



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA-VITERBO
Dipartimento di Scienze Ambientali

Corso di Dottorato di Ricerca
in
EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA XXI CICLO

**Apoptosi e HSP70 come marcatori di adattamento ambientale nei
pesci Teleostei**

Settore scientifico disciplinare: BIO/06

Coordinatore
Prof.re Federico Federici

Tutor
Prof.ssa Nicla Romano

Dottoranda
Dott.ssa Giuseppina Ceccarelli



TUSCIA UNIVERSITY-VITERBO-ITALY
Department of Environmental Sciences

BIOLOGICAL AND BIOCHEMISTRY EVOLUTION-XXI CYCLE

**Apoptosis and HSP70 as markers of environmental adaptation in
Teleost fish**

Scientific disciplinary sector: BIO/06

Coordinator

Prof.re Federico Federici

Tutor

Prof.ssa Nicla Romano

PhD student

Dr. Giuseppina Ceccarelli

INDICE

| | |
|--|------|
| ABSTRACT | p 1 |
| CAPITOLO I.:INTRODUZIONE | » 4 |
| GENERALITA' SUL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI | » 4 |
| IMMUNITA' INNATA | » 5 |
| Cellule citotossiche non specifiche (NCC)..... | » 5 |
| Macrofagi e granulociti..... | » 6 |
| I trombociti..... | » 7 |
| Il complemento..... | » 7 |
| Le citochine..... | » 8 |
| <i>Fattore tumorale di necrosi (TNF)</i> | » 9 |
| <i>Interferoni (IFNs)</i> | » 9 |
| <i>Interleuchine (IL)</i> | » 10 |
| <i>Chemochine</i> | » 10 |
| Peptici antimicrobici..... | » 11 |
| IMMUNITA' ACQUISITA | » 12 |
| I linfociti B e il BcR | » 12 |
| I linfociti T e il TcR..... | » 14 |
| STRUTTURA E FUNZIONE DEGLI ORGANI LINFOIDI | » 17 |
| Il timo..... | » 17 |
| Il rene | » 20 |
| La milza..... | » 21 |
| Tessuti linfoidi associati alle mucose..... | » 23 |
| L'APOPTOSI | » 24 |
| Il meccanismo dell'apoptosi..... | » 24 |
| L'apoptosi nel sistema immunitario..... | » 28 |
| L'APOPTOSI E LO STRESS | » 30 |
| La risposta allo stress..... | » 30 |
| Le proteine dello shock termico (HSPs)..... | » 31 |
| HSP70 e apoptosi..... | » 33 |
| | |
| SCOPO DEL LAVORO | » 36 |

| | |
|--|------|
| CAPITOLO II | » 38 |
| RIASSUNTO | » 39 |
| INTRODUZIONE | » 40 |
| MATERIALE E METODI | » 41 |
| <i>Preparazione dei campioni</i> | » 41 |
| <i>Apoptosi (metodo ISEL)</i> | » 42 |
| <i>Analisi quantitativa e statistica</i> | » 43 |
| <i>Istologia</i> | » 43 |
| RISULTATI | » 44 |
| APOPTOSI DURANTE LO SVILUPPO DEL TIMO | » 44 |
| <i>Cipriniformi (Cyprinus carpio)</i> | » 44 |
| <i>Perciformi</i> | » 44 |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | » 44 |
| <i>Epinephelus marginatus</i> | » 45 |
| <i>Perciformi polari</i> | » 48 |
| <i>Trematomus bernacchii</i> | » 48 |
| <i>Trematomus pennellii</i> | » 48 |
| <i>Trematomus hansonii</i> | » 49 |
| DISCUSSIONE | » 52 |
| CAPITOLO III | » 55 |
| RIASSUNTO | » 56 |
| INTRODUZIONE | » 56 |
| MATERIALI E METODI | » 58 |
| <i>Disegno sperimentale</i> | » 58 |
| <i>Preparazione dei campioni per la microscopia ottica</i> | » 59 |
| <i>Istologia</i> | » 59 |
| <i>Apoptosi (metodo ISEL)</i> | » 60 |
| <i>Immunoistochimica</i> | » 61 |
| <i>Analisi quantitativa e statistica</i> | » 61 |
| <i>ELISA sandwich</i> | » 62 |
| RISULTATI | » 63 |
| Timo | » 63 |
| <i>Apoptosi</i> | » 63 |

| | |
|---|-------|
| <i>HSP70</i> | » 64 |
| Branchie | » 68 |
| <i>Apoptosi</i> | » 68 |
| <i>HSP70</i> | » 68 |
| Rene cefalico | » 69 |
| <i>Apoptosi</i> | » 69 |
| <i>HSP70</i> | » 70 |
| ELISA sandwich | » 73 |
| DISCUSSIONE | » 73 |
| | |
| CAPITOLO IV | » 78 |
| RIASSUNTO | » 79 |
| INTRODUZIONE | » 79 |
| MATERIALI E METODI | » 81 |
| <i>Disegno sperimentale</i> | » 81 |
| <i>Determinazione delle Ig specifiche anti-Vibrio del siero</i> | » 81 |
| <i>Agglutinazione batterica</i> | » 82 |
| <i>Chemiluminescenza</i> | » 83 |
| <i>Preparazione dei campioni per la microscopia ottica</i> | » 84 |
| <i>Apoptosi (metodo ISEL)</i> | » 85 |
| <i>Immunoistochimica</i> | » 86 |
| <i>Analisi quantitativa e statistica</i> | » 87 |
| <i>ELISA sandwich</i> | » 87 |
| RISULTATI | » 88 |
| Valutazione dell'efficacia della vaccinazione | » 88 |
| <i>Immunità specifica</i> | » 88 |
| <i>Immunità non specifica</i> | » 91 |
| Apoptosi | » 92 |
| Espressione dell'HSP70 | » 94 |
| DISCUSSIONE | » 101 |
| <i>Immunità specifica</i> | » 102 |
| <i>Immunità non specifica</i> | » 102 |
| <i>Apoptosi e HSP70</i> | » 103 |

| | |
|---|--------------|
| CAPITOLO V..... | » 106 |
| CONCLUSIONI..... | » 106 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA..... | » 109 |
| | |
| PUBBLICAZIONI SU RIVISTE SCIENTIFICHE NAZIONALI ED INTERNAZIONALI..... | » 145 |
| <i>Lavori in preparazione</i> | » 145 |

ABSTRACT

The worldwide decline of fisheries stocks has provided a rapid growth in fish farming and a growing economical interest in intensive aquaculture, thus gained great importance to plan a proper management in order to limit stressful stocking conditions and environmental impact. This management should improve fish welfare and counteract adverse water characteristics. In aquaculture fish are exposed to stressful conditions that can be due to routine procedures (handling, selection, weighing), management factors (high stocking density, feeding, temperature and water quality or disease), transport conditions and slaughter procedures. Direct parameters such as haematocrit, total haemoglobin, blood glucose and hydrocortisone, frequently reported as descriptors of the fish conditions, may be not sufficiently reliable when chronic stresses are applied. It is therefore necessary to search for further parameters, such as alternative markers, capable to describe fish welfare to keep under control fishes in aquaculture. In this thesis work it was examined two different parameters: apoptotic process and the expression of one of the Heat Shock Protein (HSP70), to the aim of use these as markers of stress in fish farming and possibly in environmental monitoring.

With this aim, the study in the beginning analysing the physiological apoptosis presence in developmental thymus and in the late-juveniles/adult of fresh/marine temperate water species (*Dicentrarchus labrax*, *Epinephelus marginatus*, *Cyprinus carpio*), and after that in species adapted to polar water (- 1°C) such as the *Trematomus* species. The fish thymus plays an important role in the development of a fully functional immune system in maturing lymphocytes (T) where the selection process of autoreactive/damaged cells plays a central role. The developmental results showed that probably in *Cypriniiformes* and *Percyiformes* this selection process can be occur with similar features in thymus, and that it is mainly restricted to cortical/medullary border and cortex. Particularly, in carp, it was confirm and amplified previous studies (Romano et al., 1999b). The cells appeared scattered in the parenchyma in the first week post hatch (ph). From the first to the 4th week ph, the number of apoptotic cells increased in the outer-cortical region of the thymus. From the week 4 until 30-40 weeks post hatch (ph) the mean diameter of non-apoptotic lymphoid cells varied following the formation of cortex and medulla. At 22 until 48-50 weeks ph apoptotic cells were more numerous in the cortex and cortical/medullary border than in the medulla. From 22 months ph onwards the apoptotic cells remains confined minly in the cortex. In *Perciformes* Teleosts the distribution was evidenced like in carp: i) In sea bass, it was confirmed the observations done in previous

studies (Abelli et al., 1998) and further analysis revealed a cortical and cortical/medullary border distribution of apoptotic cells from 70 days ph until 165 days ph. ii) in *Epinephelus marginatus* the first anlagen of lymphoid thymus appears at day 15, while apoptotic cells were evidenced at day 48 ph. During thymus development the number of apoptotic cell increased in cortex and, contemporary decreased the average of diameter of the counted elements. In late juveniles/adult (9 months ph onwards), the apoptotic cells were mainly restricted in the cortex similarly to other species. iii) In adult Antarctic Perciformes the thymus is extremely adapted to low temperature (high vascularisation and strongly compact stroma) and. the apoptosis was 4-7 fold more intense than in temperate water fish and mainly distributed in the cortex.

Although gradually temperature changing may be physiologically balanced, rapid changes, as occur in land aquaculture, can disturb homeostasis acting as a stressor. Subsequently it was analysed the effects of the thermic stress on the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), a largely reared fish species in offshore cages and in land aquaculture. Although gradually temperature changing may be physiologically balanced, rapid changes disturb homeostasis acting as a stressor. With this aim it was studied the effect of temperature enhance (+ 4°C) on most superficial lymphoid organs (thymus, head kidney and gills) of larva (47-70 days p.h.) by using as markers of stress: the apoptotic process (by *in situ* end-labelling of fragmented DNA) and the expression of HSP70. The temperature of experimental group of larvae have been raised at 50th days for two hours, and the stressed individuals are sampled after 40 minutes, 2 hours, 24 hours and 10 days and 20 days post-treatment. In control, the gills and thymus the number of apoptotic cells progressively growth following the develop of the organs. In the stressed larvae, 40 minutes after stress, the apoptotic processes peaked significantly in thymus ($P < 0,001$) and head kidney ($P < 0,05$), while in gills ($P < 0,05$) the peak was delayed at 2 hours after stress. At 10 and 20 days post-treatment the apoptosis number decreased and was comparable to control levels. The expression of HSP70 was detectable with the ELISA assay and immuno-histochemistry techniques. In non-treated larvae, HSP70 was constitutively expressed whereas in stressed larvae, significantly enhance of the expression was revealed at 24 hours after stress, in thymus ($P < 0,01$) and head kidney ($P < 0,01$). In gills, HSP70 was more expressed at 10 days after stress ($P < 0,05$). In all organs the expression level of HSP70 remained high as compare to control samples. Taken together, this study suggest that apoptosis and HSP70 as potential candidates to describe the fish welfare.

In respect with the new European directives (2006), new vaccine therapies are requested by fish farming to prevent various infectious disease and contemporary maintaining the welfare of fish and the integrity of environment. In this work we evaluate the efficiency of different vaccination trials, against *Vibrio anguillarum*, on the specific and non-specific immune system of juveniles sea bass. In parallel it was inquired the eventual induction of apoptosis and expression of HSP70 in thymus, gills and head kidney. From the 95th days p.h. the larvae were submitted to two trials: a) two vaccinations for immersion (95 and 165 day ph) or b) two vaccinations for immersion (95/165 days ph) followed to a intraperitoneal injection (233 day ph). The specific immunity activation was demonstrated in vaccinated group by the significative enhance of B lymphocytes in the head kidney and spleen, contemporary to intensification of specific anti-*Vibrio* Ig serum content, and the agglutination capacity of the bacteria. Non-specific immunity activation was contemporary demonstrated by the enhancement of the respiratory burst in leucocytes of head kidney and spleen. The Respiratory Burst test (by ROS test) on phagocytes (macrophages and granulocytes) of non-treated and experimental groups, evidenced in the latter groups a enhance of phagocytic capability already after two vaccination for immersion. A decrease of the apoptotic processes was revealed in thymus, head kidney and gills during the trials in both experimental and non-treated groups. Moreover, also the expression of HSP70 in organs showed a similar trend. Probably, it was due to a normal differentiation mechanism of the organ. Interestingly, in thymus of the experimental groups the HSP70 had a significant enhance of expression in cortical and cortical/medullary border cells as compare with control group ($P < 0,01$). These data demonstrates that the agglutination test, ROS test and HSP70 expression are possible markers for the efficiency of the vaccination therapy. Moreover, vaccinations early done by immersion (90 days followed by an other one 60-70 days later) can be sufficient to protect sea bass juveniles by *V. anguillarum* infection.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

GENERALITA' SUL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

La funzione del sistema immunitario è quella di difendere gli organismi dagli agenti patogeni. I meccanismi per la difesa dell'ospite nei confronti delle aggressioni esterne sono presenti in tutti gli organismi multicellulari, dalle spugne ai vertebrati (Abbas et al., 2002). Il superordine dei pesci Teleostei ha avuto origine circa 300 milioni di anni fa e rappresenta, all'interno della classe dei Vertebrati, il gruppo con il più alto numero di specie (circa 23.000). I Teleostei hanno sviluppato un sistema immunitario per molti versi simile a quello dei mammiferi (Litman et al., 2005; Plouffe et al., 2005). Esso è infatti in grado di avere risposte di tipo innato o aspecifico, che sono dirette dalla presenza di cellule o sostanze xenogene. Questa immunità comprende: le cellule citotossiche non specifiche (NCC) (Evans et al., 1992; Stuge et al., 1995; Fischer et al., 1998; Vazzana et al., 2003), i fagociti (neutrofili e macrofagi) (Jang et al., 1995; Do Vale et al., 2002), le reazioni infiammatorie e l'attività di sostanze solubili tra cui le lectine, la proteina C-reattiva, alcuni tipi di interferone, il complemento e i peptidi antimicrobici (Yano, 1996; Chistiakov et al., 2007; Mulero et al., 2008). A fianco all'immunità innata, i Teleostei presentano anche una risposta immunitaria acquisita o specifica e le sue caratteristiche distintive sono la straordinaria specificità per i diversi antigeni eventualmente presenti e la capacità di mantenere memoria immunologica nel tempo. Questa capacità è stata valutata attraverso esperimenti di rigetto di trapianti (Romano et al., 2005) e di citotossicità indotta (Fisher et al., 1998). Le principali cellule che intervengono in questo tipo di risposta sono i linfociti B (immunità umorale) (Rijkers et al., 1980; Sanchez et al., 1995), i linfociti T (immunità cellulo-mediata) (Feng e Woo, 1996; Scapigliati et al., 2000, 2003; Nakanishi et al., 2002) e le cellule accessorie (Venkatesh et al., 1999). Nei Teleostei tutte le cellule coinvolte nelle risposte immunitarie (leucociti) si sviluppano e si differenziano in organi e tessuti detti linfopoietici quali il timo, il rene cefalico, la milza e i tessuti linfoidei associati alla pelle (MALT), alle branchie e all'intestino (GALT) (Fänge, 1982; Roitt et al., 2003; Zapata et al., 1996).

Una conoscenza sul funzionamento del sistema immunitario dei Teleostei riveste grande importanza sia per studi di tipo evolutivo che per la comprensione dei meccanismi molecolari di resistenza ai patogeni dal momento che numerosi virus, batteri, funghi e parassiti affliggono gli allevamenti intensivi del mediterraneo. Di conseguenza lo studio dei meccanismi della risposta immunitaria risultano fondamentali per l'attuazione di strategie efficaci di vaccinazione, considerata l'importanza crescente assunta dalle pratiche di acquacoltura e l'elevato valore economico di alcune specie allevate, tra cui la spigola, *Dicentrarchus labrax* (L.).

IMMUNITA' INNATA

Il sistema immunitario innato è caratterizzato da risposte più semplici, di tipo non specifico e rappresenta la prima linea di difesa dell'organismo contro un ampio spettro di agenti patogeni (Saurabh e Sahoo, 2008). Il riconoscimento delle sostanze xenogene è mediato da proteine o recettori (Ingram, 1980; Shephard, 1994; Rombout et al., 1993a), che riconoscono molecole tipiche dei patogeni quali i polisaccaridi, i lipopolisaccaridi (LPS), il DNA batterico, l'RNA a doppio filamento e altre molecole che normalmente non si trovano sulla superficie degli organismi multicellulari (Janeway, 1989; Medzhitov et al., 1998, 2002; Elward et al., 2003). Il sistema immunitario innato può amplificare la propria attività attraverso la liberazione di citochine, e prendere parte all'attivazione del sistema di difesa specifico (Secombes, 1996). Il sistema immunitario innato ha inoltre un ruolo fondamentale durante i primi stadi di sviluppo, in quanto già presente prima o appena dopo la schiusa delle uova (2 giorni post fertilizzazione, pdf), mentre il sistema immunitario acquisito impiega diversi giorni prima di svilupparsi completamente (Romano et al., 1997c, 1998; Magnadottir, 2006; Huttenhuis et al., 2006b).

Cellule citotossiche non specifiche (NCC)

Nei Teleostei le cellule citotossiche non specifiche (NCC) sono presenti come cellule di piccole dimensioni, localizzate nel sangue periferico, nella milza e nel rene cefalico (Manning, 1994). Le NCC costituiscono la prima barriera di difesa contro gli agenti infettivi

attraverso il riconoscimento dell'antigene da parte del recettore NCCRP-1 presente sulla loro superficie, grazie al quale tali cellule prendono contatto fisico con il bersaglio inducendone la lisi (Jaso-Friedman et al., 1997). Il ruolo da loro svolto nella difesa non specifica del pesce sembra essere simile, ma non identico, a quello delle cellule "natural killer" (NK) dei mammiferi, facendo quindi ipotizzare che le NCC siano i precursori delle NK (Evans e Jaso-Friedman, 1992).

Nell'orata è stato clonato il cDNA del recettore NCCRP-1 e la sua caratterizzazione molecolare ha evidenziato l'eterogeneità delle NCC, mettendo in evidenza differenti tipi di leucociti in grado di dare risposte non specifiche (Cuesta et al., 2005).

Macrofagi e granulociti

La fagocitosi è un meccanismo di difesa presente in tutti i Vertebrati la cui funzione principale è quella di limitare la diffusione e la crescita di agenti estranei. Le principali cellule fagocitarie dei pesci sono i fagociti mononucleati circolanti, detti monociti, ed i granulociti (Zapata e Cooper, 1990). L'origine dei macrofagi nei pesci sembra essere il sacco vitellino ed il parenchima renale (Romano et al., 1998a; Huttenhuis et al., 2006b). Alcuni macrofagi e granulociti lasciano i siti di origine e tramite il torrente sanguigno raggiungono i tessuti (Stafford et al., 2001; Belosevic et al., 2006). I macrofagi sono cellule attive nella risposta aspecifica agli antigeni attraverso la fagocitosi, la produzione di citochine e di altri fattori di modulazione della risposta immunitaria, come il complemento ed in misura minore dei peptici antimicrobici (Koumans-van Diepen et al., 1994; Lamers, 1986; Verburg van Kemenade et al., 1995; Mulero et al., 2008), ma svolgono anche una funzione accessoria per la risposta linfocitaria. Tali cellule posseggono infatti recettori per gli anticorpi e per il complemento (Secombes e Fletcher, 1992) ed esprimono il complesso maggiore di istocompatibilità MHC di classe II (Secombes, 1994), partecipando quindi ai meccanismi di processazione e presentazione dell'antigene necessari per innescare i meccanismi delle difese specifiche. I macrofagi possono inoltre trovarsi anche sotto forma di aggregati, denominati centri melanomacrofagici (MMCs), i quali contengono melanina ed altri pigmenti e sono caratterizzati dalla presenza di un contenuto subcellulare che deriva dall'attività fagocitica o litica (Fullop e De Millan, 1984). I centri melano-macrofagici sono inoltre coinvolti nel deposito di composti metabolici come il ferro (Fishelson, 1995), nella cattura dell'antigene dopo lunghi periodi di tempo dalla vaccinazione (Ellis, 1980; Tsujii e Seno, 1990; Brattgjerd e Evensen, 1996), con un probabile ruolo nella memoria immunologia (Press et al., 1996).

I granulociti sono caratterizzati dalla presenza di granuli citoplasmatici e partecipano alla prima fase della reazione infiammatoria. Nei pesci vengono suddivisi in tre sottotipi: basofili, neutrofilo ed eosinofili (Ellis, 1977; Zapata e Cooper, 1990); alcune specie, come la carpa, hanno tutti i tre tipi, mentre altre possono mostrare granulociti basofili ed una forma intermedia tra neutrofilo ed eosinofili detti “eterofili” (Rombout et al., 1997; Reite e Evensen, 2006). I basofili somigliano ai mastociti dei mammiferi anche se non è chiaro se presentino una funzione analoga (Koumas-van Diepen et al., 1994; Rombout et al., 1997); i neutrofilo dei pesci sembrano mediare le risposte infiammatorie acute raggiungendo il sito interessato per chemiotassi analogamente a quanto accade nei mammiferi (Ellis, 1981; Hine, 1992), inoltre sia i basofili che i neutrofilo, producono un peptide antimicrobico chiamato piscidina (Mulero et al., 2008); gli eosinofili sono invece numerosi in individui infettati da parassiti e sembrano coinvolti in fenomeni anafilattici (Zapata e Cooper, 1990).

I trombociti

Nei mammiferi i trombociti, detti anche piastrine, sono costituiti da frammenti cellulari derivati dai megacariociti differenziatisi nel midollo osseo (Molinaro et al., 1997). La loro funzione è quella di contribuire alla formazione e alla successiva retrazione del coagulo attraverso il rilascio di serotonina che rallenta il flusso ematico quando i vasi sono lesi (Weather et al., 1987). Nei pesci i trombociti consistono in cellule provviste di nucleo e si trovano maggiormente nel sangue (Ellis, 1977; Rowley et al., 1988). Essi svolgono la funzione di coagulare il sangue, analogamente a quanto accade per i mammiferi (Uchida et al., 1992). Nonostante i trombociti siano stati descritti in diverse specie di pesci (Rowley et al., 1988; Zapata e Cooper, 1990), nel 1996 sono stati caratterizzati anche attraverso anticorpi monoclonali (mAb). Nella carpa mediante l’utilizzo dell’ mAb (WCL6), sono stati distinti tra circolanti e quelli provenienti dalla milza (Rombout et al., 1996). La milza sembra per altro un sito di differenziamento primario per queste cellule in quanto, proprio in questa sede, vengono rilevati i primi trombociti ad una settimana post fertilizzazione (p.f.) (Romano et al., 1997c; Romano, 1998).

Il complemento

Il complemento è una parte integrante del sistema immunitario dei Vertebrati ed è costituito da un complesso sistema di circa 35 proteine solubili e di membrana. L’attivazione del

complemento a livello della membrana batterica porta all'opsonizzazione e alla lisi di microrganismi e cellule infettate, stimolando a sua volta il richiamo di cellule infiammatorie tra cui neutrofili e macrofagi, stimolandone l'attività di fagocitosi (Ellis, 1999). Il complemento partecipa inoltre alla regolazione della risposta immunitaria specifica mediante il legame con recettori presenti a livello di linfociti (Fearon e Locksley, 1996).

Nei pesci, come nei mammiferi, il sistema del complemento può essere attivato attraverso tre vie: 1) la via classica (CCP) è innescata dal legame antigene-anticorpo sulla superficie delle cellule bersaglio (Holland e Lambris, 2002); 2) la via alternativa (ACP) è indipendente dagli anticorpi e si attiva direttamente al contatto con virus e lipopolisaccaridi delle membrane batteriche, determinando la lisi dell'antigene (Van Muiswinkel, 1995); 3) la via delle lectine (LCP) si attiva con il legame di complessi proteici di lectine leganti il mannosio (MBL) alle strutture carboidrate presenti sulla superficie batterica (Matsushita e Fujita, 1995; Holland e Lambris, 2002).

Il componente principale delle tre vie è il fattore C3, questo è in grado di interagire con molte proteine e la sua attivazione porta ad un aumento della fagocitosi, al reclutamento delle cellule immunitarie, alla stimolazione delle cellule B e all'attivazione del complesso di attacco alla membrana (MAC) (Del Rio-Tsonis et al., 1998; Le Morvan et al., 1998). A differenza dei mammiferi, i Teleostei possiedono forme multiple del fattore C3, prodotte da geni differenti e che differiscono nella struttura e nella funzione, aumentando così il numero dei potenziali patogeni che può riconoscere (Sunyer et al., 1996, 1997; Nakao et al., 2000; Zarkadis, 2001). C3 è stato isolato e caratterizzato nella trota, nell'orata, nella carpa, nel rombo atlantico, nel merluzzo atlantico e nella bavosa lupa (*Anarhichas minor*) (Sunyer et al., 1997; Nakao et al., 2000; Zarkadis, 2001; Abelseth et al., 2003; Lange et al., 2004a, b).

Le citochine

Le citochine sono proteine che vengono prodotte come risposta agli antigeni sia dal sistema immunitario innato che da quello specifico. Il loro compito è quello di mediare e regolare l'attività immunitaria. Nell'immunità specifica, le citochine favoriscono la crescita e la differenziazione dei linfociti durante la fase di attivazione ed attivano diverse cellule nella fase effettrice (Abbas et al., 2002). Le citochine svolgono la loro azione legandosi a recettori specifici espressi sulla membrana delle cellule bersaglio inducendone modificazioni dell'espressione genica (Abbas et al., 2002). Nei teleostei sono state identificate diverse

citochine: il fattore della necrosi tumorale- α (TNF- α) (Secombes et al., 2001), gli interferoni, le interleuchine (IL-1) (Bird et al., 2002) e diverse chemochine (IL-8, CK-1, Ck-2).

Fattore tumorale di necrosi (TNF)

Il fattore tumorale di necrosi è il principale mediatore della risposta immunitaria a molecole di lipopolisaccaride (LPS) della parete cellulare dei batteri gram-negativi, e probabilmente svolge un ruolo importante anche nella risposta innata ad altri agenti infettivi (Abbas et al., 2002). Nei mammiferi esistono due tipi di TNFs (α e β) che vengono secreti dai macrofagi, dalle cellule natural killer e dalle cellule T dopo essere state stimolate da LPS. Geni simili al TNF α sono stati trovati in varie specie di pesci quali la passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*) (Hirono et al., 2000), la trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Laing et al., 2001; Zou et al., 2002), la trota di fiume (*Salvelinus fontinalis*) (Bobe e Goets, 2001), l'orata (*Sparus aurata*) (Garcia-Castillo et al., 2002), il salmone atlantico (*Salmo salar*) (Ingerslev et al., 2006), la tilapia (*Oreochromis* sp.) (Praveen et al., 2006), carpa (*Cyprinus carpio*) e il pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) (Zou et al., 2003). Il confronto della struttura genica e le analisi filogenetiche hanno messo in evidenza che i TNFs dei teleostei sono strettamente correlati al TNF α dei mammiferi (Goetz et al., 2004). Numerosi studi sui pesci hanno suggerito che il TNF α sia un importante fattore di attivazione dei macrofagi (MAF) prodotto dai leucociti. Inoltre, la presenza del TNF nei mammiferi è stata correlata con l'evento apoptotico di linfociti autoreattivi o danneggiati (Lewin et al. 2008) e l'espressione del recettore per il TNF è stato localizzato in linfociti pre-apoptotici (Benedict et al., 2003).

Interferoni (IFNs)

Gli interferoni sono proteine o glicoproteine che vengono secrete durante le infezioni virali e sono capaci di inibire i processi di replicazione virale (Yano, 1996; Samuel, 2001). Nei mammiferi si distinguono tre famiglie di IFNs: IFN di tipo I (α e β), IFN di tipo II e l'IFN- γ , nei pesci invece sono state evidenziate due classi di interferoni, IFN- α e IFN- β , e una molecola simile all'IFN- γ (Graham e Secombes, 1990). I geni dell'interferone sono stati clonati dal pesce zebra (*Danio rerio*) (Altmann et al., 2003), dal salmone atlantico (*Salmo salar*) (Robertsen et al., 2003), dal pesce palla giapponese (*Takifugu rubripes*) (Liu et al., 2002), dal pesce palla maculato verde (*Tetraodon nigroviridis*) (Igawa et al., 2006) e dal pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) (Long et al., 2004, 2006). Gli allineamenti multipli e le analisi filogenetiche suggeriscono che l'IFN di tipo I dei pesci e l'IFN- α/β dei mammiferi sono ortologhi (Robertsen, 2006).

Interleuchine (IL)

Nei mammiferi la famiglia dell'interleuchina-1 gioca un ruolo importante nelle infiammazioni e nella difesa dell'ospite (Dinarello, 1997, 1998a, b). La famiglia dell'interleuchina-1 è composta da quattro membri: IL-1 α , IL-1 β , il recettore antagonista IL-1 (IL-1ra) e IL-1 β (Dinarello, 1997, 1998a,b; Mulero et al., 1999; Busfield et al., 2000; Smith et al., 2000; Lin et al., 2001; Pan et al., 2001). L'IL-1 è coinvolta nelle risposte pre-infiammatorie precoci e induce una cascata di eventi, mediati indirettamente dalla regolazione di altre citochine, che portano all'infiammazione (Dinarello, 1997). L'interleuchina-1 β , analoga a quella dei mammiferi, è stata identificata in diverse specie di teleostei ed ha il compito di regolare l'immunità stimolando le cellule T (Mathew et al., 2002). Nei mammiferi l'espressione e la bioattività dell'IL-1 β si trova in macrofagi attivi sotto forma di un peptide precursore inattivo che, per essere attivato, deve essere tagliato intracellularmente dalla caspasi 1 (Thornberry et al., 1992). In alcune specie di teleostei l' IL-1 β è costitutivamente espressa nei macrofagi e nei granulociti neutrofilici (Engelsma et al., 2001; Fast et al., 2006), una caratteristica che è stata osservata nei pesci ossei che non presentano una stimolazione immunitaria (Huising et al., 2004). Nei pesci infatti, i precursori clonati dell'IL-1 β non presentano il sito di taglio per la caspasi 1 (Zou et al., 1999; Fujiki et al., 2000). IL-1 β si lega al proprio complesso recettoriale localizzato sulla superficie delle cellule bersaglio. Tale recettore è stato clonato e sequenziato nella trota e nel salmone atlantico (Sangrador-Vegas et al., 2000; Subramaniam et al., 2002).

Chemochine

Le chemochine sono una superfamiglia delle citochine e sono prodotte da diversi tipi cellulari. Le chemochine svolgono un ruolo chiave nel movimento delle cellule immunitarie effettrici verso i siti di infezione e nella conversione della risposta immunitaria da innata ad acquisita. Gli stimoli dell'immunità innata attivano i recettori "Toll", capaci di riconoscere e legare patogeni batterici, virali e fungini, e modulano l'espressione dei recettori per le chemochine sulle cellule dendritiche (cellule presentanti l'antigene). Questi cambiamenti chemochina/recettore delle chemochine dirigono il movimento delle cellule dendritiche presentanti l'antigene verso i tessuti linfoidi per attivare le cellule B e T ed iniziare una risposta adattativa (Luster, 2002; Hopken e Martin, 2004).

La superfamiglia delle chemochine è suddivisa al suo interno in quattro sottofamiglie a seconda del riarrangiamento dei primi due residui di cisterna nella loro sequenza: CXC, CC, C, CX₃C. Le prime chemochine trovate nei pesci appartengono alla famiglia CXC e sono state

individuate nel pesce gatto, nel pesce zebra (Peatman e Liu, 2006), nella trota (Dixon et al., 1998; Laing et al., 2002), nella carpa (Fujiki et al., 1999), nella passera (Lee et al., 2001), nel pesce cane (*Triakis scyllia*) (Inoue et al., 2003) e nel rombo atlantico (*Atlantic turbot*) (Park et al., 2005).

Peptici antimicrobici

I peptici antimicrobici (AMPs) sono molecole a basso peso molecolare (20-30 aminoacidi), presenti sia negli Invertebrati che nei Vertebrati, la cui funzione è quella di riconoscere ed eliminare virus, batterici e parassiti (Hancock e Diamone, 2000). I peptici antimicrobici possono essere costitutivamente presenti nelle cellule ed essere immagazzinati in granuli secretori altri, invece, possono essere indotti da stimoli proinfiammatori (Lauth et al., 2002). Essi si rinvergono principalmente a livello di cellule epiteliali e sulla superficie delle mucose (Ullal et al., 2008) e prendono parte sia alle fasi acute del processo infiammatorio, attraverso il reclutamento di neutrofili e fibroblasti, amplificando i processi di fagocitosi e diminuendo la fibrinolisi, sia nel corso di risposte infiammatorie croniche, stimolando l'apoptosi cellulare, diminuendo la produzione di citochine e neutralizzando i lipopolisaccaridi batterici (Plouffe et al., 2005).

I peptidi antimicrobici sembrano essere preferenzialmente più selettivi verso le membrane cellulari dei procarioti in quanto, tali membrane, sono ricche di fosfolipidi anionici e prive di colesterolo. E' stato dimostrato, infatti, che la presenza di colesterolo in membrane artificiali riducono significativamente l'attività litica dei peptidi antimicrobici (Sarmasik, 2002). Inoltre si pensa che un organismo possa essere ucciso in differenti modi da differenti peptidi o che un peptide possa operare mediante meccanismi diversi su organismi differenti (Merrifield et al., 1994; Sarmasik, 2002).

L'abilità dei peptidi antimicrobici di proteggere i pesci dalle infezioni causate da patogeni è stata presa in considerazione solo di recente. Negli ultimi dieci anni sono stati trovati nei pesci diversi AMPs, come: pleurocidina, daxina, misgurnina, piscidina, morocidina, parasina, defensina, epcidina, dicentracina, LEAP-2, catepsina, BPI, Hb β P-1 e cromogranina A e B (Douglas et al., 2003; Zhang et al., 2004; Shi e Camus, 2006; Huang et al., 2007; Yang et al., 2007; Falco et al., 2008; Salerno et al., 2007; Mulero et al., 2008; Ullal et al., 2008; Caccia et al., 2008, dati non pubblicati). I risultati di queste precoci investigazioni hanno rivelato un potenziale per i peptidi antimicrobici a proteggere i pesci dalle infezioni.

