium, fino ad un volume di 1ml ed il campione è stato incubato a 37°C per 1,5 ore. Le cellule presenti nel terreno sono state centrifugate per 1 minuto a 13500 rpm; del supernatante sono stati prelevati 800 µl e nei rimanenti 200 µl è stato risospeso il pellet.

Le cellule, infine, sono state piastrate su terreno selettivo (MacCONKEY) contenente ampicillina 100 µg/ml, per isolare i trasformanti ricombinanti mediante il red-white screening.

2.4.4 g Colture batteriche

Una volta ottenute le piastre con i batteri ricombinanti, il passo successivo è stato quello di incubare le colonie batteriche, in un appropriato terreno di crescita (LB) con l'aggiunta di ampicillina e lasciarle a 37°C overnight.

2.4.4 h Estrazione del DNA plasmidico

Per l'estrazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il kit Miniprep DNA purification sistem (Promega). Le cellule batteriche sono state recuperate in dei tubi da 1,5 ml, mediante centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti.

Sono stati quindi aggiunti 250 µl di Cell Resuspension Solution e il pellet è stato risospeso; poi alla sospensione sono stati aggiunti 250 µl di Cell Lysis Solution, lasciando incubare per circa 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 10 µl di Proteasi Alcalina e poi 350 µl di Neutralization Solution, quindi la sospensione è stata centrifugata a 14000 rpm per 10 minuti.

Tutto il supernatante è stato trasferito sulla colonnina fornita dal kit (800µl per volta) e centrifugato a 14000 rpm per 1 minuto. Sono stati quindi effettuati due lavaggi, centrifugando a 14000 rpm per 1 minuto, dopo aver aggiunto la soluzione di lavaggio della colonnina e etanolo in base alle istruzioni fornite dal Kit. Infine è stato rimosso tutto l'etanolo mediante centrifugazione a vuoto a 14000 rpm per 1 minuto.

A questo punto la colonnina è stata messa su un tubo da 1,5 ml, a cui sono stati aggiunti 100 µl di acqua Nuclease free e, dopo un minuto di incubazione, il campione è stato centrifugato a 14000 rpm per 1 minuto per eluire il DNA plasmidico.

2.4.4 i Analisi di sequenza

Le sequenze sono state inviate per il sequenziamento presso: MWG Biotech (Automated DNA Sequencing Service-Ebersberg, Germania); per l'analisi delle sequenze è stato impiegato l'apposito programma BLAST (Altschul et al., 1990).

2.4.5 Analisi di espressione di tipo quantitativo tramite Real time PCR

La tecnica della PCR quantitativa (Q-PCR), che fornisce un'informazione reale sull'effettiva quantità di gene espresso, è stata utilizzata per lo studio dell'espressione del : Interferon di tipo I, Mx, MHCI- α e di IL-1 β , TNF- α , COX-2 e TGF- β a seguito dei trattamenti con gli estratti secondo le modalità descritte nel paragrafo dedicato. L'esperimento di "comparative quantitation" è un metodo molto efficiente per paragonare livelli di DNA tra campioni,

quando però non è importante sapere l'assoluta quantità del gene target (Unknown), ma il relativo incremento o decremento dell'espressione rispetto ad un campione di riferimento (Calibrator). La quantità del gene d'interesse in ogni campione può subire delle variazioni, causate ad esempio dall'introduzione di quantità diverse di cDNA, oppure da differenze nell'efficienza di estrazione dell'RNA, o della trascrittasi inversa. Per ridurre gli effetti di queste variazioni viene introdotto un secondo gene (Normalizer), che viene espresso in ogni cellula e che non viene né up né down-regolato in seguito ad alcun tipo di trattamento; nel nostro caso, questo gene è l'RNA ribosomale.

I livelli d'espressione del: Interferon, Mx, MHCI- α e di IL-1 β , TNF- α , COX-2 e TGF- β sono stati determinati utilizzando il sistema Mx3000PTM real time PCR (Stratagene – software versione 2.02) e la Brilliant SYBR Green Q-PCR Master Mix (Stratagene), seguendo le istruzioni della casa produttrice ed introducendo il ROX come sonda interna di riferimento.

La sonda SYBR Green ha un'affinità maggiore per il DNA a doppio filamento (dsDNA) che per il DNA a singolo filamento (ssDNA) o per l'RNA ed è quindi l'ideale per monitorare l'accumularsi dell'amplificato. La fluorescenza emessa dal SYBR Green aumenta di circa 1000 volte quando è legato a dsDNA, rendendo questa sonda, in qualsiasi momento del saggio, un sensibile indicatore della quantità di dsDNA presente nella miscela di reazione.

Per distinguere la fluorescenza derivata da prodotti PCR specifici da quella di prodotti PCR aspecifici, le reazioni di Q-PCR con la sonda SYBR Green sono state associate alla curva di dissociazione, durante la quale i dsDNA vengono denaturati incrementando gradualmente la temperatura e raccogliendo ad ogni step i valori di fluorescenza. La riduzione dell'intensità di fluorescenza alla temperatura di melting del prodotto PCR specifico è un indice qualitativo della proporzione di dsDNA attribuibile realmente all'amplificato di interesse.

Sono stati utilizzati gli stessi primers specifici per i geni di interesse descritti in precedenza.

Approssimativamente 10 ng di cDNA (in triplicato) sono stati usati in ogni reazione di PCR e per ogni coppia di primers è stato effettuato il controllo negativo (in duplicato), aggiungendo acqua al posto del template.

Il programma utilizzato per tutte le coppie di primers è:

- denaturazione iniziale per 10 minuti a 95° C
 - denaturazione per 45 secondi a 95° C
 - annealing per 45 secondi a 52° C
 - estensione per 45 secondi a 72° C
- } per 45 cicli
- analisi della curva di melting a 52° C (metodo “all points”): quest’ultimo passaggio è utile per verificare la specificità del picco d’amplificazione, che viene comunque esaminato con l’elettroforesi su gel d’agarosio.

I valori di fluorescenza vengono raccolti durante la fase di estensione dell’amplificazione e per l’analisi dei dati viene utilizzato il metodo “endpoints” del software Mx3000PTM.

In ogni esperimento la quantificazione relativa è stata eseguita comparando i livelli dei trascritti d’interesse con quello di riferimento definito come calibratore e il cui valore è stato posto uguale a 1.0. Nell’analisi d’espressione dei geni : Interferon, Mx, MHCI- α e di IL-1 β , TNF- α , COX-2 e TGF- β a seguito dei trattamenti con solo estratto è stato preso come calibratore l’espressione del controllo al tempo zero. Lo stesso gene normalizzatore (RNA ribosomale) è stato incluso nell’analisi di tutti i campioni per correggere le differenze di cDNA tra i campioni. La quantità del trascritto è stata stabilita sulla base della determinazione del ciclo threshold (Ct), definito come il ciclo in cui è stato rilevato un incremento di fluorescenza statisticamente significativo al di sopra di un segnale di background.

2.4.5 a Analisi statistica relativa ai saggi di analisi di espressione

I risultati numerici sono stati espressi come la media $\pm$ SD. I dati ottenuti in seguito all’analisi d’espressione quantitativa, sono stati analizzati attraverso l’analisi di varianza a due vie (ANOVA), seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni. Inoltre, per determinare il peso del fattore tempo nella variazione dei livelli di espressione è stata eseguita un’analisi di varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di comparazione multipla Dunnett dove appropriato.

L’analisi dei dati è stata compiuta utilizzando il software GraphPad Prism 3.0. ed il livello di significatività accettato è stato $p < 0.05$.

2.4.6 Saggi antibatterici

In una seconda fase della sperimentazione sono stati condotti dei saggi antibatterici volti ad investigare le proprietà antibatteriche dell’estratto di Aloe o Mirto verso due dei più comuni patogeni che minacciano la salute dei pesci allevati.

2.4.6 a Batteri e mezzi di coltura

Le colture batteriche di *Listonella anguillarum* biotipo 01, strain: ATCC 43305 e *Photobacterium damsela* strain: B07/8 sono state fornite dal Dr. A. Manfrin, IZS Venezia, e mantenute in Trypticase Soy Broth (Biomerieux) 2% NaCl a 25 °C fino a crescita esponenziale, confermata tramite spettrofotometro.

2.4.6 b Antibiogramma: metodo per diffusione con dischetti imbevuti o di Kirby Bauer

L'antibiogramma, un semplice esame *in vitro*, è stato utilizzato per valutare se i batteri fossero sensibili o resistenti all'estratto di *Aloe arborescens* e/o di *Myrtus communis*. A tale scopo è stato utilizzato il metodo di Kirby-Bauer.

La metodica di Kirby-Bauer, utilizzata per questi saggi, ha previsto l'utilizzo di dischetti di carta bibula sterile del diametro di 6 mm (Bioline italiana), posizionati su ciascuna piastra agarizzata (Trypticase Soy Agar 2% NaCl), imbevuti di 20 µl di trattamento rappresentato da: estratto di foglie di *Myrtus communis* a varie concentrazioni (da 5 a 83,5 mg/ml) o di *Aloe arborescens* a varie concentrazioni (1,2-120 mg/ml) e due antibiotici, tetraciclina e ampicillina a varie concentrazioni (da 2,5 a 20 µg/ml per tetraciclina e da 3,75 a 30 µg/ml per ampicillina). La scelta degli antibiotici tetraciclina e ampicillina da utilizzare come controllo positivo dell'esperimento, è stata effettuata sulla base di un saggio preliminare nel quale sono stati testati tre antibiotici a concentrazioni consigliate dalla casa produttrice ossia: tetraciclina (20µg/ml), ampicillina (30µg/ml) e kanamicina (30µg/ml) per vedere a quale fossero sensibili i batteri. Da questa prova si è osservato che solamente la tetraciclina (20µg/ml) mostrava un'attività inibitoria nei confronti di *Listonella anguillarum* e l'ampicillina (30µg/ml) verso *Photobacterium damsela*. Per ogni prova è stato utilizzato come controllo negativo acqua sterile e come controllo positivo l'antibiotico di riferimento per il patogeno in esame, ossia la tetraciclina (20 µg/ml) per *Listonella anguillarum* e l'ampicillina (30µg/ml) per *Photobacterium damsela*. Le piastre sono state poi incubate a 25°C per 24 ore. Le prove sono state effettuate in triplicato. La presenza di attività antimicrobica, è stata rilevata attraverso l'individuazione di aloni di inibizione intorno ai dischetti presenti nelle piastre contenenti i microrganismi. I saggi sono stati calibrati misurando l'area dell'alone inibitorio creato da diluizioni seriali dell'antibiotico ampicillina per *P. damsela* e tetraciclina per *L. anguillarum*. L'attività antibatterica degli estratti è stata espressa come attività corrispondente a µg/ml di antibiotico.

2.4.6 c *Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)*

È stata inoltre effettuato un ulteriore saggio antibatterico con lo scopo di trovare la (MIC) dell'estratto di mirto verso i patogeni ovvero, la concentrazione più bassa di estratto di mirto alla quale non vi è crescita batterica visibile. Tale saggio è stato eseguito solo per l'estratto di mirto in quanto dai saggi precedenti non è stata rilevata per Aloe la presenza di aloni di inibizione della crescita batterica a seguito di trattamento. Il saggio è stato allestito seguendo la metodica di Kirby-Bauer. Sono stati quindi fatti crescere i batteri su piastre agarizzate trattate con concentrazioni decrescenti di estratto di mirto (5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml e 2.5 mg/ml) a 25°C e sono stati letti i risultati dopo 24 ore di crescita dei batteri. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

2.4.6 d *Determinazione della Minima Concentrazione Battericida (MBC)*

Dopo aver valutato i valori di MIC tramite metodica di Kirby-Bauer, per ogni patogeno è stato eseguito un saggio di diluizioni scalari in terreno liquido in cui, i tubi di coltura contenenti Trypticase Soy Broth (Biomérieux) 2% NaCl sono stati inoculati con il ceppo batterico in presenza di estratto di mirto in un intervallo di concentrazione compreso tra 83,5 e 2,5 mg/ml. I tubi sono stati incubati per 24 ore a 25°C. Dalle colture batteriche è stato poi allontanato l'estratto di mirto tramite lavaggi ed i batteri sono stati poi piastrati su terreno solido ed incubati a 25°C per 24 ore per stimare la sopravvivenza batterica. Su questa base la Minima Concentrazione Battericida (MBC) è stata stimata come la più bassa concentrazione di estratto di mirto che risulta in una totale assenza di crescita batterica. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

2.4.6 e *Analisi statistica*

Per l'analisi statistica dei saggi antibatterici è stata calcolata la regressione lineare, dove possibile, o la regressione non-lineare (associazione esponenziale ad una fase). Nei casi di regressione lineare è stata calcolata la probabilità P (pendenza della retta significativamente diversa da zero) per rigettare l'ipotesi che la regressione sia casuale. Nei grafici è stato mostrato l'intervallo di confidenza al 95% di r^2 . I dati sono stati analizzati con GraphPad Prism 4.

2.4.7 *Microscopia elettronica*

Per investigare eventuali modificazioni esterne o interne alle cellule in seguito a trattamento ci siamo avvalsi del supporto della microscopia elettronica a scansione e a trasmissione che ho

effettuato presso il Centro Interdipartimentale di Microscopia Elettronica dell'Università degli Studi della Toscana.

2.4.7 a Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Ci siamo avvalsi della microscopia elettronica a scansione per effettuare 2 tipi di indagini:

- La prima, al fine di investigare eventuali modificazioni di tipo morfologico ultrastrutturale delle cellule SAF-1 in seguito a trattamento con l'estratto di Aloe.

A tale scopo le cellule SAF-1 sono state preventivamente fatte crescere in pozzetti in presenza di un vetrino per l'adesione delle cellule in crescita. Dopodiché sono state trattate con l'estratto di *Aloe arborescens* a varie concentrazioni (1,2 mg/ml - 2,4 mg/ml - 4,8 mg/ml) ed incubate a 25°C per 24 ore. Il controllo dell'esperimento è stato effettuato incubando le cellule a 25°C per 24 ore con il solo terreno di coltura. Al termine dei trattamenti, i vetrini, con le cellule adese, sono stati preparati per la visualizzazione al SEM (secondo il protocollo descritto in seguito).

- La seconda, al fine di investigare eventuali modificazioni di tipo morfologico ultrastrutturale dei batteri in seguito a trattamento con l'estratto di Mirto (alla concentrazione minima inibente, alla concentrazione minima battericida e alla concentrazione massima) e con l'antibiotico.

A tale scopo *Listonella anguillarum* e *Photobacterium damsela* una volta raggiunta l'O.D. di 0,5 sono stati trattati con l'estratto di *Myrtus communis* alla concentrazione MIC (4 mg/ml), MBC (20 mg/ml per *L. anguillarum* e 10 mg/ml per *P. damsela*) e massima (83,5 mg/ml) ed incubate a 25°C per 24 ore. In contemporanea gli stessi batteri sono stati trattati con l'antibiotico di riferimento (tetraciclina per *L. anguillarum* e ampicillina per *P. damsela*), ed anch'essi incubati a 25°C per 24 ore. Il controllo dell'esperimento è stato effettuato incubando i batteri a 25°C per 24 ore con il solo terreno di coltura. Al termine dei trattamenti, i pellet dei batteri trattati, ricavati mediante centrifugazione, sono stati preparati per la visualizzazione al SEM (secondo il protocollo descritto in seguito).

Protocollo di preparazione per la visualizzazione al SEM dei campioni:

1. le cellule sono state fissate per 1 h in 5% formaldeide-5% glutaraldeide in tampone cacodilato 0,1 M pH 7.2 ed accuratamente risciacquate nello stesso buffer;
2. le cellule sono state post-fissate per un'altra ora in 1% tetrossido di osmio in tampone cacodilato 0,1 M pH 7.2 e risciacquate nello stesso buffer;
3. è seguita una graduale disidratazione in soluzioni di alcool a concentrazione crescente (30-50-70-100%);

4. le cellule, in alcool assoluto, ancora adese ai vetrini sono state essiccate tramite la tecnica del “critical point drying CO₂” (BALZER UNION CPD 020) per evitare il collassamento della superficie dei campioni. La tecnica dell’essiccamento al punto critico consiste nella progressiva sostituzione dell’alcool etilico assoluto con anidride carbonica allo stato liquido. A sostituzione ultimata il contenitore è fatto riscaldare sino alla temperatura di 40°C. In queste condizioni, la CO₂ raggiunge il proprio punto critico, vale a dire, una pressione tale per cui avviene il passaggio dallo stato liquido a quello gassoso senza che si crei tensione superficiale dei campioni.

5. le cellule sono state ricoperte d’oro in un’unità di sputtering (BALZER UNION MD 010) sotto continuo flusso di argon. La copertura in materiale conduttivo ha lo scopo di amplificare il segnale degli elettroni secondari.

I vetrini con le cellule adese sono stati montati su stub di alluminio e osservati al microscopio elettronico a scansione JEOL JSM 5200.

2.4.7 b Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Al fine di investigare eventuali modificazioni intracellulari dei batteri in seguito a trattamento con l’estratto di Mirto e con l’antibiotico, sono state eseguite delle indagini al microscopio elettronico a trasmissione. I patogeni *L. anguillarum* e *P. damsela* sono stati trattati con l’estratto di *Myrtus communis* alla concentrazione MIC (4 mg/ml), MBC (20 mg/ml per *L. anguillarum* e 10 mg/ml per *P. damsela*) e massima (83,5 mg/ml) ed incubate a 25°C per 24 ore. In contemporanea altri campioni degli stessi batteri sono stati trattati con l’antibiotico (tetraciclina per *L. anguillarum* e ampicillina per *P. damsela*), ed incubati a 25°C per 24 ore. Il controllo dell’esperimento è stato effettuato incubando i batteri con il solo terreno di coltura. Al termine dei trattamenti, i pellet ottenuti per centrifugazione dai batteri trattati, sono stati preparati per la visualizzazione al TEM.

I campioni sono stati fissati in una miscela al 4% paraformaldeide e 2.5% glutaraldeide in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7,2 (Karnovsky, 1965). Successivamente, il materiale è stato lavato in tampone cacodilato 0,1 M, dove è stato lasciato per una notte; è seguita poi una post fissazione con tetrossido di osmio 1 % in tampone cacodilato 0,1 M per un’ora, poi di nuovo lavato in tampone cacodilato 0,1 M per 1 ora. E’ stata effettuata, successivamente, una fase di disidratazione del materiale, attraverso una serie di passaggi in alcool etilico a concentrazioni progressivamente crescenti (dal 50% al 100%) e in seguito i campioni sono stati infiltrati in resina Spurr (TAAB, England). Le ultrasottili (dello spessore di 60-80 nm) sono state raccolte su appositi retini di rame e sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo:

queste soluzioni saline contengono atomi pesanti, i quali, legandosi in modo selettivo a specifiche strutture cellulari, ne aumentano statisticamente la possibilità di interazione con il fascio elettronico primario, permettendo, durante l'osservazione, la formazione di un'immagine ad elevato contrasto. Infine, i campioni sono stati osservati al microscopio elettronico a trasmissione Jeol JEM EX II, a 120 kV.

2.5 Sperimentazione in vitro condotta sulla linea cellulare primaria di leucociti di derivazione branchiale

2.5.1 Trattamenti

Come per i saggi di citotossicità MTT sopra descritti anche gli esperimenti di proteomica sono stati condotti su campioni di leucociti isolati dalle branchie di otto esemplari di salmone ed otto esemplari di merluzzo. Le cellule derivanti da ogni pesce sono state suddivise in 3 fiasche e trattate per 24 ore rispettivamente con solo terreno di coltura (cellule controllo non trattate) e con le due differenti concentrazioni di macrogard prescelte (480 µg/ml 240 µg/ml) sulla base delle indicazioni ottenute dall'analisi dei dati derivanti dai saggi di citotossicità MTT.

2.5.2 Estrazione proteine totali, Dosaggio e Purificazione

A seguito dei trattamenti, le cellule (leucociti estratti ed isolati dalle branchie di salmone e merluzzo) sono state raccolte mediante centrifugazione e lavate almeno 3 volte con PBS 1x osmolare per rimuovere completamente il terreno. Ai vari pellet di cellule è stato poi aggiunto un buffer di lisi (0.2% SDS, 1% Triton X 100, 10mM EDTA, 0.2M NaCl) nella misura di 0,5 ml per 5×10^7 cellule addizionato con 5 µl di protease inhibitor cocktail mix (SIGMA aldrich). A questo punto dopo aver passato al vortex la sospensione cellulare è stata posta su un agitatore per 15 minuti a temperatura ambiente ed il lisato cellulare ottenuto è stato poi centrifugato a 16000 xg per 30 minuti. Il sopranatante (sospensione proteica) è stato aspirato e posto in un tubo nuovo e dializzato per mezzo di nanosep 3kD cutoff tubes (Millipore).

Gli estratti proteici così ottenuti sono stati quantificati mediante il fluorimetro QubitTM Invitrogen (CA, USA) ed ottimizzati per le analisi di elettroforesi bidimensionale mediante il kit ReadyPrepTM 2-D Cleanup kit (BIORAD) secondo il manuale della casa produttrice.

2.5.3 Elettroforesi Bidimensionale

La quantità specifica di proteine totali per ogni campione (circa 100 µg) è stata risospesa in sample buffer (urea 7M, tiourea 2M, ASB-14 1%, Trizma base 40 mM, 62.5 mM DTT, 0.625% (w/v) Bio-Lite 3/10 anfoline, 0.001% Blue di bromofenolo) fino ad un volume di 125 µl. A questo punto le IPG strips da 7 cm, pH 3-10 (Bio-rad) sono state reidratate ed incubate con i campioni per tutta la notte a temperatura ambiente e poi soggette ad isoelettrofocusing mediante il sistema protean IEF cell (Bio-rad). Una volta focalizzate, le IPG strips sono state equilibrate mediante due tipi di equilibration buffer (urea 6M, Tris-Hcl 0.375M pH 8.8, SDS 2%, glycerol 20%) addizionati rispettivamente con 2% DTT e con 2.5 % Iodoacetamide ad azione riducente ed alchilante con i quali sono state trattate le strips per 15 minuti ciascuno. Le strips così equilibrate sono state quindi caricate su gel di poliacrilamide al 15% ed è seguita la corsa per la seconda dimensione SDS-PAGE mediante il sistema protean IIXii (Bio-rad). Gli spots proteici sono stati poi rivelati mediante colorazione Brilliant Blue Coomassie G250-Colloidale (Merck, Germany) al termine della quale, l'immagine di ciascun gel è stata acquisita tramite Versadoc imaging system (Bio-rad) ed analizzata con il software PD-Quest (BIO-RAD).

Capitolo III

Risultati e Discussione

Una recente tendenza nell'ambito dell'acquacoltura è di limitare l'uso di antibiotici e chemioterapici per controllare e prevenire infezioni di natura parassitaria, batterica e fungina e di ricercare nuove sostanze naturali, efficaci e sicure, in grado di rafforzare il sistema immunitario dei pesci. In questo contesto, l'utilizzo degli immunostimolanti naturali come erbe medicinali e beta glucani da utilizzare al posto di antibiotici e chemioterapici ha portato alla nascita di un nuovo settore di ricerca che trova applicazione nella acquacoltura di tipo biologico (Dalmo e Bogwald, 2008; Galina et al., 2009; Citarasu, 2010). Lo studio dei composti naturali come estratti di erbe medicinali e beta glucani utilizzati come immunostimolanti nell'alimentazione di larve ed adulti, rappresenta infatti un aspetto importante per incrementare la produttività degli impianti ittici e per lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile e compatibile con l'ambiente. E' noto inoltre che tali composti esibiscono un'attività antimicrobica e possano migliorare la crescita e lo sviluppo delle specie allevate in impianti di acquacoltura. Differenti studi hanno riportato che le malattie che si manifestano nei pesci di interesse commerciale possono essere controllate attraverso la somministrazione di immunostimolanti naturali di origine vegetale ma anche derivanti da lieviti in quanto sono in grado di potenziare la risposta immunitaria sia innata che adattativa (Robertson et al., 1990; Sakai et al., 1991; Anderson et al., 1992; Ainsworth et al., 1994 e Verlhac et al., 1996; Sakai, 1999; Harikrishnan et al., 2001; Kamilya et al., 2006; El-boshy et al., 2008). In particolare numerosi studi hanno riportato che alcune componenti attive o prodotti di erbe (antrachinone, oli essenziali, polisaccaridi, saponine etc..) possono aumentare alcuni parametri dell'immunità innata (lisozima, complemento, antiproteasi, mieloperossidasi, specie reattive dell'ossigeno, specie reattive del nitrogeno, fagocitosi, burst respiratorio, ossido nitrico, emociti totali, fenolossidasi, glutationeperossidasi e rilascio di citochine) e dell'immunità adattativa (livello anticorpale, attività battericida, emoagglutinazione) in differenti specie di teleostei (Harikrishnan et al., 2001).

Per quanto riguarda i beta glucani vengono definiti in letteratura come polisaccaridi utili in acquacoltura in quanto promotori della produzione di proteine litiche antimicrobiche come il lisozima ed il complemento (Engstad et al., 1992), stimolanti l'attività fagocitica dei macrofagi (Galeotti et al., 1998), capaci di potenziare la protezione contro le infezioni portando ad un aumento degli anticorpi secreti dalle plasmacellule contro patogeni. Gli effetti appena citati si traducono in una stimolazione delle risposte immunitarie a vari livelli come ad esempio uccisione di batteri, modulazione della produzione di citochine e promozione della sopravvivenza a livello cellulare, degli organi e dell'intero animale (Rodriguez et al., 2009).

Considerando quindi l'ampio spettro di attività e proprietà dimostrate dai composti e dai prodotti di origine naturale, risulta chiaro il motivo per cui sta crescendo sempre più l'attenzione verso il potenziale espresso da tali sostanze nella gestione sanitaria degli allevamenti ittici.

In questo contesto si inserisce il lavoro svolto in questa tesi di dottorato che ha avuto l'obiettivo di testare e valutare gli effetti di più immunostimolanti naturali, per poter poi fornire risultati utili a proporre tali composti come nuova prospettiva per l'allevamento biologico di teleostei marini. In particolar modo tra le varie tipologie di immunostimolanti di origine naturale abbiamo deciso di porre la nostra attenzione verso gli estratti ottenuti da due piante medicinali, l'*Aloe arborescens* ed il *Myrtus communis* ed un prodotto commerciale a base di beta glucani, il Macrogard: che per i loro composti bioattivi risultano di grande interesse nel panorama della letteratura scientifica (come ampiamente descritto nel capitolo introduttivo).

Proprio in virtù del fatto che i suddetti sono considerati fonte di biomolecole con prospettive in ambito chimico e farmacologico note perlopiù sui mammiferi abbiamo deciso di testarne le proprietà anche sui pesci.

La scelta dell'orata (*Sparus aurata*) del merluzzo (*Gadus morhua*) e del salmone (*Salmo salar*), come specie modello della ricerca, è stata dettata dall'importanza che tali specie ricoprono nel settore economico ed industriale della itticoltura europea in quanto sono le specie più allevate e quindi più soggette alle malattie che colpiscono i pesci negli impianti. Come detto in precedenza, alla base della gestione di queste patologie c'è innanzitutto una maggiore comprensione dei meccanismi immunitari che regolano le risposte alle infezioni. Proprio da qui nasce l'esigenza di utilizzare modelli *in vitro* adatti ed utili per studi di tipo immunologico, che sono alla base della messa a punto di possibili strategie utili ad arginare lo svilupparsi di malattie negli impianti con evidenti vantaggi per la produttività delle aziende.

Quindi per le sperimentazioni condotte, abbiamo deciso di avvalerci dell'uso di due linee cellulari differenti che ci hanno permesso di studiare i meccanismi alla base di una possibile attività modulatoria di immunostimolanti naturali.