IMMUNITA' ACQUISITA

L'immunità acquisita o adattativa costituisce un meccanismo di difesa evolutosi negli gnatostomati congiuntamente con il differenziamento di mandibola e mascella. Essa rappresenta un meccanismo di risposta immunitaria più evoluto rispetto all'immunità innata, in quanto stimolata solo dall'esposizione agli antigeni che accrescono la sua intensità e potenzialità difensiva ad ogni successiva esposizione. Le sue tre caratteristiche principali sono la specificità, la specializzazione e la memoria; i principali componenti cellulari sono i linfociti e le cellule accessorie (Abbas et al., 2002). La risposta immunitaria di tipo specifico può essere classificata in due tipologie, a seconda delle componenti del sistema immunitario implicate: l'immunità umorale è mediata dai linfociti B, che rispondono agli antigeni attraverso gli anticorpi, e l'immunità cellulare è mediata dai linfociti T. Anche i pesci, come gnatostomati, presentano un'immunità specifica, umorale e cellulare, che fa capo ai linfociti B e T (Clem et al., 1985; Ellis, 1997; Secombes et al., 2005; Chistiakov et al., 2007).

Nell'ultimo decennio grazie alla preparazione di anticorpi monoclonali, diretti in prevalenza contro sottopopolazioni leucocitarie, è stato possibile dimostrare nei pesci la presenza di linfociti B e T, e macrofagi come cellule accessorie (Scapigliati et al., 1998). In particolare nella spigola sono stati selezionati anticorpi monoclonali che riconoscono i determinanti antigenici espressi dalle cellule T (DLT15) e dalle cellule B (DLIg3) (Scapigliati et al., 1998), che hanno permesso di identificare e caratterizzare i linfociti durante l'ontogenesi e lo stadio adulto (Abelli et al., 1996, 1997; Picchietti et al., 1997; Romano et al., 1997b); inoltre sono state prodotte sonde molecolari per il riconoscimento specifico dei recettori dei linfociti B e T, BcR e TcR (dos Santos et al., 2000; Scapigliati et al., 2000a; Romano et al., 2007; Piergentili et al., 2008, dati non pubblicati)

I linfociti B e il BCR

I linfociti B sono le cellule che mediano l'immunità umorale. La loro maturazione avviene nel midollo osseo nel caso dei mammiferi, nella borsa di Fabrizio negli uccelli, mentre nei teleostei avviene nel rene cefalico, organo linfopoietico ed ematopoietico (Romano et al., 1997c; Hansen e Zapata, 1998; Langenau et al., 2004; Zapata et al., 2006). I linfociti B sono le uniche cellule in grado di produrre anticorpi fissati alla membrana cellulare che, quando

legano l'antigene specifico, danno inizio ad una sequenza di attivazione di linfociti B che culmina nello sviluppo di cellule effettrici chiamate plasmacellule, che secernono attivamente anticorpi (Abbas et al., 2002).

Per studiare le risposte umorali nella spigola, sono stati utilizzati diversi anticorpi monoclonali contro le immunoglobuline (Ig) e le cellule B (Romestand et al., 1995; Scapigliati et al., 1996; dos Santos et al., 1997). Molti di questi anticorpi riconoscono la catena pesante delle Ig, inferiore è il numero di quelli che riconoscono la catena leggera. L'anticorpo monoclonale DLIg3 lega la catena leggera dell'immunoglobulina ed è stato utilizzato per vedere la distribuzione delle cellule B nella spigola (Scapigliati et al., 1996). Le analisi al citofluorimetro hanno mostrato che i principali organi e tessuti ricchi di linfociti B sono il rene cefalico (circa 25-30%), la milza (circa il 20%) e il sangue (13-25%) (Romano et al., 1997a). Le cellule B comprendono il 25-35% di tutti i linfociti del sangue nella trota (Hansen et al., 2005) e il 50% nel pesce palla (Miyadai et al., 2004).

Le immunoglobuline sono sintetizzate dalle cellule B e possono essere definite come delle glicoproteine capaci di legarsi in modo specifico all'antigene che ne ha stimolato la liberazione (Abbas et al., 2002). Nei mammiferi i linfociti B vergini esprimono contemporaneamente sulla loro superficie principalmente due isotipi di immunoglobulina: IgD e IgM (Roitt et al., 2003). Nei pesci Teleostei le immunoglobuline appartengono alla sola classe delle IgM, molecole sia monomeriche (Litman, 1976; Warr e Marchalonis, 1982) che multimeriche (Wilson e War, 1992; War, 1995; War e Pilstrom, 1999), anche se nel salmone atlantico, nel pesce gatto, nel pesce palla, nella trota arcobaleno e nel pesce zebra è stato trovato un omologo del gene delle IgD dei mammiferi, di cui ancora non ne è stata dimostrata l'espressione a livello di membrana (Wilson et al., 1997, 1998; Hordvik et al., 1999; Saha et al., 2004; Savan et al., 2005a, b; Bengten et al., 2006). Le IgM sono molecole ad alto peso molecolare con una massa variabile da specie a specie, sono composte da due catene pesanti (H) e da due catene leggere (L) e ciascuna catena a sua volta è formata da uno a quattro domini costanti e da un unico dominio variabile (V) che porta il sito di riconoscimento dell'antigene (Matsunaga et al., 1994). La formazione del dominio variabile (V) avviene in seguito all'unione casuale dei segmenti genici V_H , D_H e J_H delle catene pesanti con i segmenti genici V_L e J_L delle catene leggere e a processi iper-mutazionali di inserzione e sostituzioni di singoli nucleotidi del prodotto genico riarrangiato (Tonegawa, 1983). Diversi enzimi sono coinvolti nella ricombinazione V(D)J all'interno dei geni delle immunoglobuline, uno di questi è la proteina attivante la ricombinazione, RGA1, che è uno dei componenti della ricombinasi RAG1/RAG2 (Jankovic et al., 2004).

Le IgM sono state caratterizzate in molte specie di pesci (Scapigliati et al., 2000, 2003; Pucci et al., 2003; Savan et al., 2005a, b; Bernard et al., 2006; Grove et al., 2006; Huttenhuis et al., 2006a; Cheng et al., 2006), ed alcune sue varianti sono state descritte nella carpa (Rombout et al., 1993a), nella spigola (Palenzuela et al., 1996) e nel pesce antartico *Trematomus bernacchii* (Oreste e Coscia, 2002).

L'attivazione dei linfociti B nei mammiferi avviene in seguito all'interazione dell'antigene con le Ig di membrana che, insieme alle molecole Iga e Igβ, formano il recettore antigenico delle cellule B. Tale recettore è chiamato BcR e svolge due funzioni fondamentali nell'attivazione dei linfociti B (Abbas et al., 2002). In primo luogo la sua formazione, in seguito al legame con l'antigene, trasduce nella cellula segnali biochimici che avviano il processo di attivazione (Macdougall et al., 1999). In secondo luogo il BcR lega l'antigene e lo internalizza in vescicole endosomiali. Il BcR possiede una corta coda citoplasmatica che non è in grado di trasdurre il segnale, quindi tale trasmissione è affidata alle molecole Iga ed Igβ legate covalentemente tra loro da un ponte disolfuro ed espresse in associazione non covalente con tutte le Ig di membrana. Queste due catene sembrano quindi svolgere, nel BcR, una funzione analoga a quella svolta dalle proteine del complesso CD3 nel TcR (Abbas et al., 2002). Nei pesci l'attivazione e l'internalizzazione dell'antigene coniugato al BcR è stato dimostrato nella carpa (Koumans-van Diepen et al., 1995), mentre nel pesce gatto è stata identificata la sequenza genica del BcR che ha rilevato analogie con quella dei mammiferi (MacDougals et al., 1999).

I linfociti T e il TcR

I linfociti T sono le cellule coinvolte nell'immunità cellulare, non producono anticorpi, ma legano l'antigene attraverso un recettore di membrana chiamato TcR. Nei mammiferi i precursori dei linfociti T originano nel midollo osseo per poi migrare nel timo dove vanno incontro a maturazione. I linfociti T sono suddivisi in due sottopopolazioni: T helper (Th) e T citotossici (Tc). Queste cellule fungono da effettrici nell'eliminazione dei microrganismi intracellulari e sono in grado di riconoscere i componenti propri dell'organismo (*self*) rispetto a quelli estranei (*non-self*), svolgendo quindi una funzione regolatoria centrale nella risposta immune in tutti i Vertebrati (Nam et al., 2003).

Nei pesci la presenza dei linfociti T è stata dimostrata attraverso reazioni linfocitarie miste (MLR) (Kaattari e Holland, 1990; van Muiswinkel, 1995), ipersensibilità ritardata (Stevenson e Raymond, 1990), proliferazione di leucociti attraverso mitogeni (Volpatti et al., 1996),

rigetto allografico (Abelli et al., 1999; Romano et al., 2007) e anticorpi monoclonali specifici (Scapigliati et al., 1995). In particolare nella spigola, lo sviluppo dell'anticorpo monoclonale DLT15 specifico per i timociti e le cellule T periferiche hanno permesso di stimare le popolazioni di cellule T (Scapigliati et al., 1996). Cellule positive al DLT15 sono state osservate principalmente nel timo e nell'intestino e in numero nettamente inferiore nella milza (10-12%), nel rene cefalico (12-13%) e nel sangue periferico (1-2%) (Romano et al., 1997a). Basandosi sulla presenza di attività funzionali e delle molecole MHC di classe I e II (Flajnik et al., 1999), analogamente ai mammiferi, anche nei pesci Teleostei è possibile suddividere i linfociti T in cellule citotossiche (Tc) e cellule coadiuvatrici o helper (Th) (Secombes et al., 2005). Nei mammiferi le Tc eliminano le cellule infettate da virus o da altri patogeni intracellulari e presentano sulla loro superficie la glicoproteina CD8 che agisce da co-recettore nel legame delle molecole MHC di classe I presentanti l'antigene. Al contrario le Th secernono le citochine e portano come co-recettore la glicoproteina CD4 in grado di legare le molecole di MHC di classe II (Abbas et al., 2002; Secombes et al., 2005). In base alle citochine che vengono rilasciate, le Th vengono ulteriormente suddivise in Th1 e Th2 (Romagnani, 1997). Le Th1 attraverso la secrezione di IFN- γ , del TNF- β e di IL-2 determinano l'attivazione di macrofagi e linfociti B ed inducono reazioni di ipersensibilità ritardata. Al contrario le Th2, rilasciando citochine quali IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, stimolano le risposte anticorpali (Jankovic et al., 2001). Al momento nei pesci non si hanno dati che indichino la presenza delle due tipologie di T helper.

I linfociti T riconoscono gli antigeni attraverso il proprio recettore di membrana, il TcR. Nei pesci, analogamente ai mammiferi, il TcR è un eterodimero formato dalla combinazione di due catene polipeptidiche transmembrana di tipo α/β e γ/δ , legate da ponti disolfuro e associate alla proteina CD3 per formare un complesso proteico (Klausner et al., 1990). Questo recettore riconosce brevi frammenti antigenici presentati in associazione alle molecole MHC espresse sulle cellule presentanti l'antigene (APC) (Abbas et al., 2002; Roitt et al., 2003). Ciascuna catena polipeptidica del TcR presenta un dominio variabile (V), distale dalla membrana, responsabile del riconoscimento dei diversi antigeni e generato dai segmenti genici V, (D) e J attraverso processi di ricombinazione attivati dai prodotti del gene RAG; un dominio costante (C), prossimale alla membrana e responsabile dell'inizio della cascata di traduzione del segnale; una regione idrofobica transmembrana e una breve regione citoplasmatica (Charlemagne et al., 1998; Criscitiello et al., 2004). Strutturalmente il TcR risulta essere molto simile alle immunoglobuline.

Per quanto riguarda il processo di riconoscimento dell'antigene, esistono molte informazioni sul meccanismo attuato dal TcR di tipo α/β dal momento che questo rappresenta circa il 90% dei linfociti del sangue periferico dell'uomo, al contrario sono scarse le conoscenze sul TcR di tipo γ/δ poiché questo costituisce solo 1-10% delle cellule T umane (Haas et al., 1993; Chien et al., 1996). Tutto ciò lascia supporre che i due tipi di TcR abbiano ruoli e funzioni differenti nel riconoscimento dell'antigene. Il TcR α/β riconosce e lega i peptici antigenici associati con le molecole MHC di classe I e II, presenti sulla superficie di cellule specializzate nel presentare l'antigene (APC); il TcR γ/δ sembra invece riconoscere gli antigeni in modo molto simile alle immunoglobuline, senza richiedere la presentazione dell'antigene (Chien et al., 1996; Hayday, 2000).

Geni che codificano molecole omologhe al TcR sono stati identificati anche nei Teleostei e risultano essere ben conservati in tutti i Vertebrati. In particolare sono stati clonati e sequenziali i geni delle catene α e β nel salmone (Hordivik et al., 1996), nel pesce gatto (Wilson et al., 1998), nella razza (*Raja eglanteria*) (Rast et al., 1997), nello squalo (*Heterodontus francisci*) (Rast e Litman, 1994; Rast et al., 1995; Hawke et al., 1996), nella trota (Partula et al., 1995, 1996; Nelson e Secombes, 1997), nella carpa (Rombout et al., 1993b), nel pesce zebra (Haire et al., 2000) e nella spigola (Scapigliati et al., 2000; Romano et al., 2007); recentemente è stato trovato anche il gene della catena γ nella spigola (Piergentili et al., 2008, dati non pubblicati) e nella carpa (Shang et al., 2008), mentre nella passera giapponese sono state caratterizzate tutte e quattro le catene (Nam et al., 2003).

Nei mammiferi e nei pesci il TcR è associato alle molecole co-recettoriali CD4 e CD8, che ne stabiliscono il legame con l'antigene. Il CD4 è una glicoproteina di membrana che si lega alle molecole MHC di classe II, provocando un aumento dei segnali mediati dal TcR (Roitt et al., 2003). Solo recentemente nella spigola il gene del CD4 è stato caratterizzato sia da un punto di vista molecolare che strutturale, e la sua espressione risulta essere elevata soprattutto nel timo, seguito da intestino e branchie (Buonocore et al., 2008). Il co-recettore CD8 si lega invece alle molecole MHC di tipo I e media l'induzione delle risposte immunitarie antivirali (Garcia et al., 1999). Il CD8 è costituito da due subunità: CD8 α e CD8 β , ognuna delle quali è codificata da un gene distinto. Esso può trovarsi sotto forma di eterodimero, α e β , nelle cellule T citotossiche e sotto forma di omodimero, due subunità α , nelle natural killer (Parnes et al., 1989). Nei pesci il gene del CD8 è stato individuato sia nella trota (Hansen e Strassburger, 2000) che nella spigola (Buonocore et al., 2006). Nella trota tale gene codifica per una proteina transmembrana di 204 aminoacidi che consiste di un omodimero CD8 $\alpha\alpha$ o di un eterodimero CD8 $\alpha\beta$; esso viene espresso ad alti livelli nel timo, mentre si ha una

espressione minore nella milza, nel rene cefalico e nell'intestino (Hansen e Strassburger, 2000). Nella spigola invece la proteina CD8 α è lunga 217 aminoacidi e la maggiore espressione del suo cDNA è stata osservata nel timo, nell'intestino e nei leucociti del sangue periferico (Buonocore et al., 2006). La presenza di questa molecola nel timo sottolinea l'importanza di tale organo come sede dell'educazione dei linfociti T (Hansen e Zapata, 1998; Picchietti et al., 2008).

L'attuazione di strategie di clonaggio molecolare per omologia di geni di vertebrati eterotermi ha permesso di scoprire che molti geni che codificano per molecole di membrana o secrete di cellule immunocompetenti sono comparsi precocemente nella filogenesi e risultano altamente conservati, dai pesci ai mammiferi (Partula et al., 1996). L'individuazione nei teleostei di questi geni importanti per le attività di riconoscimento e segnale, offre nuove opportunità per studiare la funzione, lo sviluppo e l'evoluzione del sistema immunitario.

STRUTTURA E FUNZIONE DEGLI ORGANI LINFOIDI

Nonostante le similarità riscontrate tra il sistema immunitario dei pesci e quello mammiferi, esistono anche delle differenze. La differenza fondamentale è rappresentata dall'assenza, nei pesci, del midollo osseo e dei linfonodi, che sono invece presenti nei mammiferi. Nei Teleostei i principali organi linfoidi sono: il timo, il rene, la milza ed i tessuti linfoidi associati alle mucose (MALT e GALT) (Ellis, 1977; Rijkers et al., 1980; Lamers et al., 1985; Clem et al., 1991).

Il timo

Il timo viene considerato un organo chiave nel sistema immunitario dei Vertebrati. Dal punto di vista evolutivo i Vertebrati più primitivi, gli agnati, sono privi di timo mentre tale organo, come struttura ben organizzata, è presente in tutti gli gnatostomi (Page e Rowley, 1982; Ardavin e Zapata, 1988) ad eccezione di due specie: il pesce aguglia (*Lepisostenus platyrhincus*) e il rettile *Sphenodon* (Marchalonis et al., 1969).

Nei pesci la ghiandola timica deriva dall'endoderma associato al mesenchima delle tasche faringee e dall'ectoderma dei corrispondenti archi branchiali (Tatner, 1996; Hansen e Zapata,

1998; Bowden et al., 2005). Nei mammiferi il timo si sviluppa dall'interazione di tutte e tre le linee germinali: ectoderma, mesoderma ed endoderma, in particolare origina dall'interazione tra l'ectoderma della III tasca faringea e la cresta neurale mesenchimale nella III e IV tasca faringea (Manley, 2000; Trede et al., 2001; Manley e Blackburn, 2003; Bowden et al., 2005). In altre specie animali le tasche interessate allo sviluppo del timo sono spesso differenti (Lambert e Ritter, 1988), comunque in tutti i vertebrati tale organo risulta essere sempre in stretto rapporto con la cavità faringea. Proprio sulla base di queste osservazioni si suppone che quest'organo abbia avuto, come ruolo primitivo, il compito di difendere la cavità orofaringea da eventuali infezioni, e solo successivamente si sarebbe evoluto divenendo fondamentale nella difesa immunitaria dell'intero organismo (Manning, 1981). Inoltre, è stato ipotizzato che la posizione del timo abbia subito uno spostamento durante l'evoluzione, passando così da una posizione abbastanza superficiale, tipica dei pesci e degli anfibi, ad una più internalizzata, tipica dei mammiferi (Tatner e Manning, 1982; Fänge e Pulsford, 1985; Chilmonczyk, 1992). Nonostante queste differenze di locazione, lo sviluppo successivo e la differenziazione cellulare sono simili in tutte le classi di Vertebrati finora studiate (Ritter e Crispe, 1992).

Nei Teleostei, come in tutti i Vertebrati, il timo è considerato il primo organo a divenire linfoide (Manning e Horton, 1982; El Deeb e Saad, 1990; Du Pasquire, 1993; Zapata et al., 1996) svolgendo una funzione essenziale nella specializzazione dei linfociti T (Abelli et al., 1996). Negli ultimi anni nei pesci è stata dimostrata la presenza di numerose cellule T nel timo (circa l'80%) durante l'ontogenesi. Questo è stato possibile nella carpa, nella spigola e nel pesce zebra mediante l'uso di specifici anticorpi monoclonali, quali WCL9 e DLT15 (Rombout et al., 1997; Romano et al., 1997b; Abelli et al., 1996; Scapigliati et al., 1998; dos Santos et al., 2000a; Danilova et al., 2004).

Nei mammiferi il timo è un organo bilobato localizzato al centro del torace vicino al cuore. Quest'organo, anche nei pesci, è circondato da uno strato di tessuto connettivo che forma la cosiddetta capsula connettivale attraverso la quale, vasi sanguigni e nervi penetrano nel tessuto. Tali vasi sono rivestiti sia da un epitelio fenestrato che da un epitelio continuo costituendo una barriera emato-timica. La struttura interna del timo è costituita da un cortex, un bordo cortico-medullare (C/M) e una medulla. I linfociti non ancora differenziati, entrano attraverso i vasi nel bordo cortico-medullare e raggiungono il cortex. All'interno del cortex questi possono differenziarsi in cellule natural killer, cellule dendritiche e cellule della linea T (Sacedòn et al., 2003). La medulla essendo ricca in macrofagi, è il sito in cui avviene la selezione verso i linfociti con elevata affinità per le molecole MHC self. I macrofagi infatti

fagocitano i linfociti autoreattivi attivati dalle cellule dendritiche ed entrati in apoptosi, evitando così il rischio dell'autoimmunità (Navratil e Ahearn, 2001). Numerosi macrofagi sono stati osservati anche nel timo dei pesci: nella carpa la loro localizzazione è principalmente nel bordo cortico-medullare (Romano et al., 1998a). Oltre ai macrofagi e alle cellule dendritiche, le cellule epiteliali hanno grande importanza nel costituire l'ambiente funzionale dove i linfociti possono terminare la loro maturazione. Anche nei pesci è stata dimostrata l'esistenza di un ambiente timico complesso costituito da una eterogeneità di cellule epiteliali classificate sulla base della loro localizzazione e delle caratteristiche citologiche (Romano et al., 1997a; 1999a, b). In particolare si ritrovano: le cellule limitanti (LECs); le cellule epiteliali reticolari corticali e medullari (c-RECs e m-RECs); le cellule tipo "nurse" e strutture simili ai corpuscoli di Hassall (Romano et al., 1999a, b).

Le LECs sono responsabili della formazione della capsula di cellule epiteliali che avvolge esternamente il timo (Romano et al., 1999a), sono localizzate nell'area subcapsulare, peritrabecolare e perivascolare e poggiano su di una lamina basale. Presentano un nucleo eterocromatidico, piccoli mitocondri rotondeggianti, filamenti intermedi, vescicole dal contenuto flocculare e numerose interdigitazioni citoplasmatiche. Sotto la capsula questi epitelioцитi formano uno strato continuo che entra in profondità avvolgendo i setti e i vasi entranti ed uscenti dall'organo (Romano et al., 1997a; 1999a). Questa organizzazione sembra garantire la presenza di una barriera emato-timica, simile a quella presente nei mammiferi (Roitt et al., 2003). Inoltre i sepimenti epiteliali formati dalle LECs si sviluppano all'interno del timo suddividendolo in lobi. In ciascun lobo timico predominano: i timociti nel cortex e le cellule epiteliali nella medulla (Romano et al., 1997a; 1999a).

Le c-RECs presentano un citoplasma trasparente agli elettroni, hanno forme irregolari e lunghi processi citoplasmatici che si uniscono ad altre cellule attraverso i desmosomi per formare un esteso sistema reticolare (Romano et al., 1997a; 1999a, b). Le m-RECs invece, si trovano isolate o in gruppi e prendono connessioni con le LECs subcapsulari, hanno una forma irregolare o globulare e un citoplasma denso agli elettroni e meno vescicolato rispetto alle c-RECs (Romano et al., 1997a, 1999b).

Differentemente dai mammiferi, le cellule "nurse" sono localizzate nel bordo cortico-medullare, hanno un nucleo irregolare, piccoli mitocondri, un reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, lisosomi, filamenti intermedi ed entrano in contatto con i linfociti avvolgendoli completamente o circondandoli con profonde invaginazioni della membrana plasmatica (Romano et al., 1999b).

I corpuscoli di Hassall nei pesci sono costituiti da cellule epiteliali disposte concentricamente contenenti al centro residui cellulari (Romano et al., 1999b). Nel timo del sarago sono state osservate anche cellule epiteliali formanti cisti associate ai corpuscoli di Hassall (Romano et al., 1999a). Strutture analoghe sono state descritte anche in altre specie di pesci (Fänge e Pulsford, 1985; Castillo et al., 1991) nonché nei mammiferi (Ritter e Crispe, 1992) e negli uccelli (Romano et al., 1996).

La differente morfologia delle cellule epiteliali che costituiscono la componente epiteliale del timo dei pesci riflette, probabilmente, la compartimentalizzazione in cortex e medulla presente anche nei mammiferi (Ritter e Crispe, 1992). Alcune indagini immunohistochimiche, lo studio della distribuzione di cellule in apoptosi durante lo sviluppo del timo e il differenziamento dei linfociti, sembrerebbero indicare un ruolo differente tra i compartimenti corticale, cortico-medullare e medullare del timo dei pesci (Abelli et al., 1998; Romano et al., 1999b) rispetto a quello dei mammiferi.

Con il procedere dello sviluppo il timo della maggior parte dei mammiferi comincia da infiltrarsi di tessuto adiposo ed a ridursi di volume. Questo fenomeno sembra verificarsi anche nei pesci (Chilmonczyk, 1992; Luer et al., 1995; Fishelson, 1995; Zapata et al., 1996). Sebbene in molti vertebrati il timo si trovi di solito come organo doppio, alcuni teleostei ne hanno più di due, per esempio nel pesce ventosa ogni camera branchiale ha una coppia di ghiandole timiche: una in posizione superficiale e l'altra vicino all'epitelio branchiale (Gorgollon, 1983).

Il rene

In tutti i Vertebrati il rene è situato centralmente alla colonna vertebrale e in posizione retroperitoneale; è un organo pari e consiste di un segmento anteriore (rene cefalico o prorene) e di uno medio-posteriore (rene del tronco). Esso viene definito un organo pluricompetente in quanto ha funzione escrettrice, ematopoietica, endocrina ed immunitaria (Abelli et al., 1996; Zapata et al., 1996). Nei Teleostei la prima porzione del rene viene chiamata rene cefalico, questa non presenta tessuto escretore, ma è principalmente un compartimento linfomieloide. La forma del rene cefalico varia tra le diverse specie: in alcune esistono due separate estensioni nella parte più anteriore dell'organo, mentre nei salmonidi è presente come singolo organo (Press e Evensen, 1998). Il rene è dotato di un sistema portale renale a bassa pressione e da capillari arteriosi e venosi in cui è disperso il parenchima renale,

il quale è costituito da cellule reticolari (REC), fagociti, monociti, numerosi granulociti e trombociti (Temminck e Bayne, 1987; Romano et al., 2000; 2004).

Durante i primi stadi larvali dei pesci, il rene cefalico forma il primo rene escretore costituito da tessuto ematopoietico intersperso tra i tubuli escretori. Negli stadi più avanzati dello sviluppo il rene cefalico perde la sua funzione escrettrice ed i tubuli si degradano; il ruolo escretore è assunto dal mesonefro larvale ed in seguito dall'opistonefro nell'animale adulto (Zapata e Cooper, 1990; Manning, 1994).

La funzione endocrina viene svolta dai tessuti interrenale e cromaffine, largamente distribuiti nell'organo e rispettivamente omologhi alla regione corticale e medullare della ghiandola surrenale dei mammiferi (Chavin et al., 1996). Studi istologici hanno dimostrato la presenza di cellule cromaffini sia nel rene cefalico che nell'epistonefro di spigola (Abelli et al., 1996).

L'analisi morfologica ed immunistochimica del rene cefalico in sviluppo ha dimostrato che è un organo linfoide primario per la produzione di diversi leucociti come i linfociti B, i macrofagi e i granulociti (Romano et al., 1997a, 1998a; Pastoret et al., 1998). Inoltre, è ritenuto l'equivalente del midollo osseo dei mammiferi adulti per la produzione di cellule B (Romano et al., 1997b; Zapata e Amemiya, 2000). Studi immunocitochimici compiuti sulla carpa (Romano et al., 1997b, 1998b) e sulla spigola (Scapigliati et al., 2003), attraverso l'uso di anticorpi monoclonali specifici per le immunoglobuline ed i linfociti B, hanno dimostrato la loro comparsa e il loro progressivo aumento nel rene cefalico, mentre appaiono più tardi nella milza e nell'intestino. Il rene sembra essere l'organo in cui si differenziano anche le altre cellule leucocitarie come i monociti e i granulociti. Nella carpa, sembra che i monociti si differenzino precocemente proprio nel rene (Romano et al., 1998a).

Nel rene sono presenti anche aggregati di cellule contenenti melanina ed altri pigmenti detti centri melano-macrofagici (CMM) (Yu et al., 1971; Roberts, 1975a; Agius, 1985), il cui numero e diametro aumentano con l'età.

La milza

Nei pesci Teleostei la milza è uno dei primi organi a svilupparsi durante l'ontogenesi, ma l'ultimo a differenziarsi in senso linfoide (Ellis, 1977; Tatner e Manning, 1983; Romano et al., 1997a, b) e svolge un ruolo importante nell'ematopoesi e nell'attività immunitaria.

L'abbozzo splenico deriva dal mesenchima mesodermico e appare dopo alcuni giorni dalla schiusa come un ispessimento del mesentere dorsale nella parte destra del corpo in continuità

con il pancreas. La milza occupa quindi una posizione centro-ventrale, compresa tra la parte cecale dello stomaco e la prima ansa intestinale (Quesada et al., 1994).

L'istologia di questo organo è stata studiata nel salmone (Ellis, 1997), nella trota (Grace e Manning, 1980; Tatner e Manning, 1983, 1985), nella carpa (Botham e Manning, 1981; Van Loon et al., 1981; Schneider, 1983) e nella spigola (Quesada et al., 1994).

La milza, come il timo, possiede un rivestimento esterno costituito da una capsula fibrosa e piccole trabecole che si estendono all'interno del parenchima. Nei pesci, analogamente ai mammiferi, la milza è suddivisa in polpa rossa (porzione eritropoietica) e polpa bianca (porzione linfopoietica) (Abbas et al., 2002), anche se in alcune specie, tra cui la carpa, la trota e il pesce zebra, prevale la polpa rossa e solo dopo una stimolazione antigenica si ha un aumento della polpa bianca (Zapata e Amemiya, 2000), viceversa, nella spigola la polpa bianca e rossa risultano equamente suddivise (Abelli et al., 1996).

Nei mammiferi e talvolta nei pesci (spigola, sarago ed orata), la polpa rossa è formata da una rete di cellule epiteliali reticolari che sostengono ed avvolgono i capillari sanguigni; questa rete trattiene diverse popolazioni cellulari quali linfociti, trombociti, macrofagi ed eritrociti (Roitt et al., 2003). La polpa bianca è ricca di centri melano-macrofagici, principali siti di distruzione di eritrociti e di accumuli metabolici, e di ellipsoidi, terminazioni di arteriole che si infiltrano tra le fibre, cellule reticolari e i macrofagi (Zapata e Cooper, 1990; Espenes et al., 1995a). Questi agglomerati cellulari sembrano essere specializzati nella filtrazione del plasma e nell'intrappolamento dei complessi immunitari (Ellis, 1980; Secombes e Manning, 1980; Espenes et al., 1995b). Talvolta in alcune specie di pesci antartici, la polpa bianca e rossa non sono facilmente riconoscibili perché frammiste (Romano et al., 2000).

Durante lo sviluppo l'attività ematopoietica della milza varia con l'età. Nelle prime settimane post-schiusa è presente un'intensa attività eritropoietica, seguita dalla linfopoietica e ciò è stato osservato in diverse specie di Teleostei (Grace e Manning, 1980; Botham e Manning, 1981; Grace et al., 1981; Tatner e Manning, 1983, 1985; Chantanachookin et al., 1991; Quesada et al., 1994). Alcuni studi, condotti sia nella carpa in sviluppo (Romano et al., 1997b) che nell'adulto (Rombout et al., 1996), hanno rivelato la presenza di numerosi trombociti sia nel sangue che nelle aree a polpa bianca della milza. Un numero così elevato di trombociti in quest'organo, prima che in altri, dopo due settimane dalla fecondazione, suggerisce che esso sia un organo primario per la trombopoiesi (Romano, 1998) e l'organo linfoide secondario per i linfociti B e T, i macrofagi ed i granulociti (Scapigliati et al., 1995, 1996; Romano, 1997a; Romano et al., 1999a). A differenza degli uccelli (Yassine et al., 1989), la milza dei pesci ossei non è sede di attività granulocitica e il loro basso numero

suggerisce la derivazione da altri organi (Quesada et al., 1994). Inizialmente il processo eritropoietico avviene solo nel parenchima splenico, successivamente vengono interessate anche le cavità spleniche (Yassine et al., 1989).

Tessuti linfoidei associati alle mucose

Nei Teleostei i tessuti linfoidei associati alla mucosa comprendono la pelle, le branchie (MALT) e l'intestino (GALT) e risultano protetti da meccanismi umorali e cellulo-mediati (Peleteiro e Richards, 1985; Hart et al., 1988; Roberts, 1989). Questi tessuti sono esposti all'ambiente esterno e, con il loro strato mucoso e le diverse componenti umorali contenute al suo interno (lisozima, lectine, proteine del complemento e peptici antibatterici), costituiscono la prima barriera di difesa contro i patogeni (Abelli et al., 1997; Dalmo et al., 1997; Magnadottir, 2006).

Nella trota è stato osservato che le branchie sono coinvolte in un "uptake" di antigeni, mentre l'epitelio faringeo che ricopre il timo, costituisce un'effettiva barriera per l'entrata sia di materiali antigenici che non (Castillo et al., 1998). Inoltre nella spigola si è visto che, attraverso l'immersione di alcuni individui a differenti stadi in presenza di batteri, le cellule secernenti anticorpi (ASC) vengono prodotte solo nelle branchie, suggerendo così la loro importanza in una precoce protezione immunitaria (dos Santos et al., 2001).

Nell'intestino dei Teleostei, analogamente ai mammiferi, ci sono linfociti, macrofagi, granulociti e plasmacellule localizzati principalmente nell'epitelio e nella lamina propria e sono assenti le placche di Peyer (Davina et al., 1980; Hart et al., 1988; Abelli et al., 1997; Picchietti et al., 1997). In alcune specie uno strato detto granuloso, costituito da una o poche file di mastociti/cellule granulari, si trova tra lo strato compatto e strato muscolare circolare (Reite, 1997). In tutte le specie di pesci fino ad oggi studiate, l'intestino può essere suddiviso in tre segmenti: anteriore, medio e posteriore (Abelli et al., 1997). Questa divisione viene fatta sulla base di differenze morfologiche e proprietà funzionali (digestione ed azione protettiva). Studi di immunoistochimica condotti sull'intestino della spigola hanno dimostrato una distribuzione diversa dei linfociti B e T nelle tre rispettive regioni, evidenziando un crescente gradiente cefalo-caudale (Abelli et al., 1996). Nella carpa sono stati trovati macrofagi intraepiteliali localizzati nella porzione posteriore dell'intestino che è considerata un importante sito immunologico in tutti i pesci (Rombout et al., 1989; Romano et al., 1998b). La porzione mediana dell'intestino, che occupa il 20-25% dell'intera lunghezza del tratto intestinale, sembra essere specializzata nell'assorbimento delle molecole ingerite, e i macrofagi sono più

numerosi e più grandi rispetto al tratto precedente (Rombout et al., 1985, 1989; Dorin et al., 1994; Strand e Dalmo, 1997). Nella carpa e nella spigola, mediante l'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro le immunoglobuline (Rombout et al., 1993a; Abelli et al., 1997) e le cellule T (Scapigliati et al., 1995; Joosten et al., 1997), è stato dimostrato che le cellule T sono la popolazione leucocitaria mucosale più numerosa, anche se cellule linfoidi Ig-positivo sono state localizzate nella lamina propria (Rombout et al., 1993b; Abelli et al., 1997; Romano et al., 1997). Questo ha portato ad ipotizzare che il GALT dei Teleostei abbia un sistema di difesa soprattutto di tipo cellulo-mediato (Picchietti et al., 1997).

L'APOPTOSI

Il meccanismo dell'apoptosi

L'apoptosi è un processo fisiologico di morte cellulare programmata (*"Programmed cell death"*, PCD) molto complesso e finemente regolato, che svolge un ruolo importante nel normale sviluppo e nel mantenimento dell'omeostasi di tutti gli organismi pluricellulari (Kizaki e Tadakuma, 1993; do Vale et al., 2003). Questo meccanismo interviene in numerosi processi biologici fondamentali quali l'embriogenesi, la metamorfosi, il rimodellamento dei tessuti, la regolazione delle dimensioni di una popolazione cellulare, la rimozione di cellule potenzialmente pericolose, le infezioni virali, la proliferazione cellulare, la regolazione delle risposte immunitarie ecc.(Salinas et al., 2007).

Oltre all'apoptosi, un'altra modalità attraverso cui una cellula muore e viene eliminata dall'organismo è la necrosi.

La necrosi è un processo di morte patologica che si attiva nella cellula in seguito ad un danno genetico o strutturale, ad un'offesa improvvisa (ipossia, ischemia e ipertermia) o come conseguenza di traumi fisici o chimici. La necrosi è spesso definita pertanto come morte cellulare accidentale (Angelucci, 2006). I cambiamenti citologici più evidenti riguardano soprattutto la membrana cellulare che perde la capacità di mantenere la pressione osmotica, per cui la cellula danneggiata si rigonfia, si frattura e riversa all'esterno il proprio contenuto citoplasmatico determinando quindi una reazione infiammatoria localizzata nel tessuto circostante (Wyllie et al., 1980).

Al contrario l'apoptosi è un processo fisiologico di eliminazione cellulare che non provoca conseguenze nocive per il tessuto in cui si verifica. Sotto l'aspetto cito-morfologico, la cellula apoptotica mantiene l'integrità della membrana plasmatica, sulla quale si formano delle "bolle" (fenomeno chiamato blebbing), si condensa e, nelle fasi più avanzate si può avere frammentazione citoplasmatica (Hacker, 2000). I frammenti cellulari, noti come corpi apoptotici, vengono rapidamente fagocitati da macrofagi o da cellule dendritiche non ancora mature (Albert et al., 1998) attraverso l'espressione di molecole di segnalazione sulla superficie cellulare che ne permettono il riconoscimento, quindi la cellula "scompare" senza lasciare traccia (Cohen et al., 1992). Dal punto di vista biochimico invece la frammentazione del DNA è la caratteristica più eclatante: l'apoptosi è infatti associata all'attivazione di endonucleasi che degradano il DNA in frammenti mono e oligonucleosomali di 180-200 paia di basi e/o loro multipli (Wyllie, 1980; Bacsò et al., 2000). Probabilmente la DNasi I gioca un ruolo primario nella comparsa di questo "ladder" nucleosomale che è osservabile attraverso elettroforesi del DNA su gel di agarosio (Wyllie, 1980; McConkey et al., 1994).

Nei mammiferi le molecole che prendono parte alla realizzazione delle vie di traduzione del segnale apoptotico si distinguono in attivatori ed inibitori dell'apoptosi. Studi condotti sul nematode *Caenorabditis elegans* hanno permesso di suddividere tale processo in tre fasi: 1) induzione, 2) esecuzione 3) riconoscimento e fagocitosi (Thompson, 1995).

L'induzione è una fase regolabile e reversibile, guidata da segnali di sopravvivenza e segnali di morte che possono seguire due distinte vie di traduzione ed attivazione del segnale apoptotico: la via estrinseca o recettoriale, regolata da segnali extracellulari, e la via intrinseca o mitocondriolare, attivata da segnali intracellulari e regolata dal mitocondrio. Entrambe le vie convergono nell'attivazione di proteasi specifiche, dette caspasi che segnano l'inizio della fase di esecuzione (Abbas et al., 2002). Le caspasi rappresentano un'ampia famiglia di enzimi proteolitici in grado di tagliare a livello del residuo di acido aspartico un gran numero di substrati. La loro attivazione determina una serie di eventi proteolitici a cascata che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi. Le prime caspasi ad essere attivate all'arrivo di uno stimolo pro-apoptotico sono le caspasi iniziatrici 2, 8, 9, 10, che a loro volta tagliano ed attivano le caspasi effettrici 3, 6, 7 (Fig. 1) (Angelucci, 2006). Uno dei più importanti bersagli delle caspasi effettrici è ICAD, l'inibitore di CAD (Caspase Activated DNase), un'endonucleasi specifica dell'apoptosi. Una volta liberatasi dall'inibitore grazie all'azione della caspasi, CAD effettua tagli a doppio filamento nella regione internucleosomica della cromatina, rendendosi così responsabile della frammentazione del DNA tipica dell'apoptosi (Angelucci, 2006). Infine si ha la fase di

riconoscimento e fagocitosi in cui la cellula apoptotica espone sulla propria superficie dei segnali di “appetibilità” che sono percepiti dai monociti e macrofagi attraverso i propri recettori oppure tali cellule vengono richiamate da segnali chemiotattici (Abbas et al., 2002).

La via estrinseca viene regolata nei mammiferi dai recettori della famiglia TNFR che, una volta attivati, determinano la formazione del complesso DISC (Death Inducing Signaling Complex), contenente numerose proteine adattatrici, e il richiamo di numerose molecole di caspasi 8 che a loro volta dirigono la caspasi 3, permettendo così il completamento del programma di morte (Fig. 1) (Muzio et al., 1998). La via intrinseca invece è regolata dal mitocondrio che, oltre ad essere il generatore energetico della cellula, contiene al suo interno diversi fattori pro-apoptotici quali il citocromo c, Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), AIF (Apoptosis Initiating Factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with Low pI) e diverse procaspasi (2, 3 e 9) (Loeffler e Kroemer, 2000). Una volta liberato nel citosol il citocromo c oligomerizza con Apaf-1 formando dei complessi multimerici denominati apoptosomi, la cui formazione determina l’attivazione della pro-caspasi 9 e della pro-caspasi 3 (Fig. 1) (Hengartner, 2000). Il meccanismo attraverso il quale il citocromo c viene rilasciato non è ancora ben noto, ma un ruolo importante è sicuramente svolto dai membri della famiglia di Bcl-2 (B Cell Lymphoma-2). Tali proteine possono avere sia funzione anti-apoptotica, la cui espressione impedisce il rilascio del citocromo c, quali Bcl-2 e Bcl-xL, e pro-apoptotica, la cui espressione ne favorisce il rilascio, quali Bax, Bak, Bad, Bid e Bim (Hengartner, 2000).

In generale i geni coinvolti nel processo apoptotico risultano essere altamente conservati durante l’evoluzione. I prototipi di tali geni furono osservati per la prima volta nel nematode *C. elegans*, a cui fu dato il nome di *ced*. Due di questi geni, *ced-3* e *ced-4* sono direttamente implicati nella morte della cellula, mentre un terzo gene chiamato *ced-9*, esercita una funzione di protezione nei confronti dell’apoptosi (Nagata e Golstein, 1995). I tre geni sono stati clonati e l’analisi della sequenza del DNA ha rivelato che *ced-4* codifica una proteina con caratteristiche non paragonabili a nessun altra proteina finora conosciuta nei mammiferi, la proteina codificata da *ced-3* ha omologia con la famiglia delle cistein proteasi, mentre quella codificata da *ced-9* presenta notevoli omologie di sequenza con la famiglia delle proteine Bcl-2 (Nagata e Golstein, 1995).

In condizioni normali è il bilancio tra i segnali di sopravvivenza e di morte che determinano il destino di una cellula. L’apoptosi può essere indotta sia in conseguenza dell’attivazione di sensori interni (via intrinseca) che rivelano situazioni di stress pericolose come ad esempio un danno irreparabile al DNA o sugli organelli interni, la mancanza di fattori di crescita o di

sopravvivenza e le infezioni virali (mediante secrezione di proteasi da parte dei linfociti T citotossici e delle cellule NK) (Kerr et al., 1972; Arends e Wyllie, 1991; Thompson, 1995), sia in risposta all'arrivo di specifiche molecole segnalatrici dall'ambiente extracellulare (via estrinseca) come i ligandi del recettore TNFR, quali Fas (CD95 o TNF-RSF6) e TNF- α (Wyllie, 1980). Pertanto anche se il programma è geneticamente scritto all'interno della cellula, l'apoptosi è il risultato di una grande varietà di fattori intrinseci ed estrinseci. A causa di queste considerazioni si ritiene che il "suicidio cellulare" si verifichi per "default", ovvero quando la cellula non riceve più segnali esterni di sopravvivenza attiva il programma apoptotico (Wyllie, 1980).

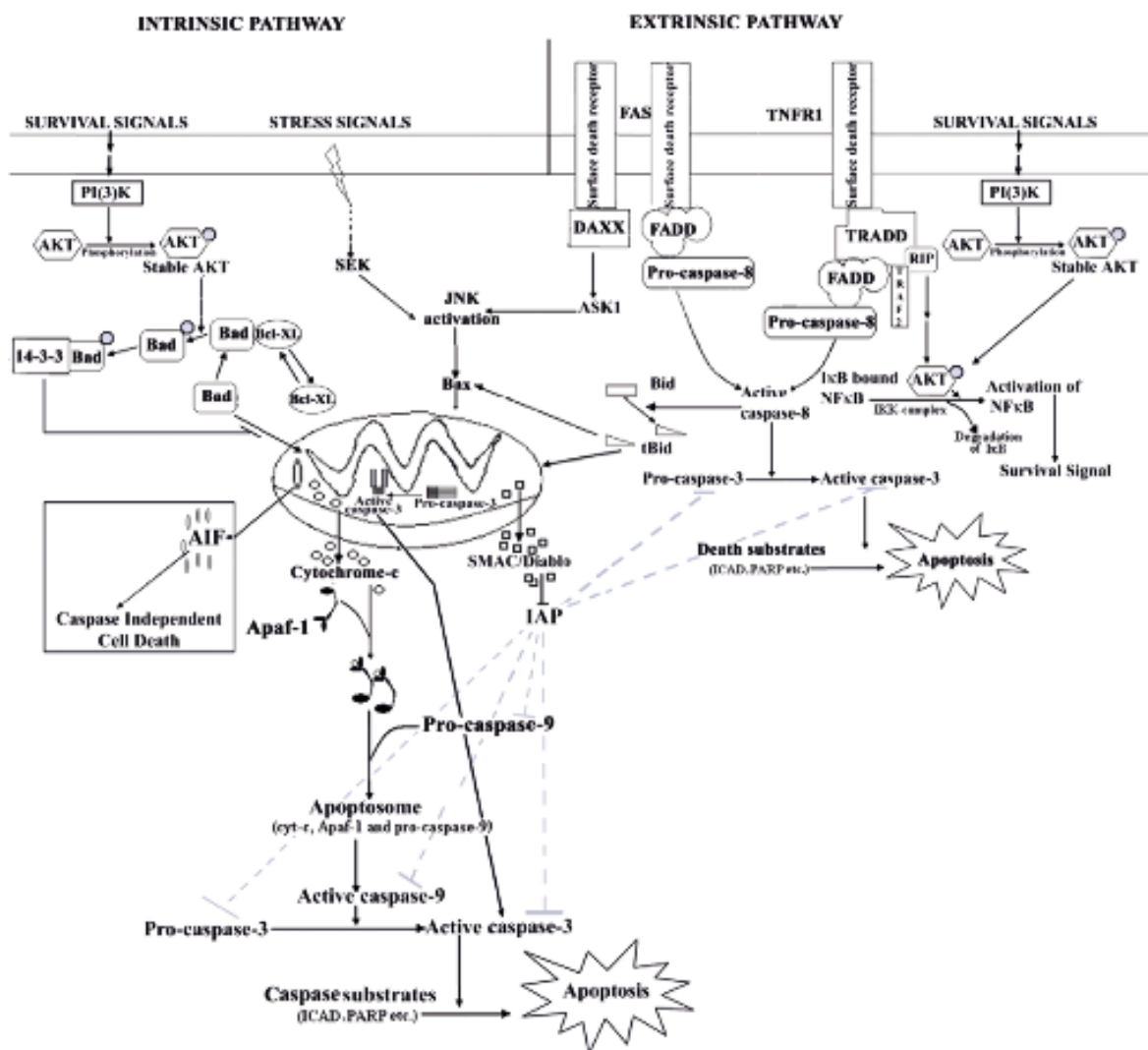


Figura 1. Rappresentazione schematica della via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi e la loro interconnessione con i segnali di sopravvivenza. I piccoli cerchi blu sui riquadri indicano la forma fosforilata della proteina in questione, le frecce indicano l'avanzamento del processo mentre le linee con la piccola barra alla fine indicano un'azione di inibizione. L'effetto inibitorio di IAPs (Inibitor of Apoptosis Protein) sulle procaspasi e caspasi sono indicate con una linea tratteggiata (da Arya et al., 2007).

L'apoptosi nel sistema immunitario

Il sistema immunitario elimina le cellule non efficaci o non più utili e quelle autoreattive, attraverso il meccanismo dell'apoptosi. Per il corretto funzionamento del sistema immunitario, durante l'evoluzione si sono infatti sviluppate complesse strategie che sottopongono continuamente le cellule del sistema immunitario a cicli di proliferazione-delezione. Tale turnover è fondamentale sia nell'acquisizione delle competenze immunologiche, durante lo sviluppo e nell'adulto, sia nel controllo della risposta immunitaria (Angelucci, 2006). Attraverso tale processo il sistema immunitario dei mammiferi elimina le cellule con DNA danneggiato o con metabolismo alterato e quelle che sono potenzialmente pericolose quali i linfociti autoreattivi, cioè quei linfociti che esprimono un TcR che lega con affinità troppo elevata l'MHC espresso dalle cellule dendritiche, quindi che riconoscono come antigeni parte dell'organismo stesso (selezione negativa) (Cohen, 1991; Golstein et al., 1991). La stessa sorte viene riservata ai linfociti che non esprimono un TcR o che ne esprimono una forma non funzionale cioè non in grado di legare l'MHC. Tale selezione avviene nel timo durante la maturazione e la differenziazione delle cellule T e normalmente solo i linfociti che producono un TcR funzionale lasciano tale organo e vanno a popolare gli organi linfoidi secondari (Fowlkes e Pardoll, 1989; von Boehmer et al., 1989; Mc Donald e Lees, 1990). La mancanza di apoptosi nel timo determina la comparsa di cellule autoreattive alla periferia causando malattie autoimmuni e gioca un ruolo importante nella carcinogenesi, mentre una massiva induzione di apoptosi può indurre immunodeficienza dovuta alla diminuzione di linfociti (Kizaki e Takushi, 1993). Perciò questo processo di morte programmata dei timociti gioca un ruolo importante nella fisiologia cellulare e nella patofisiologia del sistema immunitario suggerendo che l'apoptosi è finemente controllata *in vivo* (Kizaki e Takushi, 1993).

Attraverso il processo apoptotico vengono selezionati anche i linfociti B autoreattivi e si ha lo spegnimento dei cloni alla fine della risposta immunitaria. Questo meccanismo si attiva non solo nel timo (tolleranza centrale), ma anche negli organi linfoidi secondari e nei tessuti (tolleranza periferica) (McConkey et al., 1994).

Il processo di differenziamento dei linfociti T si attua a partire da linfoblasti migrati dai foci linfopoietici (midollo osseo nei mammiferi, vene onfalomesenteriche nel pollo), che raggiungono la medulla timica, qui prendono contatto con le cellule epiteliali specializzate dello stroma e le cellule dendritiche, provocando l'apoptosi (Ritter e Crispe, 1992; Lanzavecchia e Sallusto, 2001; Miosge e Zamoyska, 2007). Nei mammiferi è infatti noto che

proprio in questa zona del timo, è presente una densa rete di cellule dendritiche la cui funzione è proprio quella di filtrare le cellule prima che queste acquisiscano la propria competenza funzionale (Farr et al., 1995; Hogquist, 2005).

Nonostante si sappia ancora poco sul processo di selezione intratimico nei Teleostei, le interazioni tra i timociti in via di sviluppo e gli elementi stromali nel timo sembrano essenziali per stabilire sia la tolleranza che la restrizione a MHC (Abelli et al., 1996, 1998; Romano et al., 1997a, 1999a, b; Rodriguez et al., 1998). Nei pesci, probabilmente, questo processo ha luogo nel bordo cortico-medullare in quanto, diversi studi hanno indicato proprio in questa regione la presenza di cellule macrofagiche (Romano et al., 1998a), forse dendritiche (Avilès-Trigueros e Quasada, 1995). Studi condotti durante lo sviluppo nella spigola (Abelli et al., 1998) e nella carpa (Romano et al., 1999b) hanno infatti dimostrato che l'apoptosi avviene nella corteccia e nel bordo cortico-medullare dove sono state osservate anche numerose cellule "nurse" (Romano et al., 1999b). Durante lo sviluppo del timo, il numero delle cellule apoptotiche è significativamente più alto nel bordo cortico-medullare, mentre nello juvenile-adulto l'apoptosi risulta essere ristretta nella zona corticale (Abelli et al., 1998; Romano et al., 1999b). Queste osservazioni sembrano indicare che nei pesci il bordo cortico-medullare abbia un ruolo centrale e non sia semplicemente una zona di smistamento delle cellule T attraverso i capillari. Inoltre studi condotti sulla carpa hanno evidenziato che i macrofagi compaiono e si stabiliscono precocemente nei tessuti linfoidei, soprattutto timo e rene cefalico, lasciando supporre un loro ruolo non solo nella maturazione del sistema immunitario e nella processazione-presentazione dell'antigene, ma anche nel processo di selezione intratimica (Romano et al., 1998a).

Per quanto riguarda le cellule dendritiche, da quando furono scoperte negli organi linfoidei (Veldman, 1970), la loro presenza è stata confermata nel timo dei mammiferi (Veldman e Kaiserling, 1980; Duijvestijn e Hoefsmit, 1981; Kendal, 1981; Van Ewijk, 1988), degli uccelli (Kendal e Frazier, 1979; Fonfria et al., 1982), dei rettili (Leceta et al., 1984) e degli anfibi (Bigaj e Plytycz, 1984, 1987; Alvarez, 1990). Nei pesci attualmente sono poche le conoscenze circa l'esistenza di tali cellule (Avilès-Trigueros e Quasada, 1995) e dei loro numerosi markers. Uno di questi, il CD 83, è una glicoproteina di membrana facente parte della superfamiglia delle Ig ed è comunemente usato come marker di superficie standard delle cellule dendritiche nei mammiferi (Doñate et al., 2007). Ad oggi il CD83 nei pesci è stato clonato nella trota (*Oncorhynchus mykiss*) e nello squalo (*Gynglymostoma cirratus*) (Ohta et al., 2004), nel salmone (*Salmo salar*) (Haugarvoll et al., 2006), nell'orata (*Sparus aurata*) (Doñate et al., 2007), nella passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*) (Aoki et al., 2006),

nel pesce palla maculato verde (*Tetraodon nigroviridis*) e nel pesce zebbra (*Danio rerio*) (dati non pubblicati).

L' APOPTOSI E LO STRESS

La risposta allo stress

Lo stress può essere definito come una condizione in cui l'equilibrio fisiologico di un organismo risulta alterato dall'azione di stimoli interni o esterni, definiti complessivamente stressori (Wendelaar Bonga, 1997). In risposta a tali stimoli destabilizzanti l'organismo cerca di mantenere l'omeostasi attraverso l'alterazione del suo comportamento e di alcuni parametri fisiologici (risposta allo stress) (Johnson et al., 1992). La risposta allo stress rappresenta quindi un meccanismo difensivo che consente l'adattamento di un organismo o di un'intera popolazione a determinate condizioni avverse che, se elevate e durature, possono compromettere lo stato di salute e benessere (Barton, 2002).

Nei Teleostei la risposta a condizioni di stress è simile a quella evidenziata negli altri Vertebrati, e caratterizzata da una risposta di tipo endocrino (risposta di stress primaria), finalizzata al rilascio in circolo di catecolamine e ormoni corticosteroidi (Pickering, 1981), i cui effetti si ripercuotono sul metabolismo energetico e l'osmoregolazione (risposta di stress secondaria), sul sistema immunitario, sulla crescita e sul sistema riproduttore (risposta di stress terziaria) (Mommsen et al., 1999).

Nella difesa allo stress il rilascio di catecolamine dà l'inizio ad una serie di risposte integrate che servono a migliorare gli effetti negativi dovuti ad uno stress acuto (shock termici, manipolazioni) sulla normale fisiologia dell'animale. In particolare le catecolamine servono ad ottimizzare le funzioni cardiovascolari e respiratorie del pesce e mobilizzano le riserve energetiche in risposta all'aumentata richiesta metabolica causata dallo stress stesso (Randall e Perry, 1992). Un secondo tipo di risposta che si osserva nei pesci, oltre a quella adrenergica appena descritta, è denominata risposta ipotalamo-pituitaria-interrenale (HIP) e culmina in un aumento di cortisolo nel plasma. Il cortisolo è, tra i corticosteroidi secreti all'attivazione della HIP, l'ormone fisiologicamente più importante e responsabile degli effetti dello stress (Sumpter, 1997).

Il sistema endocrino e il sistema immunitario sono strettamente legati tra loro e la comunicazione bidirezionale tra i due sistemi è essenziale nel mantenimento dell'omeostasi (Harris e Bird, 2000). Come nei mammiferi, anche nei pesci, lo stress è considerato tra i principali fattori responsabili dell'alterazione delle risposte immunitarie innate e acquisite (Ellis, 1981; Anderson, 1990; Barton e Iwama, 1991; Schreck, 1996; Harris e Bird, 2000). Diversi studi dimostrano che gli effetti dello stress sul sistema immunitario sono mediati dal sistema endocrino attraverso l'interazione con recettori specifici localizzati a livello leucocitario (Maule e Schreck 1990; Weyts et al., 1998; Vizzini et al., 2007) e l'azione di citochine (es. TNF- α , IL-1 β) (Engelsma et al., 2002). Il cortisolo infatti può avere effetti sulla distribuzione dei leucociti (Rogers e Matossian-Rogers, 1982), causare linfocitopenia (Pickering, 1984) e inibire la proliferazione leucocitaria (Grimm, 1985). Prove sperimentali condotte *in vitro* e *in vivo*, confermano che la somministrazione esogena di cortisolo è associata a fenomeni di linfocitopenia, apoptosi, riduzione della produzione di anticorpi e dell'attività di fagocitosi (Stave e Roberson, 1985; Carlson et al., 1993; Espelid et al., 1996; Weyts et al., 1998; Hou et al., 1999).

Le proteine dello shock termico (HSPs)

Quando un organismo è sottoposto a stress, tra i molti cambiamenti che avvengono nell'attività e nella fisiologia cellulare, quello forse più notevole è la produzione di una famiglia di proteine altamente conservate, note come proteine dello shock termico o Heat Shock Proteins (HSPs). Le HSP, oltre a costituire un valido sistema protettivo nei confronti di una vasta gamma di agenti stressogeni, rivestono un ruolo primario nei meccanismi difensivi degli organismi (Arya et al., 2007).

Nei mammiferi le HSP vengono generalmente classificate, sulla base del loro peso molecolare, sulla sequenza aminoacidica e sulla funzione (Nover, 1984), in sei distinte famiglie: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e le small HSP. Molti membri della famiglia delle HSP sono costitutivamente presenti nelle cellule mentre altri sono espresse solo in seguito a stress. Le forme costitutive rappresentano circa il 5-10% delle proteine totali presenti nella cellula in condizioni omeostatiche e svolgono la funzione di chaperoni molecolari (Hightower, 1991). Nel ruolo di chaperoni le proteine HSP svolgono la funzione di assicurare il raggiungimento e il mantenimento del corretto stato conformazionale delle catene polipeptidiche appena sintetizzate, dirigono l'assemblaggio di complessi multienzimatici, determinano il mantenimento di uno stato parzialmente ripiegato delle proteine favorendone

così il trasporto attraverso le membrane di differenti compartimenti cellulari e stabilizzano le proteine danneggiate formatesi a seguito di stress chimici o fisici facilitandone la rinaturazione e/o la degradazione (Gething e Sambrook, 1992; Feder e Hofmann, 1999; Hartl e Hayer-Hartl, 2002).

Le HSP possono anche essere indotte da un'ampia varietà di stimoli quali la temperatura, lo stress ossidativi, deficienze nutrizionali, raggi UV, molecole tossiche, infezioni virali e stati ischemici (Lindquist e Craig, 1988; Welch, 1993), ma anche da processi differenziativi in genere (Krone et al., 2003). Tutti questi agenti stressogeni che sono in grado di produrre modificazioni del corretto assetto proteico, causano un'alterazione dell'omeostasi che comporta l'induzione del gene per la trascrizione delle HSP, conferendo quindi alla cellula la capacità di stabilizzare e ripiegare correttamente le strutture proteiche e ristabilire quindi l'equilibrio tra sintesi, assemblaggio e degradazione delle proteine.

Da un punto di vista immunologico le HSP dei mammiferi hanno iniziato ad acquistare un interesse crescente grazie alle interazioni con i peptidi antigenici presenti a livello citoplasmatico. Le HSP risultano infatti in grado di legare i peptidi nel citoplasma regolandone il trasporto, la processazione e la presentazione all'MHC di classe I. Tali proteine possono complessare una vasta gamma di peptidi sia tumuroli che virali. L'importante ruolo delle HSP come chaperoni citosolici nella processazione dell'antigene è stata dimostrata dal fatto che le HSP, in particolare le HSP70, HSP90 e le grp 96, purificate da cellule tumorali o infettate da virus, sono in grado di stimolare una risposta da parte delle cellule T strettamente MHC di classe I-dipendente, promuovendo così l'attività citotossica dei linfociti T (Blachere et al., 1997; Binder et al., 2001). I meccanismi responsabili dell'azione adiuvante delle HSP, in un contesto di risposta immunitaria antitumorale e antivirale, sono stati individuati anche nelle cellule presentanti l'antigene (APC). Le APC possiedono vari recettori endocitari di superficie, attraverso cui inglobano l'antigene per la presentazione, che sono in grado di legare complessi extracellulari HSP-peptidi ed i peptidi così internalizzati vengono trasportati sino alle molecole MHC di classe I che provvederanno alla loro presentazione di superficie, fondamentale per il riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici antigeni-specifici (Delneste, 2004). Le HSP possono interagire con le APC anche attraverso altre tipologie di recettori superficiali, i quali risultano coinvolti nella trasmissione intracellulare di segnali in grado di indurre una maturazione aspecifica delle cellule dendritiche, regolando, in particolar modo, l'espressione di marker quali l'MHC di classe II, il CD86, il CD83 e il CD40, favorendo anche la migrazione delle cellule verso i linfonodi (Binder et al., 2004). Infine le HSP risultano in grado di stimolare la secrezione di citochine (TNF, IL-1, IL-12, IL-6 e GM-

CSF), chemochine (MCP-1 e MIP-1) ed ossido nitrico da parte di macrofagi e cellule dendritiche. Gli effetti delle HSP sui meccanismi della risposta immunitaria innata sembrerebbero dipendere dal legame che i chaperoni instaurano con i recettori Toll-like di superficie, favorendo in tal modo un'attivazione aspecifica delle APC e dei macrofagi (Binder et al., 2004).

Le HSP svolgono un ruolo chiave non solo nella modulazione della risposta immunitaria innata ed adattativa, ma anche nella maturazione timica dei linfociti T. Studi effettuati evidenziano come l'inibizione o la stimolazione della sintesi di HSP, effettuate in specifici stadi della differenziazione linfocitaria, costituiscano processi indispensabili nella maturazione funzionale dei linfociti T. In particolare le HSP70 sembrerebbero interagire con i segnali responsabili dell'espansione o delezione clonale degli stadi linfocitari immaturi (Lee et al., 1998).

La sintesi indotta di HSP in risposta ad agenti stressogeni è comunemente considerata come una caratteristica universale degli organismi viventi. A tal proposito risultano di notevole interesse gli studi effettuati da Hofmann e collaboratori (2000) su *Trematomus bernacchii*, un pesce teleosteo antartico adattato a vivere a temperature notevolmente basse. Questi, sottoponendo tale pesce ad un aumento della temperatura dell'acqua di circa 10°C, hanno dimostrato l'assenza di sintesi indotta di tutte le famiglie di HSP.

HSP70 e apoptosi

All'interno della famiglia delle proteine chaperoniche dello shock termico, l'HSP70 rappresenta il gruppo meglio caratterizzato in funzione dei molteplici ruoli che riveste nella funzionalità cellulare. Questa è una proteina presente in tutte le specie, la cui funzione è quella di favorire l'assemblaggio dei complessi multimerici proteici e, come chaperone molecolare, di facilitare il ripiegamento intracellulare delle proteine (Becker e Craig, 1994).

Nei mammiferi le proteine che lasciano il ribosoma possiedono una percentuale molto piccola della loro struttura già ripiegata e una parte allungata suscettibile all'aggregazione. L'HSP70 trova queste porzioni allungate e vi si lega proteggendole così dalle molecole circostanti, poi idrolizza l'ATP e utilizza tale energia per rilasciare la proteina quando questa è pronta a ripiegarsi (Freeman et al., 1995; Demand et al., 1998). Tali proteine sono infatti costituite da due domini funzionali: un dominio N-terminale (40kDa), altamente conservato, in grado di legare e idrolizzare ATP e un dominio C-terminale (25kDa), ricco in α -eliche e responsabile del legame con il substrato (Mosser et al., 2000). Le HSP70 sono inoltre caratterizzate da

isoforme con peso molecolare variabile tra 65 e 75kDa, sia costitutive che indotte da stress, ognuna delle quali presenta differenti modalità di espressione e localizzazione subcellulare (Mayer e Bukau, 2005).

Negli ultimi anni molti studi hanno mostrato come le proteine dello shock termico dei mammiferi, in particolare l'HSP70, giochino un ruolo importante nella modulazione del processo apoptotico (Samali e Orrenius, 1998; Garrido et al., 2001; Sreedhar e Csermely, 2004; Beere, 2005; Kim et al., 2006; Didelot et al., 2006). L'HSP70 infatti interagisce a vari livelli con la via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi ed attraverso la sua attività di chaperone inibisce la morte cellulare (Fig. 2). Come proteina anti-apoptosi, l'HSP70 dei mammiferi protegge le cellule dall'azione citotossica indotta dal TNF, dai monociti, dallo stress ossidativo, dagli agenti chemioterapici e dalle radiazioni (Jaattela et al., 1992; Jaattela e Wissing, 1993; Simon et al., 1995; Karlseder et al., 1996; Mosser et al., 1997). L'HSP70 inibisce la cascata apoptotica stimolata dall'ossido nitrico e dallo stress termico, che guida la traslocazione di Bax dal citoplasma al mitocondrio (Gotoh et al., 2004; Stankiewicz et al., 2005); impedisce la formazione dell'apoptosoma, inibendo il rilascio del citocromo c oppure legando la sua forma citosolica impedendone così il legame con Apaf-1 (Beere et al., 2000; Saleh et al., 2000); previene gli eventi tardivi della caspasi, come l'attivazione della fosfolipasi citosolica A2 e i cambiamenti nella morfologia nucleare e l'attivazione delle procaspasi 3 e 9 (Jaattela et al., 1998; Mosser et al., 2000); lega l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) rilasciato dai mitocondri in seguito a segnali di morte, limitando così la sua traslocazione nel nucleo (Ravagnan et al., 2001), infine mantiene l'integrità della membrana lisosomiale, prevenendo così il rilascio di catepsine nel citosol (Nylandsted et al., 2004). In contrasto con la sua funzione anti-apoptotica, l'iper-espressione dell'HSP70 determina un aumento eccessivo dei fenomeni apoptotici nel timo con conseguente immunodeficienza dovuta alla mancanza di linfociti maturi e può avere un ruolo anche nella carcinogenesi (Mosser et al., 2000; Garrido et al., 2003). L'importanza delle HSP nel regolare la maturazione e la differenziazione cellulare mediante modulazione dell'apoptosi, è stata evidenziata anche nella gametogenesi e nell'embriogenesi dei mammiferi, rivelando come la presenza di HSP70 in cellule germinali ed in differenti periodi embrionali, dalla blastulazione all'organogenesi, rappresenti un meccanismo chiave non solo nel normale sviluppo cellulare, ma anche nella protezione dagli stress ambientali (Luft et al., 1999; Liu et al., 2004).

Allo stato attuale delle conoscenze, le HSP70 sono state utilizzate finora negli organismi acquatici in qualità di biomarkers, non solo in un'ottica di monitoraggio ambientale (Sanders, 1993), ma anche nella valutazione dello stato generale di salute degli organismi (Bagni et al.,

2005). Al contrario, il ruolo delle HSP70 nella modulazione del sistema immunitario (Sakai et al., 2005) e nella sua acquisizione funzionale durante lo sviluppo risulta ancora ampiamente sconosciuto (Deane e Woo, 2003 e 2004).