La scelta di queste due linee non è stata affatto casuale ma anzi è stata ben ponderata in base a forti evidenze bibliografiche.

Attraverso una linea cellulare continua di fibroblasti di orata (SAF-1) ho condotto tutta la sperimentazione, svolta in Italia presso l'Università degli Studi della Tuscia, volta a testare le proprietà immunostimolanti di piante medicinali, in particolar modo Aloe e Mirto. La linea cellulare continua di fibroblasti di orata SAF-1 (*Sparus aurata Fibroblasts*) risulta dalla

letteratura essere un buon modello largamente utilizzato in studi su patogeni di pesci marini e per indagini sull'immunologia dei teleostei. Il suo interesse come sistema modello per studi immunologici è in continua crescita anche a causa dell'assenza di disponibilità di linee cellulari di specie marine di importanza economica. Questa linea cellulare mima il comportamento generale che assumono i fibroblasti di orata in caso di danno tissutale e nella fase infiammatoria che segue (Castillo-Briceño et al., 2011). Infatti i fibroblasti, attraverso la produzione di citochine, chemochine e la modificazione dei vasi sanguigni, sono in grado di coordinare i movimenti delle cellule immunitarie attraverso i tessuti e in particolare possono direttamente modificare l'attivazione e lo stato di differenziamento dei linfociti T attraverso la produzione di recettori co-regolatori, citochine e delle componenti della matrice extracellulare (Barnas et al., 2010). La linea SAF-1 è stata inoltre utilizzata per ricerche su infezioni batteriche e virali, in quanto è stato dimostrato che sia suscettibile a diversi virus di pesce e a prodotti batterici extracellulari; i fibroblasti infatti presentano recettori Toll-like e CD14 sulla loro superficie divenendo quindi in grado di rispondere a LPS e ad altri PAMPs (Ingerslev et al., 2010). In particolare la linea in oggetto è stata utilizzata in recenti lavori per investigare il ruolo di proteine indotte da IFN nei meccanismi di difesa di tipo innato contro diversi virus di pesce (Bejar et al., 1997; Perez-prieto et al., 1999; Tafalla et al., 2004; Garcia Rosado et al., 2007) e per identificare i meccanismi di secrezione dell'IL-1 β nei pesci (Pelegri n et al., 2004). Come gi  detto in precedenza per la sperimentazione *in vitro* volta a studiare i meccanismi alla base di una possibile attiv  immunomodulatoria di immunostimolanti naturali ho utilizzato, oltre alla linea continua di fibroblasti di orata SAF-1, una linea cellulare primaria isolata dalle branchie di merluzzo e salmone atlantico. Grazie a questa coltura primaria ho condotto una sperimentazione, svolta in Norvegia presso il Bod  University College, tesa a testare le propriet  e gli effetti immunomodulatori di un prodotto commerciale a base di beta glucani (Macrogard) sul proteoma del merluzzo e del salmone atlantico.

Le branchie, organo da cui deriva la linea cellulare, rivestono un importante ruolo a livello immunitario visto che per la sua posizione rappresenta una delle prime vie di ingresso per potenziali patogeni e perci    luogo di intensa attiv  difensiva. Tali linee cellulari primarie hanno il vantaggio di essere stabili e di dare risultati riproducibili permettendo la valutazione di meccanismi cellulari, di condizioni e funzioni specifiche grazie all'uso di cellule funzionali direttamente isolate dall'organo (Lee et al., 2009).

Oltre ai vantaggi appena descritti ci sono anche molti problemi legati a questo tipo di procedure, non   infatti facile ottenere una coltura primaria stabile a partire da un organo estratto da un animale. Lo sviluppo di linee cellulari semi permanenti   un lungo processo che

prevede molti passaggi che sono causa di stress per le cellule (come descritto in dettaglio nei materiali e metodi).

Le colture cellulari primarie sono usualmente a breve termine, spesso richiedono specifiche condizioni per il mantenimento in coltura ed inoltre sono più suscettibili a contaminazioni microbiche. Le difficoltà riportate in letteratura si riferiscono anche a problemi relativi ad ottenere adeguate quantità di tessuto dal quale isolare un adeguato numero di cellule vitali, per queste ragioni spesso i ricercatori si indirizzano su linee cellulari permanenti che costituiscono una risorsa di cellule facile ed abbondante ma che molto spesso derivano da cellule trasformate (tumorali) il che pone dei limiti sull'attendibilità dei risultati e sulla loro vicinanza alla realtà dei sistemi studiati.

Le branchie hanno da sempre suscitato molto interesse in quanto organi unici coinvolti nello scambio di gas per la respirazione, nell'osmoregolazione, nelle risposte del sistema immunitario ed altre funzioni vitali (Evans et al. 2005) essenziali per la sopravvivenza dei pesci. Proprio da queste evidenze nasce l'esigenza di voler studiare le risposte che le cellule immunitarie derivanti da tale organo sono in grado di dare in seguito a specifici trattamenti. In particolare, le linee cellulari di derivazione branchiale possono costituire un validissimo modello per monitorare vari aspetti della salute dei pesci, nel campo dell'immunologia (Clem et al. 1996; Bols et al. 2001), della tossicologia (Babich and Borenfreund 1991; Segner 1998), dell'endocrinologia (Bols and Lee 1991), della virologia (Wolf 1988), della ricerca biomedica (Hightower and Renfrow 1988), del controllo delle malattie (Villena 2003), della biotecnologia ed acquacoltura (Bols 1991), con contributi significativi.

Per queste ragioni gran parte della prima parte della ricerca da me svolta in Norvegia si è basata proprio sullo studio del materiale bibliografico esistente su questo argomento (specialmente nei riguardi delle specie di nostro interesse, il merluzzo ed il salmone) e sull'allestimento di alcuni esperimenti preliminari volti a comprendere quali fossero tra i vari metodi presenti in letteratura i più adatti al trattamento del tessuto branchiale. Tali fasi mi hanno permesso di mettere a punto un protocollo ad hoc per l'isolamento di leucociti dalle branchie di merluzzo e salmone stabilendo una coltura primaria a breve termine grazie alla quale abbiamo potuto condurre tutte le fasi della sperimentazione in programma. Il fatto di essere riusciti ad isolare ed a mantenere in coltura questa linea cellulare è un risultato già di per sé molto interessante in quanto sono molto scarse le notizie riguardanti linee cellulari iniziate da tale organo nei pesci specialmente per quanto riguarda il merluzzo ed il salmone atlantico.

3.1 Risultati ottenuti utilizzando gli estratti di *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* sulla linea cellulare SAF-1

Come principale requisito per un sicuro utilizzo degli immunostimolanti naturali, presi in esame da questa ricerca, come prodotti medicinali, abbiamo testato per prima cosa la loro biocompatibilità sulla linea cellulare utilizzata per gli studi *in vitro*. Ci siamo quindi chiesti quali sarebbero stati i loro effetti sulla vitalità cellulare in seguito a trattamento e quale fosse la migliore concentrazione da utilizzare. A tal fine sono stati condotti saggi di citotossicità *in vitro* che hanno permesso la determinazione della vitalità cellulare a seguito dei trattamenti.

Per testare le differenti concentrazioni di estratto di Aloe o Mirto sulla linea cellulare SAF-1 è stato utilizzato il saggio ATP lite.

3.1.2 Saggio ATP lite su cellule SAF-1 in seguito a trattamento con estratto di *Aloe arborescens*

Come primissimo approccio nei confronti di questa nuova tematica ci siamo chiesti quale sarebbero stati gli effetti dell'estratto di *Aloe arborescens* sulla vitalità cellulare dei fibroblasti di orata in seguito a trattamento e quale fosse la migliore concentrazione di somministrazione. A tal fine sono stati condotti saggi di citotossicità *in vitro* mediante il kit ATP lite (PerkinElmer) che ha permesso la determinazione della percentuale di sopravvivenza delle cellule (Crouch et al., 1993; Cree and Andreotti 1997) trattate con differenti concentrazioni di estratto. La molecola ATP infatti è presente in tutte le cellule metabolicamente attive e la sua concentrazione scende rapidamente quando queste vanno incontro a necrosi o apoptosi, per cui la sua quantità rappresenta una informazione attendibile circa la vitalità cellulare (Crouch et al., 1993; Cree and Andreotti 1997).

Dall'analisi statistica dei dati che è seguita sono emerse differenze di significatività tra i gruppi studiati (controllo: costituito da cellule non trattate; cellule trattate con estratto a varie concentrazioni: 0,15 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,6 mg/ml; 1,2 mg/ml; 2,4 mg/ml; 4,8mg/ml; controllo positivo cioè trattamento con effetto sicuramente citotossico: costituito da cellule trattate con sodio azide 0,2%; controllo etanolo) (vedi figura 13). Nostro interesse era individuare la maggiore concentrazione di estratto che in termini di vitalità cellulare si discostasse meno dal controllo e che quindi presumibilmente fosse in grado di svolgere una qualsiasi attività senza creare danno alle cellule trattate, non andando a variare le caratteristiche del medium di coltura. Dopo 24 ore di trattamento le cellule incubate con estratto alla concentrazione di 1,2 mg/ml si comportano in termini di vitalità cellulare come le cellule controllo, questo è vero anche per le altre concentrazioni a scalare il che è prevedibile,

visto che diminuendo il contenuto di estratto ci si avvicina sempre più alle condizioni di normale mantenimento delle cellule ovvero al medium di coltura. D'altro canto il gruppo corrispondente alla concentrazione di 1,2 mg/ml di estratto risulta essere significativamente differente dal gruppo relativo alla concentrazione 4,8 mg/ml e da quello composto dalle cellule trattate con sodio azide allo 0,2% che per definizione viene inserito nell'esperimento per ottenere un effetto citotossico sulle cellule.

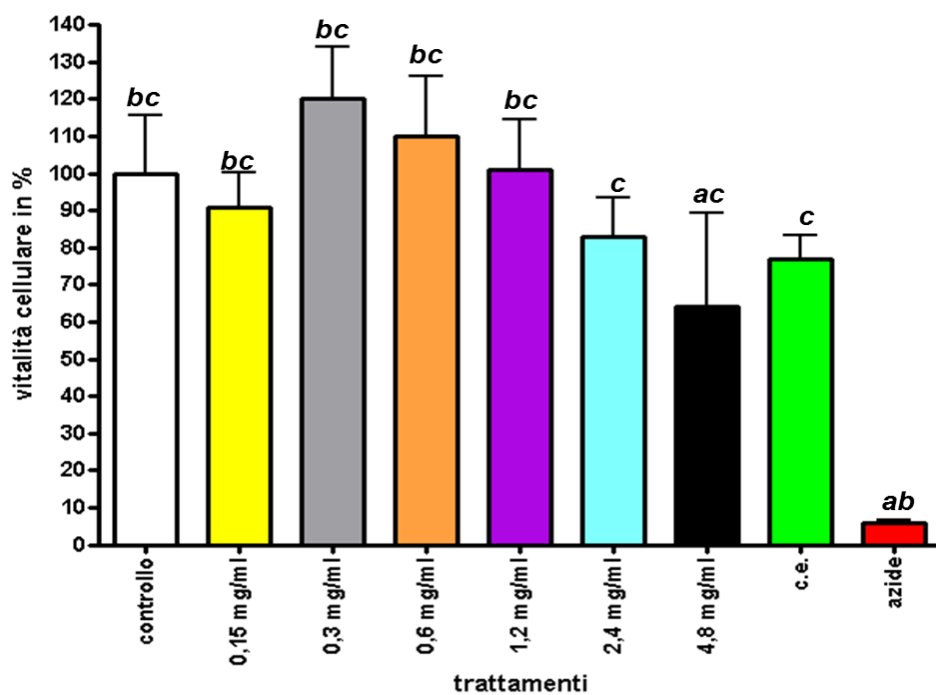


Fig. 13

Saggio di citotossicità eseguito dopo 24 ore di trattamento. Legenda: **a** significativamente differente dal controllo; **b** significativamente differente da 4,8 mg/ml; **c** significativamente differente da sodioazide. Sono stati presi in considerazione valori di p a partire da $p < 0.05$.

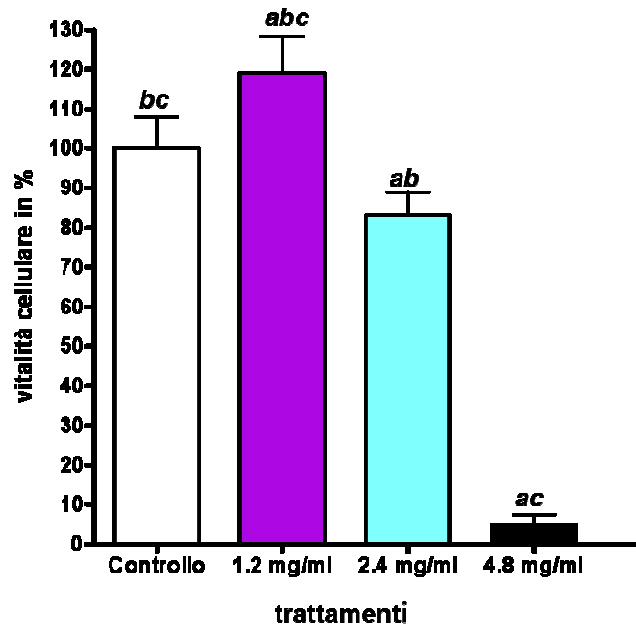


Fig. 14

Saggio di citotossicità eseguito dopo 72 ore di trattamento. Legenda: **a** significativamente differente dal controllo; **b** significativamente differente da 4,8 mg/ml; **c** significativamente differente da 2,4 mg/ml. Sono stati presi in considerazione valori di p a partire da $p < 0.05$.

In ultimo, per quanto riguarda la concentrazione di 2,4 mg/ml possiamo dire che pur non essendo significativamente diversa dal controllo, non lo è neanche dal gruppo trattato con 4,8 mg/ml di estratto che ha un chiaro effetto citotossico sui fibroblasti di orata. Questo risultato è stato riscontrato anche in fibroblasti di pollo, in cui l'effetto citotossico sembra essere relazionato ad alcuni componenti di basso peso molecolare contenuti nel gel di Aloe (Horacio e Jose 1997).

Quindi, visto che il controllo positivo e la concentrazione di 4,8 mg/ml si comportano allo stesso modo provocando la morte delle cellule e che la concentrazione di 2,4 mg/ml non risulta diversa dalla maggiore concentrazione testata, possiamo concludere che la migliore concentrazione di utilizzo dell'estratto fresco da foglie in toto di *Aloe arborescens* è quella corrispondente a 1,2 mg/ml. Tale concentrazione risulta essere la maggiore somministrabile ai fibroblasti di orata senza avere effetto citotossico e che per tali motivi è stata poi utilizzata per tutta la serie di esperimenti che sono seguiti.

Inoltre, dai saggi effettuati su un range più ristretto di concentrazioni (1,2 mg/ml; 2,4 mg/ml; 4,8 mg/ml) a vari tempi (24h, 48h e 72h), è risultato che non solo la concentrazione di 1,2 mg/ml si conferma ottimale ma addirittura il gruppo relativo alle cellule incubate per 72 ore con l'estratto 1,2 mg/ml si distingue significativamente dal controllo in quanto raggiunge quasi il 120% di vitalità cellulare (vedi figura 14) (Il grafico relativo alle 48 ore di trattamento

non è mostrato in quanto i risultati non differiscono da quelli ottenuti per le 24 ore). Perciò possiamo dire che l'estratto alla concentrazione di 1,2 mg/ml sembra avere a lungo termine un evidente effetto proliferativo sulle SAF-1 in coltura probabilmente relazionabile ad un elevato benessere dei fibroblasti di orata in presenza dell'estratto nel terreno di coltura. Tale ipotesi anche se mai riscontrata nei pesci trova conferma negli studi condotti da Yao et al. (2009) che dimostrano come una frazione polisaccaridica isolata da *Aloe barbadensis* sia in grado di aumentare la vitalità di fibroblasti umani *in vitro*, aumentandone le dimensioni del nucleo ed in proporzione del citoplasma, il numero e la grandezza delle sfere di cromatina e l'espansione del reticolo endoplasmatico; tutti fenomeni correlati con un'intensa proliferazione. Risultati analoghi sono stati recentemente ottenuti anche da Jettanacheawchankit et al. (2009) che hanno riscontrato come l'acemannano, il principale polisaccaride del gel di Aloe (Femenia et al., 1999) sia in grado di stimolare la proliferazione di fibroblasti gengivali umani, favorendo l'espressione di fattori di crescita e produzione di collagene. Non a caso una delle tante applicazioni farmacologiche dell'aloè è proprio nel trattamento di ustioni e delle ferite in quanto è in grado di velocizzare i processi di cicatrizzazione (Zhang e Tizard 1996; Chithra e Sjiithlal 1998; Reynolds e Dweck 1999; Bae et al., 2005; Trombetta et al., 2006) molto probabilmente mediante gli effetti appena descritti.

3.1.2a Analisi morfologica a seguito del trattamento delle SAF-1 con l'estratto di *Aloe arborescens*

Per confermare i risultati ottenuti dai saggi ATP lite, sono state eseguite indagini al microscopio elettronico a scansione con il fine di comprovare che la dose biocompatibile individuata non provochi danni cellulari, ovvero modificazioni di tipo morfologico ultrastrutturale delle cellule in seguito a trattamento. Osservando la figura 15 A e B appare chiaro innanzitutto che le immagini delle cellule trattate con l'estratto alla concentrazione biocompatibile (1,2 mg/ml) in B sono perfettamente paragonabili al controllo (15A), avvalorando quindi le conclusioni tratte da noi in merito ai saggi di citotossicità. Le scansioni delle cellule trattate con 2,4 mg/ml e in maniera più evidente quelle trattate con 4,8 mg/ml di estratto mostrano invece consistenti segni di sofferenza ed apoptosi cellulare (Fig. 15 C e D). Infatti è evidente che a tali concentrazioni l'estratto di *A. arborescens* provoca nei fibroblasti di orata un cambiamento netto della morfologia cellulare in quanto i prolungamenti necessari per l'adesione al substrato e di fondamentale importanza per la sopravvivenza cellulare subiscono un progressivo accorciamento, fino a provocare il distacco

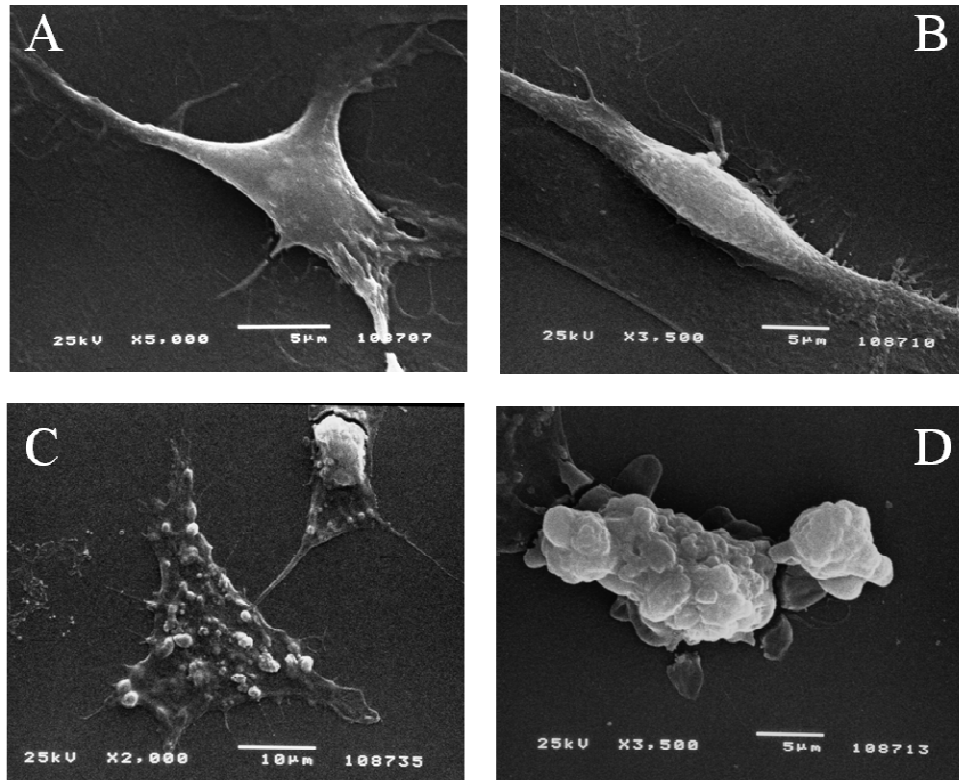


Figura 15

Analisi al microscopio elettronico a scansione su cellule SAF-1. In A: cellula SAF-1 controllo; in B: cellula SAF-1 trattata per 24 ore con estratto di *Aloe arborescens* 1,2 mg/ml; in C: cellula SAF-1 trattata con estratto 2,4 mg/ml; in D: cellula SAF-1 trattata con 4,8 mg/ml.

della cellula che da appiattita ed adesa si trasforma in sferoidale e sollevata. Inoltre sono evidenti numerosi blebs o corpi apoptotici sulla superficie cellulare correlabili a morte cellulare per apoptosi. Molto probabilmente la cellula stessa in risposta a stimoli esterni di natura fisica o chimica correlabili all'aumentata concentrazione dell'estratto, innescava una cascata di reazioni biochimiche e molecolari che la porta alla morte. Tale processo si riflette in caratteri morfologici particolari evidenziabili nelle scansioni mostrate, come diminuzione del volume cellulare e formazione di vescicole di superficie (blebbing), fenomeni provocati da modificazioni nucleari della cellula come addensamento della cromatina e frammentazione non casuale del DNA. A questo punto appare chiaro che le conclusioni tratte dai saggi di citotossicità sono ampiamente confermate e che la concentrazione definita biocompatibile non provoca alcun danno. Le indagini al microscopio elettronico a scansione ribadiscono che in particolar modo la concentrazione di estratto di 4,8 mg/ml è in grado di provocare un effetto citotossico in cellule di pesce, cosa per altro mai evidenziata tuttavia supportata dagli studi di

Horacio e Jose (1997) condotti su pollo. Inoltre le scansioni palesano che la concentrazione ottimale di somministrazione di estratto è 1,2 mg/ml, come dimostrato dai dati ottenuti mediante l'analisi ATP lite, e per questo è stata scelta per effettuare gli esperimenti a monte dell'analisi di espressione di tipo quantitativo.

3.1.3 Saggio ATP lite su cellule SAF-1 in seguito a trattamento con estratto di *Myrtus communis*

Come accaduto per l'estratto di *Aloe arborescens*, come primo approccio nei confronti dell'estratto di *Myrtus communis* ci siamo chiesti quale sarebbero stati i suoi effetti sulla vitalità cellulare dei fibroblasti di orata in seguito a trattamento e quale fosse la migliore concentrazione da utilizzare. A tal fine sono stati condotti saggi di citotossicità *in vitro* mediante il kit ATP lite (PerkinElmer) che ha permesso la determinazione della percentuale di sopravvivenza delle cellule trattate con differenti concentrazioni di estratto. Dall'analisi statistica dei dati che è seguita sono emerse differenze di significatività tra i gruppi studiati (controllo: costituito da cellule non trattate; cellule trattate con estratto a varie concentrazioni: 0,2 mg/ml - 0,4 mg/ml - 0,8 mg/ml; controllo positivo: costituito da cellule trattate con sodio azide 0,2% con effetto sicuramente citotossico e controllo etanolo). Nostro interesse era individuare la maggiore concentrazione di estratto che in termini di vitalità cellulare si discostasse meno dal controllo costituito da cellule non trattate e che quindi presumibilmente fosse in grado di svolgere una qualsiasi attività senza creare danno alle cellule, non andando a variare le caratteristiche del medium di coltura. Dopo 24 e 48 ore di trattamento le cellule incubate con estratto alla concentrazione di 0,2 mg/ml si comportano in termini di vitalità cellulare come le cellule controllo mantenendo un effetto stabile nel tempo (Fig. 16B; 16C). Dopo 12 ore di trattamento le cellule incubate con estratto alla concentrazione di 0,2 mg/ml addirittura si differenziano in termini positivi dal controllo mostrando livelli di vitalità cellulare più alti di quest'ultimo (Fig. 16A). Questo invece non accade per il gruppo corrispondente alla concentrazione di 0,4 mg/ml e 0,8 mg/ml di estratto che risultano essere significativamente differenti dal gruppo controllo in termini negativi, con una differenza di valori che aumenta col passare delle ore di trattamento (Fig. 16A; 16B; 16C). In particolar modo la concentrazione di 0,8 mg/ml mostra sin dalla prima lettura effettuata dopo 12 ore valori di vitalità cellulare significativamente minori rispetto al gruppo composto dalle cellule trattate con sodio azide allo 0,2% (Fig. 16A). In altre parole l'estratto di Mirto alla concentrazione di 0,8 mg/ml ha un effetto citotossico molto più potente della sodioazide 0,2% sui fibroblasti di orata. D'altronde è noto che gli estratti vegetali in toto in generale e la

miscela di sostanze in essi contenute possono avere effetti citotossici molto potenti se utilizzati ad alte concentrazioni (Horacio e Jose1997).

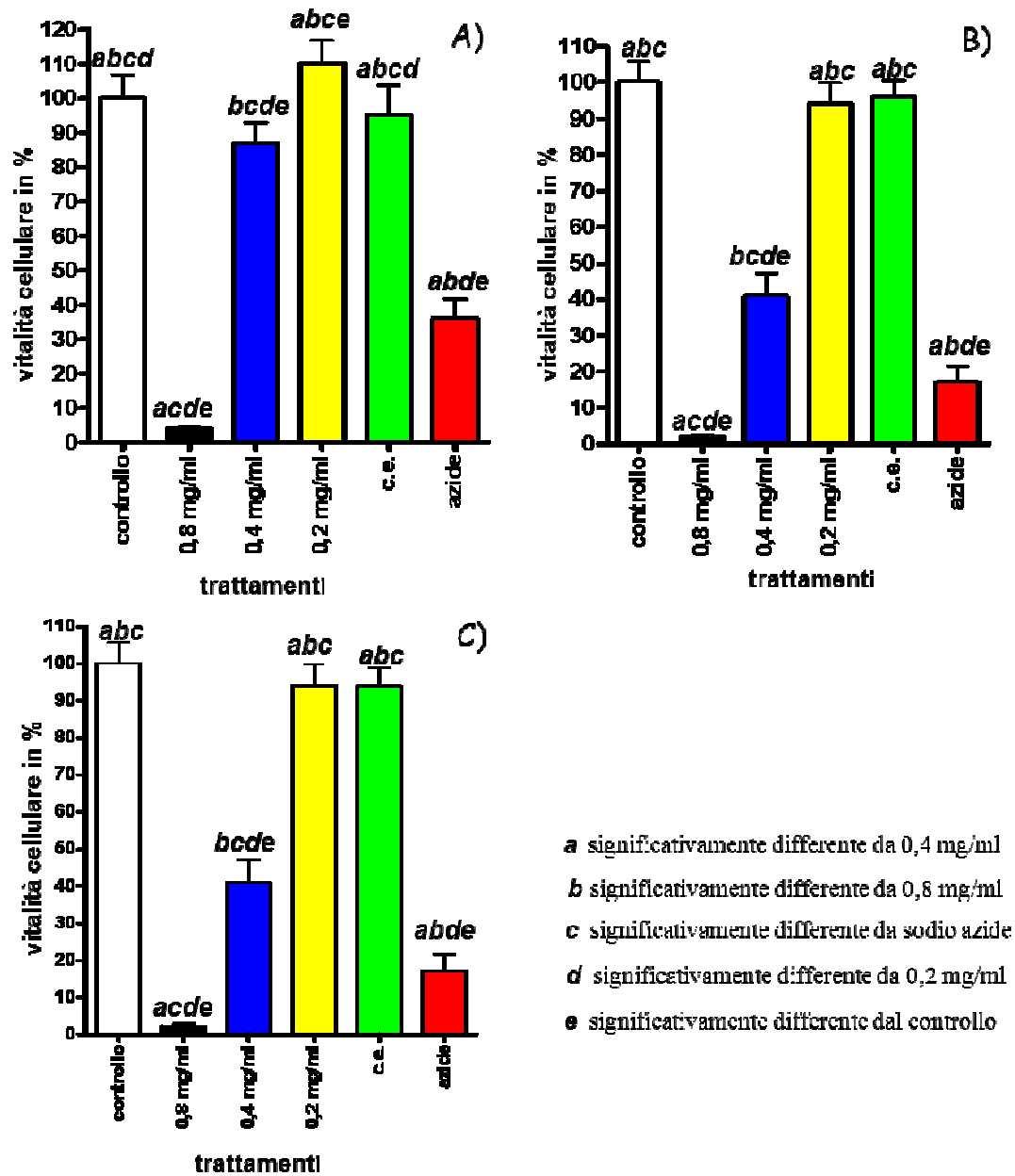


Fig. 16

Saggi ATP lite effettuati su cellule SAF-1 trattate con l'estratto di *Myrtus communis* a varie concentrazioni (0.2, 0.4, 0.8 mg/ml), confrontate con cellule controllo e con cellule trattate con sodio azide 0.2 % a) dopo 12 ore di trattamento, b) 24 ore, c) 48 ore.

Quindi, la concentrazione di 0,4 mg/ml ed in maniera ancora più evidente la concentrazione di 0,8 mg/ml dopo 48 ore di trattamento, provocano la morte dei fibroblasti di orata diminuendone la vitalità cellulare rispettivamente del 59% e del 98% contro una diminuzione della vitalità cellulare da parte della sodioazide (0,2%) dell'83% (Fig. 16C).

A questo punto risulta chiaro che la migliore concentrazione di utilizzo dell'estratto fresco ottenuto da foglie in toto di *Myrtus communis* è quella corrispondente a 0,2 mg/ml. Tale concentrazione risulta essere la maggiore somministrabile ai fibroblasti di orata senza avere effetto citotossico e che per tali motivi è stata poi scelta per tutta la serie di esperimenti che sono seguiti.

3.2 Analisi di espressione di tipo quantitativo tramite Real time PCR condotta sulla linea cellulare SAF-1 a seguito del trattamento con Aloe e Mirto: valutazione degli effetti immunomodulatori

Una volta definito il target a cui somministrare gli estratti e individuate le concentrazioni biocompatibili, il passo successivo è stato capire se gli estratti di *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* fossero in grado di potenziare la risposta immunitaria nel nostro modello di studio. A tal fine abbiamo deciso di investigare l'eventuale effetto modulatore degli estratti alcolici, su alcuni geni coinvolti nella risposta immunitaria in seguito a stimolazione mediante simulazione di infezione virale (solo nel caso di aloe) o batterica (nel caso delle due piante). A tale scopo è importante sottolineare che gli estratti prima di essere somministrati alle cellule sono stati sempre sottoposti ad un passaggio di sterilizzazione meccanica mediante filtro per escludere la presenza di batteri/LPS negli estratti e tantomeno la presenza di DNA come confermato da letture allo spettrofotometro. Inoltre abbiamo deciso di completare i dati dei saggi di analisi di espressione andando ad investigare l'effetto immunomodulatore degli estratti di Aloe e Mirto singolarmente, mediante analisi dell'espressione di geni pro e anti-infiammatori. Tale analisi ci ha permesso di appurare se l'eventuale effetto immunostimolante osservato per entrambi gli estratti fosse dipendente o meno dalla presenza di Poly I:C o LPS discriminando tra effetto di tipo sinergico o additivo. Infatti nella descrizione delle interazioni il termine additivo indica un effetto biologico finale che è semplicemente uguale alla somma delle risposte ai singoli componenti, mentre il termine sinergico o potenziante sta ad indicare che le conseguenze provocate dall'insieme delle molecole sono significativamente superiori alla somma di quelle causate dalle stesse singolarmente. Quindi la discussione riportata nella presente tesi di dottorato prende in considerazione la quantificazione ed il confronto dei livelli di espressione relativi al trattamento delle SAF-1 con: il solo PAMPs (poly I:C o LPS in caso

di simulata infezione virale o batterica), la miscela di PAMPs ed estratto di Aloe o di Mirto ed infine il solo estratto di Aloe o Mirto alla dose biocompatibile secondo le modalità descritte di seguito.

Per maggiore chiarezza i risultati verranno presentati e discussi suddivisi per estratto utilizzato e tempi di trattamento.

3.2.1 Effetto immunomodulatorio dell'estratto di *Aloe arborescens* sulla linea cellulare SAF-1 in seguito a simulata infezione virale

Al fine di comprendere meglio gli effetti dell'estratto di Aloe sui principali meccanismi dell'immunità innata coinvolti nella difesa contro le infezioni virali abbiamo deciso di stimolare le cellule SAF-1 con il poly I:C un analogo sintetico di RNA a doppia elica e ligando di MDA5 e TLR3, capace quindi di indurre la produzione di IFN nella maggior parte delle cellule nucleate. In questo senso il poly I:C è il più utilizzato stimolante di IFN di tipo I nei pesci (Congleton and Sun 1996; Jensen et al., 2002) che (come detto ampiamente nel capitolo introduttivo) è una citochina capace di indurre l'espressione di geni antivirali. L'Mx è una tra le più studiate proteine antivirali indotte da IFN (Stark et al., 1998), una molecola a lunga durata che, a differenza dell'IFN, può persistere per settimane a seguito di una singola infezione virale (Chieaux et al., 1998). I geni Mx nei pesci possono essere indotti oltre che da un'infezione virale anche da poly I:C sia *in vivo* (Robertesen et al., 1997; Trobridge et al., 1997; Fernandez-Trujillo et al., 2008) che *in vitro* (Jensen et al., 2002) suggerendo che il poly I:C è in grado di indurre uno stato antivirale.

Alla luce di queste informazioni attraverso la real time PCR abbiamo potuto analizzare i patterns e la cinetica di espressione di IFN, MX e MHCI- α da parte di cellule SAF-1 stimulate con solo poly I:C, poly I:C in presenza di estratto 1,2 mg/ml e solo estratto (1,2 mg/ml) in modo da poter rilevare un'ipotizzabile modulazione dell'espressione da parte dell'estratto di *Aloe arborescens*.

Dall'analisi dei dati emerge che la stimolazione per mezzo del ribonucleotide sintetico ha funzionato nelle SAF-1 risultando un buon induttore dell'espressione dei geni di nostro interesse come era già stato riportato da Altmann et al. (2003), Zou et al. (2003), Robertsen et al. (2004), Fierro-Castro et al. (2009), nel caso di altre cellule di pesce (salmone, trota, pesce zebra) ma non in orata. Inoltre i cambiamenti di espressione in relazione all'housekeeping gene rRNA 18S mostrano che il pattern di espressione dei tre geni analizzati (IFN, MX e MHCI- α) ha un comportamento simile (Fig.17). Infatti in seguito a stimolazione con solo poly I:C si ha una crescente up-regolazione dei tre geni in esame che raggiunge il massimo livello

tra le 24 e le 72 ore di trattamento, (Fig. 17) in particolare, il picco si ha a 24 h per l'MHCI- α , a 48 h per l'Mx e a 48-72 h per l'IFN (vedi tabella A).

In aggiunta la significativa up regolazione ottenuta per il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I potrebbe suggerire l'induzione di tale complesso da parte dell'Interferone, cosa già nota per pesci come trota e salmone (Grimholt e Lie 1998; Koppang et al., 1999; Hansen e La Patra 2002; Dijkstra et al., 2003), nei quali è stato dimostrato che la trascrizione di MHCI aumenta in risposta ad infezione virale e che il promotore di tale gene possiede elementi di risposta stimolati da Interferone (ISRE). Ad oggi non sono disponibili dati circa l'induzione di MHCI- α da parte di poly I:C. Il nostro studio sembra quindi essere la prima evidenza del fatto che i trascritti di MHCI- α aumentano in cellule in coltura trattate con poly I:C, a supporto di ciò Kawano et al., nel 2010 hanno descritto, utilizzando linee cellulari di trota, un aumento della proteina β_2 microglobulina in linee cellulari epitelio-simili, fibroblasto-simili e monocita/macrofago-simili se trattate con poly I:C 50 μ g/ml per 2–6 giorni. Per quanto riguarda la myxovirus resistance protein i nostri risultati confermano quanto riportato da García-Rosado et al. che nel 2008 hanno riscontrato un aumento dei livelli di espressione di Mx in seguito a stimolazione con poly I:C nelle SAF-1, il che suggerisce la possibilità di utilizzare questa linea cellulare come utile strumento di studio, per comprendere il ruolo che le popolazioni non leucocitarie hanno nelle risposte infiammatorie dei pesci.

In seguito a stimolazione delle SAF-1 con il ribonucleotide sintetico e l'estratto di *Aloe arborescens* alla concentrazione biocompatibile (1,2 mg/ml), i livelli di espressione degli stessi geni dopo 12, 24 e 72 ore di trattamento si mantengono più bassi rispetto ai campioni trattati con solo poly I:C. Dopo 48 ore di trattamento invece, l'estratto in combinazione con il poly I:C fa aumentare marcatamente l'espressione di tutti e tre i geni IFN, Mx e MHCI- α rispetto al trattamento con il solo ribonucleotide, inoltre la quantità di trascritti, per tutti i geni analizzati, diminuisce in maniera significativa dopo 72 ore di trattamento rispetto alle 48 ore (vedi tabella A). Tutto ciò non accade quando le cellule vengono trattate con il solo estratto di Aloe che invece è in grado di indurre una riduzione significativa dei livelli di IFN, MX e MHCI, rispetto ai livelli di espressione delle cellule controllo e delle stesse in seguito a trattamento combinato, effetto che si protrae fino alle 72 ore (Fig. 17 e tabella A).

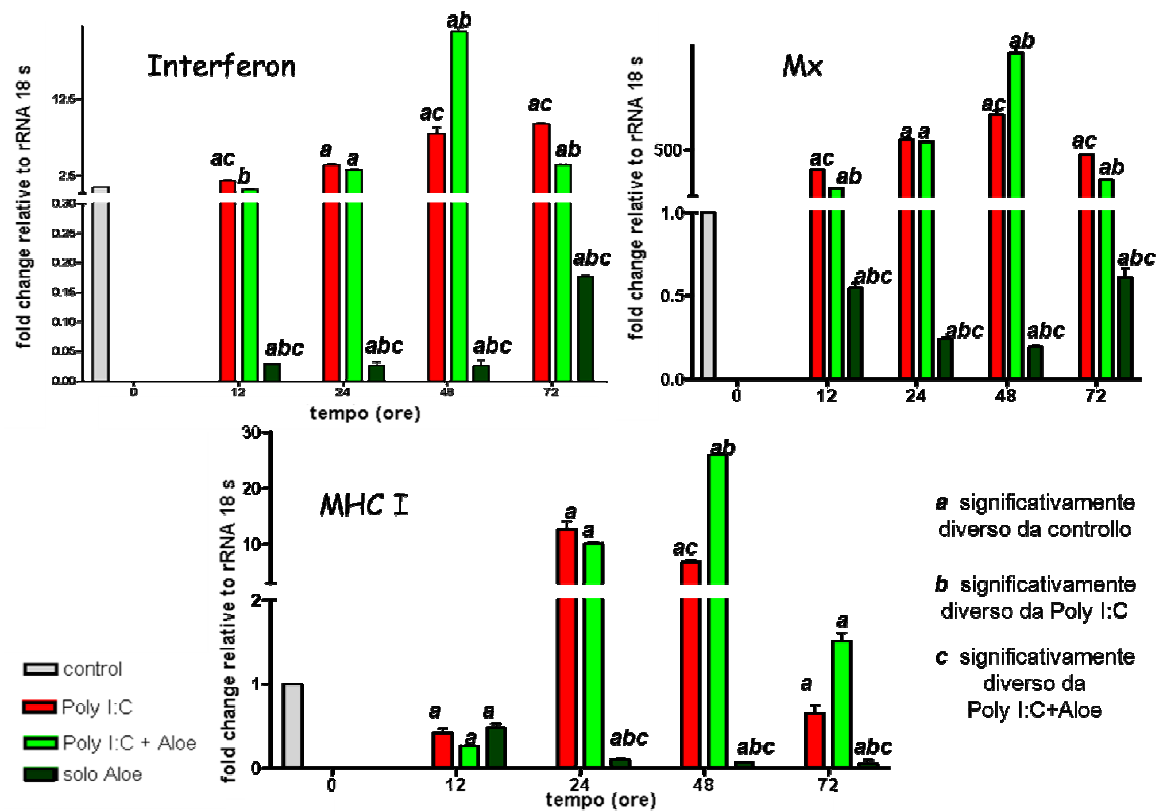


Fig. 17

Saggi di analisi di espressione relativi ai geni IFN, MX e MHC I. In grigio (calibrator) sono riportati i livelli di espressione relativi al gruppo di cellule SAF-1 controllo, in rosso quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con solo Poly I:C, in verde chiaro quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con Poly I:C+Aloe ed in verde scuro quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con il solo estratto di Aloe. Per l'analisi statistica sono stati presi in considerazione valori a partire da $p < 0,05$.

ALOE				polyI:C		
Time (h)	IFN	Mx	MHC-I	IFN	Mx	MHC-I
12	0,03±0,00 ^a	0,55±0,05 ^a	0,47±0,01	1,81±0,25 ^a	326,10±11,54 ^a	0,42±0,09 ^a
24	0,003±0,01 ^a	0,24±0,02 ^{ab}	0,10±0,02 ^{ab}	3,92±0,37 ^{ab}	589,39±31,31 ^{ab}	12,62±2,58 ^{ab}
48	0,02±0,01 ^a	0,19±0,02 ^{ab}	0,06±0,01 ^{ab}	7,93±1,58 ^{abc}	806,26±63,16 ^{abc}	6,78±0,88 ^{ab}
72	0,18±0,00 ^{abcd}	0,61±0,10 ^{acd}	0,05±0,08 ^{cd}	9,28±0,19 ^{abc}	453,81±6,02 ^{abcd}	0,65±0,17 ^{bcd}

ALOE + poly I:C			
Time (h)	IFN	Mx	MHC-I
12	0,66±0,2	168,20±11,20 ^a	0,26±0,03 ^a
24	3,22±0,24 ^{ab}	569,81±11,37 ^{ab}	0,10,10±50 ^{ab}
48	21,31±0,97 ^{abc}	1338,73±96,50 ^{abc}	25,99±0,42 ^{abc}
72	3,87±0,29 ^{abd}	239,01±10,89 ^{abcd}	1,51±0,17 ^{abcd}

Tabella A

Analisi di varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di comparazione multipla Dunnett. I risultati numerici sono espressi come media ± Dev.St di tre indipendenti misurazioni. **a** significativamente diverso da controllo (tempo 0), **b** significativamente diverso da 12 ore, **c** significativamente diverso da 24 ore, **d** significativamente diverso da 48 ore. Sono stati presi in considerazione valori a partire da $p < 0,05$.

I dati analizzati suggeriscono quindi che l'effetto immunostimolante che si palesa a 48 ore in seguito a trattamento combinato (estratto di Aloe + poly I:C) è di tipo sinergico ed inoltre è in grado di potenziare a più livelli la risposta immunitaria antivirale innalzando in particolare i livelli di IFN che ha un ruolo cruciale nella protezione dell'ospite contro la replicazione diffusa di vari virus, soprattutto grazie all'attivazione trascrizionale di geni che codificano per proteine antivirali (ISGs) (Der et al., 1998; de Veer et al., 2001). Questi geni tra cui l'Mx ed inoltre l'MHCI- α sono determinanti rispettivamente per prevenire la replicazione virale inibendo il passaggio intracellulare dei nucleocapsidi virali (Haller et al., 2004) e per promuovere la presentazione dell'antigene (Fellous et al., 1982).

A tale proposito in orata, Garcia-Rosado et al. (2007), utilizzando come modello di studio la linea cellulare SAF-1 hanno potuto dimostrare come l'espressione di Mx sia essenziale per l'inibizione della replicazione di un virus appartenente alla classe dei birnavirus, confermando che, come accade nei mammiferi, anche nei pesci l'espressione di proteine indotte da IFN costituisce uno dei meccanismi dell'immunità innata coinvolti nella difesa cellulare contro le infezioni virali (Ellis 2001). E' chiaro che la myxovirus resistance protein ed il complesso maggiore di istocompatibilità indotti da Interferon possono essere definiti strumenti in grado di aumentare la resistenza alle infezioni causate da virus e utilizzati negli allevamenti ittici come già proposto, nel caso dell'Mx, da Melamed et al. nel 2002.

Le informazioni appena descritte sono di fondamentale importanza nello sviluppo di misure preventive contro infezioni virali che colpiscono i pesci allevati, tra cui l'orata una delle specie marine più allevate del mediterraneo e affetta da un crescente numero di malattie virali (Borrego et al., 2001; Mulcahy 2002) tra le più frequenti: linfocisti virale (LCDV), Necrosi ematopoietica infettiva (IHNV), Setticiemia emorragica virale (VHSV).

A supporto di tali considerazioni in uno studio di Kim et al. (1999) vengono riportati gli effetti terapeutici dell'aloè come supplemento nella dieta dei pesci roccia (*Sebastes schlegeli*) infettati da *Vibrio alginolyticus* e la pianta viene definita come agente di immunoprofilassi in grado di sopprimere la malattia.

Principali responsabili dell'attività immunostimolante dell'Aloè potrebbero essere diverse componenti bioattive studiate per lo più sull'uomo, ma che ipotizziamo avere la stessa attività anche nei pesci. In un recente studio di Lin et al. (2008) l'aloè-emodin viene definita come il principale antrachinone in grado di indurre la produzione di IFN e di up-regolare l'espressione dei geni stimolati da tale citochina (attivando i promotori contenenti regioni ISRE e inducendo l'espressione di ISGs) portando alla generazione di ossido nitrico ed anche all'inibizione della replicazione virale.

In un lavoro su macrofagi di topo Liu et al. (2006) identificano un polisaccaride ricco in mannosio, derivato dall'Aloe, come responsabile dell'attività immunostimolante di tale pianta che si realizza in aumento dell'endocitosi, fagocitosi, produzione di ossido nitrico. Questo polisaccaride essendo in grado di legarsi ai recettori del mannosio presenti sui macrofagi quiescenti ne stimolerebbe l'attività.

Anche Zhang et al. (2006) hanno riscontrato sempre sullo stesso modello animale la stimolazione delle stesse attività da parte di due composti derivati da diidrocumarine (fenoli) dell'*Aloe vera*.

3.2.2 Effetto immunomodulatorio dell'estratto di *Aloe arborescens* sulla linea cellulare SAF-1 in seguito a simulata infezione batterica

E' ormai noto che l'attività dei composti e dei prodotti di erbe può portare alla produzione di una varietà di mediatori pro e anti-infiammatori (Galina et al., 2009; Harikrishnan et al., 2011). A tal fine abbiamo deciso di investigare l'eventuale effetto dell'estratto su alcuni geni quali IL-1 β , TNF- α , COX-2 e TGF- β che come noto dalla letteratura sono coinvolti nella risposta immunitaria. Infatti in seguito ad infezione o altri stimoli flogistici, l'IL-1 β ed il TNF- α mediano la risposta infiammatoria promuovendo l'infiltrazione e l'attivazione leucocitaria (García-Castillo et al., 2004), mentre la COX-2 catalizza una serie di reazioni che portano alla produzione di precursori di vari eicosanoidi (prostaglandine, leucotrieni, trombossani) infiammatori, di citochine e fattori di crescita. Inoltre durante i processi infiammatori vengono anche prodotte citochine ad attività antinfiammatoria ed immunosoppressiva come il TGF- β , il cui principale ruolo è quello di inibire i processi infiammatori consentendo l'angiogenesi e facilitando i processi riparativi attraverso il rilascio di vari mediatori. Sulla base di queste conoscenze abbiamo deciso di esaminare attraverso la real time PCR i patterns e la cinetica di espressione di IL-1 β , TNF- α , COX-2 e TGF- β da parte di cellule SAF-1 stimulate con solo LPS (5 μ g/ml), con LPS in presenza di estratto di Aloe alla dose biocompatibile (1,2 mg/ml) ed infine con solo estratto a vari tempi (4, 8, 12, 24 ore), in modo da poter rilevare un'ipotizzabile modulazione dell'espressione da parte dell'estratto (Fig. 18).

Dall'analisi dei dati emerge che la stimolazione per mezzo di LPS (4, 8, 12, 24 ore) ha funzionato nelle SAF-1 risultando un buon induttore dell'espressione dei geni di nostro interesse come era già stato riportato da Sepulcre et al., 2006; Fierro-Castro et al., 2009; Ingerslev et al., 2010; nel caso di cellule di teleostei e anche in cellule di orata. L'LPS è il principale componente della membrana esterna dei batteri Gram-negativi e potente

endotossina batterica che agisce da stimolante del sistema immunitario. Infatti i dati prodotti in questa tesi dimostrano che a seguito della stimolazione con solo LPS, alla concentrazione di 5 µg/ml, nei fibroblasti di orata si ha un aumento dei trascritti di IL-1β rispetto al controllo (tempo 0), con un picco dopo 4 ore dal trattamento che poi decresce ai tempi successivi (Fig. 18, tabella B); per questo si può affermare che l'LPS rappresenta un buon induttore di questo gene, come era già stato precedentemente riportato nei fibroblasti di *Oncorhynchus mykiss* (Ingerslev et al., 2010). Inoltre l'LPS si è dimostrato un buon induttore del gene TGF-β, infatti si è osservato un picco di up-regolazione corrispondente alle 4 ore di trattamento che poi decresce ai tempi successivi, mentre per il TNF-α e la COX-2 si ha un lieve e graduale innalzamento dei livelli di espressione a partire da 4 ore di trattamento che raggiunge il massimo dopo 24 ore di esposizione (Fig. 18, tabella B). Questi dati quindi suggeriscono che i fibroblasti rappresentano cellule primitive che nel corso dell'evoluzione hanno mantenuto la capacità di esprimere geni per risposte immunitarie quando sono stimolati.

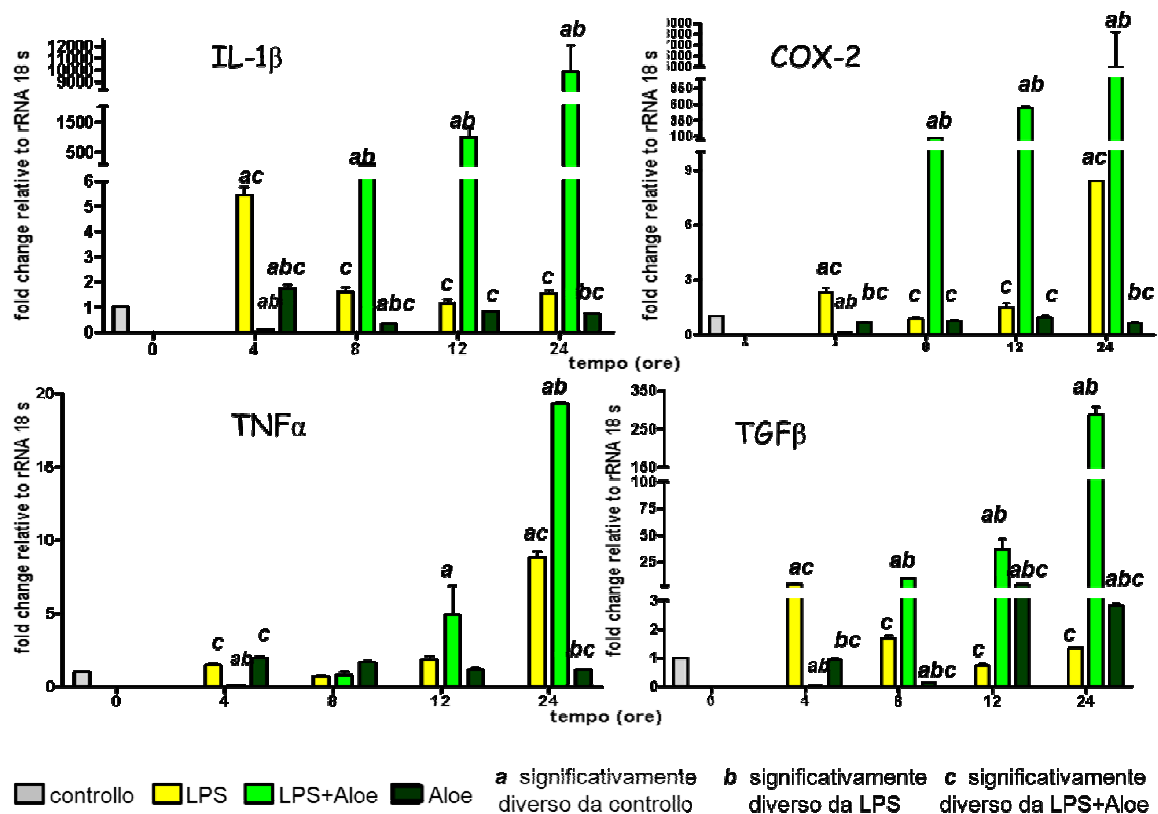


Fig. 18

Saggi di analisi di espressione quantitativa relativi ai geni IL-1β, COX-2, TNF-α e TGF-β. In grigio (calibrator) sono riportati i livelli di espressione relativi al gruppo di cellule SAF-1 controllo, in giallo quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con solo LPS, in verde chiaro quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con LPS+Aloe ed in verde scuro quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con il solo estratto di Aloe. Per l'analisi statistica sono stati presi in considerazione valori a partire da $p < 0,05$.

ALOE					LPS			
Time (h)	IL-1 β	TGF- β	TNF- α	COX-2	IL-1 β	TGF- β	TNF- α	COX-2
4	1.7 $\pm$ 0.3 ^a	0.9 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.3 ^a	0.7 $\pm$ 0.1 ^a	5.4 $\pm$ 0.6 ^a	4.4 $\pm$ 0.7 ^a	1.5 $\pm$ 0.2 ^a	2.3 $\pm$ 0.5 ^a
8	0.3 $\pm$ 0.01 ^{a,b}	0.1 $\pm$ 0.03 ^{a,b}	1.7 $\pm$ 0.2 ^a	0.8 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.3 ^{a,b}	1.7 $\pm$ 1.2 ^{a,b}	0.7 $\pm$ 0.1 ^b	0.9 $\pm$ 0.2 ^b
12	0.8 $\pm$ 0.04 ^{a,b,c}	3.8 $\pm$ 0.4 ^{a,b,c}	1.2 $\pm$ 0.2 ^{b,c}	1.0 $\pm$ 0.2 ^b	1.1 $\pm$ 0.3 ^b	0.7 $\pm$ 0.1 ^{a,b,c}	1.9 $\pm$ 0.4 ^{a,c}	1.5 $\pm$ 0.4 ^{b,c}
24	0.7 $\pm$ 0.1 ^{a,b,c}	2.8 $\pm$ 0.2 ^{a,b,c,d}	1.2 $\pm$ 0.1 ^{b,c}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{a,d}	1.5 $\pm$ 0.2 ^{a,b}	1.4 $\pm$ 0.04 ^{a,b,d}	8.8 $\pm$ 0.7 ^{a,b,c,d}	8.4 $\pm$ 0.01 ^{a,b,c,d}

ALOE+LPS				
Time (h)	IL-1 β	TGF- β	TNF- α	COX-2
4	0.1 $\pm$ 0.04 ^a	0.01 $\pm$ 0.02 ^a	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.03 ^a
8	101 $\pm$ 9 ^{a,b}	9.8 $\pm$ 0.7 ^{a,b}	0.8 $\pm$ 0.4	72 $\pm$ 4 ^{a,b}
12	999 $\pm$ 514 ^{a,b,c}	37 $\pm$ 18 ^{a,b}	4.9 $\pm$ 3.5	540 $\pm$ 52 ^{a,b,c}
24	9846 $\pm$ 3849 ^{a,b,c,d}	286 $\pm$ 38 ^{a,b,c,d}	19 $\pm$ 0.2 ^{a,b,c,d}	5003 $\pm$ 5568 ^{a,b,c,d}

Tabella B

Analisi di varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di comparazione multipla Dunnett. I risultati numerici sono espressi come media $\pm$ Dev.St di tre indipendenti misurazioni. **a** significativamente diverso da controllo (tempo 0), **b** significativamente diverso da 4 ore, **c** significativamente diverso da 8 ore, **d** significativamente diverso da 12 ore. Sono stati presi in considerazione valori a partire da $p < 0,05$.