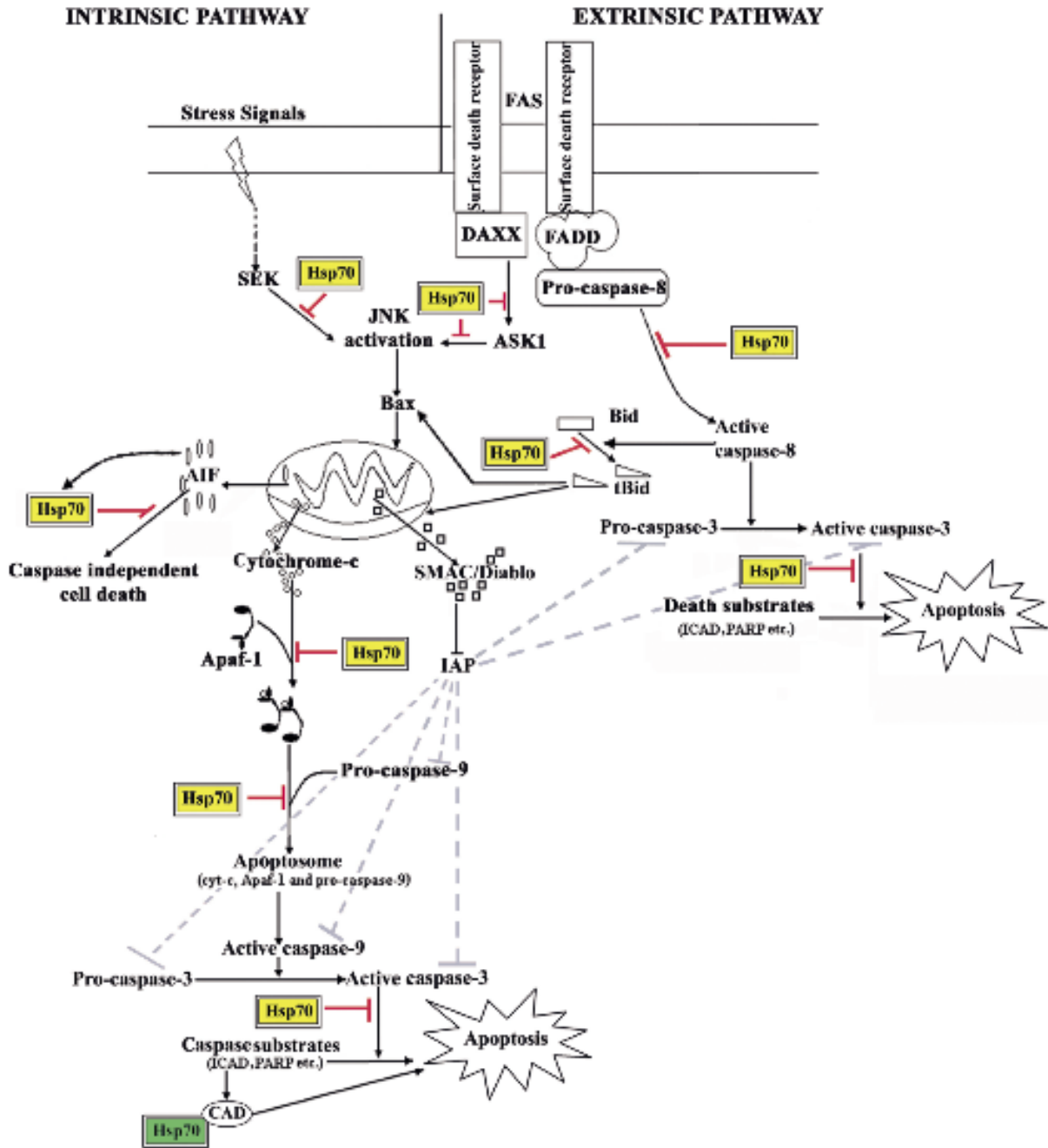


Figura 2. L'HSP70 (riquadro giallo) è generalmente una proteina anti-apoptosi poiché inibisce (linee rosse) molti steps del processo apoptotico. Comunque l'HSP70 (riquadro verde) possiede anche un ruolo pro-apoptosi in quanto viene richiesta per l'attività di CAD (Caspase-activated DNase) (da Arya et al., 2007).

SCOPO DEL LAVORO

Una conoscenza sul funzionamento del sistema immunitario della spigola *Dicentrarchus labrax* (L.) e di altri Teleostei riveste grande importanza sia per studi di tipo evolutivo che per la comprensione dei meccanismi molecolari che presiedono alla resistenza ai patogeni e allo stress. Negli allevamenti intensivi sia l'abbattimento del livello di stress che la vaccinazione risultano essere delle problematiche cruciali per aumentare la produttività senza incorrere a ingenti perdite ed eventuali contaminazioni ambientali da farmaci somministrati in vasca. Di conseguenza uno studio di entrambe le problematiche, spesso interconnesse, offre dei vantaggi dal punto di vista dell'allevatore che può quindi utilizzare le informazioni nelle pratiche di buon allevamento.

In questa tesi sono stati presi in esame due meccanismi fisiologici di adattamento a fattori di stress (naturale e indotto) in acquacoltura: il processo di apoptosi e l'espressione di una delle proteine dello shock termico, l'HSP70, allo scopo di ottenere degli indicatori di stress/adattamento in specie di pesci Teleostei che possano essere utilizzati sia in allevamento sia per il monitoraggio ambientale.

Inizialmente per valutare la localizzazione di possibili processi di selezione nel timo di diverse specie di Teleostei (**capitolo II**) è stato effettuato uno studio comparativo sulla presenza di cellule apoptotiche durante lo sviluppo del timo in specie di acque temperate (spigola, carpa, cernia). Inoltre, è stato valutato il fenomeno apoptotico nel timo di individui tardo-giovanili/adulti di specie di pesci Teleostei adattati a climi temperati e polari, allo scopo di valutare come la bassa temperatura (-1,5°C nei pesci antartici) possa far variare il fenomeno apoptotico.

Nel **capitolo III** sono stati condotti esperimenti di variazione termica su larve di spigola, durante il periodo critico di acquisizione della capacità di risposta immunitaria specifica (47-70giorni p.s.). Lo scopo è stato quello di valutare come la temperatura possa eventualmente indurre un fenomeno apoptotico/modificazioni in linfociti T localizzati in quegli organi linfatici maggiormente esposti all'esterno (timo, branchie e rene cefalico). Parallelamente, è stata studiata l'espressione delle HSP70, che è oramai noto essere coinvolta sia nel differenziamento sia nell'inibizione dell'apoptosi stessa.

Nel **capitolo IV** è stata valutata l'efficacia di cicli vaccinali contro *Vibrio anguillarum* sul sistema immunitario specifico e non specifico in giovanili di spigola dal 95° al 291 giorno p.s. allo scopo di ottenere una risposta immunitaria più efficiente rispetto alle procedure

utilizzate oggi dagli allevatori. Inoltre, è stata indagata la possibilità di utilizzare come indicatori di efficacia di risposta immunitaria sia l'analisi del processo di induzione apoptotica sia l'espressione dell'HSP70, sia altri metodi come il burst ossidativo o l'agglutinazione.

Infine, nel **capitolo V**, sono state raccolte tutte le informazioni emerse da questa tesi e sono state discusse in relazione alle loro possibili applicazioni in campo filogenetico e applicativo.

CAPITOLO II

L'apoptosi nel timo dei pesci Teleostei

Nicla Romano, Giuseppina Ceccarelli, Maria Rosaria Baldassini, Cecilia Caprera, Giovanna Marino, Jan H.M.W. Rombout**, Lucia Mastrolia e Luigi Abelli****

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Viterbo, Italia; (*) Istituto di Ricerca Applicata al Mare, Roma;(**) Dipartimento di Scienze Animali, Università dell'Agricoltura di Wageningen, Wageningen, Olanda;(***) Dipartimento di Biologia e dell'Evoluzione, Sezione di Anatomia Comparata, Università di Ferrara, Ferrara, Italia.

RIASSUNTO

Il timo dei pesci svolge un ruolo importante nel corretto sviluppo del sistema immunitario. In questo studio è stata indagata nel timo la presenza e la distribuzione delle cellule apoptotiche durante lo sviluppo del timo in differenti specie di pesci, mediante la tecnica della marcatura terminale *in situ* del DNA frammentato. Nella carpa (*Cyprinus carpio*), sono stati confermati i dati già esistenti durante lo sviluppo (Romano et al., 1999b) ed in seguito sono stati ulteriormente ampliati. Durante la 1° settimana post schiusa (p.s.), 3 giorni dopo la comparsa dell'abbozzo timico, le cellule apoptotiche appaiono diffuse nel parenchima. Dalla 1° alla 4° settimana p.s. il numero di queste cellule aumenta e risultano essere principalmente localizzate nella regione più esterna del timo. Dalla 4° fino alla 30°-40° settimana p.s. la misura del diametro dei linfociti non apoptotici varia seguendo la formazione del cortex e della medulla. Dalla 22° settimana p.s. le cellule apoptotiche diventano molto più numerose nel cortex che nella medulla e si comincia ad osservare un leggero aumento della densità di queste cellule al confine cortico-medullare. Nel timo di età tardo-giovanile (500 giorni p.s.) il numero delle cellule apoptotiche diminuisce, rimanendo localizzate preferenzialmente nel cortex. Nei pesci Teleostei Perciformi la distribuzione delle cellule apoptotiche è risultata simile a quella della carpa: i) nella spigola (*D. labrax*), in accordo con precedenti studi (Abelli et al., 1998), le prime cellule apoptotiche compaiono intorno al 35° giorno p.s.; ulteriori analisi hanno indicato un particolare ruolo delle regioni corticali e cortico-medullari. Infatti durante lo sviluppo le cellule apoptotiche dalla porzione più esterna del timo si localizzano anche più centralmente, nel bordo cortico-medullare (a 70 giorni p.s) e raramente nella medulla. Dal 165° giorno p.s. e nei pesci tardo-giovanili, il numero delle cellule apoptotiche diminuisce nel bordo cortico-medullare e rimane confinato prevalentemente nel cortex; ii) nella cernia (*Epinephelus marginatus*) il primo abbozzo timico appare al 15° giorno p.s., mentre le cellule apoptotiche cominciano ad apparire 48° giorno p.s. Durante tutto lo sviluppo del timo si osserva un incremento del numero di tali cellule soprattutto nel cortex e contemporaneamente decresce il valore medio dei diametri di tali cellule. Negli individui giovanili e tardo-giovanili le apoptosi rimangono più numerose nella regione corticale; iii) nei pesci antartici (timo adulto), dove il timo è estremamente adattato alle basse temperature (elevata vascolarizzazione e stroma fortemente compattato) le apoptosi sono molto più numerose (4-7 volte) rispetto a quelle delle specie di acque temperate e risultano distribuite principalmente nel cortex.

Nell'insieme questi dati suggeriscono che nel timo ci sia un comune processo di selezione negativa durante l'ontogenesi, che risulta principalmente ristretto al cortex e al bordo cortico-medullare. Anche nel pesce adulto il processo di selezione sembra essere attivo, ma confinato principalmente nella regione corticale.

INTRODUZIONE

I Teleostei rappresentano un gruppo eterogeneo di Vertebrati con appropriate caratteristiche di adattamento a differenti ambienti acquatici. Lo studio del sistema immunitario di questi organismi è motivo di interesse per i biotecnologi al fine di programmare ed ottimizzare specifici cicli di vaccinazione e per le analisi filogenetiche (Manning, 1994). Il sistema immunitario dei Teleostei ha molti aspetti di base in comune con quello dei Vertebrati, come la divisione in immunità specifica e non-specifica e la presenza di tessuti linfoidei e di cellule immunitarie come linfociti, macrofagi e granulociti (Ellis, 1997). Tra i tessuti linfoidei, il timo gioca un ruolo importante nella differenziazione dei linfociti T (Romano et al., 1999b, 2007; Picchietti et al., 2008). Nello sviluppo del timo dei pesci, come in quello dei mammiferi, sono attivi processi di selezione cellulare volti ad eliminare cellule in eccesso e cellule potenzialmente pericolose, come i linfociti autoreattivi (Abelli et al. 1998). A tal fine, come osservato nei mammiferi (Hengartner, 2000), e recentemente, nei vertebrati inferiori (Ottavini et al., 1997; Malikova et al., 2007), l'organismo ha messo a punto un efficace programma molecolare di morte cellulare (apoptosi) in cui l'attivazione delle caspasi è risultata essere l'esecutore centrale. L'attivazione delle caspasi non implica la degradazione della totalità delle proteine cellulari (Hengartner, 2000), piuttosto queste vanno a tagliare, in maniera selettiva, determinate proteine bersaglio solitamente in una o più posizioni della loro sequenza primaria. Una di queste proteine sembra attivare la nucleasi responsabile della frammentazione del DNA. Wyllie (1980) descrisse per la prima volta l'azione di questa nucleasi che taglia il DNA genomico in nucleosomi generando frammenti di 180-200 paia di basi o multipli. La presenza di questi frammenti di DNA è stata ampiamente utilizzata come indicatore della presenza di fenomeni di apoptosi (Hengartner, 2000). In generale i fenomeni apoptotici, alla base della selezione dei linfociti, possono essere indotti da traumi meccanici, chimico-fisici e patologici. Nei pesci, uno dei fattori maggiormente in grado di indurre apoptosi nelle cellule del timo, è la temperatura, probabilmente a causa della posizione

superficiale dell'organo stesso. I timociti rispondono al danno genomico, dovuto ad uno stress da temperatura, attraverso una complessa cascata di attivazioni, che include: l'arresto del ciclo cellulare, l'attivazione trascrizionale e post-trascrizionale di una serie di geni fra cui anche quelli coinvolti nella riparazione del DNA e, in alcune circostanze, l'innesco del programma di morte cellulare. Di conseguenza, i pesci Teleostei hanno evoluto dei meccanismi di controllo per limitare i danni da stress termico, come ad esempio la produzione delle proteine dello shock termico (Samali e Orrenius, 1998; Garrido et al., 2001; Sreedhar e Csermely, 2004; Beere, 2005; Kim et al., 2006; Didelot et al., 2006).

I pesci antartici vivono nelle acque polari, un ambiente estremo in cui la temperatura oscilla tra 1 e -2°C, i loro tessuti sono protetti dal rischio di congelamento grazie alle elevate concentrazioni di ioni nei fluidi corporei (Eastman e De Vries, 1996) e alla presenza di sostanze circolanti anti-congelamento prodotte dal fegato (Chen et al., 1997). Dal momento che i pesci antartici sono adattati allo stress esercitato dalle basse temperature, potrebbe essere interessante valutare l'andamento del numero delle cellule apoptotiche nel timo.

Il presente studio ha quindi lo scopo di effettuare uno studio generale sull'andamento dell'apoptosi durante lo sviluppo del timo comparando fra di loro organismi appartenenti a diversi ordini (Perciformi e Cipriniformi) e organismi adattati a vivere a diverse temperature (pesci di acque temperate e pesci antartici).

MATERIALI E METODI

Preparazione dei campioni

Le larve, i giovanili e i pesci adulti (18-22 mesi) di acque temperate, in base alla specie, sono stati mantenuti a differenti temperature dell'acqua (23°C per la carpa; 16°C per la spigola; 17-18°C per la cernia) fino al campionamento. I pesci antartici (22-26 mesi) sono stati pescati e campionati direttamente *in loco* e trasportati in Italia dopo la fissazione. Gli esemplari sono stati uccisi con un overdose di tricaina-metansulfonato (MS222, Sigma), alla dose di 1mg/ml e le larve o i timi dissezionati sono stati fissati in Bouin (Mazzi, 1977) e successivamente inclusi in paraffina. Tale tecnica prevede le seguenti fasi:

- Giorno I: fissazione del pezzo per 7 ore nel fissativo Bouin a 4°C e successivo passaggio in alcool etilico 80% per tutta la notte a 4°C;

- Giorno II: passaggi successivi di circa 2 ore ciascuno in alcool etilico 90% a 4°C e uno per tutta la notte a 4°C;
- Giorno III: passaggi successivi di circa 3 ore ciascuno in alcool etilico 90% a 4°C e uno per tutta la notte a 4°C;
- Giorno IV: passaggi in alcool etilico 100% a temperatura ambiente (3 cambi da 30 minuti ciascuno), in Toluene a temperatura ambiente (2 cambi da 15 minuti ciascuno), in paraffina-toluene (45 minuti), in paraffina I (45 minuti), in paraffina II (45 minuti) e in paraffina d'inclusione (30 minuti) in stufa.

Le sezioni trasversali di timo con uno spessore di circa 5 µm, sono state preparate con un microtomo a slitta Reichert-Jung, raccolte su vetrini trattati con 3-Aminopropiltriethossilene al 2% (Sigma) ed asciugate in stufa a 37°C per una notte. I vetrini seriali così ottenuti, sono stati utilizzati per effettuare colorazioni e reazioni di apoptosi.

Apoptosi (metodo ISEL)

Il timo di ogni specie analizzata ai diversi stadi, fissati in Bouin ed inclusi in paraffina (secondo le metodiche precedentemente descritte), sono stati processati per lo studio dell'incidenza dell'apoptosi mediante la tecnica della marcatura terminale *in situ* del DNA frammentato (ISEL). Tale tecnica, infatti, permette di evidenziare cellule con DNA frammentato (apoptotiche) su sezioni istologiche di tessuti inclusi in paraffina (Gravieli, 1992).

Le sezioni sparaffinate mediante immersione in toluene, sono state reidratate in serie decrescenti di alcool etilico (100%, 90%, 70%) e sciacquate per 5 minuti in tampone T.E. (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8); successivamente, sono state incubate per 20 minuti con tampone T.E. contenente Proteinasi K (10-20 µg/ml) (da *Tritirachium album* 17.5 U/mg; Sigma, U.S.A.); quindi sono state sciacquate in acqua distillata (D.W.) ed incubate per 5 minuti in D.W. contenente il 2% di H₂O₂ per neutralizzare le perossidasi endogene. Dopo vari risciacqui in D.W., le sezioni sono state lavate in tampone TDT (Tris 30 mM, sodio cacodilato 140 mM, cloruro di cobalto 1.75 mM, pH 7.2) ed incubate per 2 ore a 37°C con il tampone TDT contenente la miscela di marcatura del DNA composta da 0.3 I.U./µl di Terminal deossinucleotide Trasferasi (Promega), 2 µM di digoxigenina-11-dUTP (2'-deossiuridina-5'-difosfato sale tetralitio; Roche) e 17 µM di dATP (2'-deossiadenosina-5'-trifosfato sale di sodio; Pharmacia). I controlli positivi sono stati effettuati impiegando la deossiribonucleasi I (DNAsi I) (da pancreas bovino, Pharmacia; 1µg/ml disciolta in Tris 10

mM, cloruro di sodio 10 mM, cloruro di magnesio 10mM, cloruro di potassio 25 mM, cloruro di calcio 0.1 mM, pH 7.4) per 15 minuti a temperatura ambiente (T.A), prima dell'incubazione con la miscela di marcatura del DNA. La Terminal trasferasi è stata omessa nelle sezioni impiegate come controllo negativo.

Successivamente le sezioni sono state lavate per 25 minuti, in continua agitazione, in tampone SSC (citrato di sodio 30 mM, cloruro di sodio 300mM, pH 7), sciacquate in D.W. e lavate in TBS (5.6 mM, pH 7.5). Poi sono state incubate per 20 minuti a T.A. in TBS contenente il 3% di albumina sierica bovina (BSA, Sigma), sciacquate in TBS ed incubate per 90 minuti a T.A. con siero di capra anti-digoxigenina coniugato con perossidasi (Fab Fragment, Roche) diluito 1:200 in TBS. Dopo vari lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate per 5 minuti in Tris 50 mM contenente 0.02% di diaminobenzidina (Sigma) e 0.015% di H₂O₂. Infine sono stati effettuati vari lavaggi in TBS, acqua di rubinetto e D.W., quindi le sezioni sono state disidratate in serie crescenti di alcool etilico (70%, 90%, 100%) e chiuse con vetrini portaoggetto per essere esaminate al microscopio ottico.

Per ogni specie sono state processate ed esaminate 10 sezioni di timo non consecutive di 5 esemplari diversi per stadio. Alcune sezioni sono state controcolorate con Emallume di Harris (Sigma).

Analisi quantitativa e statistica

I Vetrini utilizzati nelle reazioni di apoptosi sono stati osservati con il microscopio Axioskope 2 plus (ZEISS), collegato ad un sistema computerizzato di analisi di immagine, Axiocam KS 300 (ZEISS). Per ogni timo di ciascuna specie (5 individui per stadio), è stato calcolato il numero di cellule positive (solo quelle nucleate) per l'unità di superficie di 100.000 μm^2 , e le misure ottenute sono state raggruppate per ottenere valori cumulativi delle medie e della deviazione standard (SD). Le misure del diametro cellulare (asse maggiore) sono state condotte in 2 individui per ogni specie e i risultati numerici sono stati analizzati mediante il test del *t*-Student.

Istologia

Le sezioni sparaffinate mediante immersione in toluene e reidratate in serie decrescenti di alcool etilico (100%, 90%, 70%) sono state sottoposte a colorazione Tricromica di Mallory, May-Grünwald/Giemsa, Ematossilina-Eosina, secondo Pappenheim (Mazzi, 1977).

RISULTATI

APOPTOSI DURANTE LO SVILUPPO DEL TIMO

Cipriniformi (Cyprinus carpio)

Il primo abbozzo timico è stato evidenziato intorno al 2° giorno p.s. in posizione dorsale rispetto all'arco branchiale e al 5° giorno p.s. le cellule del reticolo epiteliale sono state localizzate in prossimità di numerose cellule linfoidi e pochi macrofagi (Fig. 1a). In questo stadio le rare cellule apoptotiche sono state osservate nella porzione centrale/esterna del timo (Fig. 1b) ed il loro diametro risulta più piccolo rispetto a quello delle cellule non apoptotiche (Fig. 2a). Dalla 2° alla 3° settimana p.s. il timo diventa un organo in cui è possibile osservare differenti tipi di cellule epiteliali e due regioni una corticale ed una medullare entrambe ricche di cellule simili a linfociti con diametri tra loro differenti (Fig. 2a). Tuttavia, il completo differenziamento in cortex, medulla e bordo cortico-medullare si evidenzia solo alla 4° settimana. Dalla 2° alla 4° settimana, le cellule apoptotiche sono state localizzate principalmente nella regione esterna/corticale del timo (Fig. 1c, d e Tab. 1a), mentre alcune apoptosi sono state osservate anche nella medulla. Dalla 4° alla 22° settimana p.s. numerose cellule apoptotiche si localizzano, oltre che nel cortex, anche nel bordo cortico-medullare (Fig. 1e). Il diametro delle cellule apoptotiche risulta sempre più piccolo nel cortex e nel bordo cortico-medullare rispetto alla medulla ($P < 0.01$) (Fig. 2a). Negli esemplari giovanili/adulti (18-24 mesi), il timo è posizionato nella porzione più interna della camera branchiale, risultandone completamente separato mediante l'epitelio mucosale e il tessuto connettivo (Fig. 3a). Le cellule apoptotiche sono state osservate principalmente nel cortex come cellule isolate (Fig. 3b, Tab. 1b).

Perciformi

Dicentrarchus labrax

Il primo abbozzo timico appare dorsalmente rispetto alla camera branchiale intorno al 27° giorno p.s. e dal 35° giorno p.s. al 49°-50° giorno p.s. alcune cellule apoptotiche vengono individuate nella porzione centrale/esterna dell'organo (Fig. 1f, g), inizialmente risultano isolate ma, durante lo sviluppo dell'organo, si riuniscono in piccoli gruppi (Tab. 1a; Fig. 1h). I timociti apoptotici della regione esterna/centrale risultano sempre più piccoli e numerosi rispetto a quelli medullari ($P < 0.05$) (Fig. 2b). Anche le cellule non apoptotiche simili ai

linfociti mostrano un diametro più grande nella medulla rispetto a quelle del cortex ($P < 0.05$) (Fig. 2b). Intorno al 70° giorno p.s., comincia ad evidenziarsi il bordo cortico-medullare e le cellule apoptotiche diventano più numerose rispetto ai primi stadi e più concentrate nel cortex e nel bordo cortico-medullare rispetto alla medulla (Fig. 1h, i; Tab. 1a). Il diametro delle cellule apoptotiche è più piccolo nel cortex e nel bordo cortico-medullare che nella medulla ($P < 0.05$) (Fig. 2b). Nelle spigole giovanili, la distribuzione delle cellule apoptotiche non varia (Fig. 1j), tuttavia, dal 165° giorno p.s., il numero di tali cellule diminuisce in tutto il timo (Tab. 1a). Negli esemplari giovanili/adulti (18-24 mesi), il timo è completamente rivestito da tessuto connettivo e da cellule epiteliali limitanti (Fig. 3d). Il numero delle cellule apoptotiche diminuisce e tali cellule risultano essere distribuite principalmente nel cortex (Fig. 3c, d) con diametro più piccolo rispetto ai timociti non apoptotici ($P < 0.05$) (Fig. 2b; Tab. 1b).

Epinephelus marginatus

Dal 15° giorno p.f., quando è presente l'abbozzo del timo (Fig. 1k), fino al 48° g. p.s. non sono state evidenziate cellule apoptotiche. Al giorno 48° p.s. è possibile distinguere una zona corticale da una medullare ed alcune cellule apoptotiche sono state osservate nel bordo tra cortex e medulla ed alcune, molto rare, nella medulla (Fig. 1l). Le cellule apoptotiche presenti nella regione corticale sono risultate di dimensioni ridotte ($P < 0.01$) (Fig. 2c) rispetto a quelle situate nella regione cortico-medullare ($2,8 \pm 0,1$) e rispetto a quelle delle altre regioni e dei timociti normali ($P < 0.01$) (Fig. 1c). A giorni 78-80 p.s., le cellule apoptotiche, isolate o in piccoli gruppi di 2-4 cellule, sembrano essere distribuite preferenzialmente nel cortex piuttosto che nella medulla (Fig. 1n). A 110 giorno p.h., le cellule in apoptosi sono divenute molto più numerose rispetto agli stadi precedenti ed ancor più concentrate nel cortex (in gruppetti di 2-3 cellule) e nel bordo cortico-medullare (Fig. 1o) che nella medulla. Circa a 24 mesi il timo risulta essere completamente separato dalla camera branchiale attraverso la mucosa (Fig. 3e). Le cellule apoptotiche sono regolarmente distribuite nel cortex, isolate o in gruppi (2-3 cellule) (Fig. 3e, f).

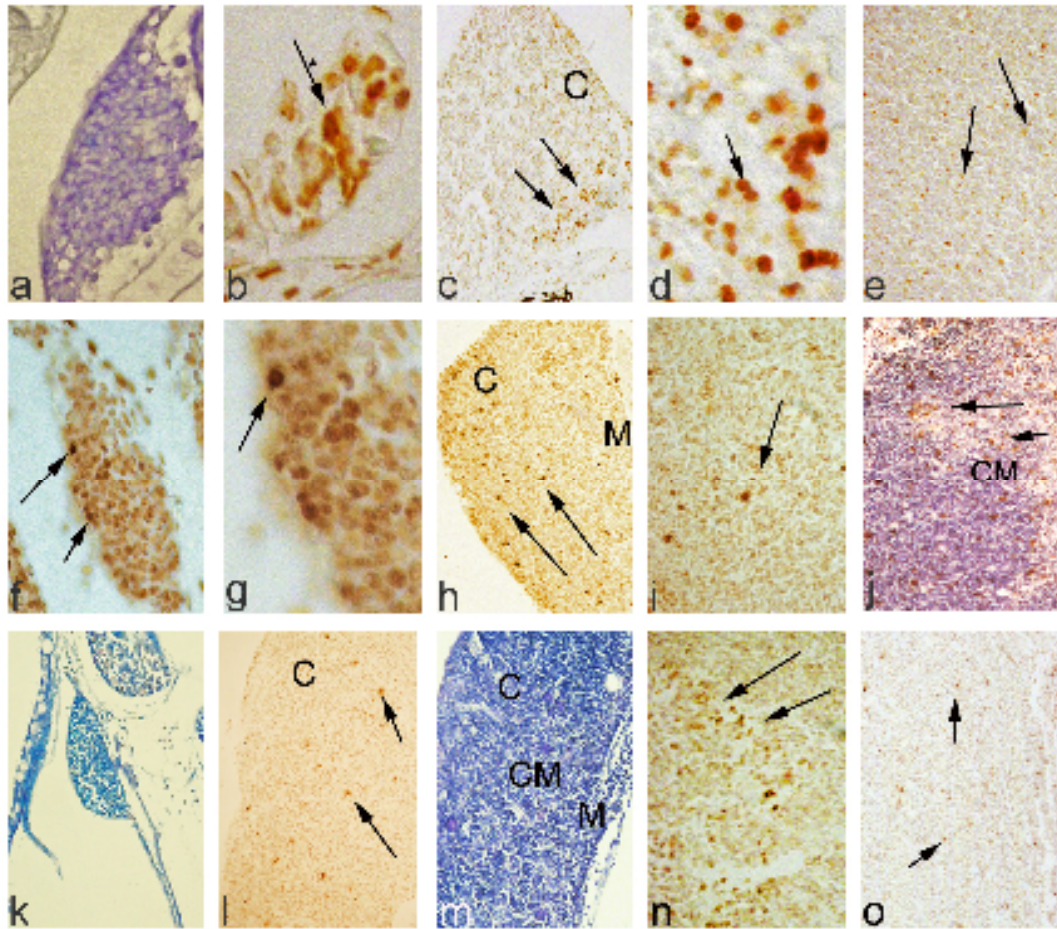


Figura 1. Apoptosi nel timo in sviluppo di specie di acque temperate. (a-e) timo della specie *C. carpio*. Ad una settimana **(a)** colorazione Pappenheim, (Bar= 40 μ m) le prime cellule apoptotiche si localizzano nella regione centro/periferica **(b)**, (Bar= 30 μ m). **(c)** A 4 settimane, le apoptosi (freccie) sono localizzate prevalentemente nel cortex e nel bordo cortico-medullare (Bar= 50 μ m), in cellule singole o raggruppate **(d)**, (freccie; Bar= 20 μ m). **(e)** A 22 settimane il timo è oramai completamente sviluppato ed le cellule apoptotiche sono sparse nel cortex (freccie; Bar= 50 μ m). **(f-j)** timo della specie *D. labrax*. **(f)** A 45 giorni p.s. il timo sporge nella camera branchiale e mostra cellule apoptotiche (freccie, Bar=40 μ m) principalmente localizzate nella porzione più esterna dell'organo **(g)**, (freccia; Bar= 20 μ m). **(h)** A 70 giorni p.s. si osserva il primo differenziamento del bordo cortico-medullare e le apoptosi (freccie) sono preferenzialmente distribuite nel cortex (C) che nella medulla (M) (Bar = 60 μ m); **(i)** in un ingrandimento di (h) è possibile osservare che alcune apoptosi sono localizzate anche nel bordo cortico-medullare in formazione, come gruppi di 2-3 cellule (freccia, Bar= 35 μ m). **(j)** A 120 giorni p.s il timo presenta un bordo cortico/medullare (CM) ben sviluppato (colorazione di Harris su ISEL) e le apoptosi sono concentrate proprio in questa zona (freccie, Bar= 60 μ m). **(k-o)** Timo della specie *E. Marginatus*. **(k)** A 20 giorni il timo sporge nella camera branchiale ed è ricco di elementi linfoidi (colorazione Pappenheim; Bar=160 μ m). **(l)** A 48 giorni p.s. le cellule apoptotiche (freccie) sono localizzate prevalentemente nella regione corticale (C), (Bar= 60 μ m). **(m)** A 78 giorni p.s. si osserva la presenza di un bordo cortico-medullare (CM) distinto dal cortex (C) e dalla medulla (M) (colorazione di Pappenheim, Bar= 80 μ m) nella stessa data **(n)**, si osservano numerose cellule apoptotiche (freccie) localizzate proprio nel bordo C/M (Bar= 30 μ m). **(o)** A 120 giorni numerose cellule apoptotiche risultano evidenti nel cortex (freccie, Bar= 40 μ m).

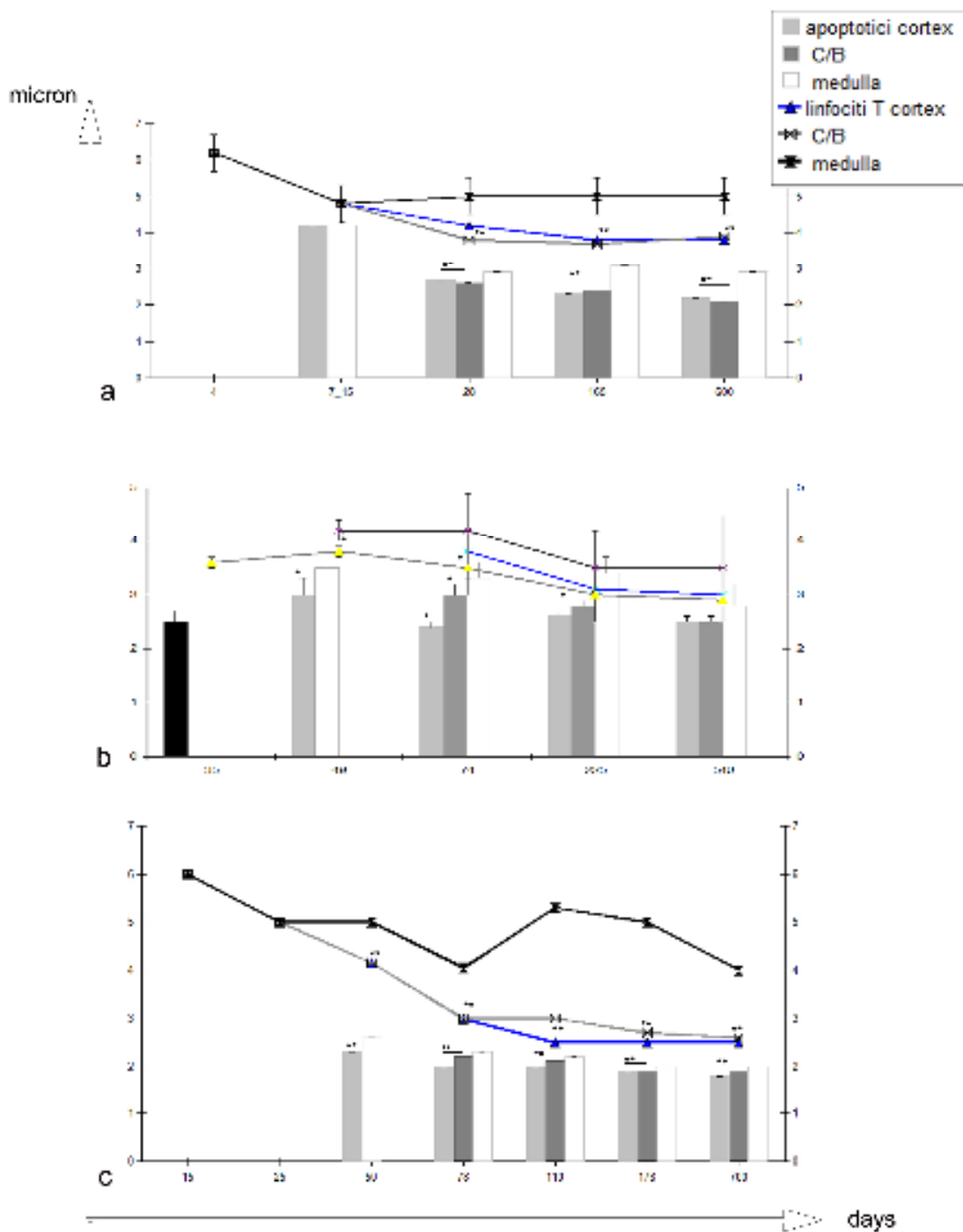


Figura 2. Risultati della misurazione dei diametri maggiori (μm) delle cellule apoptotiche (barre) e non apoptotiche (linee) del timo di *C. carpio* (a), *D. labrax* (b) e *E. marginatus* (c) nella zona piú esterna (Cortex), nella zona mediana (Bordo Cortico-Medullare) e nella zona piú interna (Medulla). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (barre di deviazione) del numero di cellule analizzate (N=100) su sezioni di timo (N=10) non contigue. Differenza significativa della zona Corticale e/o la zona del Bordo C./M. Vs la zona Medullare ($P < 0.01$). Differenza significativa della zona Corticale e/o la zona del Bordo C./M. Vs la zona Medullare ($P < 0.05$)*. Test di *t*-Student per dati non appaiati (a due code) per varianze omogenee.**

Perciformi polari

Trematomus bernacchii

In *Trematomus bernacchii*, il timo è localizzato nella porzione dorsale di entrambe le camere branchiali, come in altre specie di pesci di acque temperate. Tale organo può essere diviso in una regione corticale, in cui la parte più esterna si trova a stretto contatto con la mucosa della faringe ed in una regione subcapsulare, in cui la parte più interna risulta separata da un singolo strato di cellule epiteliali. Il timo è appiattito, con lobi incompleti e difficilmente distinguibile con la normale istologia in una regione corticale (corrispondente alla porzione timica riversa verso la mucosa branchiale) ed in una regione medullare (corrispondente alla porzione subcapsulare che si trova nella porzione timica interna) come risulta evidente nei pesci di acque temperate. Tuttavia l'analisi del diametro medio dei linfociti ha rilevato che i linfociti corticali sono più piccoli (3.12 ± 0.99) rispetto a quelli mediani ($P < 0.05$) e della medulla ($P < 0.01$) (Fig. 4). L'organo risulta estremamente vascolarizzato da capillari sanguigni (Fig. 3g). Le cellule apoptotiche si osservano soprattutto nella regione più esterna dell'organo (Tabella 1b) sottoforma di gruppetti di 2-3 cellule, spesso come allineate (Fig. 3h) con diametri minore rispetto alle circostanti (Fig. 4). Anche nella medulla sono presenti alcune cellule apoptotiche (non mostrato, Tabella 1b) di diametro maggiore rispetto a quelle corticali ($P < 0.01$) (Fig. 4); talvolta, si può riscontrare la presenza di piccole cellule apoptotiche immediatamente al di fuori della capsula connettivale.

Trematomus pennelli

In *Trematomus pennelli*, il timo è localizzato nella porzione dorso-laterale di entrambe le camere branchiali. Anche in questa specie è possibile distinguere una regione corticale a stretto contatto con la spessa mucosa della faringea ed una regione subcapsulare/medullare, in cui la parte più interna risulta separata da un singolo strato di cellule epiteliali seguite da uno spesso strato connettivale (Fig. 3i). Le cellule localizzate nel cortex hanno un diametro medio di 2.98 ± 0.67 che è risultato significativamente minore rispetto a quelle centrali (bordo cortico-medullare, $P < 0.05$) e medullari ($P < 0.01$). (Fig. 4). Le cellule apoptotiche sono state osservate nella regione più esterna dell'organo (cortex) (Tabella 1b) sottoforma di gruppetti o cellule singole (Fig. 3j) ed a livello del confine reticolo-medullare come singole cellule. Nella medulla le poche cellule apoptotiche sono presenti concentrate vicino ai capillari. I diametri cellulari delle cellule apoptotiche e non sono mostrati in Fig. 4, dove si osserva che il diametro delle cellule apoptotiche è minore delle cellule non apoptotiche.

Trematomus hansonii

In *Trematomus hansonii*, il timo è localizzato nella porzione dorsale di entrambe le camere branchiali. La regione corticale è molto sviluppata e la parte più esterna di questa si trova a stretto contatto con la spessa, pluristratificata, mucosa faringea (Fig. 3k). I linfociti localizzati più esternamente (cortex) posseggono un diametro di 3.01 ± 0.97 che è risultato significativamente minore di quelli nella zona centrale ($P < 0.05$) e medullare ($P < 0.01$) (Fig. 4). Le cellule apoptotiche sono state osservate con densità elevata nella regione esterna-corticale del timo (Tabella 1b) sottoforma di cellule singole oppure gruppetti di due-tre cellule (Fig. 3l), con diametro di 2.21 ± 0.41 , ed a livello del confine reticolo-medullare come singole cellule (non mostrato) con diametro di 2.30 ± 0.32 . Nella medulla le poche cellule apoptotiche sono presenti concentrate vicino ai capillari (non mostrato; Tabella 1b) con un diametro maggiore rispetto a quelle del cortex (2.58 ± 0.84 ; $P < 0.01$) (Fig. 4).

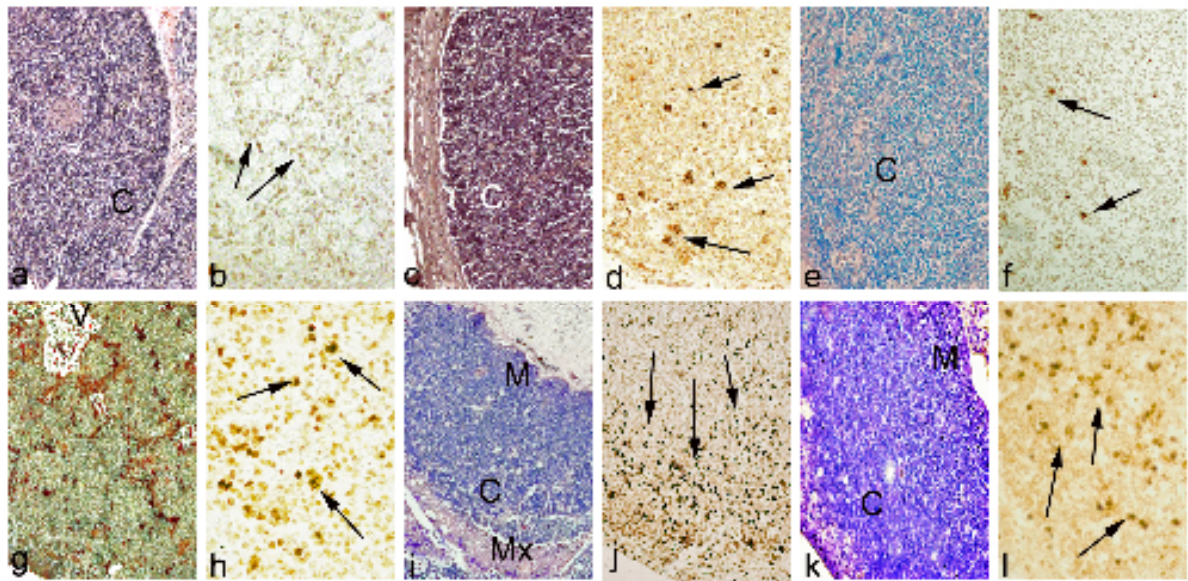


Figura 3. Apoptosi nel timo di specie tardo-giovanili/adulti di acque temperate (a-f) e polari (g-l). (a-b) timo della specie *C. carpio*. A 20 mesi (a), colorazione Pappenheim, (barra= 70 μ m) il timo è completamente incapsulato e nella sua parte corticale (rettangolo) presenta molte cellule apoptotiche (freccie) situate intorno a capillari (b), (barra= 35 μ m). (c-d) Timo della specie *D. labrax*. A 20 mesi il timo della spigola è completamente incapsulato e le cellule della regione corticale (C) risultano intensamente reattive all'ematossilina (colorazione, Ematossilina/eosina, (barra= 45 μ m). (d) Nello stesso stadio le apoptosi (freccie) sono localizzate prevalentemente nel cortex in cellule singole o più spesso raggruppate (freccie, barra= 38 μ m). (e-f) Timo della specie *E. Marginatus*. A 22 mesi il timo è oramai completamente separato dalla camera branchiale ed il cortex (C) è molto esteso e vascolarizzato (barra= 45 μ m) e (f) le apoptosi sono concentrate proprio in questa zona (freccie) (barra = 35 μ m).

(g-h) Timo della specie *T. bernacchii*. (g) A 24 mesi il timo è fortemente vascolarizzato (V) e numerosi eritrociti sono evidenziabili nei vasi (rossi) (colorazione tricromica di Mallory; barra=60 μ m). (h) Nel cortex, numerose apoptosi sono evidenziabili (freccie) (barra=35 μ m). (i-j) Timo della specie *T. pennellii*. (i) A 24 mesi il timo è incapsulato da uno strato di cellule epiteliali limitanti e nella porzione corticale (C) anche da strati di cellule mucosali (Mx) (barra= 80 μ m). (j) Le cellule apoptotiche sono numerose e localizzate prevalentemente nella regione corticale (freccie, barra= 35 μ m). (k-l) Timo della specie *T. hansonii*. (k) Il timo è completamente incapsulato da cellule epiteliali limitanti e nella porzione corticale (C) presenta numerosi strati di cellule mucosali (M, medulla, colorazione di Pappenheim, barra=70 μ m). (l) Numerose cellule apoptotiche risultano evidenti nel cortex (freccie, barra= 35 μ m).

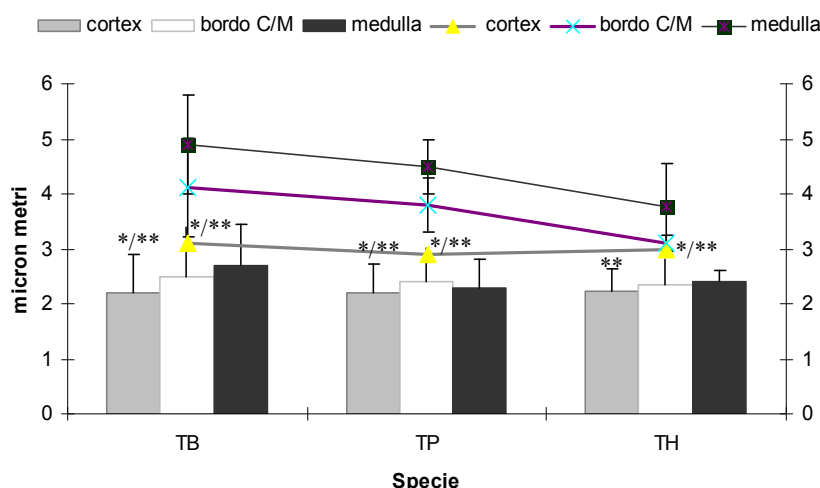


Figura 4. Risultati della misurazione dei diametri maggiori (μm) delle cellule apoptotiche (barre) e non apoptotiche (linee) del timo di *T. bernacchii* (TB), *T. pennelli* (TP) e *T. hansonii* (TH) nella zona più esterna (Cortex), nella zona mediana (Bordo Cortico-Medullare) e nella zona più interna (Medulla). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (barre di deviazione) del numero di cellule analizzate (N=250) su sezioni di timo (N=5) non contigue. Differenza significativa tra la zona Corticale e la zona del Bordo C./M. ($P < 0.05$)* e tra la zona Corticale e la zona Medullare ($P < 0.01$)**. Test di *t*-Student per dati non appaiati (a due code) per varianze omogenee.

A)

| | Stadio larvale | | Comparsa bordo | | | | Stadio avanzato | | | |
|----------------------|----------------|---------------|----------------|--------------|--------------|----------------|-----------------|----------------|--------------|----------------|
| | gg | stroma | gg | cortex | bordo | medulla | gg | cortex | bordo | medulla |
| <i>C. carpio</i> | 7-15 | 1 \pm 0,2 | 28 | 7 \pm 0,5 | 8 \pm 0,5 | 1,8 \pm 0,05 | 165 | 20 \pm 0,5 | 60 \pm 10 | 0,1 \pm 0,05 |
| <i>E. marginatus</i> | 15 | 1,5 \pm 0,1 | 78 | 14 \pm 0,5 | 23 \pm 0,1 | 4 \pm 0,3 | 178 | 9,7 \pm 0,43 | 18 \pm 0,5 | 3 \pm 0,5 |
| <i>D. labrax</i> | 35 | 3 \pm 1 | 74 | 15 \pm 0,5 | 25 \pm 5 | 5 \pm 0,5 | 225 | 10,2 \pm 0,3 | 13 \pm 0,1 | 1 \pm 0,01 |

B)

| | giovanile/adulto | | | |
|----------------------|------------------|----------------|--------------|----------------|
| | anni | cortex | bordo | medulla |
| <i>C. carpio</i> | 1,5 | 15 \pm 2,2 | 7 \pm 3 | 2,1 \pm 0,5 |
| <i>E. marginatus</i> | 1,9 | 8 \pm 0,04 | 3 \pm 0,05 | 1,5 \pm 0,05 |
| <i>D. labrax</i> | 1,6 | 9 \pm 0,5 | 4 \pm 0,5 | 1,04 \pm 0,5 |
| <i>T. bernacchii</i> | 2 | 58 \pm 14* | 38 \pm 14* | 28 \pm 11* |
| <i>T. pennelli</i> | 2,2 | 59 \pm 6* | 38 \pm 12* | 29 \pm 0,6* |
| <i>T. hansonii</i> | 1,9 | 80 \pm 10,5* | 60 \pm 2* | 30 \pm 10* |

Tabella 1. Risultati della misurazione della densità delle cellule apoptotiche del timo di diverse specie di pesci in sviluppo (A) e in individui tardo-giovanili/adulti (B). Il numero delle cellule apoptotiche è espresso come media \pm deviazione standard del conteggio delle positive alla reazione ISEL in 100.000 μm^2 nel timo larvale (stroma) o, al primo differenziamento di tutte le regioni timiche: cortex, bordo cortico-medullare e medulla. (*) Significativamente maggiore *Vs* specie di acque temperate ($P < 0.01$), Test di *t*-Student per dati non appaiati (a due code) per varianze omogenee.

DISCUSSIONE

Nei mammiferi, le principali vie di trasduzione ed attivazione del segnale apoptotico sono la via estrinseca, regolata da segnali extracellulari, e la via intrinseca, regolata da segnali intracellulari (Albert et al., 1998). Le due vie sono ritenute non esclusive e spesso vengono contemporaneamente attivate; entrambe convergono verso l'attivazione dei medesimi enzimi effettori, le caspasi (Hengartner, 2000). La via estrinseca viene regolata nei mammiferi dall'attivazione di una ben definita famiglia di recettori trans-membrana come la fosfotidil-serina (PS) e il TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) (Fadok et al., 1992; Benedict et al., 2003). Anche nei pesci (spigola e carpa) è stata evidenziata la presenza di apoptosi nel timo (Abelli et al. 1998; Romano et al., 1999b) e recentemente, è stato sequenziato il TNF in diverse specie (Hirono et al., 2000; Laing et al., 2001; Bobe et al., 2001; Zou et al., 2002; Garcia-Castillo et al., 2002; Zou et al., 2003; Ingerslev et al., 2006; Praveen et al., 2006; Stolte et al., 2008). È noto che il processo di apoptosi è caratterizzato, oltre che dall'espressione del TNF di membrana, anche dalla frammentazione del DNA nucleare con conseguente produzione di frammenti cellulari rivestiti di membrana (Lewin, 2008). I macrofagi sono in grado, attraverso il legame del TNF e/o del PS, di riconoscere le cellule apoptotiche e di fagocitarle (Benedict et al., 2003). In questo modo le cellule in apoptosi, che contengono fattori potenzialmente infiammatori, vengono rapidamente eliminate dalle cellule deputate alla fagocitosi (macrofagi) senza che venga indotto il processo infiammatorio stesso (Savill 1997, 1998).

L'apoptosi gioca un ruolo importante nello sviluppo delle cellule T intratimiche attraverso l'eliminazione dei precursori delle cellule T autoreattive (selezione negativa) (Cohen, 1991; Golstein et al., 1991). Il timo dei pesci Teleostei si è rivelato, similmente ai mammiferi, un organo linfatico primario per la maturazione dei linfociti T (Abelli et al., 1996, Romano et al., 1999, 2007; Picchietti et al., 2008; Rombout et al., 2005) e suddivisibile in regione corticale (rivolta verso la camera branchiale), cortico/medullare e medullare. Tali suddivisioni provengono da studi sulle componenti epiteliali (Romano et al., 1997a, 1999b), dall'analisi della taglia cellulare (Abelli et al., 1996) e dalla presenza di marcatori molecolari come il TcR β (Romano et al., 2007), CD8 e CD4 (Buonocore et al., 2008; Picchietti et al., 2008). In particolare il bordo cortico-medullare sembra una regione particolarmente coinvolta nella espressione del TcR β (Romano et al., 2007), nella presenza di cellule epiteliali di tipo "nurse" (Romano et al., 1997a, 1999b), nella presenza di ipotetiche cellule dendritiche (Avilès-Trigueros & Quesada, 1995) e macrofagi (Romano et al., 1998a). In accordo con studi

precedenti del nostro gruppo (Abelli et al.,1998; Romano et al.,1999b), nel presente lavoro sono state eseguite nuove reazioni di apoptosi su sezioni di timo in sviluppo, giovanile e tardo giovanile/adulto di spigola e carpa ed analizzate considerando la comparsa del bordo cortico-medullare. Parallelamente è stato condotto uno studio simile su una specie di Perciforme non ancora studiata, la cernia bruna (*E. marginatus*). Le analisi su tale specie hanno rivelato che la distribuzione delle cellule apoptotiche è simile a quella delle altre due specie studiate dimostrando quindi una comparabilità durante lo sviluppo. Infatti, non appena si differenziano le cellule reticolo epiteliali, evento da considerarsi tempo-dipendente dalla specie (Romano et al.,1999b e osservazioni personali), le prime cellule apoptotiche si localizzano nella porzione centrale accanto a queste. Inoltre il successivo differenziamento di tali cellule in corticali e medullari, sembra essere correlato con la distribuzione delle cellule apoptotiche nella regione corticale. La formazione di una regione di bordo cortico-medullare sembra nuovamente essere correlato con la distribuzione dell'apoptosi, infatti le cellule apoptotiche mostrano una maggiore densità proprio in questa zona (Romano et al., 1999b). Questi risultati, insieme alle nuove informazioni disponibili sulla distribuzione dei linfociti T, differenziati e/o in differenziamento nel timo, suggeriscono fortemente che la proliferazione dei timociti e la selezione negativa dei linfociti avvenga principalmente nel cortex e nel bordo cortico-medullare. Nei mammiferi, le cellule doppio positive ($CD4^+$ e $CD8^+$) sono disperse nel cortex e, sia la selezione per il riconoscimento dell' MHC-*self* che la delezione dei timociti che esprimono TcR $\alpha\beta$, probabilmente avviene in questo stadio di differenziamento (Kappler et al., 1987). Nelle specie di pesci giovanili e tardo giovanili, le cellule apoptotiche diminuiscono sensibilmente, rimanendo confinate nella regione corticale (Abelli et al., 1998; Romano et al. 1999b). Questo suggerisce quindi la possibilità che il timo dei pesci mantenga un ruolo nella proliferazione/selezione anche negli esemplari adulti. L'apoptosi nel timo dei pesci, oltre ad essere un evento fondamentale nello sviluppo/selezione dei linfociti T, svolge un ruolo importante anche nell'eliminazione dei linfociti T danneggiati in seguito a stress termico (Engelsma et al., 2003). Paradossalmente, il danno cellulare può innescare due opposti tipi di risposta: l'apoptosi, in grado di prevenire l'infiammazione, e la risposta allo shock termico che innesca meccanismi di protezione facilitando la sopravvivenza cellulare; le interazioni tra queste due vie definisce il destino della cellula determinando in modo significativo le conseguenze biologiche dello stress (Beere, 2004). Nei mammiferi i segnali che inducono la morte cellulare attivano la delezione clonale delle cellule T (Shi et al., 1991) e sembrano essere dei meccanismi cellulari che mediano la regressione dei tessuti linfoidei dipendente da glucocorticoidi (Wyllie, 1980). E' noto che i linfociti possiedono recettori per i

glucocorticoidi e che elevate concentrazioni di queste molecole possono indurre apoptosi (Weyts et al., 1998; Stolte et al., 2008). Dato che uno degli stress che ha maggiore effetto nei pesci è la temperatura (Rottland et al., 2003; Bagni et al., 2005; Engelsma et al., 2003), appare molto interessante valutare come i pesci antartici riescano a mantenere inalterata la popolazione linfocitaria nonostante un drammatico e continuo stress termico. Lo studio morfologico effettuato nelle specie antartiche analizzate in questo lavoro appare in linea con le osservazioni precedentemente effettuate nel timo di *T. bernachii* (Romano et al., 1997b). Sebbene non sia stata individuata neanche in questo caso una chiara distinzione anatomica tra cortex e medulla, la differenza nelle misure cellulari dei timociti tra la regione interna ed esterna del timo, indica una possibile regionalizzazione dell'organo, comparabile con quella dei pesci delle acque temperate (Romano et al., 2000).

Accanto alle considerazioni morfologiche, in questo studio è stata rilevata nel timo un'elevata concentrazione di apoptosi nella regione corticale, la porzione situata più esternamente all'organo in diretto contatto con la camera branchiale. Sorprendentemente la densità di queste cellule è 4-7 volte maggiore rispetto a quella osservata nelle specie di acque temperate, mantenendosi sempre con un valore costante nel tempo. Questi risultati suggeriscono la possibilità che l'apoptosi possa avvenire come processo fisiologico adattativo in questi pesci antartici per rimuovere le cellule danneggiate dal congelamento. È noto che il processo apoptotico può essere regolato dall'espressione delle HSP70 che possono inibire le caspasi (Beere, 2004). L'espressione di queste proteine durante esperimenti di variazione di temperatura sembra non modificarsi in organi come milza, branchie e fegato, suggerendo che i pesci antartici abbiano perso le forme inducibili di tali chaperoni (Hoffmann et al., 2000; Poltronieri et al., 2007). Questo studio spiegherebbe come il processo apoptotico risulti così intenso nei pesci antartici rispetto a quelli di acque temperate.

In conclusione, l'apoptosi fisiologica che avviene nel timo dei pesci è dovuta alla maturazione dell'organo e al mantenimento del suo ruolo di selezione dei linfociti T, a maggior ragione l'aumento di apoptosi nei pesci antartici, soprattutto a carico delle cellule danneggiate, può essere ulteriormente giustificata come meccanismo di protezione dell'organo negli ambienti estremi.

CAPITOLO III

L'apoptosi e l'HSP70 possono essere utilizzati come indicatori di stress indotto

Giuseppina Ceccarelli, Andrea Brunetti, Pietro Giorgio Tiscar, Francesco Mosca*, Marco Galeotti**, Donatella Volpatti**, Lucia Mastroliola e Nicla Romano*

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Viterbo, Italia; (*) Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università di Teramo, Teramo, Italia; (**) Dipartimento di Scienze Animali, Università di Udine, Udine, Italia.

RIASSUNTO

La temperatura rientra tra i principali parametri ambientali in grado di influire sulla qualità dell'acqua e sullo stato di benessere delle specie allevate, e può quindi essere considerata una possibile fonte di stress. Nel presente lavoro è stato studiato in larve di spigola (47-70 giorni post-schiusa, p.s.) l'effetto dell'aumento della temperatura (4 gradi) sull'induzione di apoptosi (marcatura terminale *in situ* del DNA frammentato) e sulla sintesi della proteina dello shock termico, l'Hsp70. Le larve sperimentali sono state sottoposte al 50° giorno p.s. e campionate dopo 40 minuti, 2 ore e 24 ore di stress, inoltre sono stati prelevati campioni anche a 10 e 20 giorni dal termine del trattamento. Negli esemplari di controllo le cellule apoptotiche aumentano progressivamente durante lo sviluppo nelle branchie e nel timo, in particolare in quest'ultimo risultano essere localizzate nel cortex e soprattutto nel bordo cortico-medullare, mentre nel rene cefalico si osserva un decremento. Negli esemplari stressati si osserva un aumento significativo dell'apoptosi nel timo e nel rene, rispetto al controllo, già dopo 40 minuti di stress termico (rispettivamente $P < 0,001$ e $P < 0,05$), tuttavia questi valori tendono ad essere comparabili a partire dalle 2-24 ore successive post-trattamento. Nelle branchie il picco apoptotico, con differenze statisticamente significative rispetto al controllo ($P < 0,05$) si raggiunge dopo 2 di stress con cellule distribuite in modo uniforme nella mucosa.

L'espressione citoplasmatica dell'HSP70 è costitutivamente presente nei campioni di controllo esaminati, ed un aumento dell'intensità è valutabile sia a livello immunostochimico che mediante la tecnica ELISA. Nel timo e nelle branchie tale induzione si verifica subito dopo i primi 40 minuti di stress, nel rene invece dopo 2 ore di stress. Tale aumento di espressione rimane costante fino al 20° giorno dal termine del trattamento per il timo e le branchie mentre tende ad una diminuzione progressiva nel rene.

INTRODUZIONE

I Teleostei rappresentano al momento una delle maggiori risorse mondiali di cibo. La recente espansione delle pratiche di acquacoltura ha stimolato interesse nell'attuare pratiche di allevamento atte a mantenere uno stato di benessere al fine di prevenire patologie provocate da stress (Sepulcre et al., 2002). I fattori in grado di influire negativamente sullo stato di salute delle specie allevate possono essere: la qualità dell'acqua, la densità di allevamento,

l'alimentazione, la manipolazione, il trasporto, l'alterazione del foto-termo-periodo e i metodi di uccisione (Håstein et al., 2005). L'emergere di determinate patologie, non è quindi solo l'esito di infezioni specifiche, ma può anche dipendere da altri fattori ambientali e/o gestionali che agiscono come stressori, riducendo le difese immunitarie e predisponendo così i pesci all'insorgenza di malattie (Huntingford et al., 2006).

In particolare la temperatura è un importante fattore abiotico che influenza la qualità dell'acqua in allevamento e può quindi essere considerato una fonte di stress. Dalla temperatura dipende la concentrazione di ossigeno disciolto in acqua, la velocità di decomposizione dei composti organici ed il contenuto di ammoniaca nell'acqua (Knut Schmidt-Nielsen, 1997). La temperatura influenza inoltre lo sviluppo, il metabolismo (McIntyre et al., 2008), la crescita, la riproduzione, la risposta fisiologica allo stress (Varsamos et al., 2006), l'osmoregolazione (Metz et al., 2003) e il sistema immunitario dei pesci (Bly et al., 1991). In particolare, numerosi studi riportano una depressione del sistema immunitario alle basse temperature sia in specie ittiche d'acqua dolce (Le Morvan et al., 1997; Engelsma et al., 2003; Nikoskelainen et al., 2004; Kumari et al., 2006; Swain et al., 2007) che marina (Hutchinson et al., 1996; Alcorn et al., 2002; Langston et al., 2002; Hernandez e Tort, 2003; Bowden et al., 2004; Tort et al., 2004), tra cui la spigola (Scapigliati et al., 1999; Cecchini e Saroglia, 2002; Bagni et al., 2005). Un incremento della temperatura è invece associato ad una diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno disciolto ed un aumento dello sviluppo di agenti patogeni (Knut Schmidt-Nielsen, 1997; Roberts, 1975b). Il diverso grado di tolleranza alle variazioni di temperatura dipende dalla specie, dal tempo di acclimatazione e dall'interazione con altri fattori, tra cui l'ossigeno, il pH e l'ammoniaca.

Nei mammiferi l'apoptosi è un processo naturale di selezione dei linfociti autoreattivi, ma è anche un processo che si verifica in seguito a situazioni di stress (Nagarsekar et al., 2008; El-Nabi Kamel e Shehata, 2008). Nella spigola (Perciformi) e nella carpa (Cipriniformi), è stato accertato che, analogamente ai mammiferi, il processo apoptotico si evidenzia durante lo sviluppo nella porzione corticale e nel bordo cortico-medullare del timo (Abelli et al., 1998; Romano et al., 1999b) e tale processo potrebbe essere implicato nella selezione self/non self dei linfociti T. Tuttavia tale informazione dovrebbe essere estesa ad altre specie di perciformi di acque temperate e soprattutto di acque fredde dove la temperatura può essere vicina al grado di congelamento. La temperatura può essere infatti una causa esogena del fenomeno apoptotico nel timo ed in altri organi (Engelsma et al., 2003; Uchida et al., 2004; Sollid e Nilsson, 2006). Inoltre il fenomeno apoptotico è spesso accompagnato dall'iper-espressione di HSP70, una famiglia di chaperoni molecolari a 70 kDa, che rappresentano delle proteine

chiave nella dinamica funzionale della cellula. In topi transgenici difettivi per l'HSP70, ad esempio, si osservano abnormi fenomeni apoptotici nel timo, con conseguente ipoplasia dell'organo ed immunodeficienza (Lee et al., 1998). Gli effetti legati all'iper-espressione proteggono le cellule dall'apoptosi stress-indotta, prevenendo l'attivazione delle caspasi 3 e 9, oppure inibendo il rilascio mitocondriale di citocromo c (Mosser et al., 2000).

In questo lavoro è stato quindi valutato l'effetto dell'aumento della temperatura (19-23°C), sia sulla sintesi dell'HSP70 che sulla conseguente induzione di apoptosi, in larve di spigole allevate durante le fasi critiche di sviluppo del sistema immunitario (dal 50° al 70° giorno post-schiusa). La spigola (*Dicentrarchus labrax*, L.) è un Teleosteo marino utilizzato frequentemente in studi di stress per la sua spiccata risposta a stimoli stressanti (Rottland et al., 2003; Bagni et al., 2005). Questo pesce occupa un posto importante non solo nel panorama dell'acquacoltura italiana, ma anche in tutta l'area del Mediterraneo e l'approfondimento degli effetti di stress termici sulla fisiologia e sul sistema immunitario è di fondamentale importanza ai fini di un miglioramento delle condizioni di salute, benessere e delle produzioni in acquacoltura.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Le spigole utilizzate in questo studio sono nate ed allevate con acqua ad ingresso continuo presso l'allevamento "Nuova Azzurra" di Torvaldaliga (Civitavecchia, Roma), dotato di avannotteria e provvisto di un proprio incubatore industriale.

La sperimentazione, condotta nei mesi di Giugno e Luglio 2007, ha previsto l'allestimento di 2 vasche separate contenenti entrambe larve allo stadio di 50 giorni post-schiusa (p.s.): una con gli esemplari di controllo e l'altra con quelli da sottoporre a stress. La temperatura dell'acqua di quest'ultimo gruppo, attraverso l'uso di due riscaldatori, è stata aumentata gradualmente di circa 4°C (da 19,30°C a 23,30°C) nell'arco di circa 2 ore.

Le larve sono state campionate allo stadio di 47 giorni p.s. (pre-trattamento), dopo 40 minuti di stress (40'S), dopo 2 ore di stress (2hS) e dopo 24 ore (24hS), 10 e 20 giorni dal termine del trattamento (60 e 70 giorni post stress, 60gS e 70gS); per ogni stadio sono stati prelevati anche i rispettivi controlli.

Le larve utilizzate negli esperimenti sono state prelevate asetticamente ed anestetizzate per bagno in acqua di mare con tricaina-metansulfonato (MS222, Sigma), alla dose di 1mg/ml. Durante tutto il tempo dell'esperimento gli animali sono stati monitorati per quanto riguarda le condizioni sanitarie ed i parametri ambientali, registrando valori di temperatura mai superiori a 23.8°C e una percentuale di O₂ compresa tra 82,8 e 97.

Preparazione dei campioni per la microscopia ottica

Le larve campionate sono state fissate in Bouin (Mazzi, 1977) e successivamente incluse in paraffina. Tale tecnica prevede le seguenti fasi:

- Giorno I: fissazione del pezzo per 7 ore nel fissativo Bouin a 4°C e successivo passaggio in alcool etilico 80% per tutta la notte a 4°C;
- Giorno II: passaggi successivi di circa 2 ore ciascuno in alcool etilico 90% a 4°C e uno per tutta la notte a 4°C;
- Giorno III: passaggi successivi di circa 3 ore ciascuno in alcool etilico 90% a 4°C e uno per tutta la notte a 4°C;
- Giorno IV: passaggi in alcool etilico 100% a temperatura ambiente (3 cambi da 30 minuti ciascuno), in Toluene a temperatura ambiente (2 cambi da 15 minuti ciascuno), in paraffina-toluene (45 minuti), in paraffina I (45 minuti), in paraffina II (45 minuti) e in paraffina d'inclusione (30 minuti) in stufa.

Le sezioni trasversali in serie dei principali organi linfoidi (timo, rene cefalico e branchie) con uno spessore di circa 7 µm, sono state preparate con un microtomo a slitta Reichert-Jung, raccolte su vetrini trattati con 3-Aminopropiltri-etossilene al 2% ed asciugate in stufa a 37°C per una notte. I vetrini seriali così ottenuti, sono stati alternativamente utilizzati per effettuare colorazioni, analisi di immunoistochimica e reazioni di apoptosi.