Infatti, come nelle SAF-1, anche nei fibroblasti di trota si è osservata una competenza immunitaria in quanto si è visto che queste cellule sono in grado di esprimere citochine e recettori immunitari; ed è per questo motivo che si pensa che i fibroblasti contribuiscano in maniera significativa alle reazioni infiammatorie locali insieme alle cellule immunitarie (Ingerslev et al., 2010).

In seguito a stimolazione delle SAF-1 con il lipopolisaccaride e l'estratto di *Aloe arborescens* (1,2 mg/ml) si ha per tutti i geni in esame uno shift del quadro di espressione che parte dalle 8 ore di trattamento per poi crescere marcatamente ai tempi successivi mostrando differenze significative nei confronti del solo LPS (Fig. 18). In particolare dalla tabella B si evince per il TNF- α sempre un andamento crescente che però raggiunge livelli statisticamente significativi solo alle 24 ore di trattamento.

L'estratto in combinazione con il lipopolisaccaride aumenta pesantemente l'espressione di tutti e quattro i geni IL-1 β , TNF- α , COX-2 e TGF- β palesando la sua attività immunostimolante. A supporto di tali interpretazioni anche Peddie et al., 2002 utilizzando l'Ergosan, un prodotto a base di alghe lo definiscono un potente immunostimolante in quanto è in grado, una volta somministrato intraperitonealmente alla trota, di aumentare significativamente l'espressione di IL-1 β e TNF- α da parte dei leucociti peritoneali ad un giorno dall'iniezione.

E' noto infatti in letteratura che gli immunostimolanti sono in grado di potenziare la risposta immunitaria, e per questo risultano utili nell'ottenere una protezione nei confronti di diverse

malattie infettive che riguardano i pesci d'acquacoltura. In primo luogo gli immunostimolanti agiscono innescando i meccanismi di difesa non specifici aumentando le risposte proinfiammatorie e conseguentemente la risposta ai patogeni, infatti l'IL-1 β mediatore chiave della risposta alle invasioni microbiche e danni ai tessuti è in grado di stimolare la risposta immunitaria attivando i linfociti e/o inducendo il rilascio di altre citochine capaci di attivare i macrofagi, le cellule NK ed i linfociti. Altro aspetto importante è che gli immunostimolanti non solo sono in grado di attivare i leucociti, ma svolgono la loro azione anche su molti altri tipi di cellule, incluse le cellule del tessuto connettivo, endoteliali, stromali (Filer et al., 2006) ed i fibroblasti (Ingerslev et al., 2010) che sono quindi coinvolte nell'inizio dell'infiammazione e nella risposta ai patogeni.

Una volta chiarita e descritta l'attività degli immunostimolanti è nostro interesse a questo punto citare lavori che supportino il ruolo immunostimolante dell'Aloe provando a definirne anche le componenti bioattive responsabili.

A tale proposito di particolare interesse è la ricerca di Pugh et al., che nel 2001 hanno caratterizzato l'Aloeride, un polisaccaride dall'alto peso molecolare dell'*Aloe vera* che ha potente attività immunostimolante in quanto capace di stimolare il rilascio di citochine infiammatorie e non. Infatti N. Pugh ed il suo gruppo hanno dimostrato che l'Aloeride aumenta l'espressione di NF-kappa B nella linea cellulare THP-1 fino a livelli del 50% rispetto all'espressione ottenuta mediante la concentrazione massima di (10 μ g/ml) LPS utilizzata nei loro saggi. Inoltre l'Aloeride è in grado di indurre l'espressione di mRNA che codificano per IL-1 β e TNF- α fino a livelli comparabili con quelli osservati nelle stesse cellule attivate con solo LPS.

Nei nostri esperimenti utilizzando l'intero estratto di *Aloe arborescens* abbiamo ottenuto risultati estremamente interessanti. Infatti se consideriamo ad esempio il pattern di espressione dell'IL-1 β facendo un confronto in termini di potenziamento dei livelli di espressione di tale citochina tra il solo LPS e l'estratto di Aloe in presenza di LPS a 24 ore, possiamo asserire che il primo è in grado di aumentare l'espressione rispetto al controllo di 5 volte (significatività con $p < 0.01$) mentre il trattamento combinato dell'LPS con l'estratto incrementa i livelli di mRNA di ben 4000 volte (significatività con $p < 0,001$).

Nel momento in cui le cellule sono state trattate con il solo estratto di aloe (Fig. 18, gruppo evidenziato in verde scuro), questo effetto stimolante è chiaramente evidenziabile solo per il gene del TGF- β . Infatti l'estratto di tale pianta ha indotto da solo un significativo innalzamento della quantità di trascritto di TGF- β dopo 12 ore di trattamento che pur diminuendo al tempo successivo, mantiene comunque livelli di espressione significativamente

diversi dal controllo e dal trattamento con solo LPS agli stessi tempi. I dati osservati riguardo l'espressione del TGF- β sono molto interessanti in quanto palesano l'attività immunostimolante del solo estratto di Aloe verso questo gene (a 12 e 24 ore), attività pari a quella indotta dal solo LPS (a 4 ore) anche se meno rapida. A parità di effetto però è importante ricordare che l'estratto di Aloe, risulta essere a differenza del lipopolisaccaride, un composto biocompatibile, biodegradabile e sicuro per l'ambiente. L'estratto di Aloe ha anche determinato cambiamenti dei livelli di espressione di IL-1 β , COX-2 e TNF- α , sebbene non significativi.

Inoltre, dallo studio dell'analisi statistica relativa alle differenze tra i tempi di trattamento (tabella B) in riferimento al trattamento con il solo estratto di Aloe si evincono le seguenti considerazioni:

- possiamo notare variazioni significative dei trascritti di IL-1 β per tutti i tempi rispetto al controllo, in particolare si ha un aumento a 4 ore, una diminuzione a 8 ore seguita da una parziale ripresa a 12 e 24 ore.
- riguardo ai trascritti di TGF- β si hanno variazioni significative rispetto al controllo solo dalle 8 alle 24 ore di trattamento.
- i trascritti di TNF- α differiscono statisticamente dal controllo solo a 4 e 8 ore con un andamento decrescente a partire dalle 8 ore.
- in ultimo riguardo i livelli di trascritti di COX-2 si ha una diminuzione significativa solo per le 4 e 24 ore di trattamento rispetto al controllo al tempo 0.

I risultati nel loro insieme quindi indicano che l'estratto di Aloe alla dose biocompatibile è un potente immunostimolante nelle cellule SAF-1 attivate da LPS in quanto è in grado di indurre un effetto sinergico stimolante per tutti i geni presi in esame (a 8, 12 e 24 ore per quanto riguarda l'IL-1 β e la COX-2 ed a 24 ore per il TNF- α , ed il TGF- β) e coinvolti in diversi aspetti della risposta immunitaria (Hong et al, 2001.) quali: IL-1 β , TGF- β (Suda e Zlotnik, 1992; Hanada e Yoshima, 2002), COX-2 e TNF- α (Roca et al., 2008).

L'Aloe è quindi in grado di indurre, in cellule stimulate con LPS e non, una significativa upregolazione dei trascritti di TGF- β in entrambi i gruppi di cellule SAF-1. Mentre ha dimostrato di essere un potente induttore dell'espressione di IL-1 β , COX-2 e TNF- α solo nelle SAF-1 attivate da lipopolisaccaride rivelando un effetto sinergico stimolante del trattamento combinato sui geni.

3.2.3 Effetto immunomodulatorio dell'estratto di *Myrtus communis* sulla linea cellulare SAF-1 in seguito a simulata infezione batterica

Per quanto riguarda i dati relativi al Mirto (Fig. 19) la stimolazione delle SAF-1 con LPS e l'estratto di *Myrtus communis* 0,2 mg/ml ha indotto una stimolazione che si palesa, per tutti i geni in esame, dopo 12 ore di trattamento.

In particolare, l'IL-1 β ed il TGF- β vengono up regolati dal trattamento LPS in combinazione con l'estratto raggiungendo il massimo livello di espressione dopo 12 ore per poi decrescere; queste variazioni si mantengono statisticamente significative a tutti i tempi rispetto al controllo (tabella C). Sempre confrontando i livelli di espressione dei geni trattati con l'estratto dopo stimolazione con LPS in relazione agli stessi campioni trattati con solo lipopolisaccaride, per il TNF- α e la COX-2 si ha un picco di upregolazione corrispondente alle 12 ore di somministrazione di mirto, che però non continua ad aumentare come accade per il solo LPS fino alle 24 ore. A questo tempo invece corrisponde una diminuzione del livello di espressione genica che è evidente per il TNF- α e drastica per la COX-2 evidenziando una significativa down regolazione della produzione di tali citochine. Per quanto riguarda l'analisi statistica, relativa alle differenze tra i tempi di trattamento, le significatività si riscontrano a tutti i tempi rispetto al controllo, ad eccezione delle 8 ore di trattamento (tabella C).

Quando invece le cellule vengono trattate con il solo estratto di Mirto (Fig. 19, gruppo in celeste), per la maggior parte dei geni presi in esame, non si ha alcun tipo di stimolazione. Infatti l'estratto quando somministrato da solo induce una riduzione significativa dei livelli di IL-1 β e TGF- β , rispetto ai livelli di espressione delle cellule controllo (a tutti i tempi, vedi tabella C) e delle stesse in seguito a trattamento combinato (Mirto + LPS), effetto che si protrae fino alle 24 ore (vedi Fig. 19). Addirittura per quanto riguarda il pattern di espressione relativo alla COX-2 il mirto da solo non sortisce alcun effetto. Infatti in seguito a trattamento con solo estratto si hanno livelli di espressione non significativamente diversi dalle cellule controllo per cui non si ha altro che l'espressione basale del gene (dato confermato anche dalle significatività ottenute rispetto ai tempi di trattamento espresse in tabella C). I dati analizzati suggeriscono quindi che l'effetto immunostimolante che si palesa per questi geni (IL-1 β , TGF- β e COX-2) in seguito a trattamento combinato (Mirto + LPS) è di tipo sinergico e non additivo in quanto l'estratto di mirto da solo non ha indotto significativi effetti immunostimolanti. Differenti sono invece le conclusioni che possiamo trarre dall'analisi dell'espressione del TNF- α . Per questo gene infatti, nel momento in cui le cellule sono trattate con il solo estratto di mirto, non solo l'effetto stimolante è mantenuto ma è

significativamente superiore e più rapido rispetto a quello ottenuto in seguito a trattamento combinato (Mirto + LPS). Infatti l'estratto da solo induce un significativo innalzamento della quantità di trascritto di TNF- α dopo 4 ore di trattamento che tende notevolmente a diminuire alle 8 e 12 ore per raggiungere poi alle 24 ore gli stessi livelli di espressione indotti dal solo LPS e LPS in combinazione con Mirto. Queste variazioni sono statisticamente significative rispetto al controllo a tutti i tempi (vedi tabella C).

Il mirto è quindi in grado di indurre una significativa upregolazione dei trascritti di TNF- α in entrambi i gruppi di cellule SAF-1, stimulate con LPS e Mirto e solo Mirto, mentre ha dimostrato di essere un potente induttore dell'espressione di IL-1 β (a 12 e 24 ore), TGF- β (ad 8, 12 e 24 ore) e COX-2 (a 12 ore) solo nelle SAF-1 attivate da lipopolisaccaride rivelando un effetto sinergico stimolante del trattamento combinato per questi geni.

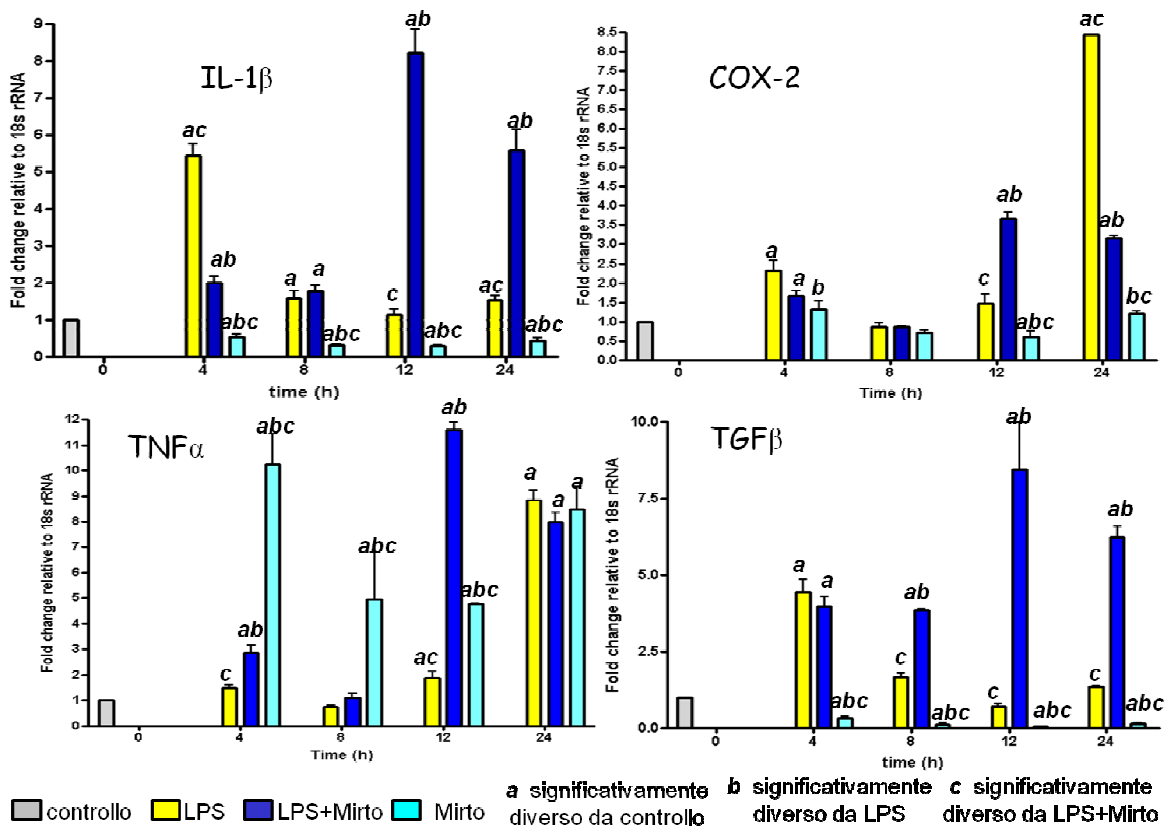


Fig. 19

Saggi di analisi di espressione quantitativa relativi ai geni IL-1 β , COX-2, TNF- α e TGF- β . In grigio (calibrator) sono riportati i livelli di espressione relativi al gruppo di cellule SAF-1 controllo, in giallo quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con solo LPS, in blu scuro quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con LPS+Mirto ed in celeste quelli relativi al gruppo SAF-1 trattato con il solo estratto di Mirto. Per l'analisi statistica sono stati presi in considerazione valori a partire da $p < 0,05$.

MIRTO					LPS			
Time (h)	IL-1 β	TGF- β	TNF- α	COX-2	IL-1 β	TGF- β	TNF- α	COX-2
4	0,5 $\pm$ 0,1 ^a	0,3 $\pm$ 0,09 ^a	10,2 $\pm$ 2,1 ^a	1,3 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,5 ^a	4,4 $\pm$ 0,7 ^a	1,5 $\pm$ 0,2 ^a	2,3 $\pm$ 0,4 ^a
8	0,3 $\pm$ 0,06 ^{ab}	0,1 $\pm$ 0,09 ^{ab}	5 $\pm$ 3,2 ^{ab}	0,7 $\pm$ 0,09 ^b	1,6 $\pm$ 0,3 ^{ab}	1,7 $\pm$ 0,2 ^{ab}	0,75 $\pm$ 0,1 ^b	0,9 $\pm$ 0,2 ^b
12	0,3 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,05 $\pm$ 0,01 ^{ab}	4,8 $\pm$ 0,03 ^a	0,6 $\pm$ 0,2 ^b	1,1 $\pm$ 0,3 ^{abc}	0,7 $\pm$ 0,1 ^{abc}	1,9 $\pm$ 0,4 ^{ac}	1,5 $\pm$ 0,4 ^c
24	0,4 $\pm$ 0,1 ^a	0,1 $\pm$ 0,03 ^a	8,5 $\pm$ 1,5 ^a	1,2 $\pm$ 0,1 ^d	1,5 $\pm$ 0,2 ^{ab}	1,3 $\pm$ 0,03 ^{abd}	8,8 $\pm$ 0,6 ^{abcd}	8,4 $\pm$ 0,01 ^{abcd}

MIRTO+LPS				
Time (h)	IL-1 β	TGF- β	TNF- α	COX-2
4	2 $\pm$ 0,3 ^a	4 $\pm$ 0,5 ^a	2,8 $\pm$ 0,5 ^a	1,7 $\pm$ 0,2 ^a
8	1,8 $\pm$ 0,2 ^a	3,8 $\pm$ 0,06 ^a	1,1 $\pm$ 0,2 ^b	0,9 $\pm$ 0,04 ^b
12	8,2 $\pm$ 1,1 ^{abc}	8,4 $\pm$ 2,6 ^{abc}	11,6 $\pm$ 0,5 ^{abc}	3,7 $\pm$ 0,3 ^{abc}
24	5,6 $\pm$ 0,9 ^{abcd}	6,2 $\pm$ 0,6 ^{abc}	8 $\pm$ 0,6 ^{abc}	3,2 $\pm$ 0,1 ^{abc}

Tabella C

Analisi di varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di comparazione multipla Dunnett. I risultati numerici sono espressi come media $\pm$ Dev.St di tre indipendenti misurazioni. **a** significativamente diverso da controllo (tempo 0), **b** significativamente diverso da 4 ore, **c** significativamente diverso da 8 ore, **d** significativamente diverso da 12 ore. Sono stati presi in considerazione valori a partire da $p < 0,05$.

Come osservato per Aloe i dati ottenuti utilizzando gli estratti di Mirto quindi, non solo contribuiscono alla comprensione dei meccanismi di immunità innata e di infiammazione nei pesci, ma soprattutto palesano il fatto che gli estratti di *Aloe arborescens* e di *Myrtus communis* alla dose biocompatibile hanno un effetto immunostimolante di tipo sinergico nelle cellule SAF-1 trattate con LPS andando a modulare l'espressione di alcuni geni chiave coinvolti nella risposta immunitaria dei pesci.

Tali osservazioni fatte non solo sulla stimolazione ma anche sulla modulazione delle citochine da parte dell'estratto di Mirto da solo o in combinazione con LPS sono supportate da studi recenti che confermano come sostanze bioattive contenute nell'estratto di tale pianta esibiscano una potente attività antiinfiammatoria. In particolare, Rossi et al., (2009) asseriscono che il mirtocommulone, composto derivante dal floroglucinololo, è in grado di bloccare la biosintesi di eicosanoidi attraverso l'inibizione della lipossigenasi e cicloossigenasi *in vitro* e di arrestare la formazione di specie reattive dell'ossigeno da parte dei leucociti polimorfonucleati attivati. Nel loro lavoro Rossi et al., 2009; hanno testato gli effetti antiinfiammatori del mirtocommulone *in vivo* utilizzando come modello topi in cui era stato indotto uno stato infiammatorio. L'effetto inibitorio del mirtocommulone nei confronti delle prostaglandine è stato testato con successo anche da Koeberle et al., (2010), proponendo il mirto come potente antiinfiammatorio.

Risulta chiaro a questo punto come le informazioni e i dati appena descritti siano indubbiamente di fondamentale importanza e utilizzabili per la messa a punto di misure

preventive contro infezioni batteriche che colpiscono i pesci allevati tra cui l'orata, una delle specie marine più allevate del mediterraneo e affetta da un crescente numero di malattie batteriche che sono causa di importanti perdite economiche nell'allevamento ittico.

3.3 Valutazione della eventuale attività antimicrobica dell'estratto etanolic di *Aloe arborescens* e *Myrtus communis* verso i ceppi batterici *Listonella anguillarum* ATCC 43305 e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* B07/8

E' ormai noto che le piante superiori sono fonte di biomolecole come polisaccaridi, acidi organici, alcaloidi, glucosidi ed oli volatili che non solo sono in grado di potenziare la risposta immunitaria, ma alcune delle quali mostrano effetti antibatterici con prospettive future in ambito chimico-farmacologico (Lewis and Ausubel, 2006). L'effetto inibitorio della crescita di patogeni da parte degli estratti vegetali rappresenta un metodo di controllo alternativo delle malattie, che può contribuire a limitare il fenomeno della resistenza batterica e che è in accordo con le rigide politiche dell'unione europea e le nuove tendenze del consumismo verde. Per queste ragioni abbiamo deciso di testare l'attività del Mirto e di Aloe verso due tra i più comuni patogeni che minacciano la salute dei pesci, *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* e *Listonella (Vibrio) anguillarum*, entrambi batteri gram-negativi responsabili rispettivamente di due frequenti malattie la pasteurellosi e la vibriosi.

A questo scopo abbiamo utilizzato il metodo della disk diffusion che prevede l'utilizzo di dischetti di carta bibula sterile imbevuti con il trattamento posizionati fino a 6 per ciascuna piastra agarizzata su cui sono stati seminati i batteri. Le piastre vengono poi incubate per 24 ore alla temperatura di crescita dei batteri in esame. Per ogni prova viene utilizzato come controllo negativo acqua sterile e come controllo positivo l'antibiotico di riferimento per il patogeno testato. La presenza di attività antimicrobica, viene rilevata attraverso la formazione di aloni di inibizione intorno ai dischetti presenti nelle piastre contenenti i microrganismi.

Quindi per prima cosa è stato effettuato un saggio preliminare per stabilire per quale antibiotico i due patogeni fossero sensibili. A questo scopo i batteri sono stati fatti crescere inizialmente in terreno di coltura fino a crescita esponenziale e successivamente sono stati seminati su piastre Petri. In seguito sono stati inoculati su dei dischetti di carta bibula 20µl di tre antibiotici differenti ossia: tetraciclina (20µg/ml), ampicillina (30µg/ml) e kanamicina (30µg/ml). Sono state scelte tali concentrazioni di antibiotici seguendo le indicazioni specificate dalla casa produttrice.

Dalla misura dell'area degli aloni di inibizione si è osservato che solamente la tetraciclina (20µg/ml) mostrava un'attività inibitoria nei confronti di *Listonella anguillarum* e

l'ampicillina (30µg/ml) verso *Photobacterium damsela*e (Fig. 20A; 20B) ed è per questo che si è scelto quindi di utilizzare tali antibiotici come rispettivi controlli positivi nei successivi saggi antibatterici.

Una volta stabiliti i controlli positivi per ogni patogeno la calibrazione del saggio è stata ottenuta misurando il diametro dell'alone inibitorio creato da concentrazioni seriali di due antibiotici quali, ampicillina per *P. damsela*e e tetraciclina per *L. anguillarum*, nei confronti dei ceppi batterici sopra descritti.

Per quanto riguarda l'estratto di Aloe, dall'analisi delle piastre incubate per 24 ore a 25°C con varie concentrazioni di estratto (1,2 - 4,8 - 12 - 120 mg/ml) non è stato possibile evidenziare alcuna presenza di aloni di inibizione in corrispondenza dei dischetti per entrambi i ceppi batterici. Quindi, possiamo concludere che l'estratto di Aloe non ha alcuna attività antibatterica nei confronti dei patogeni testati.

Per quanto riguarda l'estratto di mirto i batteri sono stati, allo stesso modo, seminati su una nuova piastra, e trattati con diverse concentrazioni seriali di estratto (5 - 10 - 20 - 40 - 83,5 mg/ml) e con concentrazioni seriali dei due antibiotici. In particolare la tetraciclina è stata utilizzata alle concentrazioni di 2,5 - 5 - 10 - 20 µg/ml mentre l'ampicillina alle concentrazioni di 3,75 - 7,5 - 15 - 30 µg/ml. I batteri sono stati così incubati a 25°C per 24 ore. A questo punto, l'attività antimicrobica dell'estratto di mirto è stata valutata misurando le aree degli aloni di inibizione (Fig. 21A; 22A). Le misure di tali aree sono state confrontate con quelle ottenute dopo il trattamento con i rispettivi antibiotici (Fig. 21B; 22B). Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato ed è stata calcolata per ogni trattamento la percentuale di inibizione. In particolare, per *Listonella anguillarum* si è osservato che tra le concentrazioni di tetraciclina testate, anche la più bassa (2,5 µg/ml) dava una significativa area di inibizione ($90 \pm 10 \text{ mm}^2$) che risultava essere confrontabile con l'area di inibizione ottenuta trattando i batteri con 20 mg/ml di estratto di mirto ($85,0 \pm 0,0 \text{ mm}^2$) (fig. 21A; 21B). Invece, per *Photobacterium damsela*e, la più bassa concentrazione di ampicillina testata (3,75 µg/ml) dava un'area di inibizione di $60 \pm 10 \text{ mm}^2$ che risultava essere paragonabile all'area di inibizione ottenuta trattando i batteri con 10 mg/ml di estratto ($65 \pm 4 \text{ mm}^2$) (fig. 22A; 22B). A concentrazioni maggiori di estratto (10 - 20 - 40 - 83,5 mg/ml) l'area di inibizione aumentava, per raggiungere alla concentrazione di 83,5 mg/ml un valore massimo di area di inibizione di $130 \pm 21 \text{ mm}^2$ per *Listonella anguillarum* e di $180 \pm 16 \text{ mm}^2$ per *Photobacterium damsela*e.

Quindi, dall'analisi delle piastre incubate con varie concentrazioni di estratto di Mirto è stato possibile evidenziare la presenza di aloni di inibizione per entrambi i ceppi batterici la cui

grandezza è risultata direttamente proporzionale alla dose di estratto utilizzata. Per entrambi i patogeni l'estratto comincia ad avere un'attività che può essere considerata antibatterica dai 4 mg/ml in poi, in particolare per *P. damsela* l'area dell'alone di inibizione ottenuto utilizzando l'estratto di mirto alla concentrazione di 10 mg/ml era equivalente all'area dell'alone di inibizione ottenuto utilizzando 3,75 µg/ml di ampicillina; diversamente nel caso di *Listonella anguillarum* l'area dell'alone di inibizione ottenuto utilizzando la tetraciclina a 2,5 µg/ml era equivalente all'area dell'alone di inibizione ottenuto con l'estratto di mirto alla concentrazione di 20 mg/ml. Testando concentrazioni via via crescenti si è potuto evincere che il batterio Gram-negativo *P. damsela* ha una sensibilità maggiore all'attività antibatterica dell'estratto di mirto, infatti alla concentrazione di 83,5 mg/ml si raggiunge un'area dell'alone di inibizione di $180 \pm 16 \text{ mm}^2$, contro i $130 \pm 21 \text{ mm}^2$ (ottenuti sempre alla concentrazione di 83,5 mg/ml) riscontrati per *L. anguillarum*.