Istologia

Le sezioni sparaffinate mediante immersione in toluene e reidratate in serie decrescenti di alcool etilico (100%, 90%, 70%) sono state colorate con Ematossilina-Eosina (Mazzi, 1977). A seguito del trattamento i nuclei e le membrane cellulari si colorano di un blu violaceo ed il citoplasma di rosso.

Apoptosi (metodo ISEL)

I tessuti linfoidi di timo, rene cefalico e branchie degli esemplari stressati e di controllo di tutti gli stadi campionati, fissati in Bouin ed inclusi in paraffina (secondo le metodiche precedentemente descritte), sono stati processati per lo studio dell'incidenza dell'apoptosi mediante la tecnica della marcatura terminale *in situ* del DNA frammentato (ISEL). Tale tecnica, infatti, permette di evidenziare cellule con DNA frammentato (apoptotiche) su sezioni istologiche di tessuti inclusi in paraffina (Gravieli, 1992).

Le sezioni sparaffinate mediante immersione in toluene, sono state reidratate in serie decrescenti di alcool etilico (100%, 90%, 70%) e sciacquate per 5 minuti in tampone T.E. (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8); successivamente, sono state incubate per 20 minuti con tampone T.E. contenente Proteinasi K (5-10 µg/ml) (da *Tritirachium album* 17.5 U/mg; Sigma, U.S.A.); quindi sono state sciacquate in acqua distillata (D.W.) ed incubate per 5 minuti in D.W. contenente il 2% di H₂O₂ per neutralizzare le perossidasi endogene. Dopo vari risciacqui in D.W., le sezioni sono state lavate in tampone TDT (Tris 30 mM, sodio cacodilato 140 mM, cloruro di cobalto 1.75 mM, pH 7.2) ed incubate per 2 ore a 37°C con il tampone TDT contenente la miscela di marcatura del DNA composta da 0.3 I.U/µl di Terminal deossinucleotide Trasferasi (Promega), 2 µM di digoxigenina-11-dUTP (2'-deossiridina-5'-difosfato sale tetralitio; Roche) e 17 µM di dATP (2'-deossiadenosina-5'-trifosfato sale di sodio; Pharmacia). I controlli positivi sono stati effettuati impiegando la deossiribonucleasi I (DNAsi I) (da pancreas bovino, Pharmacia; 1µg/ml disciolta in Tris 10 mM, cloruro di sodio 10 mM, cloruro di magnesio 10mM, cloruro di potassio 25 mM, cloruro di calcio 0.1 mM, pH 7.4) per 15 minuti a temperatura ambiente (T.A), prima dell'incubazione con la miscela di marcatura del DNA. La Terminal trasferasi è stata omessa nelle sezioni impiegate come controllo negativo.

Successivamente le sezioni sono state lavate per 25 minuti, in continua agitazione, in tampone SSC (citrato di sodio 30 mM, cloruro di sodio 300mM, pH 7), sciacquate in D.W. e lavate in TBS (5.6 mM, pH 7.5). Poi sono state incubate per 20 minuti a T.A. in TBS contenente il 3% di albumina sierica bovina (BSA, Sigma), sciacquate in TBS ed incubate per 90 minuti a T.A. con siero di capra anti-digoxigenina coniugato con perossidasi (Fab Fragment, Roche) diluito 1:200 in TBS. Dopo vari lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate per 5 minuti in Tris 50 mM contenente 0.02% di diaminobenzidina (Sigma) e 0.015% di H₂O₂. Infine sono stati effettuati vari lavaggi in TBS, acqua di rubinetto e D.W., quindi le sezioni sono state

disidratate in serie crescenti di alcool etilico (70%, 90%, 100%) e chiuse con vetrini portaoggetto per essere esaminate al microscopio ottico.

Per ogni organo sono state processate ed esaminate 5 sezioni non consecutive di 3 esemplari provenienti da ciascun gruppo sperimentale, stressato e di controllo.

Immunoistochimica

Per ogni esemplare appartenente al gruppo stressato e di controllo, sezioni trasversali degli stessi tessuti linfoidi analizzati per l'apoptosi (fissati in Bouin ed inclusi in paraffina, come precedentemente descritto), sono state utilizzate per condurre reazioni di immunoistochimica.

Le sezioni sparaffinate mediante immersione in toluene, sono state reidratate in serie decrescenti di alcool etilico (100%, 90%, 70%), lavate in PBS (0.1 M, pH 7.3) ed incubate per 20 minuti con PBS contenente 0.5% di perossido di idrogeno per ridurre l'attività delle perossidasi endogene. Successivamente le sezioni sono state incubate per 18 ore a T.A. con l'anticorpo monoclonale anti-HSP70 (clone BRM-22, Sigma) diluito (1:200) in PBS 0.1 M, pH 7.3, contenente il 5% di siero normale di cavallo, il 5% di siero normale di spigola e lo 0.1% di sodio azide. Nelle sezioni di controllo, l'anticorpo primario è stato sostituito con il terreno di coltura per mielomi. Dopo i lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 1 ora a 25°C con IgG di siero di cavallo anti-topo biotinilato coniugato con perossidasi (Vector Labs, Burlingame, USA) diluito 1:1000 con PBS contenente lo 0.1% di sodio azide e l'1% di albumina sierica bovina (BSA, Sigma), seguita da incubazione di 1 ora con il complesso avidina-biotinilata perossidasi (ABC, Vectastain® Elite, Vector) con le soluzioni di avidina e della perossidasi biotinilata diluite 1:2000 nel tampone salino Tris (TBS: 0.05 M, pH 7.6). Successivamente ai lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate nel tampone Tris 0.05 M contenente 0.4% di nickel ammonio solfato, 0.02% di diaminobenzidina e 0.015% di perossido di idrogeno. Dopo i lavaggi in tampone Tris, le sezioni sono state deidratate in serie crescenti di alcool etilico (70%, 90%, 100%), montate ed esaminate al microscopio ottico.

Per ogni organo sono state processate ed esaminate 5 sezioni non consecutive di 3 esemplari provenienti da ciascun gruppo sperimentale, stressato e di controllo.

Analisi quantitativa e statistica

I Vetrini utilizzati nelle reazioni di immunoistochimica e apoptosi sono stati osservati con il microscopio Axioskope 2 plus (ZEISS), collegato ad un sistema computerizzato di analisi di

immagine, Axiocam KS 300 (ZEISS). Per ciascun organo di ogni gruppo sperimentale (3 individui per stadio), è stato calcolato il numero di cellule positive (solo quelle nucleate) per l'unità di superficie di $100.000 \mu\text{m}^2$, le misure ottenute sono state raggruppate per ottenere valori cumulativi delle medie e della deviazione standard (SD) e i risultati numerici sono stati analizzati mediante il test del *t*-Student.

ELISA sandwich

Gli esemplari di spigola di entrambi i gruppi sperimentali (controllo e stressato), raccolti in un unico pool; sono stati posti, con rapporto 1:4 (p/v), in un tampone di lisi (TRIS-HCl, pH7.6) contenente il 3% di Nonidet P-40 e vari inibitori delle proteasi (aprotina, leupeptina, antipaina, pepstatina A, PMSF) ed omogenati in ghiaccio mediante Ultraturrax® (IKA). La concentrazione proteica del surnatante raccolto da ciascun campione è stata condotta mediante saggio Bradford e lettura allo spettrofotometro a 595 nm. Per la determinazione dell'espressione di HSP70 nell'omogenato, mediante ELISA sandwich, sono state utilizzate piastre a 96 pozzetti ad alta capacità legante (ELISA-strip Greiner, Labortechnik). L'anticorpo monoclonale anti-HSP70 (clone BRM-22, Sigma) diluito 1:500 in tampone carbonato/bicarbonato (50mM, pH 9.6) è stato fatto adsorbire in ogni pozzetto (100 μl /pozzetto) ed incubato per una notte a 4°C. In seguito i pozzetti sono stati lavati per 3 volte con il tampone PBS contenente lo 0.05% (v/v) di tween 20 ed i siti di legame saturati con incubazione di 1 ora in tampone PBS contenente lo 0.05% di tween 20 e l'1% di albumina sierica bovina. Dopo 3 ulteriori lavaggi sono stati aggiunti i surnatanti dei campioni (stessa concentrazione per pozzetto) diluiti in tampone PBS contenente lo 0.05% di tween 20 e l'1% di albumina sierica bovina (100 μl /pozzetto) ed incubati per 2 ore a 37°C. In seguito i pozzetti sono stati lavati per 3 volte ed incubati per 1 ora a 37°C con l'anticorpo policlonale anti-HSP70 (StressGen) diluito 1:200 in PBS (100 μl /pozzetto). A seguito di ulteriori 3 lavaggi, i pozzetti sono stati incubati per 1 ora a 37°C con l'anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi diluito 1:100 in PBS. Infine dopo gli ultimi lavaggi è stata aggiunta la soluzione di sviluppo ABTS come substrato cromogeno ed il valore di assorbimento relativo ad ogni pozzetto è stato misurato mediante una lettura spettrofotometrica a 405 nm. Ogni punto è stato eseguito in duplicato, ed i controlli negativi sono stati compiuti omettendo l'anticorpo primario mentre l'HSP70 di cervello bovino è stata impiegata come controllo positivo per calibrare la retta degli standard. I valori numerici sono stati espressi come media

± deviazione standard ed il saggio è stato analizzato statisticamente tramite il test *t*-Student a 2 code.

RISULTATI

L'esperimento di stress è stato condotto al 50° giorno, ma le larve sono state poste in due vasche differenti al 47° giorno. I prelievi sono stati quindi effettuati a 47 giorni (pre-trattamento), a 50 giorni, controllo e trattato: 1) dopo 40 minuti; 2) dopo 2 ore; 3) dopo 24 ore; 4) a 60 giorni, controllo e trattato; 5) a 70 giorni, controllo e trattato.

Timo

Apoptosi

Nel timo degli esemplari pre-trattati (47 giorni p.s.) le cellule apoptotiche sono isolate o in piccoli gruppi (15.9 ± 2.8) distribuite in tutto il parenchima, senza una particolare localizzazione (Fig. 3a). A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) le cellule apoptotiche risultano essere localizzate nei controlli, in gruppi di 2-3 cellule, principalmente nella regione più esterna del timo (27.6 ± 0.4) (Fig. 3b). A 60 giorni p.s. (post-trattamento) il timo aumenta di dimensioni e diventa più evidente la separazione tra una zona interna ed esterna paragonabili alla medulla e al cortex dei mammiferi; le cellule apoptotiche risultano essere maggiormente distribuite nella regione più esterna del timo (cortex) e si osserva una lieve preponderanza di tali cellule al confine cortico-medullare (26.3 ± 2.1 cortex; 4.9 ± 0.4 medulla). A 70 giorni p.s. la demarcazione tra cortex e medulla è ormai ben definita e le cellule apoptotiche diventano significativamente più numerose rispetto agli stadi precedenti ($P < 0.05$), esse risultano essere più concentrate nel cortex rispetto alla medulla e soprattutto nel bordo cortico-medullare (15.8 ± 2.2 cortex; 5.3 ± 0.1 medulla; 26.0 ± 2.7 bordo cortico-medullare) (Fig. 3f, g).

Negli individui sperimentali sottoposti a stress termico a 50 giorni p.s., si osserva un aumento significativo del numero delle cellule apoptotiche dopo i primi 40 minuti di trattamento ($P < 0.001$). Questi elementi sono distribuiti principalmente nella regione esterna del timo (34.7 ± 0.001) (Fig. 3c). Dopo 2 ore e durante le 24 ore successive, le cellule apoptotiche cominciano a diminuire (Fig. 3d, e). Dopo 10 e 20 giorni dal trattamento, gli esemplari di 60 e 70 giorni p.s. presentano valori di cellule apoptotiche comparabili ai rispettivi controlli (Fig. 1 e 3h).

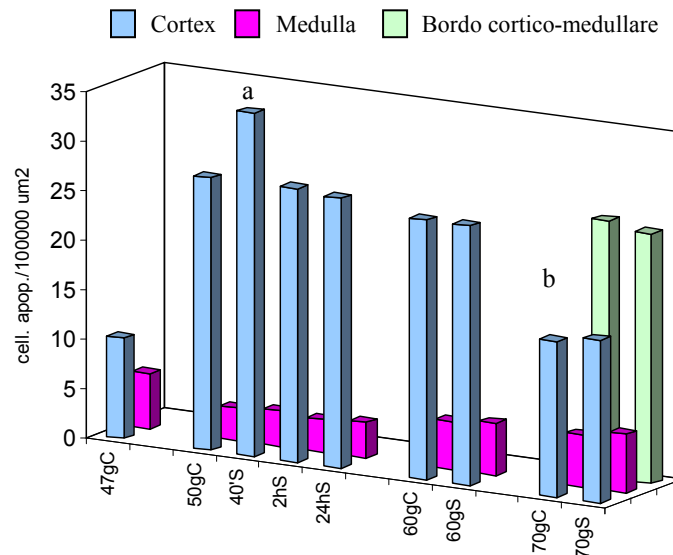


Figura 1. Variazione del numero di cellule apoptotiche nel timo durante e dopo lo stress termico. In primo piano gli istogrammi indicano l'andamento delle cellule apoptotiche nel cortex; in secondo piano l'andamento di quelle della medulla; in terzo piano, solamente per lo stadio a 70 giorni p.s., viene mostrato il numero delle cellule apoptotiche nel bordo cortico-medullare (le barre di deviazione standard sono state rimosse per chiarezza, e i dati sono indicati nel testo). (a) 40' Vs controllo ($P < 0.001$); 40' Vs 2hS e Vs 24hS ($P < 0.05$), test del *t*-Student a 2 code. (b) 70gC Vs 47, 50, 60gC ($P < 0.05$), test del *t*-Student a 2 code.

HSP70

Nel timo degli esemplari pre-trattati (47 giorni p.s.) le cellule che esprimono l'HSP70 sono isolate o in gruppi di 2-3 cellule e localizzate principalmente nella porzione più interna del timo (30.8 ± 1.5) (Fig. 3i). A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) tali cellule nei controlli sono ancora maggiormente concentrate nella regione più interna del timo (28.4 ± 7.7) e diminuiscono in maniera non significativa rispetto allo stadio precedente (Fig. 3l). A 60 giorni p.s. (post-trattamento), quando la separazione tra la zona interna ed esterna del timo risulta più evidente, le cellule che esprimono l'HSP70 sono concentrate principalmente nella zona interna del timo (29.3 ± 3.6) rispetto a quella esterna (20.4 ± 2.5). A 70 giorni p.s. (post-trattamento) il cortex e la medulla sono ormai ben definiti ed il numero di queste cellule aumenta, esse risultano più concentrate nella medulla rispetto al cortex e soprattutto nel bordo cortico-medullare (24.5 ± 2.7 medulla; 23.7 ± 1.5 bordo cortico-medullare; 14.0 ± 1.7 cortex) (Fig. 2 e 3q).

Negli individui sperimentali sottoposti a stress termico a 50 giorni p.s., il numero di cellule che esprimono l'HSP70 aumenta già dopo i primi 40 minuti di stress, tale valore si incrementa dopo 2 ore di stress, e diventa significativamente più elevato ($P < 0.01$), soprattutto nella

regione più esterna del timo, nelle 24 ore successive al trattamento (43.5 ± 1.4) (Fig. 3m, n, o). A giorni 10 e 20 dal trattamento, il numero di cellule esprimenti l'HSP70 rimane significativamente elevato nella regione esterna del timo per entrambi gli stadi ($P < 0.01$.) ed in particolare nel bordo cortico-medullare (70 giorni p.s.; $P < 0.05$) (Fig. 2 e 3p, r).

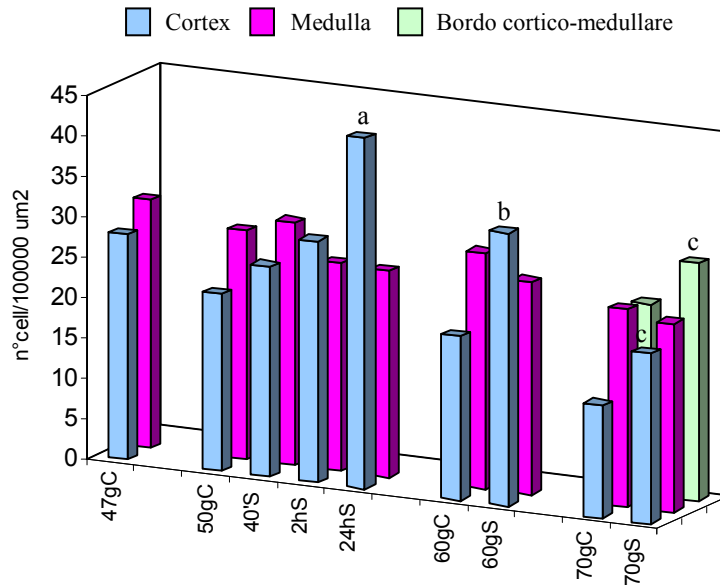


Figura 2. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nel timo durante e dopo lo stress termico. In primo piano gli istogrammi indicano l'andamento dell'HSP70 nel cortex; in secondo piano l'andamento di quelle della medulla; in terzo piano, solamente per lo stadio a 70 giorni p.s., viene mostrata l'espressione dell'HSP70 nel bordo cortico medullare (le barre di deviazione standard sono state rimosse per chiarezza, e i dati sono indicati nel testo). (a) 24hS cortex *Vs* controllo, *Vs* 2hS cortex ($P < 0.01$) e *Vs* 60gS cortex ($P < 0.05$), test del *t*-Student a 2 code; (b) 60gS cortex *Vs* controllo, *Vs* 70gS cortex ($P < 0.01$) e *Vs* 70gC cortex ($P < 0.05$), test del *t*-Student a 2 code; (c) 70gS cortex *Vs* controllo ($P < 0.01$); 70gS bordo *Vs* controllo ($P < 0.05$), test del *t*-Student a 2 code.

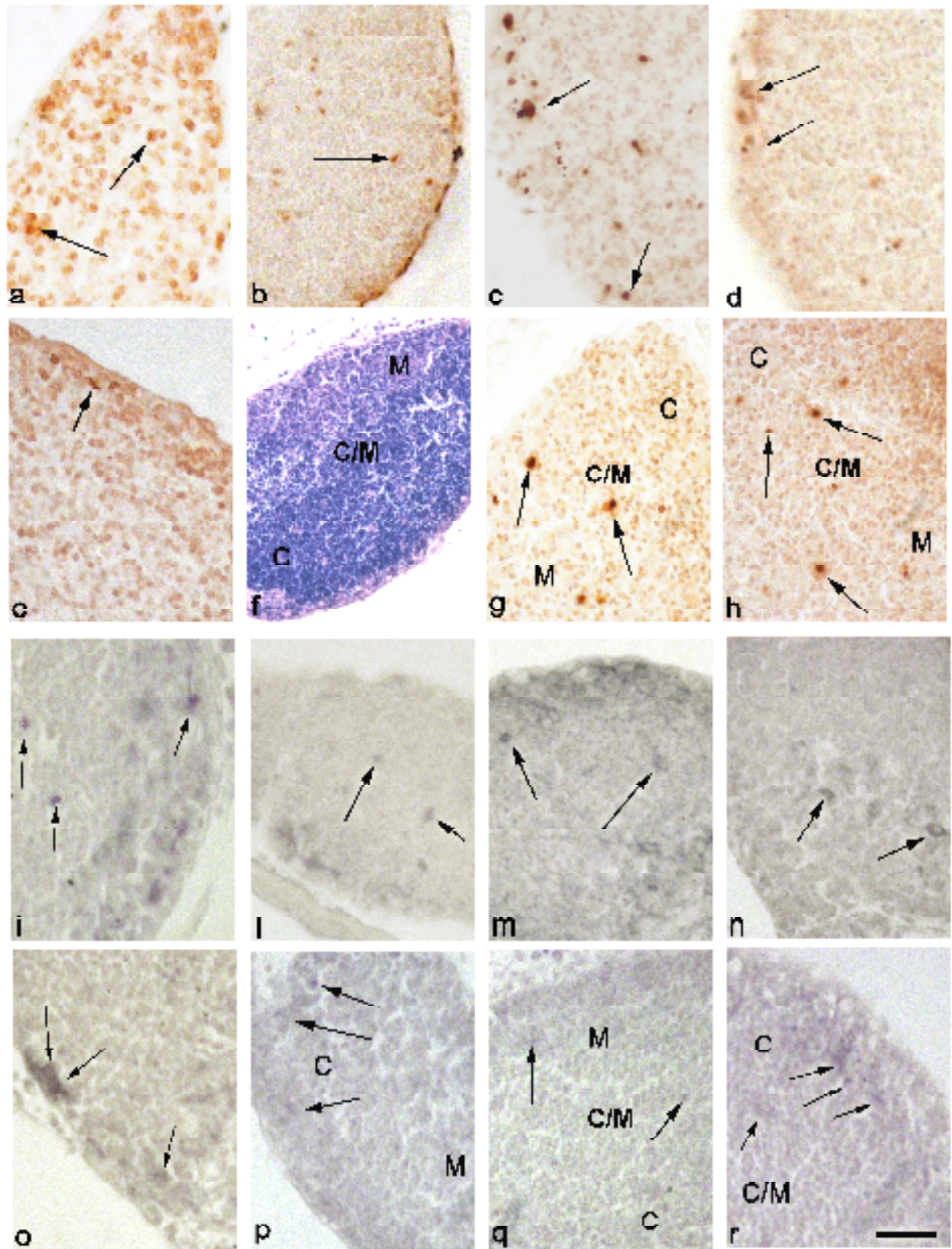


Figura 3. Reazione di apoptosi ed espressione delle HSP70 nel timo di spigola durante e dopo lo stress termico. (a) A 47 giorni p.s. (pre-trattamento) le cellule apoptotiche sono uniformemente distribuite nel parenchima timico (freccette), Bar = 20 μm . (b) A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) tali cellule sono localizzate principalmente nella regione più esterna del timo (freccia), Bar = 30 μm . (c) Dopo 40 minuti di stress termico le apoptosi aumentano significativamente nella regione esterna del timo (freccette), Bar = 30 μm . Dopo 2 ore di stress (d) e dopo 24 ore dal termine del trattamento (e), il numero delle cellule apoptotiche diminuisce pur rimanendo principalmente localizzate nella regione più esterna del timo (freccette), Bar = 30 μm . (f) Colorazione con Ematossilina-Eosina a 70 giorni p.s., stadio in cui si osserva la presenza di un bordo cortico-medullare, Bar = 60 μm . (g) A 70 giorni p.s. negli esemplari di controllo le cellule apoptotiche aumentano rispetto agli stadi precedenti e localizzate preferenzialmente nel cortex e nel bordo cortico medullare (freccette), Bar = 20 μm . (h) Dopo 20 giorni dal trattamento (70 giorni p.s.) il numero delle cellule apoptotiche diminuisce e torna ad essere uguale ai controlli (freccette), Bar = 20 μm .

(i) A 47 giorni p.s. (pre-trattamento) le cellule che esprimono HSP70 sono isolate o in gruppi di 2-3 cellule (freccette), localizzandosi nella parte interna del timo (freccette), Bar = 20 μm . (l) A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) tali cellule sono ancora maggiormente concentrate nella regione più interna del timo (freccette), Bar = 30 μm . Dopo 40 minuti (m) e 2 ore di stress (n) le HSP70 cominciano ad aumentare (freccette) e nelle 24 ore successive al trattamento (o) si incrementano in modo significativo principalmente nella regione più esterna del timo (freccette). Bar =20 μm (m-n), Bar =30 μm (o). (p) Dopo 10 giorni dal trattamento (60 giorni p.s.) le HSP70 sono espresse nel cortex ad elevati livelli (freccette), Bar = 30 μm . (q) A 70 giorni p.s. le HSP70 aumentano soprattutto nella medulla e nel bordo cortico-medullare (freccette), Bar =20 μm . (r) Dopo 20 giorni dalla fine del trattamento (70 giorni p.s.) i livelli di HSP70 si mantengono elevati soprattutto nel cortex e nel bordo cortico-medullare (freccette), Bar =30 μm . C = cortex, M = medulla, C/M = bordo cortico-medullare.

Branchie

Apoptosi

Nelle branchie è stato osservato che negli esemplari, da 47 (pre-trattamento) a 70 giorni p.s., il numero delle cellule apoptotiche aumenta progressivamente e risultano essere diffuse in modo uniforme nella mucosa branchiale, senza una particolare localizzazione (Fig. 4 e 9i).

A differenza del timo, nelle branchie degli individui sperimentali sottoposti a stress termico, dopo i primi 40 minuti di trattamento il numero di cellule apoptotiche subisce un leggero aumento (23.9 ± 5.0), che diventa significativamente più elevato e raggiunge il valore massimo, solo dopo 2 ore di stress (27.0 ± 3.3) ($P < 0.05$) (Fig. o, m). Negli individui stressati, a 24 ore il fenomeno apoptotico sembra diminuire di intensità e diventare comparabile al controllo, questa situazione è quindi stabile per tutto il periodo considerato (70 giorni p.s.) (Fig. 4 e 9n).

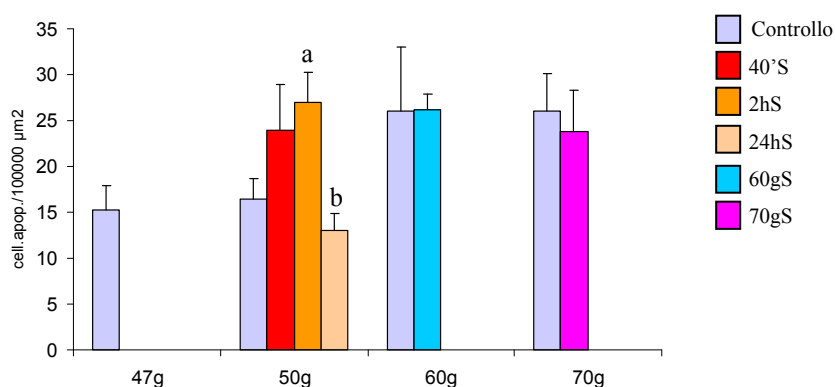


Figura 4. Variazione del numero di cellule apoptotiche nelle branchie durante e dopo lo stress termico. (a) 2hS *Vs* controllo ($P < 0.05$) e *Vs* 24hS ($P < 0.01$), test del *t*-Student a 2 code. (b) 24hS *Vs* 60gS ($P < 0.001$), test del *t*-Student a 2 code.

HSP70

Nelle branchie degli esemplari da 47 (pre-trattamento) a 70 giorni p.s., le cellule che esprimono l'HSP70 diminuiscono in maniera progressiva e sono distribuite in modo uniforme nella mucosa branchiale, senza una particolare localizzazione (Fig. 5 e 9o, q).

Negli individui sperimentali sottoposti a stress termico a 50 giorni p.s, la densità delle cellule esprimenti l'HSP70 aumenta dopo i primi 40 minuti di stress (27.3 ± 3.7), tale valore si incrementa dopo 2 ore (29.3 ± 5.6) e nelle 24 ore successive al trattamento (31.0 ± 5.5), e diventa significativamente più elevata ($P < 0.05$) dopo 10 giorni dalla fine del trattamento

(29.9 ± 3.5) (Fig. 9p, r). Dopo 20 giorni dallo stress tale valore rimane elevato (29.6 ± 2.4) (Fig. 5).

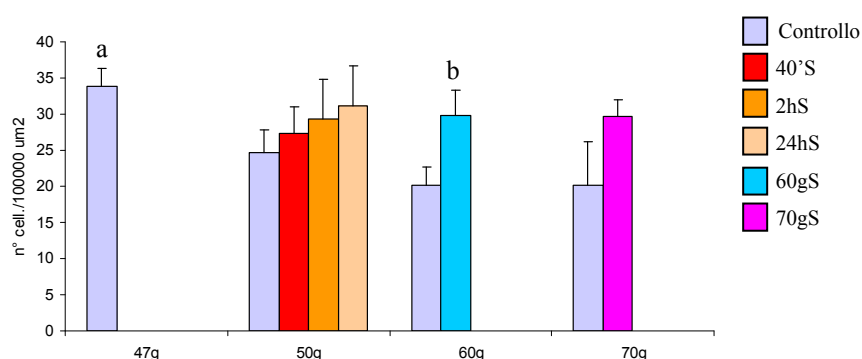


Figura 5. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nelle branchie durante e dopo lo stress termico. (a) 47g Vs 50gC; (b) 60gS Vs controllo ($P < 0.05$), test del *t*-Student a 2 code.

Rene cefalico

Apoptosi

Rispetto agli altri organi, timo e branchie, il rene cefalico evidenzia un fenomeno apoptotico di minore intensità nei pesci sottoposti a stress termico. Nelle sezioni degli esemplari pretrattati (47 giorni p.s.) le cellule apoptotiche sono scarse (11.8 ± 2.4) e distribuite omogeneamente nel parenchima renale, senza una particolare localizzazione. A 50 giorni p.s. le cellule apoptotiche dei controlli sono localizzate nel tessuto intertubulare e diminuiscono progressivamente fino a 70 giorni p.s. (da 7.1 ± 2.0 a 2.0 ± 0.2) (Fig. 7 e 9a).

Negli individui sperimentali sottoposti a stress termico a 50 giorni p.s., si osserva un aumento significativo del numero di cellule apoptotiche già dopo i primi 40 minuti di trattamento (11.3 ± 1.9 ; $P < 0.05$) (Fig. 9b). Dopo 2 ore e durante le 24 ore successive, le cellule apoptotiche diminuiscono (Fig. 9c). Dopo 10 e 20 giorni dal trattamento, gli esemplari di 60 e 70 giorni p.s. presentano valori di cellule apoptotiche comparabili ai rispettivi controlli (Fig. 7 e 9d).

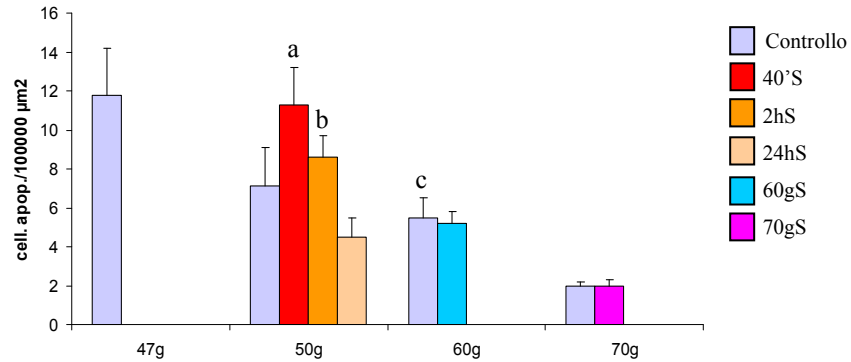


Figura 7. Variazione del numero di cellule apoptotiche nel rene cefalico durante e dopo lo stress termico. (a) 40'S *Vs* controllo e *Vs* 2hS ($P<0.05$), test del *t*-Student a 2 code. (b) 2hS *Vs* 24hS ($P<0.05$), test del *t*-Student a 2 code. (c) 60gC *Vs* 70gC ($P<0.05$), test del *t*-Student a 2 code.

HSP70

Nel rene cefalico degli esemplari da 47 (pre-trattamento) a 70 giorni p.s., le cellule che esprimono l'HSP70 sono distribuite nel tessuto intertubulare e la loro densità si mantiene costante nel tempo (Fig. 8 e 9e).

Negli individui sperimentali sottoposti a stress termico a 50 giorni p.s., il numero di cellule che esprimono l'HSP70 aumenta dopo 2 ore di stress (21.1 ± 0.4) e si incrementa in modo significativo nelle 24 ore successive (34.7 ± 4.4 ; $P<0.01$) (Fig. 9f, g). A 10 e 20 giorni dal trattamento il numero di cellule esprimenti l'HSP70 si abbassa in entrambi gli stadi (Fig. 8 e 9h).

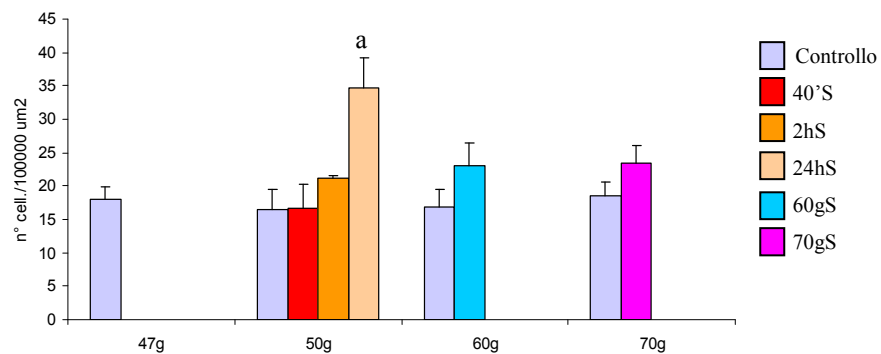


Figura 8. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nel rene cefalico durante e dopo lo stress termico. (a) 24hS *Vs* controllo, *Vs* 2hS ($P<0.01$) e *Vs* 60gS ($P<0.05$), test del *t*-Student a 2 code.

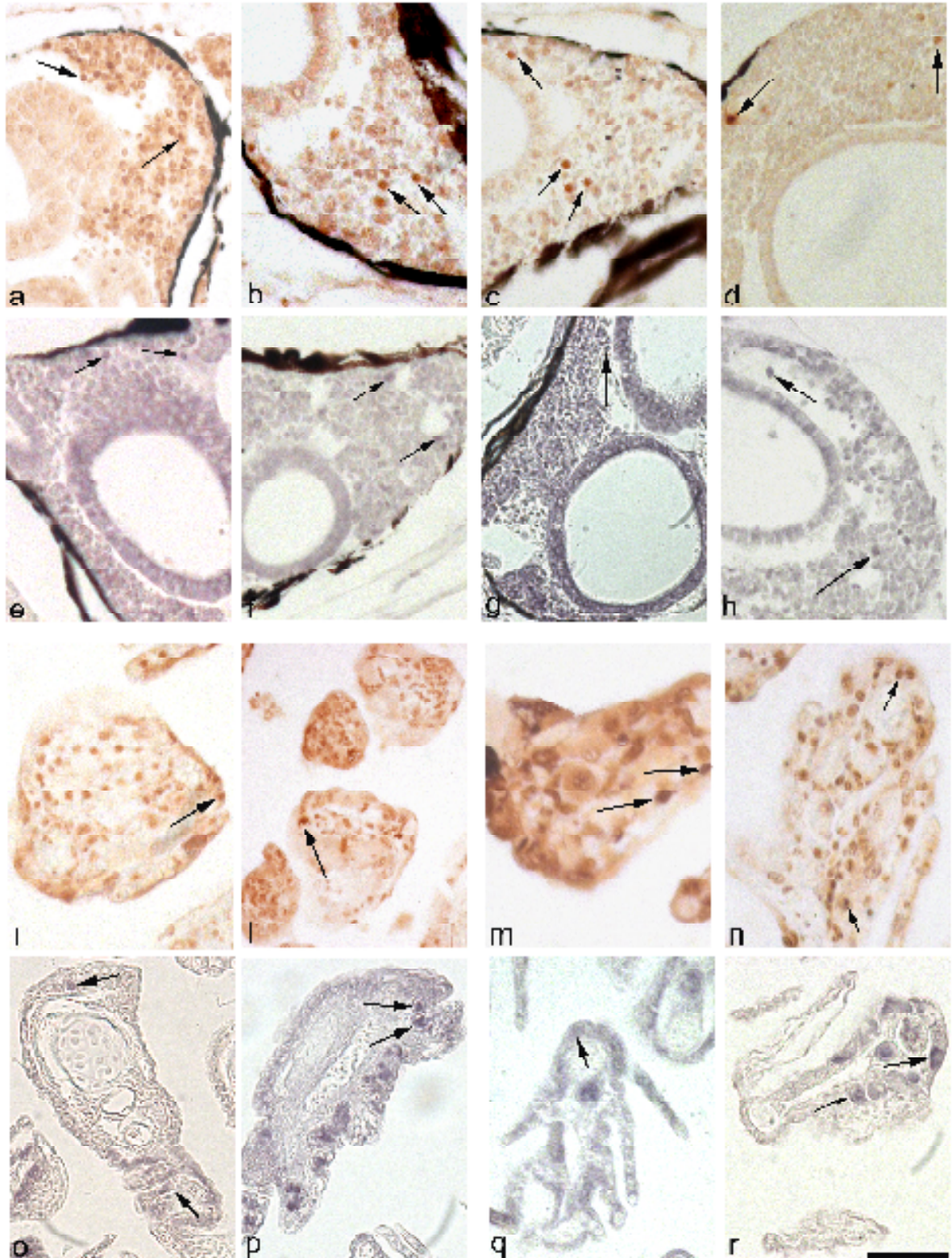


Figura 9. Reazione di apoptosi ed espressione delle HSP70 nel rene cefalico (a-h) e nelle branchie (i-r) di spigola durante e dopo lo stress termico.

Rene cefalico:

(a) A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) le cellule apoptotiche sono localizzate nel tessuto intertubulare (freccia), Bar = 15 μm . (b) Dopo 40 minuti di stress il numero di apoptosi aumentano in modo significativo (freccia), Bar = 10 μm . (c) Dopo 2 ore di stress tali cellule iniziano a diminuire (freccia) e dopo 20 giorni dalla fine del trattamento (70 giorni p.s.) (d) il numero delle cellule apoptotiche torna ad essere uguale ai controlli (freccia), Bar = 15 μm e Bar = 20 μm rispettivamente.

(e) A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) le cellule HSP70⁺ sono diffuse nel tessuto intertubulare (freccia), Bar = 15 μm . (f) Dopo 2 ore di stress tali cellule aumentano e nelle 24 ore successive al trattamento (g) subiscono un incremento significativo (freccia), Bar = 15 μm . (h) Dopo 10 giorni dallo stress (60 giorni p.s.) il livello di HSP70 si abbassa e tende a tornare alla normalità (freccia), Bar = 20 μm .

Branchie:

(i) A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) le cellule in apoptosi sono distribuite in modo uniforme nella mucosa branchiale (freccia), Bar = 15 μm . (l) Dopo 40 minuti di stress il numero di cellule apoptotiche aumenta (m) e raggiunge il valore massimo dopo 2 ore di trattamento (m). (freccia), Bar = 30 μm e Bar = 10 μm rispettivamente. (n) 10 giorni dopo il trattamento i livelli l'apoptosi è comparabile al controllo (freccia), Bar = 15 μm .

(o) A 50 giorni p.s. (inizio trattamento) le cellule che esprimono HSP70 sono uniformemente distribuite nella mucosa branchiale (freccia), Bar = 15 μm . (p) Dopo 2 ore di stress le cellule HSP70⁺ aumentano (freccia), Bar = 15 μm . (q) A 60 giorni p.s. negli esemplari di controllo le HSP70 diminuiscono rispetto allo stadio precedente di 50 giorni p.s. (freccia), Bar = 10 μm . (r) 10 giorni dopo la fine del trattamento (60 giorni p.s.) le cellule che esprimono HSP70 aumentano significativamente (freccia), Bar = 10 μm .

Elisa sandwich

L'analisi ELISA sandwich sull'omogenato degli esemplari di controllo raccolti in pool, ha evidenziato un livello d'espressione basale di HSP70 costante nelle spigole ai differenti stadi considerati (Fig. 10a) ed un induzione di tale proteina in seguito a stress termico. In particolare l'aumento della proteina è stato evidenziato dopo 2 ore di stress ($P < 0.05$) per intensificarsi a distanza di 24 ore dalla fine dello stress stesso. A 10 e 20 giorni dal trattamento l'espressione l'HSP70 rimane significativamente elevato in entrambi gli stadi ($P < 0.01$) (Fig. 10b). In particolare i valori a 24 ore, 10 e 20 giorni sembrerebbero essere sovrapponibili tra loro e superiori a quanto riscontrato dopo 2 ore di trattamento.

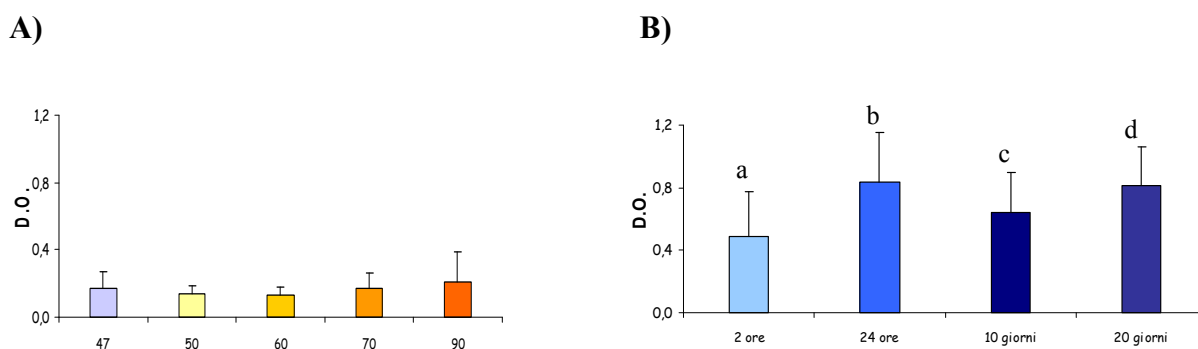


Figura 10. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nell'ELISA sandwich: A) negli esemplari di controllo; **B)** durante e dopo lo stress termico. (a) 2hS *Vs* controllo ($P < 0.05$), test del *t*-Student a 2 code; (b) 24hS *Vs* controllo ($P < 0.01$), test del *t*-Student a 2 code; (c) 60gS *Vs* controllo ($P < 0.01$), test del *t*-Student a 2 code; (d) 70gS *Vs* controllo ($P < 0.01$), test del *t*-Student a 2 code.

DISCUSSIONE

La temperatura rientra tra i principali parametri ambientali in grado di influire negativamente sulla qualità dell'acqua delle specie ittiche allevate (Bly et al., 1991). In ambiente acquatico, una variazione anche di pochi gradi della temperatura dell'acqua può provocare un fenomeno di stress acuto (Engelsma et al., 2003; Tanch et al., 2000). A questo fenomeno di stress il pesce risponde alterando alcuni parametri fisiologici (Engelsma et al., 2003; Tanch et al., 2000) inclusa la secrezione endocrina del cortisolo (Barton et al., 2002). La secrezione del cortisolo ad alti livelli può determinare anche fenomeni apoptotici (Weyts et al., 1998) ed

inoltre può essere causa, a livello cellulare, della maggiore sintesi di heat shock proteins (Iwama et al., 1998; Bly et al., 1991). Nel presente studio è stato valutato l'effetto che ha avuto l'innalzamento della temperatura sul processo di induzione apoptotica e l'espressione di una delle proteine dello shock termico, Hsp70, in alcuni organi immunitari di larve di spigola, da 47 giorni p.s. a 70 giorni p.s.

Le proteine dello shock termico (HSP) sono una famiglia di proteine cellulari altamente conservata durante l'evoluzione (Morimoto et al., 1990; Iwana et al., 1998; Feder e Hofmann, 1999). Nei pesci, come nei mammiferi, alcune tipologie di HSP sono costitutivamente presenti nelle cellule e normalmente svolgono il ruolo di chaperoni molecolari nella maturazione proteica. Inoltre, vengono prodotte durante lo sviluppo per il corretto assemblaggio, la localizzazione e l'attivazione dei recettori endo/superficiali delle cellule in differenziamento (Krone et al., 1997, 2003; Deane et al., 2003; Christians et al., 2003; Murtha et al., 2003; Evans et al., 2004). Forme inducibili sono invece espresse ad elevati livelli solo in seguito a stress (Morimoto et al., 1990; Yamashita et al., 2004). La famiglia delle HSP70 possiede un'estremità amino-terminale in grado di legare ATP mentre l'estremità carbossi-terminale è responsabile del legame con il substrato (Arya et al., 2007). Presentando un elevato grado di omologia di sequenza amminotermiale è stato possibile utilizzare diverse tipologie di anticorpi cross-reattivi appartenenti a specie molto distanti in termini evolutivi (Lewis et al., 1999; Becker and Craig, 1994). L'anticorpo utilizzato in questo lavoro, (BRM-22) è stato quindi impiegato con successo su tessuti di spigola (Bagni et al., 2005). Tale anticorpo riconosce nei mammiferi entrambe le forme di HSP70 sia costitutiva che indotta e nella spigola, mediante western blotting, evidenzia una singola banda proteica con peso molecolare simile alla forma costitutiva dell'HSP70 purificata da cervello bovino. Probabilmente tale banda è costituita da alcune isoforme (Tiscar et al., osservazione personale), la conferma di tale ipotesi è al momento sotto studio proteomico.

Le forme inducibili e non inducibili di HSP70 possono essere coinvolte nella modulazione del processo apoptotico, infatti interagiscono a vari livelli sia con la via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi ed attraverso l'attività di chaperoni inibiscono la morte cellulare (Kim et al., 2006; Didelot et al., 2006; Arya et al., 2007). Durante lo sviluppo, l'apoptosi risulta essere un fenomeno indotto e diretto da fattori morfogenetici e le HSP70 sono espresse in modo costitutivo (Iwama et al., 2004). Nel presente lavoro l'apoptosi risulta essere un fenomeno naturale durante lo sviluppo degli organi/tessuti linfoidei esaminati (timo, rene cefalico, branchie). Infatti, analizzando i tessuti di pesci non trattati (controlli) dal 47° al 70° giorno, si è osservato un aumento di apoptosi in branchie e timo. In quest'ultimo le HSP70 sembrano

maggiormente espresse nella porzione interna/medullare dell'organo. Questa evidenza potrebbe suggerire che alcune zone della medulla potrebbero essere sedi di centri di memoria, oppure di linfociti T che ancora non esprimono fortemente TcR, Cd4 o Cd8. Nei mammiferi le HSP70 sembrano essere implicate nel differenziamento precoce dei linfociti T e pre-T, in quanto topi transgenici che mancano della corretta espressione dell'HSP70 risultano immunodeficienti per i linfociti T ($\alpha\beta$ e γ) (Lee et al., 1998). Una diminuzione dell'apoptosi si è invece osservata nel rene cefalico, suggerendo che la forte espansione del tessuto tubolare osservata, potrebbe aver abbassato la densità delle cellule del tessuto linfopoietico. Analogamente, avendo considerato come parametro di analisi la densità delle cellule positive, le HSP70 sono espresse maggiormente in branchie e timo e in misura minore nel rene durante lo sviluppo, avvalorando l'ipotesi di un fenomeno apoptotico di tipo naturale. Di conseguenza, si può ipotizzare che nel periodo larvale considerato ci sia un'attività differenziativa dei linfociti stessi. Timo e rene cefalico nei pesci ossei rappresentano i due organi linfatici primari per lo sviluppo, proliferazione ed educazione dei linfociti T e B, rispettivamente (Abelli et al., 1996, Romano et al., 1997a, 1997b, 1999b; Rombout et al., 1997; Picchietti et al., 2008; Buonocore et al., 2008). E' stato evidenziato che durante lo sviluppo, il differenziamento dei linfociti T avviene principalmente nella regione corticale e corticomedullare del timo, con evidente aumento del fenomeno apoptotico (Abelli et al., 1996, 1998; Romano et al., 1999b; Picchietti et al., 2008; Romano et al., 2008, manoscritto in preparazione). Anche nel presente studio si è osservato un progressivo aumento nelle stesse regioni in accordo con quanto precedentemente pubblicato. Il rene cefalico è un organo linfoide primario per la produzione di linfociti B, macrofagi e granulociti (Romano et al., 1997a, 1998a; Pastoret et al., 1998) ed è ritenuto l'organo equivalente del midollo osseo dei mammiferi adulti per la produzione di cellule B (Romano et al., 1997b; Zapata e Amemiya, 2000). Tuttavia in tale organo la valutazione del fenomeno apoptotico non è mai stata pubblicata ed i dati del presente lavoro rappresentano quindi un'osservazione originale. La distribuzione delle cellule apoptotiche si è dimostrata principalmente a carico di cellule linfoidi intersperse tra il tessuto tubolare.

Le branchie sembrano essere precocemente coinvolte nel processo di "uptake" di antigeni (Castillo et al., 1998), e responsabili della produzione mucosale di anticorpi specifici diversi da quelli prodotti dalla via sistemica (dos Santo et al., 2001). Il fenomeno apoptotico che si osserva nel presente lavoro potrebbe essere dovuto quindi alla processazione/selezione di linfociti proprio in questo tessuto. Un'altra ipotesi potrebbe essere quella di un processo naturale di rimodellamento della branchia in sviluppo (Sollid e Nilsson, 2006). In entrambi i

casi, l'espressione delle HSP70 potrebbe aiutare ad individuare la tipologia del fenomeno apoptotico, se di tipo naturale o indotto. Un recente lavoro di Poltronieri et al. (2007) ha valutato l'espressione di HSP70 inducibili e non in diversi organi e tessuti ed in particolare in branchie e rene. Le HSP70 costitutive nello studio di Poltronieri et al. (2007) sembrano essere espresse in modo comparabile con quanto riscontrato nel presente lavoro.

L'esposizione a shock termico delle larve di 50 giorni p.s., ha mostrato che già dopo i primi 40 minuti di trattamento si osserva nel timo e nel rene l'aumento del numero delle cellule apoptotiche. Queste risultano essere distribuite nel timo principalmente nella regione esterna e nel rene presso i foci linfoidi. Dopo 2 ore e durante le 24 ore successive, le cellule apoptotiche diminuiscono e tornano ai valori dei controlli fino alla fine del trattamento. Nelle branchie il picco apoptotico si raggiunge invece dopo 2 ore di stress e successivamente nell'arco di pochi giorni la densità delle cellule apoptotiche diviene comparabile a quelle dei controlli. L'espressione delle HSP70 sembra seguire l'andamento del fenomeno apoptotico, con una rilevabilità posticipata di alcune ore. L'espressione rimane comunque più alta a 70giorni p.s. in tutti gli organi rispetto agli individui di controllo analizzati. Anche l'analisi ELISA dell'omogenato della larva ha confermato tale andamento.

Tali risultati suggeriscono che la spigola sia una specie molto sensibile alle variazioni di temperatura, ed una volta sottoposta a stress possa attivare alcuni meccanismi in grado di riparare il danno cellulare. Tra questi meccanismi la produzione di forti quantità di HSP70 in grado di controllare il fenomeno apoptotico potrebbe evitare la perdita di cellule ancora attive (Iwana et al., 2004; Didelot et al., 2006). Inoltre si potrebbe ipotizzare che il fenomeno apoptotico in timo e rene cefalico possa essere la conseguenza di una secrezione imponente di cortisolo da parte delle cellule interrenali. E' stato infatti dimostrato nella carpa che i linfociti B posseggono il recettore per il cortisolo e che discrete quantità di cortisolo *in vitro* provocano l'apoptosi cellulare (Weyts et al., 1998). Nelle branchie invece l'apoptosi e la produzione di HSP70 potrebbero essere dovuti al naturale fenomeno di rimodellamento post-stress. Quest'ultima ipotesi è avvalorata da precedenti studi che hanno accertato la variazione di espressione delle HSP70 in seguito a "stress da trasporto" (Poltronieri et al., 2007), "stress da alte densità" di allevamento (Gornati et al., 2004), "stress da temperatura" (Enes et al., 2006) e "stress da manipolazione" (Vijayana et al., 1997a, 1997b; Washburn et al., 2002). In conclusione, il presente lavoro rappresenta un contributo alla conoscenza del fenomeno apoptotico indotto e dovuto al differenziamento, in alcuni organi linfoidi maggiormente coinvolti nella risposta alle pratiche di vaccinazione negli avannotti. Lo studio dei fenomeni apoptotici e dell'espressione dell'HSP70 rappresenta non solo il punto di partenza nella

comprensione di processi biologici finalizzati alla conoscenza di base, ma anche il tentativo di fornire “indicatori” in grado di misurare alterazioni omeostatiche nello sviluppo del sistema immunitario, eventualmente da applicare nella gestione e nel controllo delle malattie al fine di garantire il benessere dei pesci in allevamento.

CAPITOLO IV

Utilizzo di indicatori innovativi per valutare l'efficienza di trial vaccinali nella spigola

Giuseppina Ceccarelli, Marco Galeotti, Donatella Volpatti*, Chiara Bulfon*, Luigi Abelli**, Fabrizio Bertoni**, Pietro Giorgio Tiscar***, Francesco Mosca***, Andrea Brunetti e Nicla Romano*

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Viterbo, Italia; (*) Dipartimento di Scienze Animali, Università di Udine, Udine, Italia;(**) Dipartimento di Biologia e dell'Evoluzione, Sezione di Anatomia Comparata, Università di Ferrara, Ferrara, Italia; (***)Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Università di Teramo, Teramo, Italia.

RIASSUNTO

Nuove strategie vaccinali sono richieste dal settore dell'acquacoltura al fine di mantenere alta la produttività ed abbattere il problema dell'insorgenza di patologie, anche tenendo conto delle nuove direttive dell'Unione Europea (2006) che limitano l'uso di antibiotici in coltura. In questo studio, avannotti di spigola sono stati sottoposti a diversi cicli di vaccinazione contro *Vibrio anguillarum* (ciclo completo: due vaccinazioni per bagno ed una iniezione per i.p.; ciclo incompleto: solo due vaccinazioni per bagno), dal 95° al 291° giorno p.s., al fine di controllare la risposta immunitaria (specifica e non specifica) alla vaccinazione stessa. Parallelamente è stato controllato anche il livello di stress tissutale indotto (timo, branchie e rene cefalico). In particolare, per quanto riguarda l'immunità specifica, vi è un aumento di linfociti B nel rene cefalico e milza, dei livelli sierici di Ig specifiche anti-*Vibrio*, ed un aumento della capacità di agglutinazione del batterio negli individui vaccinati con il ciclo completo. Analogamente anche il sistema immunitario non specifico ha evidenziato un aumento dell'attività di *burst* ossidativo nei leucociti purificati di rene cefalico e milza dei soggetti vaccinati. L'analisi del processo apoptotico e l'espressione proteica della heat shock protein 70 (Hsp70) ha dimostrato che, dal 95° al 291° giorno, la diminuzione delle cellule apoptotiche, nonché l'espressione delle HSP70, che si evidenziano sono da attribuirsi ad una normale attività di differenziamento degli organi e che solo nel timo l'espressione delle HSP70 sembra invece essere dovuta al ciclo di vaccinazione.

INTRODUZIONE

La spigola o branzino (*Dicentrarchus labrax*, L.) rappresenta una delle principali specie allevate in tutta l'area del Mediterraneo, ed in Italia vengono prodotte circa 9300 tonnellate annue (ISMEA, 2007; dati produzione 2006). Dato il rilevante valore economico occupato dall'industria dell'acquacoltura di questo Teleosteo marino ed il rapido declino della disponibilità di pesci in natura, di recente il suo allevamento ha avuto un notevole impulso. La produzione di tale specie marina può essere incrementata nel rispetto delle normative CEE (COM, 2005 Action Plan 2006-2010), tra queste direttive, una riguarda la limitazione dell'uso di chemioterapici, tra cui gli antibiotici a scopo profilattico negli allevamenti animali (UE [COM(2005/297)]). Il miglioramento delle strategie di vaccinazione, che oltre ad assicurare la

copertura al patogeno possono rimanere efficaci nel tempo, sembra essere un'azione chiave nell'ambito dell'acquacoltura.

In acquacoltura il vaccino contro la vibriosi è ampiamente utilizzato in tutte le possibili vie di somministrazione nei pesci d'allevamento d'acqua dolce e marini (per iniezione intramuscolare e intraperitoneale, immersione e per via orale) (Smith, 1985; Salinas et al., 2004), anche se attualmente il *Vibrio anguillarum* è ancora considerato il patogeno che causa le perdite più elevate nelle forme giovanili ed adulte delle specie ittiche (API, 2006). Diversi studi sono stati effettuati sull'uso dei vaccini nei pesci (Salinas et al., 2004). Un generale miglioramento dei parametri fisiologici è stato evidenziato nelle specie immunizzate contro la vibriosi (Smith, 1985; Salinas et al., 2004; Salati, 2005; Angelidis, 2006; Angelidis et al., 2006). Un significativo incremento del titolo anticorpale e della percentuale di linfociti T e B, sono state osservate dopo immunizzazione contro *Vibrio anguillarum* sia per bagno che per iniezione intraperitoneale (Scapigliati et al., 1999; Romano et al., osservazioni personali). Tuttavia, è stato dimostrato che nella spigola anche se la risposta immunitaria si instaura rapidamente, questa perde di efficacia dopo circa 6 mesi dalla prima vaccinazione (Ellis, 2001). Inoltre i vaccini possono provocare degli effetti collaterali nella fisiologia del pesce provocando essi stessi patologie (Afonso et al., 2005) e possibili fenomeni di stress dovuti alla manipolazione (Wedemeyer, 1996; Marino et al., 2001). Inoltre sono stati osservati anche fenomeni apoptotici a carico dei fagociti (macrofagi e granulociti) (do Vale et al., 2003) responsabili del *burst* respiratorio (ROS) contro i batteri (Neumann et al., 2001; Sarmiento et al., 2004; Acosta et al., 2005).

L'apoptosi e l'espressione delle Heat Shock Proteins (HSP) sono eventi naturali nel processo di maturazione degli organi linfatici ed in particolare del timo (Abelli et al., 1998; Romano et al., 1999b; Poltronieri et al., 2007), tuttavia possono essere stimulate anche da un evento stressante (Engelsma et al., 2003; Poltronieri et al., 2007). In questo lavoro è stata analizzata l'efficacia della vaccinazione contro il batterio *Vibrio anguillarum* sul sistema immunitario specifico e non specifico e sono stati valutati l'espressione delle HSP70 e del fenomeno apoptotico, in spigole giovanili allevate, prima e dopo il trattamento vaccinale. Per quest'ultimo tipo di analisi sono stati valutati il timo, le branchie e il rene cefalico in quanto organi chiave per la produzione di linfociti T e B (timo e rene) oppure responsabili della captazione antigenica per bagno (branchie). Le informazioni ottenute da questa ricerca potranno essere trasferite nelle pratiche di vaccinazione della spigola ed in altre applicazioni biotecnologiche, data l'importanza crescente assunta dall'acquacoltura.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

La sperimentazione è stata condotta presso l'allevamento ittico "Valle Del Lovo" di Carlino (Udine) ed ha avuto la durata di sei mesi: da Agosto 2007 a Febbraio 2008.

Il protocollo sperimentale ha previsto la suddivisione delle spigole in tre differenti gruppi e la loro vaccinazione contro *Vibrio anguillarum* (serotino 01 e 02; Vibrio VAB, AquaVac™, AVL) come di seguito indicato:

- Gruppo di controllo: esemplari non trattati durante tutta la durata della sperimentazione;
- Gruppo V₁: esemplari di 95 giorni p.s., circa 0.7-0.8 grammi, sono stati vaccinati per bagno (immersione per 60 secondi) ed hanno successivamente subito un primo richiamo per bagno a 165 giorni p.s., 7-8 grammi, e un secondo richiamo mediante iniezione intraperitoneale (0.1 ml) a 233 giorni p.s., 12-15 grammi;
- Gruppo V₂: esemplari di 95 giorni p.s., circa 0.7-0.8 grammi, sono stati vaccinati per bagno ed hanno subito un richiamo per bagno a 165 giorni p.s., 7-8 grammi, ed un iniezione intraperitoneale di PBS (0.1 ml) a 233 giorni p.s., 7-8 grammi;

La sperimentazione si è conclusa a 291 giorni p.s., 12-15 grammi, e per ogni vaccinazione e richiamo sono stati campionati sia gli individui trattati che i rispetti controlli.

In tutti i prelievi i pesci sono stati pescati dalle vasche mediante un guadino, trasferiti in un mastello ed anestetizzati per immersione con tricaina-metansulfonato (MS222, Sigma) alla dose di 1mg/ml.

Determinazione delle Ig specifiche anti-Vibrio del siero

Da ogni gruppo sperimentale sono stati campionati 10 soggetti i quali sono stati anestetizzati con MS222 per prelevare il sangue, dal quale dopo centrifugazione è stato recuperato il siero. Per la determinazione delle Ig specifiche anti-Vibrio nel siero, mediante ELISA indiretto, sono state utilizzate micropiastre di polistirene da 96 pozzetti (Nunc, Roskilde, Denmark). L'antigene (batterina del vaccino anti-*Vibrio anguillarum* biotipo 01 e 02; AquaVAC Vibrio VAB, Shering Plough: 1×10^9 cell/ml) è stato fatto adsorbire in ogni pozzetto (circa 10.000 cellule/ pozzetto). La sospensione di batterina (1 ml) è stata centrifugata a 10000 rpm per 10 min, il pellet è stato risospeso in 1 ml di tampone carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9.5),

diluito 1:200 nello stesso tampone, ed incubato per una notte a 4°C (100 µl/pozzetto). In seguito i pozzetti sono stati lavati con TTN (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 0.05% Tween 20 e 0.15 M NaCl) ed i siti di legame saturati con TBT (TTN-BSA 3%). In seguito sono stati aggiunti i sieri diluiti (1:10) in 100 µl di TTN-BSA per una notte a 4°C. Dopo lavaggi con TTN, sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo monoclonale anti IgM di spigola (Aquatic Diagnostic Ltd, Stirling U.K.) in TBT per 90 min. I pozzetti sono stati lavati con TTN ed incubati per 90 minuti con un anticorpo secondario GAM-HRP (siero di capra anti-topo marcato con perossidasi, Sigma) diluito 1:500 in TBT (100 µl/pozzetto). Dopo vari lavaggi in TTN e in fosfato-citrato pH 5.0 (50 mM Na₂HPO₄ e 50 mM acido citrico), è stata aggiunta una soluzione di sviluppo costituita da: 0.04% o-fenildiammina in 50 mM tampone fosfato-citrato pH 5.0 contenente 0.0015% di H₂O₂. La soluzione di sviluppo, che evidenzia l'anticorpo secondario mediante una reazione colorimetrica, è stata lasciata agire per 20 minuti, poi la reazione è stata bloccata con acido solforico (H₂SO₄, 2M) 50 µl per pozzetto. Il valore di assorbimento relativo ad ogni pozzetto è stato misurato mediante un lettore automatico ELISA ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Ogni punto è stato eseguito in duplicato, ed i controlli negativi sono stati effettuati utilizzando sieri di spigole non esposti al patogeno, mentre sieri ottenuti da spigole immunizzate tramite somministrazione per via intraperitoneale dei ceppi di riferimento di *V. anguillarum* inattivati con formalina sono stati impiegati come controllo positivo. Il contenuto di Ig specifiche di ogni siero è stato espresso come valori di densità ottica (O.D.) ed i valori numerici come media±deviazione standard. Il test è stato analizzato statisticamente tramite χ^2 Test.

Agglutinazione batterica

Da ogni gruppo sperimentale sono stati campionati 10 soggetti, da ognuno di essi è stato prelevato il sangue e dopo centrifugazione è stato recuperato il siero.

Questo test è stato condotto su piastre di polistirene da 96 pozzetti a fondo piatto (MICROTEST Tissue culture Plate 96 well, Becton Dickinson). E' stato preso 1 ml di vaccino (S1, S2 Vibrio Vac, Schering Plough, UK) e centrifugato a 10.000 giri per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di tampone fosfato salino (PBS) 1X isosmolare spigola pH 7.2. Il test è stato eseguito in triplicato e per ciascun campione di siero sono stati presi 50 µl e messi in un singolo pozzetto, a questi sono stati aggiunti 50 µl di vaccino (rapporto 1:1). La piastra è stata posta a temperatura ambiente in agitazione per 10-30 minuti in modo da poter

miscelare le due componenti; trascorso questo tempo la piastra è stata osservata al microscopio rovesciato (Axiovert 25, Carl Zeiss, Germany).

L'agglutinazione batterica si basa sul principio che in presenza di una quantità di antigene la concentrazione dell'anticorpo (Ig) condiziona il legame antigene-anticorpo (Abbas et al., 2000). Il grado d'agglutinazione viene espresso con dei numeri a seconda della quantità di cellule agglutinate rilevate dall'osservazione dell'operatore. I valori sono stati espressi come media \pm deviazione standard ed il test è stato analizzato statisticamente tramite il test *t*-Student a 2 code. Prima di procedere negli esperimenti è stata costruita una retta di taratura (Fig. 1).

A)

| n. cellule agglutinate | Valori agglutinazione |
|------------------------|-----------------------|
| >100 | +++ |
| 100-51 | ++ |
| 50-21 | + |
| 20-11 | +/- |
| <10 | - |

B)

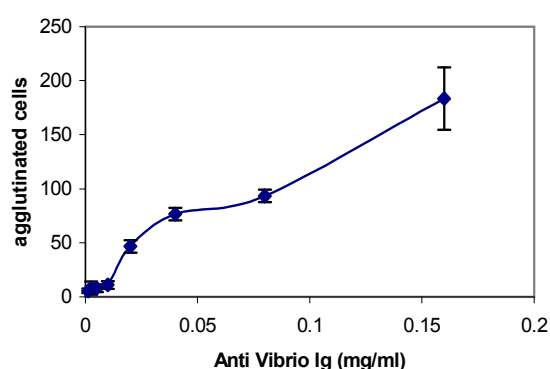


Figura 1. **A)** scala dell'agglutinazione batterica; **B)** Agglutinazione batterica in funzione della concentrazione di Ig specifiche nel siero. Ogni punto rappresenta una conta (in triplicato) di cellule agglutinate ottenute dalla diluizione del titolo sierico.

Chemiluminescenza

La metodica adottata è stato ricavata e parzialmente modificata partendo dall'esperienza di Coteur *et al.* (2002). Questo saggio ha previsto l'impiego di micropiastre a 96 pozzetti a fondo nero (NUNC) nei quali sono stati posti 100 μ l di vaccino per Vibriosi (Shering Plough) o mitogeno alle seguenti concentrazioni: vaccino, 106/107 cellule/ml, Forbolo Miristato Acetato (PMA) 20 μ g/ml, *Micrococcus luteus* 107 cellule/ml; LPS 20 μ g/ml (Sigma). In seguito sono stati aggiunti 50 μ l/pozzetto di luminol 2 mM (Sigma) in soluzione salina bilanciata di Hank (HBSS) e 50 μ l/pozzetto di leucociti purificati da milza e rene cefalico di soggetti sperimentali risospesi in HBSS alla concentrazione di 1×10^7 cell/ml. Queste cellule sono state purificate mediante gradiente Histopaque, ed in seguito riunite in pool. Ogni punto è stato allestito in triplicato e in ogni piastra esaminata sono stati predisposti dei pozzetti di controllo in cui è stata omessa l'aggiunta della sostanza stimolante. La luminescenza

sviluppata è stata misurata durante un tempo di incubazione di 1 ora ad intervalli di 5 min, alla temperatura costante di 25°C (Integration time = 0,5 sec; photomultiplier gain = 180, TECAN Infinite™ 200). La produzione di ROS è stata valutata sia in termini di risposta cumulativa, sia come cinetica di risposta (RLU/10⁷ cellule/ ml). Questo saggio ha rivelato delle differenze per quanto riguarda il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte dei leucociti purificati dagli organi linfatici e successivamente stimolati in micropiastro, in funzione della sostanza stimolante utilizzata. In particolare il “burst ossidativo” è stato promosso, rispetto alle colture di leucociti non stimolati, dal PMA e dal *Micrococcus luteus*. L'incubazione delle cellule con LPS e con il vaccino commerciale è apparsa invece ininfluente (Fig. 2a). Sono state inoltre evidenziate differenze nella cinetica di rilascio dei ROS da parte dei leucociti stimolati (Fig. 2b). Il PMA si è rivelato quindi il miglior stimolo da utilizzare per le analisi. I risultati del test sono stati analizzati statisticamente tramite χ^2 Test.