L'analisi statistica dei dati ha inoltre permesso di calcolare la regressione lineare, ove possibile, o la regressione non-lineare e nei casi di regressione lineare, è stata calcolata la probabilità P (pendenza della retta significativamente diversa da zero) per rigettare l'ipotesi che l'andamento sia casuale. Per *Photobacterium damsela* l'andamento dell'effetto inibitorio alle varie concentrazioni (Fig. 23A; 23B) di estratto e di ampicillina è rappresentato da una retta con $r^2 = 0,970$ ($P < 0,0001$) per l'estratto di Mirto e $r^2 = 0,962$ ($P < 0,01$) per l'ampicillina; nel caso di *Listonella anguillarum* (Fig. 23C; 23D) la curva che meglio rappresenta l'andamento della percentuale di inibizione in dipendenza della concentrazione è una funzione non lineare con $r^2 = 0,9468$ ($P < 0,01$) per l'estratto di mirto e $r^2 = 0,9168$ ($P < 0,01$) per l'antibiotico tetraciclina.

Sulla base quindi di tale analisi i risultati ottenuti ci fanno ipotizzare che le proprietà antibatteriche riscontrate non dipendano probabilmente da un effetto casuale, ma da componenti bioattive uniche presenti nelle foglie di mirto che potrebbero avere attività ed efficacia differenti su patogeni diversi.

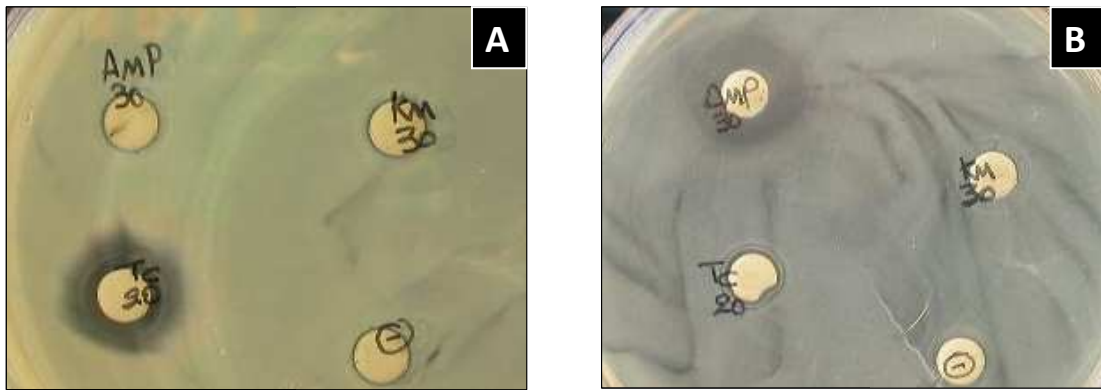


Fig. 20

Antibiogrammi effettuati per testare la sensibilità dei ceppi patogeni agli antibiotici ampicillina (30 $\mu\text{g/ml}$), kanamicina (30 $\mu\text{g/ml}$) e tetraciclina (20 $\mu\text{g/ml}$), con l'aggiunta di un controllo negativo (acqua distillata), in a) *Listonella anguillarum* e in b) *Photobacterium damsela*.

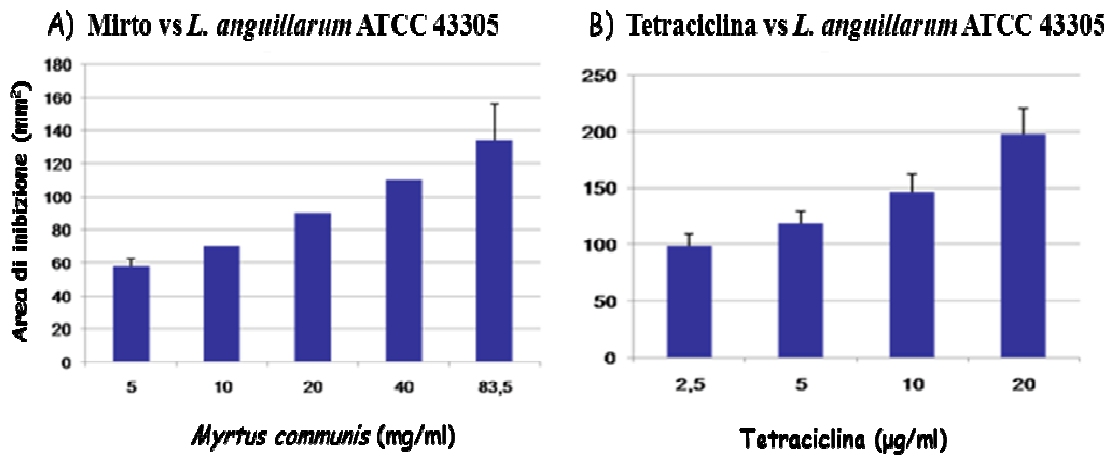


Fig. 21

Saggi antibatterici effettuati sul ceppo *Listonella anguillarum* trattato in a) con concentrazioni scalari di mirto (da 5 mg/ml a 83,5 mg/ml) e in b) con concentrazioni scalari dell'antibiotico tetraciclina (da 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$)

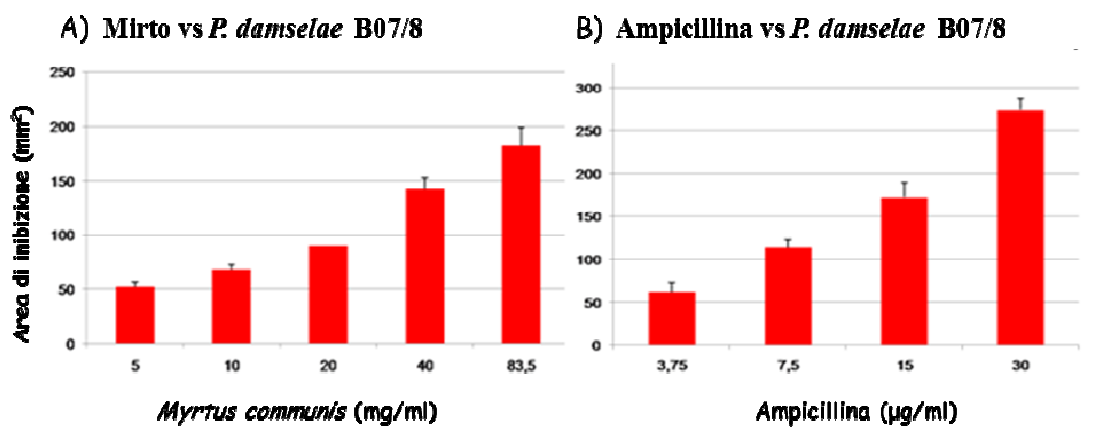


Fig. 22

Saggi antibatterici effettuati sul ceppo *Photobacterium damsela* trattato in a) con concentrazioni scalari di mirto (da 5 mg/ml a 83,5 mg/ml) e in b) con concentrazioni scalari dell'antibiotico ampicillina (da 3,75 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$).

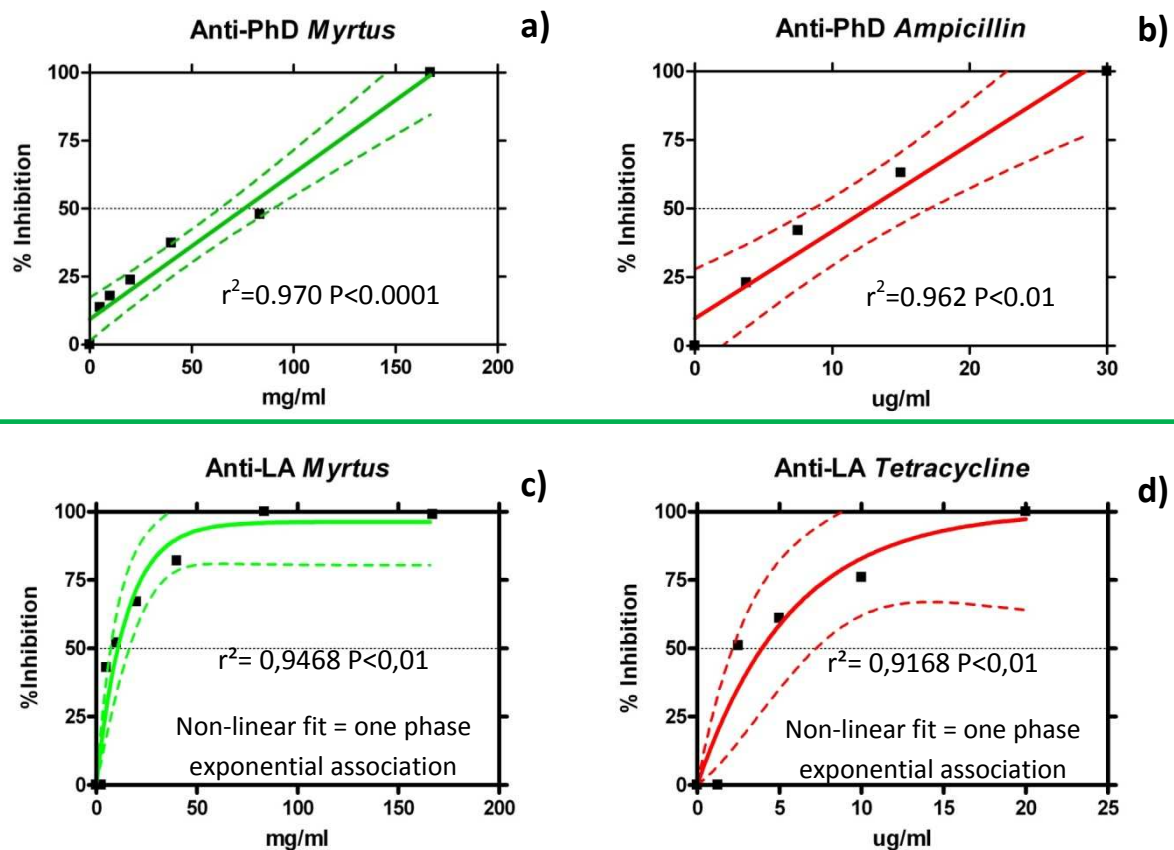


Fig. 23

Rappresentazione dell'andamento della percentuale di inibizione in dipendenza di a) concentrazione di mirto verso *P. damsela*, b) concentrazione di ampicillina verso *P. damsela*, c) differenti concentrazioni di mirto verso *L. anguillarum*, d) concentrazione di tetraciclina verso *L. anguillarum*.

A supporto di tali considerazioni studi in ambito umano hanno utilizzato l'estratto di mirto contro diversi ceppi clinici come ad es. *Helicobacter pylori* (Deriu et al., 2007) *M. tuberculosis* e ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Zanetti et al., 2010) ottenendo risultati significativi. Appendino et al., (2006) Shaheen et al., (2006) e Flesar et al., (2010) asseriscono che i principali responsabili dell'attività antibatterica dell'estratto di Mirto attestata verso batteri Gram-positivi e Gram-negativi sono gli acilfluoroglucinoli di cui fa parte il mirtocommulone definiti come prodotti naturali molto potenti, grazie ai quali, il mirto può essere qualificato come risorsa di unici metaboliti secondari con specifici target biologici. A tale proposito è nostro interesse in un prossimo futuro andare a testare singole frazioni dell'estratto così da poter attuare indagini più approfondite sui composti responsabili di tali attività.

In ultimo, per definire quale fosse la MIC dell'estratto di mirto verso i due ceppi batterici, definita come la minima concentrazione in grado di inibire la crescita visibile del microrganismo preso in esame, è stata utilizzata la metodica di Kirby-Bauer. I risultati sono stati ottenuti dopo aver fatto crescere i due ceppi batterici su piastre agarizzate trattate con concentrazioni decrescenti di estratto di mirto (5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml e 2,5 mg/ml) partendo dalla concentrazione di 5 mg/ml la quale era in grado di determinare la formazione di un'area di inibizione di $63,0 \pm 0,0 \text{ mm}^2$ per entrambi i patogeni. Dalla misurazione delle aree degli aloni di inibizione è stato possibile definire che la concentrazione minima inibente per l'estratto di mirto risultava essere 4 mg/ml, tale concentrazione era in grado di generare un alone di inibizione di aree pari a $50,0 \pm 0,0 \text{ mm}^2$ per entrambi i batteri. Dopo aver valutato i valori di MIC tramite metodica di Kirby-Bauer, per ogni patogeno è stato eseguito un saggio di diluizioni scalari in terreno liquido per valutare la concentrazione minima battericida (MBC). A tale scopo i tubi di coltura sono stati inoculati con il ceppo batterico in presenza di estratto di mirto in un intervallo di concentrazione compreso tra 83,5 e 2,5 mg/ml. Dopo opportuna incubazione, dalle colture batteriche è stato poi allontanato l'estratto di mirto ed i batteri sono stati piastrati su terreno solido per stimare la sopravvivenza batterica. Su questa base la più bassa concentrazione di estratto di mirto che risulta in una totale assenza di crescita ossia la MBC è risultata pari a 20 mg/ml per *Listonella anguillarum* e a 10 mg/ml per *Photobacterium damsela*.

3.3.1 Valutazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) delle eventuali modificazioni ultrastrutturali indotte da *Myrtus communis* su *Listonella anguillarum* ATCC 43305 e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* B07/8

Una volta accertata l'attività antibatterica dell'estratto di mirto sui patogeni *Listonella anguillarum* e *Photobacterium damsela*, abbiamo condotto delle indagini al SEM e al TEM volte a valutare se tale attività fosse battericida o batteriostatica.

Avendo definito, tramite saggi di diluizioni scalari in terreno liquido e solido, la concentrazione minima inibente (MIC: la concentrazione più bassa di estratto di mirto alla quale non vi è crescita batterica visibile) e la concentrazione minima battericida (MBC: la concentrazione più bassa di estratto di mirto necessaria per provocare la morte di più del 99% dei batteri) per entrambi i ceppi batterici, abbiamo deciso di effettuare le analisi morfologiche ed ultrastrutturali di microscopia elettronica.

Abbiamo quindi ottenuto dei dati tramite SEM e TEM a seguito di trattamento dei patogeni con le rispettive MIC (pari a 4 mg/ml per entrambi i ceppi batterici) ed MBC (pari a 20 mg/ml per *L. anguillarum* e 10 mg/ml per *P. damsela*) (Fig. 24; 25 e 26).

Per quanto riguarda le immagini relative alla microscopia elettronica a scansione (Fig. 24) per entrambi i batteri in esame non si sono state riscontrate differenze significative, rispetto alla morfologia del controllo, a seguito di trattamento per 24 ore con la rispettiva MIC ed MBC. Infatti i batteri risultavano turgidi e ben rigonfi senza depressioni e cambiamenti nei margini, mantenendo quindi la loro forma convenzionale non mostrando alcun segno, almeno all'esterno del batterio, di sofferenza o danno.

Al contrario, dall'osservazione delle immagini ottenute alla trasmissione (Fig. 25 e 26) appariva evidente che entrambi i patogeni a seguito di trattamento con la MIC e con la MBC subivano danni a livello ultrastrutturale. Infatti, come prevedibile, la MIC, induce danni di minore entità che sono riscontrabili, per entrambi i patogeni (Fig. 25 e 26 D, E ed F), in un iniziale e lieve disassemblamento del materiale genetico e citoplasmatico che interessa anche la parete del batterio senza però compromettere l'integrità di questa struttura.

Probabilmente il fatto di non creare rotture alla parete della cellula è direttamente correlabile con la successiva ripresa delle attività fisiologiche una volta allontanato l'estratto, per cui possiamo concludere che le lievi modificazioni che sono state osservate potrebbero determinare un blocco della crescita e replicazione del batterio senza però portarlo a morte.

Al contrario, per quanto riguarda l'analisi delle immagini relative al trattamento con la concentrazione minima di estratto capace di uccidere il 99% dei batteri (MBC) per entrambi i patogeni è stato possibile rilevare danni così devastanti da essere incompatibili con la sopravvivenza del batterio. In particolare sono emersi fortissimi danni a livello del citoplasma che risultava disomogeneo rispetto al controllo (Fig. 25 e 26 G, H e I) con formazione di masse compatte ed elettrondense, segno di disgregazione del materiale citoplasmatico e di evidenti danni intracellulari.

Oltre ai danni a carico del citoplasma che risultava perdere completamente la sua organizzazione interna, a seguito di trattamento con MBC è stato possibile rilevare danni altrettanto gravi alla parete che però differivano tra i due batteri. Infatti nel caso di *P. damsela* (Fig. 26 G, H e I) il batterio rispondeva alla minima dose battericida con un forte disassemblaggio e la conseguente rottura della membrana con fuoriuscita di materiale intracellulare che quindi si ritrova nello spazio tra la membrana e la parete che risultavano profondamente distaccate. Nel caso di *L. anguillarum* (Fig. 25 G, H ed I) i danni riscontrabili erano ancora più evidenti e devastanti, infatti la cellula dapprima si gonfia, ne consegue un

netto scollamento della parete dalla sottostante membrana con una successiva esplosione e rilascio di materiale citoplasmatico all'esterno.

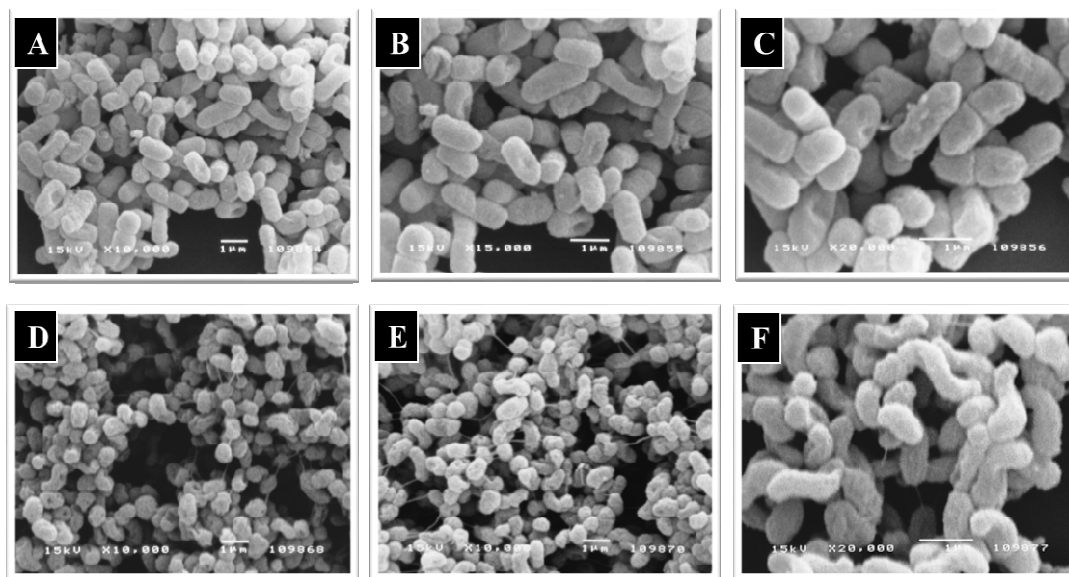
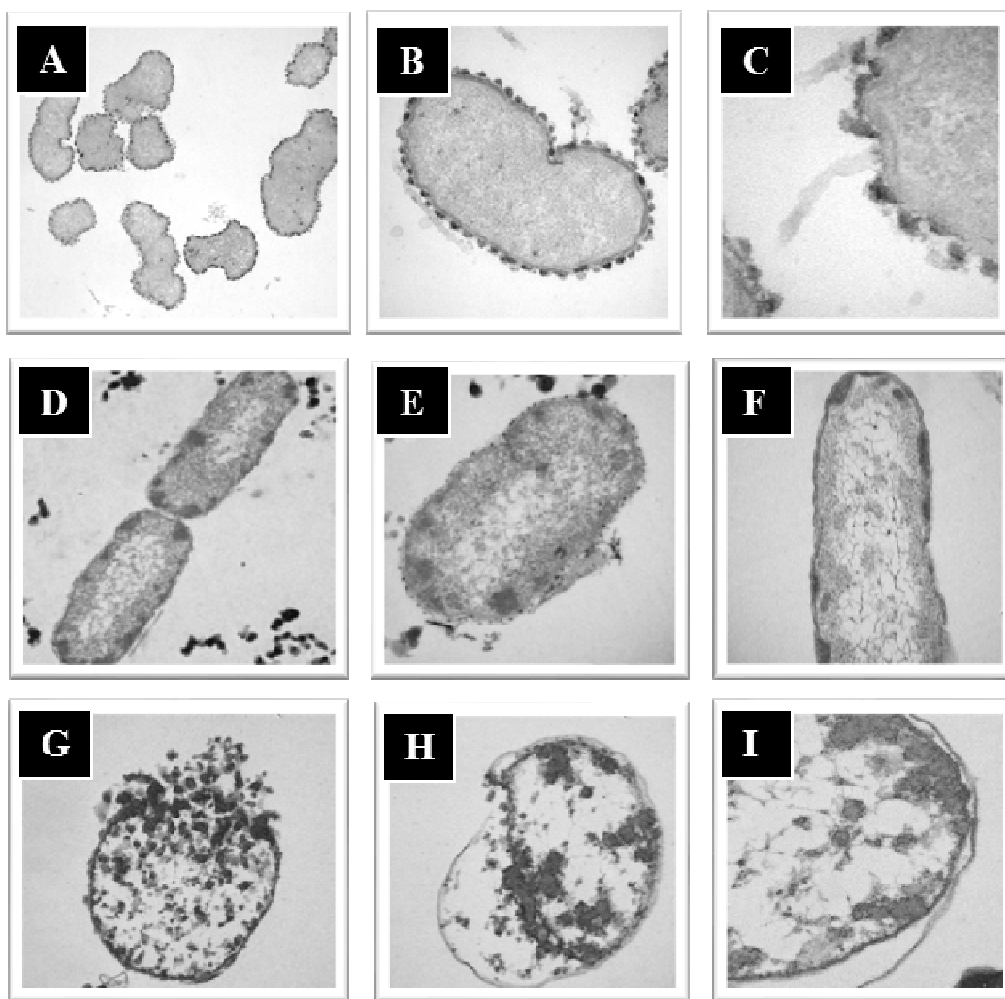


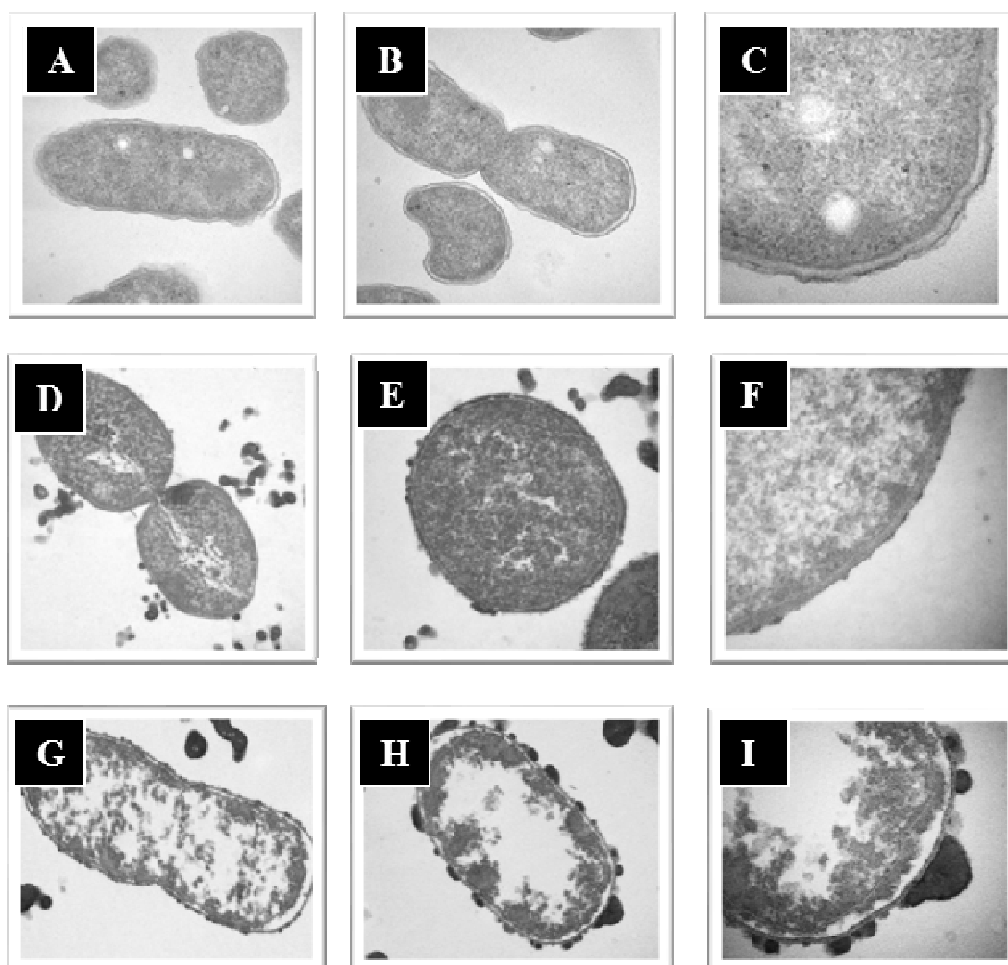
Fig. 24

Indagini morfologiche condotte al microscopio elettronico a scansione su *Photobacterium damsela* in A, B e C e su *Listonella anguillarum* in D, E ed F. In dettaglio sono riportate in A) e D) cellule controllo, in B) ed E) cellule trattate con la MIC (estratto di mirto 4 mg/ml) e in C) ed F) cellule trattate con la MBC (estratto di mirto 10 mg/ml per *P. damsela* e 20 mg/ml per *L. anguillarum*).

In conclusione alla luce di quanto detto possiamo quindi affermare che i dati riguardo la MIC e MBC ottenuti mediante i saggi di diluizioni scalari in terreno liquido e solido sono stati confermati dalle indagini di microscopia elettronica, evidenziando a seguito di trattamento con la dose minima inibente di estratto (4 mg/ml) danni lievi compatibili con il solo blocco della replicazione batterica e non la morte, ed a seguito di trattamento con la dose minima battericida di estratto (20 mg/ml per *L. anguillarum* e 10 mg/ml per *P. damsela*) danni così pesanti da essere incompatibili con la vita. In aggiunta a questi dati, per completare le analisi morfologiche ed ultrastrutturali condotte al microscopio elettronico ho deciso di valutare eventuali cambiamenti morfologico-ultrastrutturali dei ceppi batterici in esame a seguito dei trattamenti con la pianta medicinale alla concentrazione di 83,5 mg/ml (la massima concentrazione testata), e le immagini sono state confrontate con quelle di batteri trattati con l'antibiotico di riferimento alle concentrazioni di 7µg/ml di tetraciclina per *L. anguillarum* e 15 µg/ml di ampicillina per *P. damsela*.

**Fig. 25**

Indagini ultrastrutturali su *Listonella anguillarum* condotte al microscopio elettronico a trasmissione in a) b) c) su cellule controllo, in d) e) f) su cellule trattate con estratto di mirto alla dose MIC (4 mg/ml) e in g) h) i) su cellule trattate con estratto di mirto alla dose MBC (20mg/ml).

**Fig. 26**

Indagini ultrastrutturali su *Photobacterium damsela* condotte al microscopio elettronico a trasmissione in a) b) c) su cellule controllo, in d) e) f) su cellule trattate con estratto di mirto alla dose MIC (4 mg/ml) e in g) h) i) su cellule trattate con estratto di mirto alla dose MBC (10mg/ml).

Tali concentrazioni dei due antibiotici sono state scelte per il confronto, in quanto determinavano la formazione di aloni di inibizione di area equivalente a quella ottenuta utilizzando l'estratto di mirto sui due differenti patogeni. L'osservazione delle immagini al microscopio elettronico ha permesso di evidenziare in modo significativo lo stato di sofferenza cellulare dei batteri a seguito dei trattamenti. In particolare emerge che entrambi i trattamenti (antibiotici e mirto) sono altamente tossici per i patogeni presi in esame in quanto capaci di provocare gravi danni a livello morfologico-ultrastrutturale (Fig. 27; 28; 29 e 30).

E' significativo inoltre evidenziare che, a differenza di ciò che è stato osservato in seguito a trattamento con MIC ed MBC, sono visibili chiare modificazioni sin dalle immagini al SEM, ovvero i cambiamenti che il Mirto provoca alla concentrazione massima di 83.5 mg/ml si evidenziano anche dalla morfologia esterna dei patogeni esaminati. In particolare i batteri del ceppo *Listonella anguillarum* in presenza di mirto (83,5 mg/ml) per 24 ore di trattamento mostravano differenze significative rispetto al controllo (Fig. 27A; 27B) e ai batteri trattati con la tetraciclina (7 µg/ml) (Fig. 27C). Infatti, in presenza di mirto, i batteri si presentavano ammassati e inoltre le cellule presentavano delle modificazioni nella forma che in alcuni casi risultava con morfologia più allungata e più curvata con margini arrotondati, rispetto al proprio controllo (Fig. 27A) e al campione trattato con l'antibiotico (Fig. 27C). Gli effetti dovuti al trattamento con l'estratto di mirto erano ancora più evidenti nel ceppo *Photobacterium damsela* che presentava grosse differenze morfologiche rispetto alle cellule controllo e alle cellule trattate con l'ampicillina (15 µg/ml), con presenza di margini fortemente irregolari dovuti al trattamento con l'estratto (Fig. 28A; 28B; 28C).

Anche le indagini al TEM hanno permesso di evidenziare lo stato di sofferenza cellulare dei batteri a seguito del trattamento con l'estratto. Infatti, sia *Listonella anguillarum* (fig. 29D,E,F) che *Photobacterium damsela* (fig. 30D,E,F) trattati con l'estratto di mirto (83,5 mg/ml) mostravano danni evidenti a livello del citoplasma che si presentava disomogeneo rispetto al controllo con formazione di masse compatte ed elettrondense, segno di disgregazione del materiale citoplasmatico e di evidenti danni intracellulari.

Anche i trattamenti effettuati utilizzando i due antibiotici inducevano evidenti danni citoplasmatici. In particolare il citoplasma di *Listonella anguillarum* dopo trattamento con tetraciclina risultava disomogeneo (Fig. 29 G,H,I).

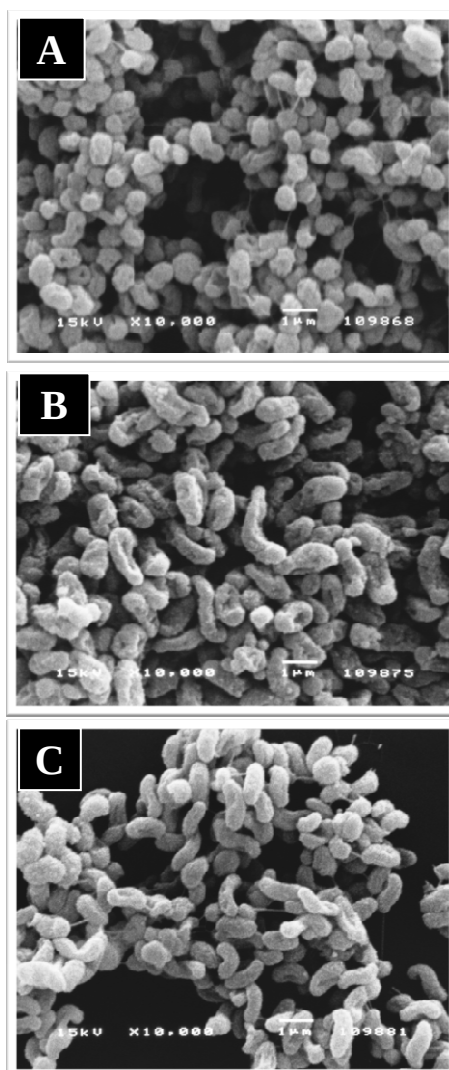


Fig. 27

Indagini morfologiche sul batterio *Listonella anguillarum* condotte al microscopio elettronico a scansione in a) su cellule controllo, in b) su cellule trattate con estratto di mirto (83,5 mg/ml) e in c) su cellule trattate con tetraciclina (7 µg/ml).

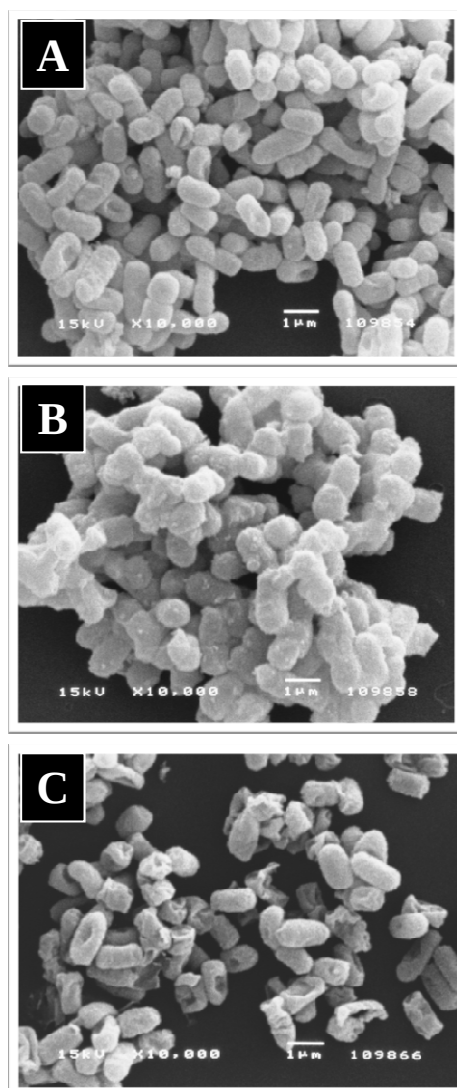


Fig. 28

Indagini morfologiche su *Photobacterium damsela* condotte al microscopio elettronico a scansione in a) su cellule controllo, in b) su cellule trattate con estratto di mirto (83,5 mg/ml) e in c) su cellule trattate con ampicillina (15 μ g/ml).

Ancora più evidenti erano i danni citoplasmatici indotti su *Photobacterium damsela* a seguito del trattamento con ampicillina (Fig. 30G,H,I). Tale antibiotico infatti determinava una quasi completa distruzione del contenuto citoplasmatico della cellula batterica che si presentava completamente disorganizzato. Similmente per entrambi i patogeni erano riscontrabili evidenti danni sulla loro parete cellulare. In particolar modo in *Listonella anguillarum* il trattamento con l'estratto di mirto (83,5 mg/ml) induceva rottura e disassemblaggio di quest'ultima (Fig. 29 D,E,F). Tali danni a livello della parete erano riscontrabili anche nei batteri trattati con la tetraciclina (7 µg/ml) (Fig. 29 G,H,I) in cui la parete risultava completamente distaccata dalla sottostante membrana cellulare. Inoltre è stato possibile riscontrare, a seguito di trattamento con la dose massima di Mirto, alcune cellule esplose come riportato in seguito a trattamento di *L. anguillarum* con la dose minima battericida. Per quanto riguarda *Photobacterium damsela*, il trattamento con l'estratto di mirto (83,5 mg/ml) provocava rispetto al controllo (Fig. 30A,B,C) danni a livello della parete cellulare che appariva disorganizzata (Fig. 30D,E,F).

Alla luce di quanto detto possiamo quindi affermare che l'attività antibatterica dell'estratto di Mirto alla concentrazione di 83,5 mg/ml è di tipo battericida, in quanto è in grado di recare ai patogeni da noi presi in esame danni a livello cellulare così pesanti da essere incompatibili con la vita.

Dal confronto delle immagini ottenute alla scansione e alla trasmissione per i campioni incubati con solo estratto e solo antibiotico, emerge che entrambi i trattamenti sono altamente tossici per i patogeni presi in esame in quanto capaci di provocare gravi danni a livello morfologico-ultrastrutturale. Per cui l'estratto di mirto e gli antibiotici hanno sui batteri testati un effetto equivalente ovvero, battericida. Sebbene i danni arrecati al citoplasma ed alla parete delle cellule sono di tipo differente perché dovuti a probabili differenti meccanismi di azione che per il Mirto risultano essere al momento completamente sconosciuti.

In riferimento alla tossicità dell'estratto di Mirto nei confronti dei batteri è importante inoltre sottolineare che tale effetto battericida non è esclusivamente dipendente dalla concentrazione di utilizzo, infatti l'estratto preparato in due differenti periodi del ciclo vegetativo della pianta e utilizzato alla stessa concentrazione massima di 83,5 mg/ml ha attività differente. In particolare l'estratto ottenuto durante il periodo in cui la pianta presenta i frutti (autunno e primi mesi invernali) ha un'attività battericida trascurabile nei confronti dei patogeni testati. E' noto infatti che, l'estratto di Mirto ha una sua stagionalità, ovvero la pianta presenta o meno molecole bioattive in momenti diversi del ciclo vegetativo (Wannes et al., 2010; Zanetti et al., 2010).

Queste speculazioni oltre ad essere molto interessanti ci incoraggiano, ci stimolano in futuro ad approfondire e a contribuire con ulteriori indagini alle scarse conoscenze nei temi di ricerca qui discussi, specialmente nei pesci. In particolar modo è nostro interesse condurre studi finalizzati a determinare i principi attivi contenuti in tali estratti vegetali, conoscenze utili per poter utilizzare queste piante medicinali come supplemento nella dieta dei pesci allevati.

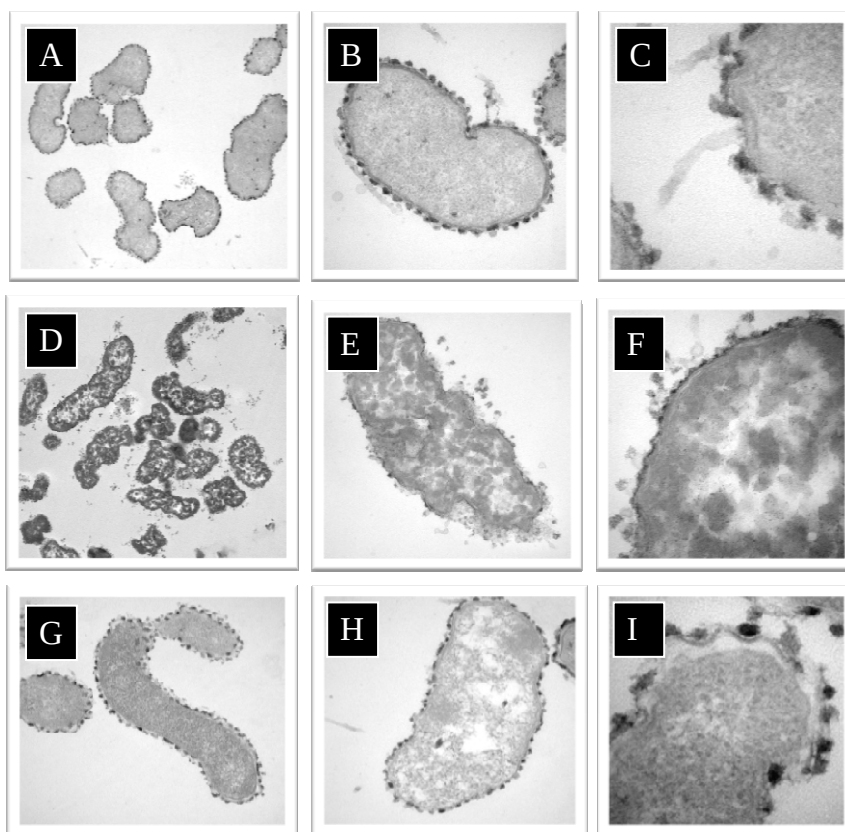
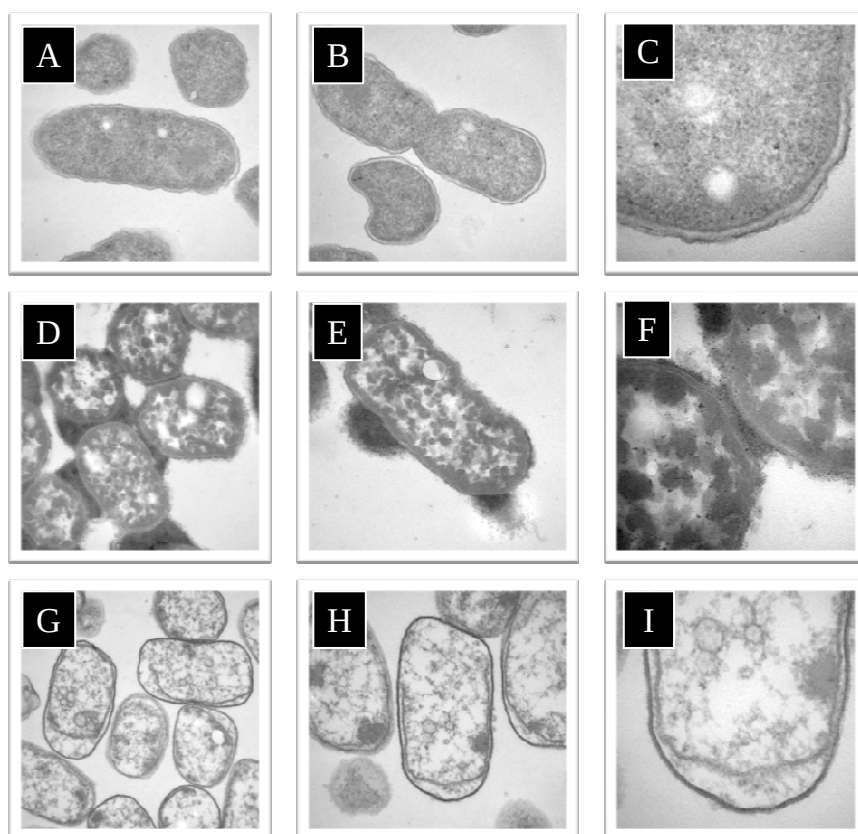


Fig. 29

Indagini ultrastrutturali sul batterio *Listonella anguillarum* condotte al microscopio elettronico a trasmissione in a) b) c) su cellule controllo, in d) e) f) su cellule trattate con estratto di mirto (83,5 mg/ml) e in g) h) i) su cellule trattate con tetraciclina (7 µg/ml).

**Fig. 30**

Indagini ultrastrutturali su *Photobacterium damsela* condotte al microscopio elettronico a trasmissione in a) b) c) su cellule controllo, in d) e) f) su cellule trattate con estratto di mirto (83,5 mg/ml) e in g) h) i) su cellule trattate con ampicillina (15 µg/ml).

3.4 Risultati ottenuti utilizzando il prodotto commerciale Macrogard

Come già detto in merito all'utilizzo degli estratti, anche per il Macrogard come primo approccio per un suo sicuro utilizzo ne abbiamo testato la biocompatibilità sulla linea cellulare primaria di leucociti utilizzata per gli studi *in vitro*. Ci siamo quindi chiesti quale sarebbe stato il suo effetto sulla vitalità cellulare in seguito a trattamento e quale fosse la migliore concentrazione da utilizzare. A tal fine sono stati condotti saggi di citotossicità *in vitro* che hanno permesso la determinazione della vitalità cellulare a seguito dei trattamenti. Quindi, per testare le diverse concentrazioni di Macrogard sulla linea cellulare primaria di derivazione branchiale, di merluzzo e di salmone atlantico, è stato utilizzato il saggio MTT.

3.4.1 Saggi MTT condotti sulla linea cellulare primaria di leucociti

Una volta stabilita e testata con successo l'attendibilità della linea cellulare isolata dalle branchie, abbiamo deciso di condurre una serie di esperimenti volti a testare su tale linea gli effetti di un prodotto commerciale costituito da beta glucani derivanti dalla parete di *S. cerevisiae* (Macrogard), sul proteoma di merluzzo e salmone a seguito di trattamenti.

Come primo approccio nei confronti del Macrogard ci siamo chiesti quale sarebbero stati i suoi effetti sulla vitalità cellulare dei leucociti isolati dalle branchie delle due specie in seguito a trattamento e quale fosse la migliore concentrazione da utilizzare. A tal fine sono stati condotti saggi di citotossicità *in vitro* MTT che hanno permesso la determinazione della percentuale di sopravvivenza delle cellule trattate con differenti concentrazioni di Macrogard. Dall'analisi statistica dei dati che è seguita sono emerse per entrambe le specie, differenze di significatività tra i gruppi studiati (controllo: costituito da cellule non trattate; cellule trattate con Macrogard a varie concentrazioni: 480 µg/ml - 240 µg/ml - 120 µg/ml - 60 µg/ml - 30 µg/ml - 15 µg/ml e controllo positivo: costituito da cellule trattate con sodio azide 0,2% con effetto sicuramente citotossico). Nostro interesse era individuare la maggiore concentrazione di Macrogard che in termini di vitalità cellulare si discostasse meno dal controllo costituito da cellule non trattate e che quindi presumibilmente fosse in grado di svolgere una qualsiasi attività senza creare danno alle cellule, non andando a variare le caratteristiche del medium di coltura.

Nel caso del merluzzo dopo 24 ore di trattamento le cellule incubate con il Macrogard alla concentrazione di 60 µg/ml, 30 µg/ml e 15 µg/ml si comportano in termini di vitalità cellulare come le cellule controllo (Fig. 31A). Cosa che invece non accade per i gruppi corrispondenti alla concentrazione di 480 µg/ml, 240 µg/ml e 120 µg/ml di Macrogard (Fig. 31A).

Infatti a tali concentrazioni le cellule trattate risultano essere significativamente differenti dal controllo in termini positivi, in quanto mostrano una vitalità cellulare in percentuale significativamente maggiore rispetto a tale gruppo, evidenziando quindi un effetto benefico della miscela di beta glucani.

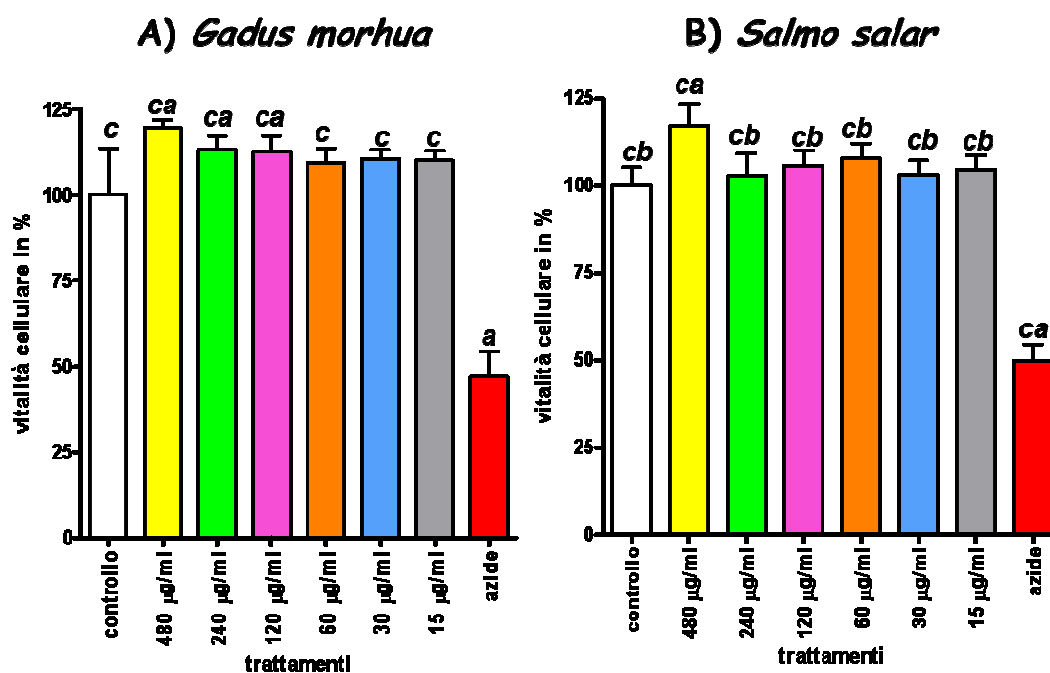


Fig. 31(A-B)

Saggio di citotossicità MTT eseguito dopo 24 ore di trattamento. Legenda: **a** significativamente differente dal controllo; **b** significativamente differente da 480 µg/ml; **c** significativamente differente da sodioazide. Sono stati presi in considerazione valori di p a partire da $p < 0.05$.

Nessuna delle concentrazioni testate ha mostrato effetti citotossici nei confronti delle cellule trattate e ciò è confermato dal fatto che tutte le concentrazioni testate sono significativamente diverse dal gruppo composto dalle cellule trattate con sodio azide allo 0,2% che invece induce una mortalità del 50 %. Quest'ultimo risultato è stato riscontrato anche per il salmone confermando la scarsa tossicità del Macrogard almeno nei confronti delle due specie testate. Infatti sono pochissime le notizie riguardo saggi di citotossicità effettuati su cellule di pesce in seguito a trattamento con Macrogard e le poche che sono presenti in letteratura riguardano crostacei (Hauton et al., 2004) e specie lontane da quelle di nostro interesse fornendo quindi indicazioni poco calzanti.

L'unico aspetto che differenzia i risultati ottenuti per il salmone (Fig. 31B) rispetto al merluzzo riguardano il trattamento dei leucociti isolati dalle branchie con la concentrazione di Macrogard pari a 480 µg/ml. Infatti tale concentrazione nel salmone è l'unica a differenziarsi significativamente dal controllo sempre in termini di aumento della vitalità cellulare, accentuando ancora di più lo stato di benessere in cui si trovano le cellule a seguito di trattamento con tale concentrazione per 24 ore.

A questo punto, risulta chiaro che le migliori concentrazioni di utilizzo del Macrogard per entrambi i pesci Merluzzo e Salmone (Fig. 31) sono quelle corrispondenti a 480 µg/ml e 240 µg/ml in quanto tali concentrazioni risultano essere le maggiori somministrabili alla nostra linea cellulare primaria senza avere effetto citotossico. Considerate le scarse indicazioni riportate in letteratura in merito a saggi di questo tipo abbiamo deciso di prenderle entrambe in considerazione per condurre le indagini di tipo proteomico volte a valutare l'eventuale effetto del Macrogard sul proteoma delle due specie di interesse.

3.4.2 Risultati ottenuti dalla sperimentazione in vitro condotta sulla linea cellulare primaria di leucociti di derivazione branchiale

Una volta individuate le concentrazioni di utilizzo del Macrogard attraverso le informazioni ottenute mediante i saggi MTT (vedi paragrafo precedente), durante il periodo trascorso in Norvegia mi sono quindi dedicata in seguito, al trattamento delle linee cellulari primarie derivanti dalle branchie di merluzzo e salmone con le due concentrazioni di Macrogard, all'estrazione delle proteine totali di tali campioni ed al processamento di questo materiale per le analisi di elettroforesi bidimensionale. Similmente ai saggi MTT, i trattamenti alla base degli esperimenti di proteomica sono stati condotti su campioni di leucociti isolati dalle branchie di otto esemplari di salmone ed otto esemplari di merluzzo. Le cellule derivanti da ogni pesce sono state poi suddivise in 3 fiasche e trattate per 24 ore rispettivamente con solo terreno di coltura (cellule controllo non trattate) e con le due differenti concentrazioni di Macrogard prescelte (480 µg/ml e 240 µg/ml). A seguito dei trattamenti, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione ed i vari pellet di cellule sono stati poi processati secondo il protocollo descritto nel paragrafo dedicato, così da ottenere estratti proteici che sono stati poi quantificati mediante fluorimetro ed ottimizzati per le analisi di elettroforesi bidimensionale. La quantità specifica di proteine totali per ogni campione (circa 100 µg) è stata quindi prelevata e risospesa nell'apposito buffer. A questo punto le IPG strips sono state reidratate ed incubate con i campioni e poi soggette ad isoelettrofocusing. Una volta focalizzate, le IPG strips sono state equilibrate e quindi caricate su gel di poliacrilamide al 15% a questo

passaggio è seguita la corsa per la seconda dimensione SDS-PAGE. Gli spots proteici sono stati poi rivelati mediante colorazione Brilliant Blue Coomassie al termine della quale, l'immagine di ciascun gel è stata acquisita tramite Versadoc imaging system (Bio-rad) (Fig. 32) ed analizzata con il software PD-Quest (BIO-RAD).

A questo punto è seguita la fase relativa all'analisi dei dati acquisiti, in particolare si è proceduto all'escissione degli spot dai quali a seguito di tripsinizzazione sono stati estratti i peptidi ed analizzati tramite LC-MSMS (ESI Quad TOF).

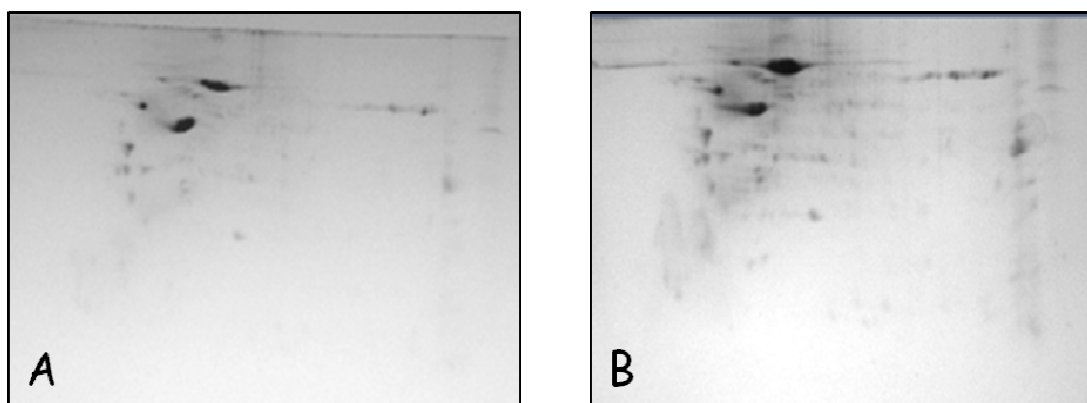


Fig. 32 (A-B)

Scansioni di Gel bidimensionali effettuati su salmone.

A: gel relativo alle proteine totali estratte da leucociti isolati dalle branchie di salmone non trattati (controllo).

B: gel relativo alle proteine totali estratte dalle stesse cellule trattate per 24 ore con 240 µg/ml di Macrogard.

Gli spettri di massa che ne sono risultati sono stati poi normalizzati mediante uno standard di tripsina interno al sistema ed utilizzati per l'identificazione delle proteine mediante programmi di bioinformatica come il motore di ricerca MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Ad oggi, dai preliminari dati ottenuti, relativi ad una parte dei gel analizzati, abbiamo potuto evidenziare un effetto sul proteoma sia nel caso di merluzzo che di salmone dovuto al trattamento con il Macrogard. Il fatto di aver ottenuto in questo tempo solo parte dei dati dipende strettamente dal grande numero di campioni utilizzati per l'estrazione di proteine e quindi dal grande numero di gel allestiti e di spot ottenuti, una mole di dati difficile da gestire in un tempo relativamente breve.

Solo dopo aver ultimato l'analisi delle informazioni derivanti da tutti i gel sarà quindi possibile concludere che tipo di effetti ha indotto a livello proteomico il prodotto commerciale

Macrogard e se possa rappresentare un valido aiuto per il trattamento di merluzzo e salmone negli impianti di acquacoltura biologica.

Infatti il Macrogard in quanto costituito da polisaccaridi di origine naturale potrebbe contribuire alla difesa dalle malattie e al miglioramento della salute degli animali, rappresentando così un punto importante per incrementare la produttività degli impianti ittici e per lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile e compatibile con l'ambiente. Evidenze in parte già dimostrate ma completamente nuove per quanto riguarda i meccanismi che intervengono nelle cellule che costituiscono uno degli organi chiave per la difesa dell'animale, sede della prima attività di difensiva nei confronti di possibili patogeni, ovvero le branchie.

Capitolo IV

Conclusioni

La situazione sanitaria degli organismi acquatici destinati al consumo alimentare umano costituisce una preoccupazione per molte agenzie internazionali (FAO, OIE, CODEX, Commissione UE) e per molte amministrazioni governative dove l'attività d'acquacoltura è un segmento produttivo molto importante. Le perdite economiche determinate dalle patologie ittiche sono ragguardevoli sia in termini di volumi che di valore economico.

Per arginare la diffusione dei patogeni le agenzie internazionali hanno stilato una lista delle malattie di maggiore impatto a livello internazionale, così come la Comunità Europea ha emanato la direttiva 2006/88/CE relativa alle condizioni sanitarie applicabili alle specie animali d'acquacoltura, per prevenire alcune malattie. Questa direttiva è stata recepita dall'Italia con il DL.vo n. 148 del 4 agosto 2008.

In questa norma viene considerato lo stato sanitario della zona e il rischio di contrarre e diffondere le malattie da parte delle aziende ittiche. Inoltre, è stata compilata una lista delle patologie considerate a maggior rischio di diffusione e di impatto socio-sanitario in ambito comunitario. Queste norme cercano solo di organizzare alcune misure di prevenzione. Rimane comunque alto il rischio di contrarre infezioni per le specie acquatiche allevate e si ripropone la questione degli interventi profilattici e terapeutici tradizionali. Questi però mostrano molti limiti, come analizzato precedentemente (disponibilità, efficacia, impatto, residui, resistenza), infatti non risultano esserci rimedi validi per una serie di importanti patologie ittiche presenti nella maricoltura europea (ma anche di altri paesi), come la Necrosi Virale del Sistema Nervoso (VNN), la Tubercolosi (*Mycobacterium marinum*), l'Infezione Enterica (*Enteromyxum leei*), la Linfocisti (Iridovirus), la Winter disease, le infezioni parassitarie da protozoi, elminti, ectoparassiti.

Al momento non risulta alcun anestetico, né antiparassitario che rientri nei dettami imposti dalle nuove politiche della bioacquacoltura. Tale situazione, consente quindi di ipotizzare una diversa strategia nella ricerca scientifica per l'individuazione di nuovi principi presenti negli organismi vegetali o provenienti dall'attività della flora batterica e fungina. Sostanze che stanno offrendo interessanti risultati.

Tra questi si inserisce anche il mio lavoro di dottorato infatti, le informazioni e i dati descritti nel capitolo III sono indubbiamente di fondamentale importanza e utilizzabili per la messa a punto di misure preventive contro infezioni virali e batteriche che colpiscono i pesci allevati.

Alla luce dei dati ottenuti possiamo quindi concludere che questo lavoro propone una nuova prospettiva per l'utilizzo di sostanze naturali come terapia adiuvante nei pesci per prevenire malattie. L'utilizzo di tali composti infatti, per le loro caratteristiche di biocompatibilità e di biodegradabilità, che rispondono alla crescente richiesta di sicurezza per l'ambiente e per il

consumatore, potrebbero rappresentare un'interessante alternativa agli antibiotici nel controllo delle malattie, permettendo così di lasciarsi alle spalle tutte le controversie circa i residui di antibiotici nei cibi e la resistenza da essi provocata.

Ovviamente, anche gli elementi attivi provenienti dalle sostanze naturali per impiego in acquacoltura devono rientrare nei basilari principi della farmacopea classica: efficacia, sicurezza e qualità. Inoltre, la ricerca di questo tipo di sostanze dovrebbe tenere in considerazione la reperibilità dei prodotti base (piante, alghe) e i costi finali non dovrebbero risultare eccessivi per le aziende ittiche, soprattutto in confronto con quelli tradizionali. Infine, l'impiego di sostanze naturali alternative a quelle tradizionali per contrastare le eventuali patologie assume crescente importanza in relazione allo sviluppo di allevamenti ittici che producono applicando i principi dell'agricoltura biologica.

Capitolo V

Bibliografia

- Abelli L., Picchietti S., Romano N., Mastrolia L., Scapigliati G., 1996. Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish & Shellfish immunol.*, 6: 493 - 505.
- Agnew W., Barnes A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. *Veter. Microbiol.*, 122: 1 – 15.
- Ahmad A., Elkamel B.V., 1993. pathogenic mechanisms of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* in hybrid striped bass PhD thesis Sc. Assiut. University
- Ai Q., Mai K., Zhang L., Tan B., Zhang W., Xu W., 2007. Effects of dietary Beta-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 22: 394 - 402.
- Ainsworth A.J., 1992. Fish granulocytes: morphology, distribution and function. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 123.
- Ainsworth A.J., 1994. β -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Vet Immunol. Immunopathol.*, 41: 141 – 152.
- Alem G., Mekonnen Y., Tiruneh M., Mulu A., 2008. In vitro antibacterial activity of crude preparation of Myrtle (*Myrtus communis*) on common human pathogens. *Ethiopian Med. J.*, 46: 63 – 69.
- Alexander JB., Ingram GA., 1992. Non cellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 2: 249 - 79.
- Altman P.L., Dittmer D.S., 1972. *Biology data book*, 2nd edn. Wiley, Bethesda.
- Altmann S. M., Mellon M. T., Distel D. L., Kim C. H., 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.*, 77: 125 - 7.
- Anders., 1993. Characterization of a novel virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 2434 - 2444.
- Anderson D.P., 1992. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. In: Faisal M, Hetrick FM (Eds.), *Ann. Rev. of Fish Dis.*, Pergamon Press, New York., 281 – 307.
- Appendino G., Maxia L., Bettoni P., Locatelli M., Valdivia C., et al., 2006. Antibacterial Galloylated Alkylphloroglucinol Glucosides from Myrtle (*Myrtus communis*). *J. Nat. Prod.*, 69: 251 - 254.
- Aranishi F., Nakane M., 1997. Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiol. Biochem.*, 16: 471 - 8.
- Babu M.M., Marian M.P., 2001. Developing bioencapsulated herbal products for maturation and quality larval production in *Penaeus monodon* (L.). In: Hendry C., Van Stappen G., Wille M., Sorgeloos (Eds.), *Larvi.*, 2001. 3rd fish and Shellfish Larviculture symposium. Special Publication, vol. 30. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium., 40 – 43.
- Bae J. S., Jang K. H., Park S. C., Jin H. K., 2005. Promotion of dermal wound healing by polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* in rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 67: 111 - 114.
- Bagni M., Romano N., Finioia M.G., Abelli L., Scapigliati G., Tiscar P.G., et al., 2005. Short- and long-term effects of dietary yeast β -glucan (Macrogard) and Aliginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 18: 311 - 325.
- Bahich H., Borenfreund E., 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicol. In Vitro.*, 5: 91 – 100.
- Bandin I., Oliveira J.G., Borregi J.J., Barja J.L., 2006. Susceptibility of the fish cell line SAF-1 to bedanovirus. *J. Fish Dis.*, 29: 633 – 636.
- Barnas J.L., Simpson-Abelson M.R., Yokota S.J., Kelleher R.J., Bankert R.B., 2010. T cells and stromal fibroblasts in human tumor microenvironments represent potential therapeutic targets. *Cancer Microenvironment.*, 3:29-47
- Bayne C.J., Gerwick L., 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 725 – 743.
- Bassetti A. e Sala S.: “ Il grande libro dell’aloe”. ediz. Zuccari., 2001.
- Bejar J., Borrego J.J., Alvarez M.C., 1997. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture.*, 150: 143 – 153.
- Biao X., 2008. The development of and prospects for organic aquaculture worldwide, *Outlook on Agriculture*, 37: 255 - 260.

- Bird S., Wang T., Zou J., Cunningham C., Secombes C.J., 2002. The first cytokine sequence within cartilaginous fish: IL-1 β in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *J. Immunol.*, 168: 3329 - 3340.
- Bird S.J., Zou C.J., Secombes., 2006. Advances in fish cytokine biology give clues to the evolution of a complex network. *Curr. Pharm. Design.*, 12: 3051 - 3069.
- Biron C. A., Nguyen K. B., Pien G. C., Cousens L. P., Salazar- Mather T. P., 1999. Natural killer cells in antiviral defence: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev. Immunol.*, 17: 189 - 220.
- Blazer V.S., 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 309-323.
- Bols N. C., 1991. Biotechnology and aquaculture: the role of cell cultures. *Biotechnol. Adv.*, 9: 31–49.
- Bols N.C., Lee L.E.J., 1991. Technology and uses of cell culture from tissues and organs of bony fish. *Cytotechnol.*, 6: 163 – 187.
- Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.A.J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish: *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 853 – 873.
- Borrego J. J., Castro D., Balebona M. C., Garcia-Rosado E., Lopez-Cortes L., 2001. Patologias de Dorada. Servicio de Publicaciones de la Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.
- Buelens C., Bartholome E. J., Amraoui Z., Boutriaux M., Salmon I., Thielemans K., et al., 2002. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood.*, 99: 993 - 8.
- Cabello F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environment Microbiol.*, 8: 1137 – 1144.
- Cao L., Ding W., Zhang L., Jeney G., Yin G., 2008. Effect of the activation of immunological cells in the common carp after stimulation by lentinan and astragalus polysaccharides. *J. Anhui Agric. Univ.*, 35: 219 - 223.
- Carrol M.C., Prodeus A.P., 1998. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10: 36 – 40.
- Castillo-Briceño P., Bihan D., Nilges M., Hamaia S., Meseguer J., García-Ayala A., et al., 2011. A role for specific collagen motifs during wound healing and inflammatory response of fibroblasts in the teleost fish gilthead seabream. *Mol Immunol.*, 48: 826 - 34.
- Chakrabarti R., e Vasudeva R. Y., 2005. *Achyranthes aspera* stimulates the immunity and enhances the antigen clearance in *Catla catla*. *Int. Immunopharmacol.*, 6: 782 - 790.
- Chackabarti R., Rao Y.V., 2006. *Achyranthes aspera* stimulates the immunità and anhanche the antigen clearance in *Catla catla*. *Int. Immunopharmacol.*, 6: 782 – 790.
- Chen D., Ainsworth A.J., 1992. Glucan administration potentiates immune defence mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. *J. Fish. Dis.*, 15: 295 – 304.
- Chen X., Wu Z., Yin J., Li L., 2003. Effect of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. *J. Fish. Sci. China.*, 10: 34 – 40.
- Chieux D., Hober J., Harvey G., Lion D., Lucidarme G., et al., 1998. The MxA protein levels in whole blood lysates of patients with various viral infections. *J. Virol. Methods.*, 70: 183 – 191.
- Chithra P., Sjitlhal G. B., Chandrakasan G., 1998. Influence of Aloe vera on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 36: 896 - 901.
- Chong Y.G., Chao T.M., 1969. Common Diseases in Marine Finfish. Primary Production Department, Republic of Singapore.
- Citarasu T., Sekar R.R., Babu M.M., Marin M.P., 2002. Developing *Artemia* enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*. *Asian Gish Sci.*, 15: 21 – 32.
- Citarasu T., Sivaram V., Immanuel G., Rout N., Murugan V., 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish & Shellfish Immunol.* 21: 72 - 384.
- Citarasu T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquacultures industry. *Aquacult. Int.*, 18: 403 – 414.
- Clem L. W., Bly J. E., Wilson M., Chinchar V. G.; Stuge T., et al., 1996. Fish immunology: the utility of immortalized lymphoid cells—a mini review. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 54: 137–144;

- Congleton and Sun., 1996. J. Congleton and B. Sun., Interferon-like activity produced by anterior kidney leukocytes of rainbow trout stimulated in vitro by infectious haematopoietic necrosis virus or poly I:C. Dis. Aquat. Organ., 25 : 185 – 195.
- Cook M.T., Hayball P.J., Hutchinson W., Nowak B.F., Hayball J.D., 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActivaTM as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and growth rate of *Pagrus auratus*, in winter. Fish & Shellfish Immunol., 14: 333 - 345.
- Cree I.A., Andreotti P.E., 1997. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultured and cell lines. Toxicol In Vitro., 11: 553 – 556.
- Crouch S.P., Kozlowski R., Slater K.J., Fletcher J., 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Methods., 160: 81 – 88.
- Cuesta A., Esteban M.A., Mesenguer J., 2002. Natural cytotoxic cells of gilthead seabream: maximum percentage of lysis. Fish & Shellfish Immunol., 12: 111 – 118.
- Dalmo R.A., Bogwald J., 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. Fish & Shellfish Immunol., 25: 384 - 396.
- Daniels G.D., Zou J., Charlemagne J., Partula S., Cunningham C., Secombes C.J., 1999. Cloning of two chemokine receptors homologs (CXCR and CCR-7) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Leukoc. Biol., 65: 684 – 690.
- Danilova N., Bussmann J., Jekosch K., Szteiner L.A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. Nat. Immunol., 6: 295 – 302.
- Debra L., 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. J. of Bacteriol., 1310 - 1319.
- de Veer M. J., Holko M., Frevel M., Walker E., Der S., Paranjape J. M., 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. J. Leukoc. Biol., 69: 912 - 20.
- Der S. D., Zhou A., Williams B. R., Silverman R. H., 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95: 15623 - 8.
- Deriu A., Branca G., Mollicotti P., et al., 2007. “In vitro activity of essential oil of *Myrtus communis* L. against *Helicobacter pylori*,” Int. J. of Antimicrob. Agents., 30: 562 – 563.
- Dijkstra J. M., Yoshiura Y., Kiryu I., Aoyagi K., Kollner B., Fischer U., et al., 2003. The promoter of the classical MHC class I locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunol., 14: 177 - 85.
- Dixon B., Shum B., Adams E.J., Magor K.E., Hedrick R.P., Muir D.G., Parham P., 1998. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Immunol. Rev., 166: 341 – 348.
- Dixon B., Stet R.J.M., 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleostean fish. Dev. Comp. Immunol., 25: 683 – 699.
- Dugenci S.K., Arda N., Candan A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulants for fish. J. Ethnopharmacol., 88: 99 – 106.
- Duncan P.L., Klesius P.H., 1996a. Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsella ictaluri*. J. Aqua Anim. Health., 8: 24 - 248.
- Duncan P.L., Klesius P.H., 1996b. Effect of feeding spirulina on specific and nonspecific immune response in channel cat fish. J. Aqua Anim. Health., 8: 308 – 313.
- Edahiro T., Haomguchi M., Kusuda R., 1991. Suppressive effect of glycyrrhizin against streptococcal infection promoted by feeding oxidized lipids to yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Suisanzoshoku., 39: 239 – 243.
- El-boshy M.E., A.M.M. El-Ashram and Nadia., A. ABD El-Ghany., 2008. Effect of dietary Beta (1,3) Glucan on immunomodulation on diseased *Oreochromis niloticus* experimentally infected with aflatoxin B1. 8th international Symposium on Tilapia in Aquaculture., 1109 -1127
- Elbe A., Stingl G., 1995. Dendritic cells as simulator cells of MHC class I-restricted immune responses. Adv. Exp. Med. Biol., 378: 31 – 345.
- Ellis A. E., 2001. Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol., 25: 827 - 839.

- Elward K., Gasque P., 2003. "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol. Immunol.*, 40: 85 – 94.
- Engelsma M.Y., Ste, R.J.M., Saei, J.P., Verburg-van Kemenade B.M.L., 2003. Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1 β genes in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Cytokine.*, 22: 21 - 32.
- Engstad R.E., Robertsen B., Frivold E., 1992. Yeast beta glucan induces increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology.*, 2: 287 - 97.
- Engstad R., Robertsen B., 1993. Recognition of yeast wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 319 – 330.
- Esteban M.A., Meseguer J., Garcia Ayala A., Agulleiro B., Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Arch Histol. Cytol.*, 1989., 52: 407.
- Esteban M.A., Cuesta A., Ortuno J., Meseguer J., 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish & Shellfish Immunol.*, 11: 303 – 315.
- Etlinger H.M., Hodging H.O., 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.
- Evans D.L., Cooper E.L., 1990. Natural killer cells in ectothermic vertebrates. *Biol. Science.*, 40: 745 – 749.
- Evans D.L., and Jaso-Friedman L., 1992. Non specific cells as effectors of immunity in fish. *Ann. Rev. of fish dis.*, 2: 109 - 121.
- Evans D. H.; Piermarini P. M.; Choe K. P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 85: 97 – 177
- Fange R. A., 1982. Comparative study of limphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 2: 23.
- Fearon D.T., 1997. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature.*, 388: 323 – 324
- Feist C., Franke L., Appendino G., Werz O., 2005. Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315: 389 – 396.
- Fellous M., Nir U., Wallach D., Merlin G., Rubinstein M., Revel M., 1982. Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 79: 3082 - 6.
- Femenia A., Sanchez E. S., Simal S., Rossello C., 1999. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carb. Pol.*, 39: 109 - 117.
- Fernandez-Trujillo A., Ferro P., Garcia-Rosado E., Infante C., Alonso M.C., Bejar J., et al., 2009. Fish cell cultures as in vitro models of pro-inflammatory response elicited by immunostimulants. *ISDC Praga.*, 28 giugno - 4 luglio.
- Filer A., Pitzalis C., Buckley C.D., 2006. Targeting the stromal microenvironment in chronic inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6(4): 393 - 400.
- Flesar J., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Titera D., et al., 2010. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Vet. Microbiol.*, 145: 129 - 133.
- Fock W.L., Chen C.L., Lam T.J., Sin Y.M., 2000. Isolation and characterization of a serum lectin from blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish & Shellfish Immunol.*, 10: 489 - 504.
- Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T., 2000. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta high affinity immunoglobulin E Fc receptor γ subunit and serum amyloid A. *Fish & Shellfish Immunol.*, 10: 229 – 242.
- Galeotti M., 1998. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *J. App. Ichtiol.*, 14: 189 – 199.
- Galina J., Yin G., Ardò L., Jeney Z., 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 107 - 115.
- Gao X., Wu W., 1994. The effect of Dang – Gui (*Angelica sinensis*) and ferulic acid on mice immune system. *Chin. J. Biochem. Pharm.*, 15: 107 – 110.

- García-Castillo J., Chaves-Pozo E., Olivares P., Pelegrin P., Meseguer J., Mulero V., 2004. The tumor necrosis factor α of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cell Mol. Life Sci.*, 61: 1331 – 1340.
- García-Rosado E., Cano I., Martín-Antonio B., Labella A., Manchado M., et al., 2007. Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *Int. Microbiol.*, 10: 193 - 9.
- García-Rosado E., Alonso M. C., Bejar J., Manchado M., Cano I., Borrego J. J., 2008. Expression analysis of Mx protein and evaluation of its antiviral activity against sole aquabirnavirus in SAF-1 and TV-1 cell lines. *Vet. Imm and Immunopathol.*, 121: 123 - 129.
- Gauthier G., Lafay B., Ruimy R., Breittmayer V., Nicolas J.L., Gauthier M., Christen R., 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snietzko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 139 – 144.
- Gomez-Gil B., Roque A., Turnbull J. F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191: 259 – 270.
- Gopalakannan A., Arul V., 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255: 179 – 187.
- Grimholt Y., Lie O., 1998. The major histocompatibility complex in fish. *Rev. Sci. Tech.*, 17: 121-7.
- Grinde B., 1989. Lysozymes from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J. Fish Immunol.*, 12: 95 – 104.
- Grosser T., Yusuff S., Cheskis E., Pack M.A., FitzGerald G.A., 2002. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99: 8418 - 8423.
- Guery J.K., Adorini L., 1995. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J. Immunol.*, 154: 536 – 544.
- Gündüz G.T., Gonul S.A., Karapinar M., 2009. Efficacy of Myrtle oil against *Salmonella typhimurium* on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 147 – 150.
- Gyeong-En Hong., 2009. Identification of *Vibrio anguillarum* outer membrane vesicles related to immunoistimulation in the japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biosci. Biothecnol. Biochem.*, 73: 437 - 439.
- Haddad G. Hanington PC., Wilson EC., Grayfer L., Belosevic M., 2008. Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta. *Dev. Comp. Immunol.*, 6: 654 - 63.
- Haller O., Kochs G., 2004. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 3: 710 - 7.
- Hanada T., Yoshimura A., 2002. Regulation of cytokine signalling and inflammation. *Cytokine Grow Factor Rev.*, 13: 413 - 421.
- Hansen J. D., e La Patra, S., 2002. Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection. *Immunogenet.*, 54: 654 - 61.
- Hansen J.D., Landis E.D., Phillips R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102: 6919 – 6924.
- 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.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Dharaneedharan S., Moon Y.B., Kim J.S, Heo,M.S., 2009a. Effect of plant active compounds on immune response and disease resistance in *Cirrhina mrigala* infected with fungal fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture Res.*, 40: 1170 – 1181.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Kim M.C., Kim J.S., Han Y.J., Heo M.S., 2009b. Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. *Fish & Shellfish Immunol.*, 27: 508 – 515.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M., 2010. Impact of plant products on innate and adaptative immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317: 1 – 15.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M., 2011. Impact of plant products on innate and adaptative immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317: 1 – 15.

- Harris C., Pierce K., King G., et al. 1991. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol Biothe.*, 3: 207 – 13.
- Hart S., Wrathmell A.B., Harris J.E., and Grayson T.H., 1988. Gut immunology in fish: a review. *Dev. Comp. Immunol.*, 12 :453 - 480.
- Haugarvoll E., Bjerkas I., Nowak B.F., Hordvik I., and Koppang O., 2008. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J. Anat.*, 213: 202-209.
- Hawke J.P.,1996. Importance of a siderophore in the pathogenesis and virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in hybrid-striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). Ph.D. Dissertation. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, LA.
- Henninger D.D., Panes J., Eppihimer M.J., Russell J., Gerritsen M.E., Anderson D.C., Granger D.N., 1997. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J.Immunol.*, 158: 1825 – 1832.
- Hightower R.H., Renfro J.L., 1988. Recent applications of fish cell culture to biomedical research. *J. Exp. Zool.*, 248: 290 – 302.
- Hine P.M., 1992. The granulocytes of fish. *Fish & Shellfish Immunol.*, 2: 79.
- Hogan R.J., Stuge T.B., Clem L.W., Miller N.W., Chinchar V.G., 1999. Anti-viral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol.*, 2: 115 - 27.
- Holcomb E.J., Michalas P.J., 1992. Myrtle as a flowering potted plant. *Bull. Pennsylvania Flower Growers.*, 413: 5 - 7.
- Holt G., 1970. Vibriosis (*Vibrio anguillarum*) as an epizootic disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta. Vet. Scand.*, 11: 600 - 603.
- Honda S., Kashiwagi M., Miyamoto K., Takei Y., Hirose S., 2000. Multiplicity, structures and endocrine and exocrine natures of eel fucose-binding lectins. *J. Biol. Chem.*, 275: 33151 – 33157.
- Hong S., Zou J., Crampe M., Peddie S., Scapigliati G., Secombes C.J., 2001. Production and bioactivity testing of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 81: 1 - 14.
- Horacio A., Jose R., 1997. Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Toxicon.*, 35: 1423 - 1430.
- Huttenhuis H.B.T., Ribeiro A.S.P., Bowden T.J., Van Bavel C., Taverne-Thiele A.J., et al., 2006. The effect of oral immunostimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, 21: 261 – 271.
- Im S. A., Oh S.T., Song S., Kim D. S., Woo S. S., Jo T. H., Park Y. I., Lee C. K., 2005. *Int. .*, 5: 271.
- Imanishi K., Suzuki I., 1984. Augmentation of natural cell-mediated cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells by aloctin A. *Int. Immunopharmacol.*, 6: 539 - 543.
- Imanishi K., 1993. Aloctin A, an active substance of *Aloe arborescens* Miller as immunomodulator. *Phytoterap. Res.*, 7: 20 - 22.
- Ines S., Ines B., Wissem B., Mohamed B.S., Nawel H., et al., 2011. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of 3,5-O-di-galloylquinic acid extracted from *Myrtus communis* leaves and modulation of cell gene expression by H(2)O(2). *J. Appl. Toxicol.*, 31(8).
- Izhaki I., 2002. Emodin. A secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants., *New Phytol.*, 155: 205 - 217.
- Ingerslev H.C., Ossum C.G., Lindenstrøm T., Nielsen M.E., 2010. Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One.*, 2: e 9304.
- Irwin M.J., Kaattari S.L., 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12: 39 - 45.
- Ishikawa T.O., Hershman H.R., 2007. Two inducible functional cyclooxygenase-2 genes are present in the rainbow trout genome. *J. of cell. biochem.*,102: 1486 – 1492.
- Jang S.I., Marsden M.J., Kim Y.G., Choi M.S., Secombes C.J., 1995. The effect of glycyrrhizin on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), leucocyte responses. *J. Fish. Dis.*, 18: 307 – 315.
- Janssen W.A., Surgalla M.J., 1968. Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology.*, 96: 1606 – 1610.

- Jarving R., Jarving I., Kurg R., Brash A.R., Samel N., 2004. On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes: characterization of marine invertebrate COX genes points. *J. Biol. Chem.*, 14:13624-33.
- Jaso-Friedman L., Leary 3rd J.H., Evans D.L., 1997. NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost nonspecific cytotoxic cells. *Mol. Immunol.*, 34: 955 – 965.
- Jaso-Friedman L., Evans D.L., 1999. Mechanisms of cellular cytotoxic innate resistance in tilapia. (*Oreochromis nilotica*). *Dev. Comp. Immunol.*, 1: 27 – 35.
- Jault C., Pichon L., Chluba J., 2004. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol. Immunol.*, 40: 759 - 71.
- Jeney G., Anderson D.P., 1993a. Enhance immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunol.* 3: 51 – 58.
- Jeney G., Anderson D.P., 1993b. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in ranbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 116: 315 – 329.
- Jensen I., Albuquerque A., Sommer A.I., Robertsen B., 2002. Effect of poly I: C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunol.*, 13: 311 - 326.
- Jettanacheawchankit S., Sasithanasate S., Sangvanich P., Banlunara W., Thunyakitpisal P., 2009. Acemannan stimulates gingival fibroblasts proliferation; expression of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J. Pharmacol. Sci.*, 109: 525 - 531.
- Ji S.C., Takaoka O., Lee S.V., Hwang J.H., Kim Y.S., Ishimaru K., et al., 2009. Effect of dietary medicinal herbs on lipid metabolism and stress recovery in red sea bream *Pagrus major*. *Fish Sci.*, 75: 665 – 672.
- Jian J., Wu Z., 2003. Effects of traditional Chinese medicine on non-specific immunity and disease resistance on large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture* 218:1– 9.
- Jian J., Wu Z., 2004. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish & Shellfish Immunol.*, 16: 185 – 191.
- Jung U., Ley K. 1997. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation*, 4: 311–319.
- Kahlon J. B., Kemp M. C., Yawei N., Carpenter R. H., Shannon W. M., McAnalley B. H., 1991. In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir. *Mol. Biother.*, 3: 214 - 23.
- Kajita Y., Sakai M., Atsuta S., Kobayashi M., 1990. The immunomodulatory effects of levamisole in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, 25: 93 – 98.
- Kamilya D., Maiti T.K., Joardar S.N., Mal B.C., 2006. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in *Catla catla*, *J. Fish dis.*, 29: 331 - 337.
- Karen Mcgee., 1996. Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *J. of Bacteriol.*, 5188 – 5198.
- Kawakami H., Shinohara N., Sakai M., 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathol.*, 33: 287 - 292.
- Kawano A., Kales S.C., Fujiki K., DeWitte-Orr S.J., Dixon B., Lee L.E., Bols N.C., 2010. A comparison of rainbow trout cell lines for their expression of the major histocompatibility complex genes and the induction of beta-2-microglobulin by dsRNA. *Fish & Shellfish Immunol.*, 2: 312.
- Kennedy N.J., Spithill T.W., Tennent J., Wood P.R., Pietrafida D., 2006. DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine.*, 24: 970 – 979.
- Kim K.V., Hwang Y.J., Bai S.C., 1999. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed diets containing different doses of aloe. *Aquacultures.*, 180: 13 – 21
- Kim G.Y., Choi G.S., Lee S.H., Park Y.M., 2004. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the upregulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from peritoneal macrophages. *J. Ethnopharmacol.*, 95: 69 - 76.

- Kim D.H., Austin B., 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 114: 297 - 304.
- Koeberle A., Rossi A., Zettl H., Pergola C., Dehm F., Bauer J., et al., 2010. The molecular pharmacology and in vivo activity of 2-(4-chloro-6-(2,3-dimethylphenylamino)pyrimidin-2-ylthio)octanoic acid (YS121), a dual inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 332(3): 840 - 8.
- Koike Beppu H., Kuzuya H., Maruta K., Shimpo K., et al., 1995. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from “Kidachi Aloe” (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). *J. Biochem.*, 118: 1205 - 10.
- Kolman H., 2001. The humoral effects of epin in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Arch. Polish Fish.*, 9: 61 - 69.
- Koppang E.O., Lundin M., Press C. McL., Ronningen K., Lie O., 1998a. Differing levels of MHC class II beta chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 8: 183 - 196.
- Koppang E.O., Press C.M., Ronningen K., Lie O., 1998b. Expression of MHC class I mRNA in tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 8: 577 - 587.
- Koppang B. O., Dannevig B. H., Lie O., Ronningen K., Press C. M., 1999. Expression of MHC class I and II mRNA in a macrophage-like cell line (SHK-1) derived from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. head kidney. *Fish & Shellfish Immunol.*, 9: 473 - 89.
- Kumari J., Sahoo P.K., 2006. Non-specific immune response of healthy and immuno compromised *Clarias batrachus* to several immunostimulants. *Aquaculture.*, 255: 133 - 141.
- Kuzuya H., Tamai I., Beppu H., Shimpo H., Chiara T., 2001. Determination of aloenin, barbaloin and isobarbaloin in Aloe species by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chrom.*, 752: 91 - 97.
- Lamers C H J., 1985. The reaction of the immune system of fish to vaccination. PhD thesis, agricultural University Wageningen Olanda.
- Langston A.L., Johnstone R., Ellis A.E., 2001. The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic salmon, following injection of lypopolisaccaride. *Fish & Shellfish Immunol.*, 11: 333 - 345.
- Lee L. E. J., Dayeh V. R., Schirmer K., Bols N. C., 2009. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1 In Vitro Cell. Dev. Biol., 1007.
- Levraud J-P., Boudinot P., 2009. Arche de Noè Immunologique: Le sisteme immunitarie des poissons teleosteens medicine/science vol.25 n°4.
- Lewis K., Ausubel F.M., 2006. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.*, 24: 1504-1507.
- Li J., Barreda D.R., Zhang Y.A., Boshra H., Gelman A.E., Lapatra S., et al., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat. Immunol.*, 7: 1116 - 1124.
- Lim B.O., Seong N.S., Choue R.W., Kim J.D., Lee,H.M., Kim,S.Y., et al., 2003. Protective Effect of a Mixture of *Aloe vera* and *Silybum marianum* against Carbon Tetrachloride–Induced Acute Hepatotoxicity and Liver Fibrosis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 49: 292.
- Lin G L., Ellsaesser C F., Clem L W., Miller N W., 1992. Phorbol ester/ calcium ionophore activate fish leucocytes and induce long-term cultures. *Dev. Comp. Immunol.*, 16: 153.
- Lin C. W., Wu C. F., Hsiao N. W., Chang C. Y., Li S. W., Lin Y. J., Lin W. Y., 2008. Aloe emodin is an interferon- inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Int. J. of Antimic. Agents.*, 32: 355 - 359.
- Liu C., Leung M. Y. K., Koon J. C. M., Zhu L. F., Hui Y. Z., Yu B., Fung K. P., 2006. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *Chinensis* (Haw.) Berg. *Int. Immunopharmacol.*, 6: 1634 - 1641.
- Lo D., Feng L., Carson M.J., Crowley M., Pauza M., Nguyen A., 1999. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol. Rev.*, 169: 225 - 239.
- Logambal S.M., Venkatalakshmi S., Michael R.D., 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. In *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia.*, 430: 113 - 120.
- Logambal S.M., Michael R.D., 2000. Immunostimulatory effect of Azadirachtin in *Oreochromis mossambicus* (Peter). *Indian. J. Exp. Biol.*, 38: 1092 - 1096.

- Logambal S.M., Michael R.D., 2001. Azadirachtin – an immunostimulant for *Oreochromis mossambicus* (Peters). J. Aquac. Trop., 16: 339 – 347.
- Mac Artur J.I., Fletcher T.C., 1985. Phagocytosis in fish. In Fish Immunology, M.J. Manning and M.F. Tatner (eds). Academic Press, London., 29-46
- MacDougall K.C., Mericko P.A., Burnett K.G., 1999. Antigen receptor-mediated activation of extracellular related kinase (ERK) in B lymphocytes of teleost fishes. Dev. Comp. Immunol., 23: 221 - 30.
- Magarinos B., Bonet R., Romalde J.L., Martínez M.J., Congregado F., Toranzo A.E., 1996. Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. Microbial Pathogenesis., 21: 289 - 297.
- Magor, B.G., Magor .E., 2001. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. Dev. Comp. Immunol., 25: 651 – 68.
- Manchado M., 2008. Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). Fish & Shellfish Immunol., 24(3) 279 - 85.
- Marrack P., Kappler J., Mitchell T., 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. J. Exp. Med., 189: 521 - 30.
- Marsden M.J., Vaughan L.M., Foster T.J., Secombes C.J., 1996. A live (Delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Infect Immun., 64:3863-9.
- Matsuo K., Miyazano I., 1993. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi 59: 1377 – 1379.
- Medzhitov R., Janeway Jr C.A., 1998. An ancient system of host defence. Curr. Opin. Immunol., 10: 12 – 15.
- Medzhitov R., Janeway Jr, C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science 296: 298 – 300.
- Meijer A., Gabby- Krens S., Medina-Rodriguez I., He S., Bitter W., Ewa S-J B., Spaink H., 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. Mol. Immunol., 40: 773-783.
- Melamed P., Gong Z., Fletcher G., Hew C. L., 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. Aquaculture, 204: 255-269.
- 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.
- Mesenguer J., Esteban M.A., Mulero V., 1996. The non-specific cell mediated cytotoxicity in the seawater teleost (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanism. Anat. Rec., 64: 5403 – 5405.
- Metz J.R., Huising M.O., Leon K., Verburg-van Kemenade B.M., Flik G., 2006. Central and peripheral interleukin-1 β and interleukin-1 receptor I expression and their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. J Endocrinol., 191: 25 - 35.
- Milhou G., Valentin A., Benoit F., Mallie M., Bastide J.M., Pelissier Y., Bessiere J.M., 1997. *In vitro* antimalarial activity of eight essential oils. J. Essential Oil Res., 9: 329-333.
- Miller N.W., Sizemore R.C., Clem L.W., 1985. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. J. Immunol., 134: 2884 – 2888.
- Miller N.W., Van Ginkel J.E., Ellsaesser F., Clem L.W., 1987. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulation of channel catfish lymphocyte with monoclonal antibodies. Dev. Comp. Immunol., 11: 739 – 748.
- Mills K.H., 2008. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. Eur. J. Immunol., 38:2636.
- Misra C.K., Das B.K., Mukherjee S.C., Pattnaik P., 2006. Effect of long term administration of dietary Beta-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture, 255: 82- 94.
- Mounday B., Eleftheriou A., Kentouri M., Divanach P., 1992. The interaction of Aquaculture and the Environment – A Bibliographical Review. A Report prepared for the Commission of European Communities. Directorate General for Fisheries – EC XIV/D/3.

- Mulcahy M. F. 2002. Diseases of flatfish. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 22: 86-94.
- Mulero V., Mesenguer J., Esteban M.A., 1994. The nonspecific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleost *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. Arch. Histol. Cytol., 57: 351 – 358.
- Mulero V., Esteban M.A., Mulero V., Esteban M.A., 1998a. *In vitro* levamisole fails to encrease seabream (*Sparus aurata*) phagocyte function. Fish & Shellfish. Immunol., 8: 315 – 318.
- Mulero V., Esteban M.A., Munoz J., Mulero V., Esteban M.A., 1998b. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish. Immunol., 8: 49 – 62.
- Mulero V., García Ayala A., Meseguer J., 2005. What can we learn from fish? An evolutionary perspective of pro-inflammatory cytokines. Immunol., 24: 17-22.
- Mulligan M.S., Vaporciyan A.A., Miyasaka M., Tamatani T., Ward P.A. 1993. Tumor necrosis factor alpha regulates in vivo intrapulmonary expression of ICAM-1. Am. J. Pathol., 142: 1739–1749.
- Nagai T., Mutsuro J., Kimura M., Kato Y., Fujiki K., Yano T., et al., 2000. A novel truncated isoform of the mannose-binding lectin associated serine protease (MASP) from the common carp (*Cyprinus carpio*). Immunogenet., 51: 193 – 200.
- Nakanishi T., Fisher U., Dijksatra J.M., Hasegawa S., Sommamoto T., et al., 2001. Cytotoxic T cell function in fish. Dev. Comp. Immunol., 26: 131 – 9.
- Nakao M., Mutsyro J., Obo R., Fujiki K., Nonaka M., Yano T., 2000. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. Eur. J. Immunol., 30: 858 – 866.
- Nam B.H., Yamamoo E., Aoki T., 2000. A survey of expressed genes in the leokocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Hirame rhabdovirus*. Dev. Comp. Immunol., 24: 13 - 24.
- Nam B.H., Hirono I., Aoki T., 2002. Bulk isolation of immune response-related genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Hirame rhabdovirus*. Dev. Comp. Immunol., 24: 13 – 24.
- Ninomiya M., Hatta H., Fujiki .M., Kim Yamamoto T.R., 1995. Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) leucocytes by oral administration of *Quillaja* saponin. Fish & Shellfish Immunol., 5: 325 – 327.
- Nya E.J., Austin B., 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophyla* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis., 32: 963 – 970.
- Oshiumi H., Tsujita t., Shida K., Matsumoto M., Ikeo K., Seya T., 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. Immunogenet., 54: 791-800.
- Ottinger C.A., Johnson S.C., Ewart K.V., Brown L.L., Ross N.W., 1999. Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmo (*Salmo salar*) macrophages by mannose-binding lectin. Comp. Biochem. Physiol., C 123: 53 – 59.
- Peddie S., Zou J., Secombes C. J., 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. Vet. Immunol. and Immunopathol., 86: 101-113.
- Pelegrin P., García-Castillo J., Mulero V., Meseguer J., 2001. Interleukin-1 β isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines. Cytokine, 16: 67–72.
- Pelegrin P., Chaves-Pozo E., Mulero V., Meseguer J., 2004. Production and mechanism of secretion of interleukin-1b from the marine fish gilthead seabream. Dev. and Comp. Immunol., 28: 229–237.
- Peleteiro M.C. and Richards R.H., 1985. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. J. of fish Dis., 8:161-172.
- Perez-Prieto S.I., Rodriguez-Saint-Jean S., Garcia-Rosado E., Castro D., et al., 1999. Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream. Dis. of Aquat. Organ., 35: 149 – 153.
- Picchietti S., Taddei A.R., Scapigliati G., Buonocore F., Fausto A.M., Romano N., et al., 2004. Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*. Cell. Tissue Res., 315:259-70.

- Picchietti S., Abelli L., Buonocore F., Randelli E., Fausto A.M., Scapigliati G., et al., 2006. Immunoglobulin protein and gene transcripts in sea bream (*Sparus aurata* L.) oocytes. *Fish & Shellfish Immunol.*, 20:398-404.
- Pignatti S., 1998. La foresta sempreverde mediterranea. In: S. Pignatti – I boschi d'Italia. *Sinecologia e biodiversità*. Utet, Torino: 393-448.
- Pleguezuelos O., Zou J., Secombes C.J., 2000. Cloning, sequencing and analysis of expression of a second IL-1 β gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenet.*, 51: 1002-1011.
- Pugh N., Ross S. A., ElSohly M. A., Pasco D. S., 2001. Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1030-1034.
- Puybaret C., David B., Charveron M., Mamatas S., 1990. FR 98-11619 19980917, *Chem. Abstr.*, 112: 195-230.
- Raa J., Rorstad G., Engstad R.E., Robertson B., 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infection. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., (Eds.), *Disease in Asian Aquaculture. Proceedings of the First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Asian Fisheries Society, Philippines, 1: 39 – 50.
- Raa J., 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds) *Advance en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrcion Acouicola*. Merida, Yucatan, pp 47-56.
- Rammamoorthy L., Kemp M. C., Tizard I.R., 1996. Acemannan, a (1,4)-acylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. *Mol. Pharmacol.*, 50: 878-884.
- Rao Y.V., Chackabarti R., 2005. Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients. *Fish & Shellfish Immunol.*, 18: 327 – 334.
- Randelli E., Buonocore F., Scapigliati G., 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish & Shellfish Immunol.*, 25: 326 – 340.
- Reynolds T., Dweck A. C., 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J. Ethnopharmacol.*, 68: 3-37.
- Rijkers G.T, Teunissen A.G., Van Oosterom R., Van Muiswinkel W.B., 1980. The immune system of cyprinid fish. The iimunosoppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 19 (2): 177 – 189.
- Roberts R.J., 2001. *Fish Pathology*. Saunders, Elsevier Ltd. Philadelphia, USA
- Robertsen B., Rorstad G., Engstad E., Raa J., 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.* 13, 391–400.
- Robertsen G., Trobridge and Leong J.A., 1997 B. Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 21: 397–412.
- Robertsen B., 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish & Shellfish Immunol.*, 9: 269 – 290.
- Roca F.J., Mulero I., López-Muñoz A., Sepulcre M.P., Renshaw S.A., et al., 2008. Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *J. Immunol.*, 7: 5071-81.
- Rocha B. e Tanchot C., 2004. CD8 T cell memory. *Seminars in immunol.*, 16: 305 – 314.
- Rodríguez I., Chamorro R., Novoa B., Figueras A., 2009. Beta-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 27(2):369-373.
- Romani A., Coinu R., Carta S., Pinelli P., Galardi C., et al., 2004. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L.. *Free Rad. Res.*, 38: 97-103.
- Romano N., Abelli L., Mastrolia L., and Scapigliati G., 1997. Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Tissue Res.*, 289:163-171.
- Rombout J., 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.*; 17:55-66.
- Rombout J.H.W.N., Taverne N., Kamp Mvd, Taverne-Thiele A.J., 1993b. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*; 17: 309-17.

- Rombout J.H.W.M., Koumans-van Diepen J.C.E.K., Emmer P.M., Tavernethiele J.J., et al., 1996. Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *J Fish. Biol.*, 49:521.
- Rørstad G., Aasjord P.M., Robertsen B., 1993. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in *Salmo salar*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 3:179-190.
- Rosa A., Marenduzzo D., Maritan A., Seno F., 2003. Mechanical unfolding of directed polymers in a poor solvent: Critical exponents. *Phys. Rev.*, 67 : 041802.
- Rossi A., Di Paola R., Mazzon E., Genovese T., Caminiti R., et al., 2009. Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329:76-86.
- 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.
- Ruiz J., Leary J.H., Jaso-Friedman L., 2001. Phosphorylation-induced activation of thilapia non-specific cytotoxic cells by serum cytokines. *Dis. Aquat. Organ.*, 46: 129 – 137.
- Ryan L.A., Seymour C.B., O'Neill-Mehelnbacher A., Mothersill C.E., 2008. Radiation-induced adaptive response in fish cell lines. *J. Environ. Radioact.*, 99: 739 – 747.
- Sahoo P.K., and Mukherjee S.C., 2001. Effect of dietary Beta (1,3) glucan on immune response and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised *Labeo rohita* . *Fish & Shellfish Immunol.*, 11: 683-695.
- Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Sarangi N., 2007. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival oh *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophyla*. *J. Appl. Ichtyol.* 23: 80 – 86.
- Sakai M., Kamiya H., Atsuta S., Kobayashi M., 1991. Immunomodulatory effects on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, injected with the extract of abalone, *Haliotis discushannai*. *J. Appl. Ichthyol.*, 7: 54–59.
- Sakai M., 1999. Current research statue of fish immunostimolant. *Acquaculture* 172: 63 – 92.
- Salinas I., Meseguer J., Esteban M.A., 2007. Assessment of different protocols for the isolation and purification of gut associated lymphoid cells from the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol. Proced. Online.*, 9:43-55.
- Sangrador-Vegas A., Martin S.A.M., O'Dea P.G., Smith T.J., 2000. Cloning and characterisation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-I receptor cDNA. *Eur J. Biochem.*, 267: 7031 - 7037.
- Savan R., Sakai M., 2006. Genomics of fish cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. D Genomics Proteomics.*, 1: 89-101.
- Savina A., Amigorena S., 2007. Phagocytosis and dendritic presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.*, 219: 143 – 156.
- 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 & Shellfish Immunol.*, 5: 393.
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L., Meloni S., Ficca A.G., et al., 2000. Immunopurification of T-cells of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, 10: 329 – 341.
- Schiavo A., 2008a. Sulla conversione dall'allevamento ittico convenzionale a quello biologico, *Il Pesce*, 25, Modena, agosto 2008, pag. 37.
- Schiavo A.,2008b Il punto sull'acquacoltura biologica in Europa ed in Italia, *Il Pesce*, 25, Modena, agosto 2008, pag. 77.
- Schirmer K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicol.*, 224: 163 – 183.
- Secombes C.J., 1994. Enhancement of fish phagocyte acivity. *Fish & Shellfih Immunol.* 4: 421 – 436.
- Secombes C.J., Hardie L.J., Daniels G., 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish & Shellfish Immunol.* 6: 291 – 304.
- Segner H., 1998. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *EXS.* 86: 1–38.
- Selvaraj V., Sampath K., Sekar V., 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of Beta-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 114: 15- 24.

- Sepulcre M. P., Lopez-Castejon G., Meseguer J., Meulero V., 2006. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate cells of bony fish. *Mol. Immunol.*, 44: 2009-2016.
- Seung-Cheol J.I., Takaoka O., Jeong G.S., Lee S.W., Ishimaru K., et al., 2007. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries science*, 73: 63–69.
- Shaheen F., Ahmad M., Nahar Khan S., Samreen Hussain S., Anjum S., et al., 2006. New α -Glucosidase Inhibitors and Antibacterial Compounds from *Myrtus communis* L. *Eur. J. Org. Chem.*, 2371–2377.
- Sharifpour I., 1997. Istology of inflammatory response of carp (*Cyprinus carpio* L.) to various stimuli. Ph.D. thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland.
- Simon M., 1996. Characterization of a porin from the outer membrane of *Vibrio anguillarum*. *J. of Bacteriol.*, 4182-4188.
- Sivaram V., Babu M.M., Citarasu T., Immanuel G., Murugadass S., Marian M.P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harvey* infections. *Aquaculture* 237: 9 – 20.
- Siwiki A.K., Anderson D.P., Rumsey G., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41: 125 – 139.
- Sizemore R.G., Miller N.W., Cuchens M.A., Lobb C.J., Clem L.W., 1984. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.*; 133: 2920-4
- Smith P., Hiney M.P., Samuelesen O.B., 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agent used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual. Rev. Fish Dis.*, 4: 273 – 313.
- Snieszko S.F.G.L., Bullock E., Hollis and Boone J.B., 1964. *Pasteurella* sp. From an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.*, 88: 1814 – 1815.
- Stafford J.L., Neumann N.F., Belosevic M., 2001. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:101-15.
- Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R., Silverman R. H., Schreiber R. D., 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 227-264.
- Stenvik J., Jorgensen T.O., 2000. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenet.*, 51: 452 – 461.
- Stuart R. W., Lefkowitz D., Lincoln J. A., Howard K., Gelderman M. P., Lefkowitz S. S., 1997. Upregulation of phagocytosis and candidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant acemannan. *Int. J. Immunopharmacol.*, 19: 75-83.
- Su Y. T., Chang H. L., Shyue S.K., Hsu S. L. 2005. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 70: 229.
- Suda T., Zlotnik A., 1992. Transforming grow factor β and tumor necrosis factor β induce CD8 expression on CD8 thymic subsets including CD25+CD3-CD4-CD8-. Pre T cell subset. *J. Immunol.*, 148: 1737 – 45.
- Sunyer J.O., Tort L., 1994. The complement system of the teleost *Sparus aurata*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 712: 371 – 373.
- Sunyer J.O., Tort L., 1995. Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* are effected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 45: 333 – 345.
- Sveinbjorsson B, Seljelid R., 1994. Aminated (b)-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41:113.
- Tae S. Jung, 2008. *In vivo* morphological and antigenic characteristic of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Vet. Sci.*, 9: 169-175.
- Tafalla C., Aranguren R., Secombes C.J., Figueras A., Novoa B., 2004. Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish & Shellfish Immunol.*, 16: 21 – 24.

- Tancioni L., Scardi M., 2001. Ecologia in acquacoltura. In: Acquacoltura Responsabile. A cura di Cautadella S., e Bronzi P. Ed. Unimar-Uniprom., 352-374.
- Tattini M., Remorini D., Pineli P., Agati G., Saracini E., Traversi M.L., Massai R., 2006. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. New Phytologist., 170: 779-794.
- Takano T, Iwahori A, Hirono I, Aoki T., 2004. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. Fish & Shellfish Immunol., 17:367-374.
- Takano T, Kondo H, Hirono I, et al., 2007. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Mol. Immunol., 44:1845-1853.
- Tatner M.F., 1996. Natural changes in immune system of fish. In The fish immune system: organism, pathogen, & environment series: fish physiology, Iwana, G. & Nakanishi, T. eds., 255 - 287.
- Trombetta D., Puglia C., Perri D., Licata A., Pergolizzi S., et al., 2006. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. Phytomed., 13: 352-358.
- Van Ginkel F.W., Miller N.W., Cuchens M.A., 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. 729 – 749.
- Venkatalakshmi S., Michael R.D., 2001. Immunostimulation by leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. In *Oreochromis mossambicus* (peters). J. Aquac. Trop., 16: 1 – 10.
- 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.
- Verho S., Jarvinen S., Nikoskelainen S., Lilius E.M., 2005. Biological effect of vaccination can be assessed directly from diluted whole blood of rainbow trout using homologous blood phagocytes as immunosensors. Fish & Shellfish Immunol., 19: 175 – 13.
- Verlhac V, Gabaudan JA, Obach A, Schuep W, Hole R., 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non –specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 143: 123-33
- Villena A.J., 2003. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. Rev. Fish Biol. Fisher., 13: 111 – 140.
- Vilmos P., Kurucz E., 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunol. Lett., 62: 59 – 66.
- Wang T., Bird S., Koussounadis A., Holland J.W., Carrington A., Zou J., Secombes C.J., 2009. Identification of a Novel IL-1 Cytokine Family Member in Teleost Fish . J. Immunol., 183: 962-974.
- Wannes W.A., Mhamdi B., Sriti J., Marzouk B., 2010. Changes in essential oil composition of Tunisian *Myrtus communis* var. italic L. during its vegetative cycle. J. of Ess. Oil Res., 22: 13-18.
- Warr G.W., 1995. The immunoglobulin genes of fish. Dev. Comp. Immunol., 19: 1 – 12.
- Wilson M., Bengten E., Miller N.W., Clem L.W., Du Pasquier L., Warr G.W., 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to Ig D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 453 – 457.
- Wolf K., 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, New York
- Wu Y., Wang S., Peng X., 2003. Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma. Fish & Shellfish Immunol., 16: 381 – 389.
- Xie J., Liu B., Zhou Q.L., Su Y.T., He Y.J., Pan L.K., et al., 2008. Effects of anthraquinones extract from *rhubarb R. officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian.). Aquaculture 281: 5 – 11.

- Xue M., He S., Zhang J., Cui Y., Yao Y., Wang H., 2008. Comparison of cholera toxin A2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of *Toxoplasma* multi-antigenic SAG1-ROP2 DNA vaccine. *Exp. Parasitol.*, 119: 352 – 357.
- Yadegarinia D., Gachkarl L., Rezaei M.B., Tadizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L., essential oils. *Phytochem.*, 67: 1249 – 1255.
- Yagi A., Kabash A., Mizuno K., Moustafa S. M., Khalifa T. I. 2003. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel *Planta Med.*, 69:269.
- Yang M., Zhou H., 2008. Grass carp transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1): molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes. *Mol Immunol.*, 6:1792-8.
- Yao H., Chen Y., Shaoguang L., Huang L., Chen W., Lin X., 2009 Promotion proliferation effect of a polysaccharide from *Aloe barbadensis* Miller on human fibroblasts in vitro. *Int. J. of Bio. Macromol.*, 45: 152-156.
- Yin G., Jeney G., Racz T., Xu P., Jun X., Jeney Z., 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* e *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 253: 39 – 47.
- Yin G., Ardo L., Thompson K.D., Adams A., Jeney Z., Jeney G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 26: 140 – 145.
- Yoshida T., Kruger R., Inglis V., 1995. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.*, 18: 195 – 198.
- Yousif A.N., Albright L.J., Evelyn T.P.T., 1994a. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.*, 19: 15 – 19.
- Zanetti S., Cannas S., Mollicotti P., Bua A., Cubeddu M., Porcedda S., Marongiu B., Sechi L.A., 2010. Evaluation of the Antimicrobial Properties of the Essential Oil of *Myrtus communis* L. against Clinical Strains of *Mycobacterium* spp. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 93-153.
- Zapata A., 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.*, 3: 55-65.
- Zapata A.G., Chibà A., Varas A., 1996. Cell and tissue of the immune system of fish (1). In *The fish immune system: organism, pathogen, & environment series: fish physiology* Iwana, G. & Nakanishi, T. eds. 225 - 287.
- Zarkardis I.K., Sarrias MS., Sfyroera G., Sunyer J.O., Lambris J.D., 2001. Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 11 – 24.
- Zhang L., Tizard I. R., 1996. Activation on a mouse macrophage cell line by acemannan the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacol.*, 35: 119-28.
- Zhang X.F., Wang H.M., Song Y.L., Nie L.H., Wang L.F., Liu B., Shen P.P., 2006. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*. *Life Sci.*, 78(6):62230.
- Zou J., Grabowski P. S., Cunningham C., Secombes C. J., 1999. Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine* 11: 552-560.
- Zou J., Secombes C.J., Long S., Miller N., Clem L.W., Chinchar V.G., 2003. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol.*, 27(10):845-58.