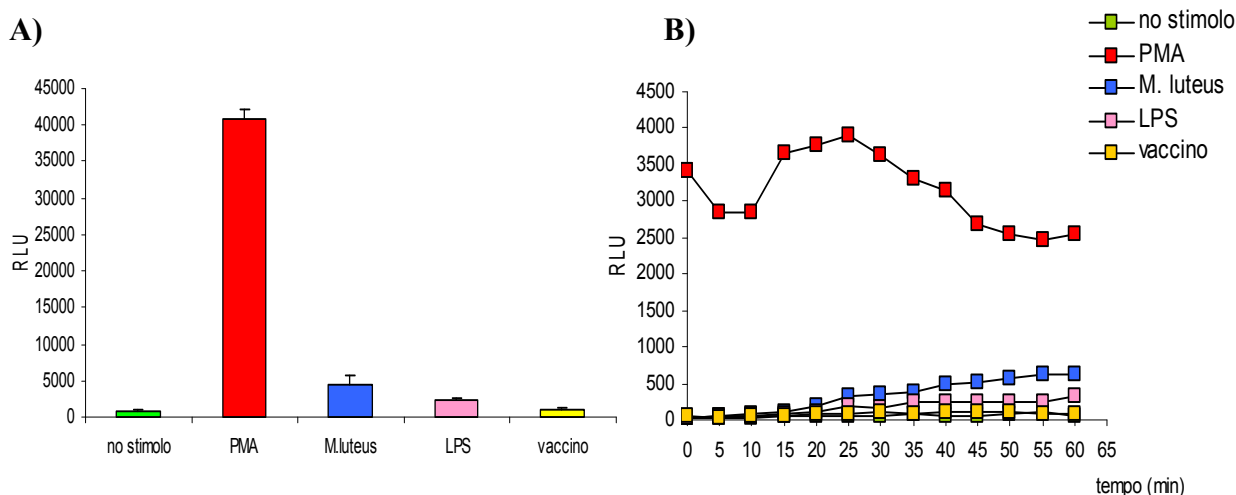


Figura 2. Confronto della risposta del saggio di chemiluminescenza in 60 min di stimolazione con PMA (20 μ g/ml), *M. luteus* (107 cellule/ml), LPS (20 μ g/ml) e vaccino (106/107 cellule/ml), in spigole di 291 giorni p.s. (V₁). **a)** Valutazione della risposta cumulativa; **b)** valutazione della cinetica.

Preparazione dei campioni per la microscopia ottica

Gli organi dissezionati delle spigole sono stati fissati in Bouin (Mazzi, 1977) e successivamente incluse in paraffina. Tale tecnica prevede le seguenti fasi:

- Giorno I: fissazione del pezzo per 7 ore nel fissativo Bouin a 4°C e successivo passaggio in alcool etilico 80% per tutta la notte a 4°C;

- Giorno II: passaggi successivi di circa 2 ore ciascuno in alcool etilico 90% a 4°C e uno per tutta la notte a 4°C;
- Giorno III: passaggi successivi di circa 3 ore ciascuno in alcool etilico 90% a 4°C e uno per tutta la notte a 4°C;
- Giorno IV: passaggi in alcool etilico 100% a temperatura ambiente (3 cambi da 30 minuti ciascuno), in Toluene a temperatura ambiente (2 cambi da 15 minuti ciascuno), in paraffina-toluene (45 minuti), in paraffina I (45 minuti), in paraffina II (45 minuti) e in paraffina d'inclusione (30 minuti) in stufa.

Le sezioni trasversali in serie dei principali organi linfoidi, con uno spessore di circa 7 µm, sono state preparate con un microtomo a slitta Reichert-Jung, raccolte su vetrini trattati con 3-Aminopropiltriethossilene al 2% ed asciugate in stufa a 37°C per una notte. I vetrini seriali così ottenuti, sono stati alternativamente utilizzati per effettuare analisi di immunoistochimica e reazioni di apoptosi.

Apoptosi (metodo ISEL)

I tessuti linfoidi di timo, rene cefalico e branchie degli esemplari vaccinati e di controllo di tutti gli stadi campionati, fissati in Bouin ed inclusi in paraffina (secondo le metodiche precedentemente descritte), sono stati processati per lo studio dell'incidenza dell'apoptosi mediante la tecnica della marcatura terminale *in situ* del DNA frammentato (ISEL). Tale tecnica, infatti, permette di evidenziare cellule con DNA frammentato (apoptotiche) su sezioni istologiche di tessuti inclusi in paraffina (Gravieli, 1992).

Le sezioni sparaffinate mediante immersione in toluene, sono state reidratate in serie decrescenti di alcool etilico (100%, 90%, 70%) e sciacquate per 5 minuti in tampone T.E. (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8); successivamente, sono state incubate per 20 minuti con tampone T.E. contenente Proteinasi K (10-20 µg/ml) (da *Tritirachium album* 17.5 U/mg; Sigma, U.S.A.); quindi sono state sciacquate in acqua distillata (D.W.) ed incubate per 5 minuti in D.W. contenente il 2% di H₂O₂ per neutralizzare le perossidasi endogene. Dopo vari risciacqui in D.W., le sezioni sono state lavate in tampone TDT (Tris 30 mM, sodio cacodilato 140 mM, cloruro di cobalto 1.75 mM, pH 7.2) ed incubate per 2 ore a 37°C con il tampone TDT contenente la miscela di marcatura del DNA composta da 0.3 I.U/µl di Terminal deossinucleotide Trasferasi (Promega), 2 µM di digoxigenina-11-dUTP (2'-deossiridina-5'-difosfato sale tetralitio; Roche) e 17 µM di dATP (2'-deossiadenosina-5'-trifosfato sale di sodio; Pharmacia). I controlli positivi sono stati effettuati impiegando la

deossiribonucleasi I (DNAsi I) (da pancreas bovino, Pharmacia; 1µg/ml disciolta in Tris 10 mM, cloruro di sodio 10 mM, cloruro di magnesio 10mM, cloruro di potassio 25 mM, cloruro di calcio 0.1 mM, pH 7.4) per 15 minuti a temperatura ambiente (T.A), prima dell'incubazione con la miscela di marcatura del DNA. La Terminal trasferasi è stata omessa nelle sezioni impiegate come controllo negativo.

Successivamente le sezioni sono state lavate per 25 minuti, in continua agitazione, in tampone SSC (citrato di sodio 30 mM, cloruro di sodio 300mM, pH 7), sciacquate in D.W. e lavate in TBS (5.6 mM, pH 7.5). Poi sono state incubate per 20 minuti a T.A. in TBS contenente il 3% di albumina sierica bovina (BSA, Sigma), sciacquate in TBS ed incubate per 90 minuti a T.A. con siero di capra anti-digoxigenina coniugato con perossidasi (Fab Fragment, Roche) diluito 1:200 in TBS. Dopo vari lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate per 5 minuti in Tris 50 mM contenente 0.02% di diaminobenzidina (Sigma) e 0.015% di H₂O₂. Infine sono stati effettuati vari lavaggi in TBS, acqua di rubinetto e D.W., quindi le sezioni sono state disidratate in serie crescenti di alcool etilico (70%, 90%, 100%) e chiuse con vetrini portaoggetto per essere esaminate al microscopio ottico.

Per ogni organo sono state processate ed esaminate 5 sezioni non consecutive di 3 esemplari provenienti da ciascun gruppo sperimentale, vaccinato e di controllo.

Immunoistochimica

Le sezioni trasversali dei principali organi linfoidei di spigola (timo, rene cefalico, milza e branchie) degli esemplari vaccinati e di controllo di tutti gli stadi campionati (fissati in Bouin ed inclusi in paraffina, come precedentemente descritto), sono state utilizzate per condurre reazioni di immunoistochimica.

Le sezioni sparaffinate mediante immersione in toluene, sono state reidratate in serie decrescenti di alcool etilico (100%, 90%, 70%), lavate in PBS (0.1 M, pH 7.3) ed incubate per 20 minuti con PBS contenente 0.5% di perossido di idrogeno per ridurre l'attività delle perossidasi endogene. L'anticorpo monoclonale DLIg 3 è stato utilizzato puro, mentre il BRM-22 (anti-HSP70, Sigma) diluito in PBS 0.1 M, pH 7.3, contenente il 5% di siero normale di cavallo, il 5% di siero normale di spigola e lo 0.1% di sodio azide e incubati per 18 ore a T.A. Nelle sezioni di controllo, l'anticorpo primario è stato sostituito con il terreno di coltura per mielomi.

L'anticorpo monoclonale DLIg3 (classe isotipica IgG1) è stato ottenuto immunizzando i topi con siero di spigola purificato attraverso una cromatografia di affinità proteina A-Sefarosio.

E' stato dimostrato che DLlg3 è specifico per le immunoglobuline nelle cellule fissate e vive (Scapigliati et al., 1996; Abelli et al., 1996).

Dopo i lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 1 ora a 25°C con IgG di siero di cavallo anti-topo biotinilato coniugato con perossidasi (Vector Labs, Burlingame, USA) diluito 1:1000 con PBS contenente lo 0.1% di sodio azide e l'1% di albumina sierica bovina (BSA, Sigma), seguita da incubazione di 1 ora con il complesso avidina-biotinilata perossidasi (ABC, Vectastain® Elite, Vector) con le soluzioni di avidina e della perossidasi biotinilata diluite 1:2000 nel tampone salino Tris (TBS: 0.05 M, pH 7.6). Successivamente ai lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate nel tampone Tris 0.05 M contenente 0.4% di nickel ammonio solfato, 0.02% di diaminobenzidina e 0.015% di perossido di idrogeno. Dopo i lavaggi in tampone Tris, le sezioni sono state deidratate in serie crescenti di alcool etilico (70%, 90%, 100%), montate ed esaminate al microscopio ottico.

Per ogni organo sono state processate ed esaminate 5 sezioni non consecutive di 3 esemplari provenienti da ciascun gruppo sperimentale, vaccinato e di controllo.

Analisi quantitativa e statistica

I Vetrini utilizzati nelle reazioni di immunoistochimica e apoptosi sono stati osservati con il microscopio Axioskope 2 plus (ZEISS), collegato ad un sistema computerizzato di analisi di immagine, AxioCam KS 300 (ZEISS). Per ciascun organo di ogni gruppo sperimentale (3 individui per stadio), è stato calcolato il numero di cellule positive (solo quelle nucleate) per l'unità di superficie di 100.000 μm^2 , le misure ottenute sono state raggruppate per ottenere valori cumulativi delle medie e della deviazione standard e i risultati numerici sono stati analizzati mediante il test del *t*-Student.

ELISA sandwich

Gli organi linfoidi delle spigole (timo, rene cefalico, e branchie) di entrambi i gruppi sperimentali raccolti in un unico pool; sono stati posti, con rapporto 1:4 (p/v), in un tampone di lisi (TRIS-HCl, pH7.6) contenente il 3% di Nonidet P-40 e vari inibitori delle proteasi (aprotina, leupeptina, antipaina, pepstatina A, PMSF) ed omogenati in ghiaccio mediante Ultraturrax® (IKA). La concentrazione proteica del surnatante raccolto da ciascun campione è stata condotta mediante saggio Bradford e lettura allo spettrofotometro a 595 nm. Per la determinazione dell'espressione di HSP70 nell'omogenato, mediante ELISA sandwich, sono

state utilizzate piastre a 96 pozzetti ad alta capacità legante (ELISA-strip Greiner, Labortechnik). L'anticorpo monoclonale anti-HSP70 (clone BRM-22, Sigma) diluito 1:500 in tampone carbonato/bicarbonato (50mM, pH 9.6) è stato fatto adsorbire in ogni pozzetto (100 µl/pozzetto) ed incubato per una notte a 4°C. In seguito i pozzetti sono stati lavati per 3 volte con il tampone PBS contenente lo 0.05% (v/v) di tween 20 ed i siti di legame saturati con incubazione di 1 ora in tampone PBS contenente lo 0.05% di tween 20 e l'1% di albumina sierica bovina. Dopo 3 ulteriori lavaggi sono stati aggiunti i surnatanti dei campioni (stessa concentrazione per pozzetto) diluiti in tampone PBS contenente lo 0.05% di tween 20 e l'1% di albumina sierica bovina (100 µl/pozzetto) ed incubati per 2 ore a 37°C. In seguito i pozzetti sono stati lavati per 3 volte ed incubati per 1 ora a 37°C con l'anticorpo policlonale anti-HSP70 (StressGen) diluito 1:200 in PBS (100 µl/pozzetto). A seguito di ulteriori 3 lavaggi, i pozzetti sono stati incubati per 1 ora a 37°C con l'anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi diluito 1:100 in PBS. Infine dopo gli ultimi lavaggi è stata aggiunta la soluzione di sviluppo ABTS come substrato cromogeno ed il valore di assorbimento relativo ad ogni pozzetto è stato misurato mediante una lettura spettrofotometrica a 405 nm. Ogni punto è stato eseguito in duplicato, ed i controlli negativi sono stati compiuti omettendo l'anticorpo primario mentre l'HSP70 di cervello bovino è stata impiegata come controllo positivo per calibrare la retta degli standard. I valori numerici sono stati espressi come media \pm deviazione standard ed il saggio è stato analizzato statisticamente tramite il test *t*-Student a 2 code.

RISULTATI

Valutazione dell'efficacia della vaccinazione

La valutazione dell'efficacia della vaccinazione contro *Vibrio anguillarum* è stata effettuata analizzando sia la variazione dei parametri dell'immunità specifica che quelli dell'immunità non specifica.

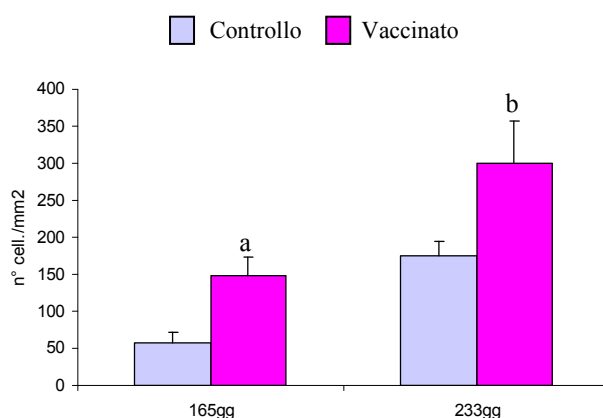
Immunità specifica

Per quanto riguarda il sistema immunitario specifico, è stata valutata la distribuzione (per immunoistochimica) e la funzionalità dei linfociti B, responsabili una volta attivati

dall'antigene, della produzione di immunoglobuline specifiche (per ELISA) in grado di agglutinare il *Vibrio anguillarum* (test di agglutinazione).

Le reazioni di immunoistochimica sono state condotte utilizzando l'anticorpo monoclonale DL1g3 sulle sezioni di milza e rene cefalico di esemplari di controllo e vaccinati a 165 giorni p.s. (70 giorni dopo la vaccinazione per immersione) e a 233 giorni p.s. (68 giorni dopo il primo richiamo per immersione). A 165 giorni è stato osservato, sia nella milza che nel rene cefalico, un aumento significativo del numero dei linfociti B nei soggetti vaccinati (149 ± 25 e 157 ± 56 rispettivamente, $P < 0.001$) rispetto ai controlli (57 ± 14 milza; 52 ± 28 rene cefalico) (Fig. 3a, b). A 233 giorni in entrambi gli organi è stato osservato un incremento significativo del numero dei linfociti B degli esemplari vaccinati (300 ± 58 e 2960 ± 1108 rispettivamente, $P < 0.01$) rispetto ai controlli (175 ± 20 milza; 501 ± 155 rene cefalico) (Fig. 3a, b).

A)



B)

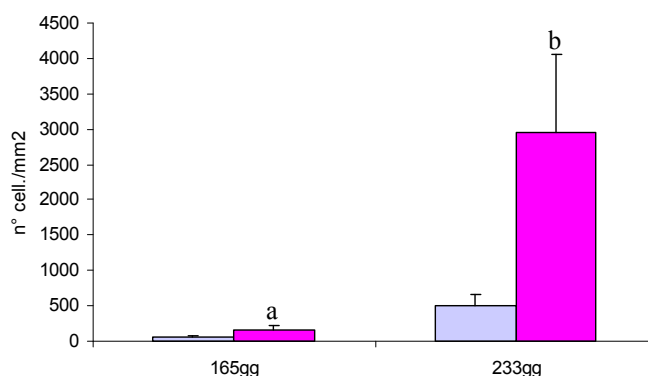


Figura 3. Variazione del numero di linfociti B ottenuta mediante reazioni di immunoistochimica con l'anticorpo DL1g3: A) nella milza a 165 e 233 giorni p.s.; B) nel rene cefalico a 165 e 233 giorni p.s. (a) vaccinato *Vs* controllo ($P < 0.001$), test *t*-Student a 2 code; (b) vaccinato *Vs* controllo ($P < 0.01$), test *t*-Student a 2 code.

L'analisi ELISA condotta sui sieri delle spigole vaccinate e non, non ha evidenziato differenze significative tra i soggetti 70 giorni dopo la prima immunizzazione per bagno (165 giorni p.s.) e i soggetti di controllo. E' stato evidenziato invece un sensibile incremento degli anticorpi specifici per *Vibrio anguillarum* nei soggetti vaccinati sottoposti al secondo richiamo ($P<0.01$) e un incremento consistente in quelli successivamente sottoposti al richiamo vaccinale per iniezione intraperitoneale ($P<0.01$). In particolare, i soggetti sottoposti al richiamo per via intraperitoneale (V_1 , 291 giorni p.s.) hanno mostrato un valore di densità ottica (O.D.) del siero significativamente più alto rispetto a quello dei soggetti di controllo e dei soggetti a cui è stato iniettato PBS (V_2 , 291 giorni p.s.; $P<0.01$) (Fig. 4).

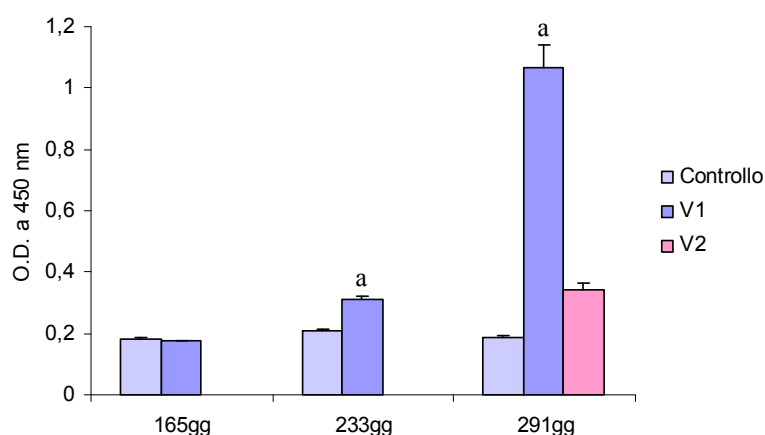


Figura 4. Immunoglobuline specifiche anti-*Vibrio anguillarum* presenti nei sieri delle spigole vaccinate e non durante la sperimentazione. (a) 291gV₁ Vs controllo e Vs 291gV₂ ($P<0.01$), χ^2 Test. O.D.: densità ottica; V₁: due vaccinazioni per bagno ed una iniezione per i.p.; V₂: due vaccinazioni per bagno.

Il test di agglutinazione batterica effettuato sui sieri prelevati dalle spigole immunizzate e di controllo ha evidenziato negli esemplari vaccinati un progressivo aumento della capacità delle immunoglobuline specifiche anti-*Vibrio* di agglutinare la componente batterica ($P<0.01$) in tutti i campioni analizzati rispetto ai controlli. Negli esemplari a 291 giorni che hanno ricevuto un'iniezione intraperitoneale di PBS (V_2) la capacità di agglutinazione è comparabile a quella del gruppo vaccinato con *Vibrio anguillarum* per i.p. (Fig. 5).

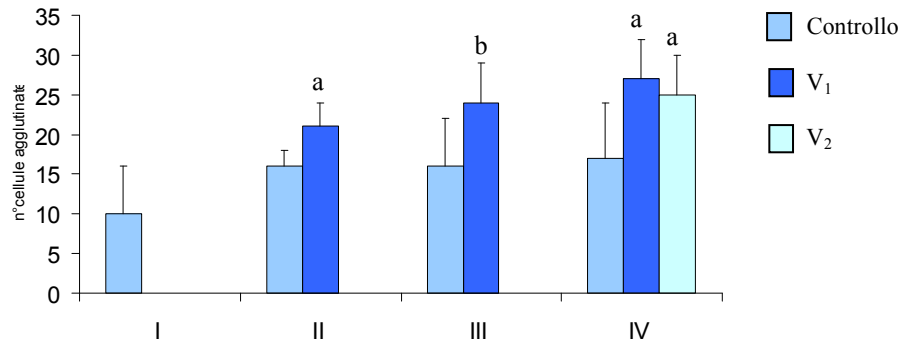


Figura 5. Andamento del test di agglutinazione batterica durante i quattro campionamenti (I-IV). (a) V₁ Vs controllo, V₂ Vs controllo (P<0.001), test *t*-Student a 2 code; (b) V₁ Vs controllo (P<0.01), test *t*-Student a 2 code.

Immunità non specifica

Per quanto riguarda invece il sistema immunitario non specifico sono stati effettuati saggi di chemiluminescenza per valutare l'attività di "scoppio ossidativo" (*burst*) nei leucociti purificati da milza e rene cefalico raccolti insieme ad ogni campionamento. La capacità di rilascio di ROS da parte dei leucociti purificati e stimolati con PMA (Fig. 6) aumenta durante la crescita dei pesci (da 95 a 291 giorni p.s.) (P<0.01). Inoltre sono state rilevate differenze anche tra soggetti di controllo e vaccinati della medesima età, con valori significativamente maggiori nelle spigole sottoposte alla vaccinazione (P<0.01).

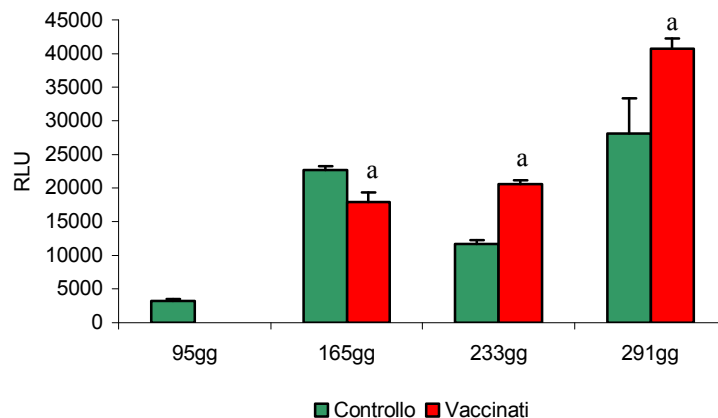


Figura 6. Valutazione della risposta cumulativa del saggio di chemiluminescenza (RLU/10⁷ cellule * ml⁻¹) in 60 minuti di stimolazione con PMA (20 µg/ml), nel corso dell'intera sperimentazione. (a) vaccinati Vs controlli (P<0.01), χ^2 Test.

Apoptosi

Nel timo di esemplari di controllo, da 95 a 291 giorni p.s., le cellule apoptotiche risultano essere localizzate, in gruppi di 3-4 cellule, principalmente nella porzione corticale, nel bordo cortico-medullare ed in misura minore nella medulla ($P < 0.01$) (Fig. 5 e 11°, b, d). Come è possibile osservare in figura 5, la densità delle cellule apoptotiche tende a diminuire nel tempo. Nei soggetti vaccinati (dal 165° al 291 giorno p.s.), in tutti gli stadi considerati, la distribuzione ed il numero delle cellule apoptotiche non subisce sostanziali variazioni e la loro densità si mantiene comparabile a quella dei controlli (Fig 5 e 11c, e, f).

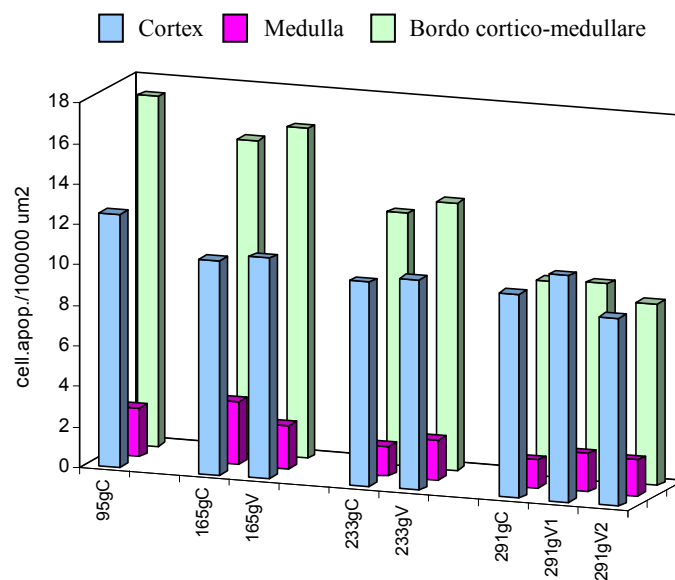


Figura 5. Variazione del numero di cellule apoptotiche nel timo prima e dopo la vaccinazione. In primo piano gli istogrammi indicano l'andamento delle cellule apoptotiche nel cortex; in secondo piano l'andamento di quelle della medulla; in terzo piano viene mostrato il numero delle cellule apoptotiche nel bordo cortico medullare (le barre di deviazione standard sono state rimosse per chiarezza).

Durante la sperimentazione, da 95 a 291 giorni p.s., nel rene cefalico degli esemplari di controllo, le cellule apoptotiche sono principalmente localizzate nella porzione più esterna dell'organo presso i centri linfoidei (Fig. 12a, b). L'analisi densitometrica ha evidenziato che la numerosità delle cellule apoptotiche rimane costante nel tempo (Fig. 6) Nei soggetti vaccinati non si osservano sostanziali variazioni rispetto ai controlli (Fig.6 e 12c,d).

Nei controlli dal 95° al 291° giorno p.s. le branchie mostrano una organizzazione a lamelle 1° e 2°. Le cellule apoptotiche risultano distribuite nella mucosa delle lamelle secondarie situate

nella porzione prossimale della lamella primaria (Fig. 12i, l). A 95 giorni p.s., le apoptosi sono abbastanza numerose (8 ± 1.7), in seguito si osserva una progressiva diminuzione numerica (Fig. 7).

Nei soggetti vaccinati la distribuzione ed il numero delle cellule apoptotiche non subisce sostanziali variazioni e la loro densità si mantiene uguale ai rispettivi controlli (Fig. 7 e 12m, n).

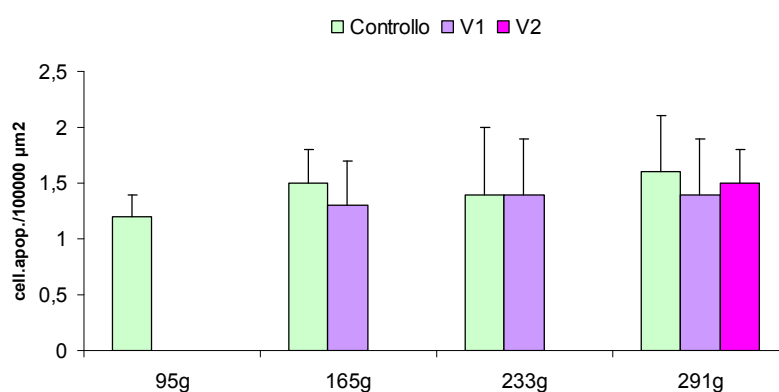


Figura 6. Variazione del numero di cellule apoptotiche nel rene cefalico prima e dopo la vaccinazione.

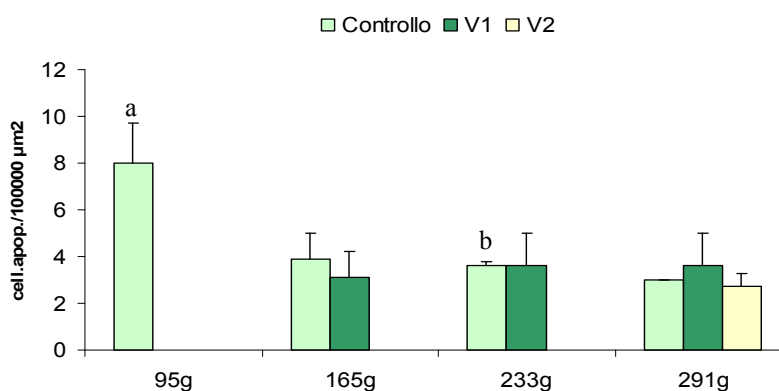


Figura 7. Variazione del numero di cellule apoptotiche nelle branchie prima e dopo la vaccinazione. (a) 95g Vs 165g controllo ($P < 0.05$), test *t*-Student a 2 code; (b) 233g controllo Vs 291g controllo ($P < 0.05$), test *t*-Student a 2 code.

Espressione dell'HSP70

La distribuzione delle cellule positive all'espressione l'HSP70 nel timo di esemplari di controllo è risultata uniforme in tutto l'organo (Fig. 11g, h, l). Tuttavia, la tendenza durante lo sviluppo sembra essere quella di un incremento di espressione (Fig. 8).

Nel timo dei soggetti vaccinati la densità delle cellule che esprimono l'HSP70 aumenta in modo significativo nel cortex a 233 giorni p.s. (20.5 ± 2.4 ; $P < 0.05$) (Fig. 11i). Nei soggetti che hanno subito due richiami (V_1) i livelli si mantengono significativamente elevati anche a 291 giorni p.s. (21.4 ± 0.9 ; $P < 0.05$) (Fig. 11m), mentre in quelli che hanno avuto un solo richiamo (V_2) l'espressione dell'HSP70 torna ad essere uguale ai controlli (Fig. 8 e 9n).

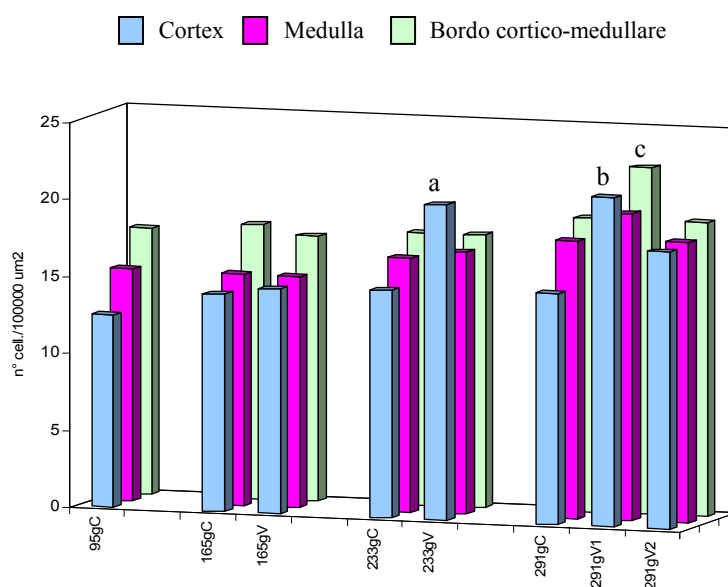


Figura 8. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nel timo prima e dopo la vaccinazione. In primo piano gli istogrammi indicano l'andamento dell'HSP70 nel cortex; in secondo piano l'andamento di quelle della medulla; in terzo piano viene mostrata l'espressione dell'HSP70 nel bordo cortico medullare (le barre di deviazione standard sono state rimosse per chiarezza, e i dati sono indicati nel testo) (a) 233gV cortex significativamente maggiore V_s controllo ($P < 0.05$), test del t -Student a 2 code; (b) 291gV₁ cortex significativamente maggiore V_s controllo, V_s 291gV₂ cortex ($P < 0.05$), V_s il cortex di tutti gli stadi precedenti controlli e vaccinati ($P < 0.01$), test del t -Student a 2 code; (c) 291gV₁ bordo cortico-medullare significativamente maggiore V_s 291gV₂ bordo cortico-medullare ($P < 0.05$), test del t -Student a 2 code.

Durante l'intera sperimentazione nel rene cefalico degli esemplari di controllo, le cellule positive all'HSP70 sono risultate essere localizzate nella porzione più periferica (Fig. 12e,f)

mentre nelle branchie le cellule HSP70⁺ sono concentrate nella mucosa delle lamelle secondarie situate all'apice di quelle primarie (Fig. 12o, p). In entrambi i tessuti la densità delle cellule rimane costante nel tempo (Fig. 9 e 10).

Nel rene cefalico e nelle branchie dei soggetti vaccinati la distribuzione ed il numero delle cellule che esprimono l'HSP70 non subisce sostanziali variazioni e la loro densità si mantiene uguale ai rispettivi controlli (Fig. 9, 10 e 12g, h, q, r).

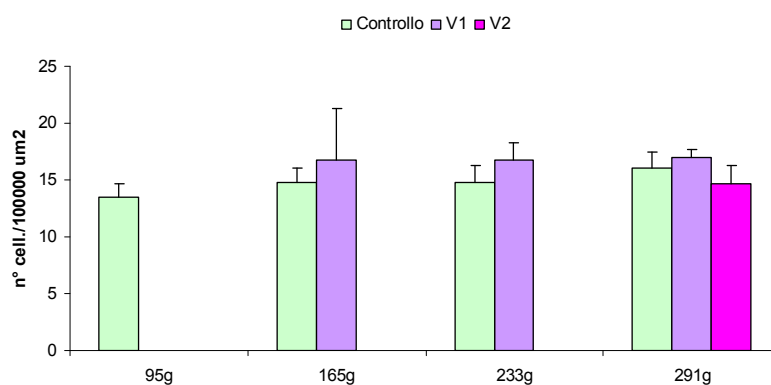


Figura 9. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nel rene cefalico prima e dopo la vaccinazione.

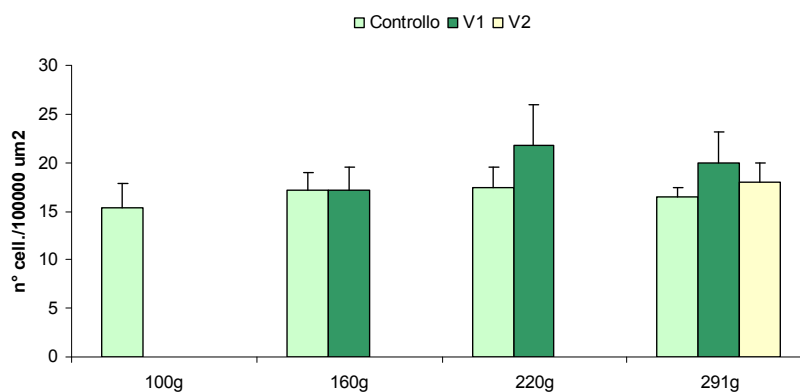


Figura 10. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nelle branchie prima e dopo la vaccinazione.

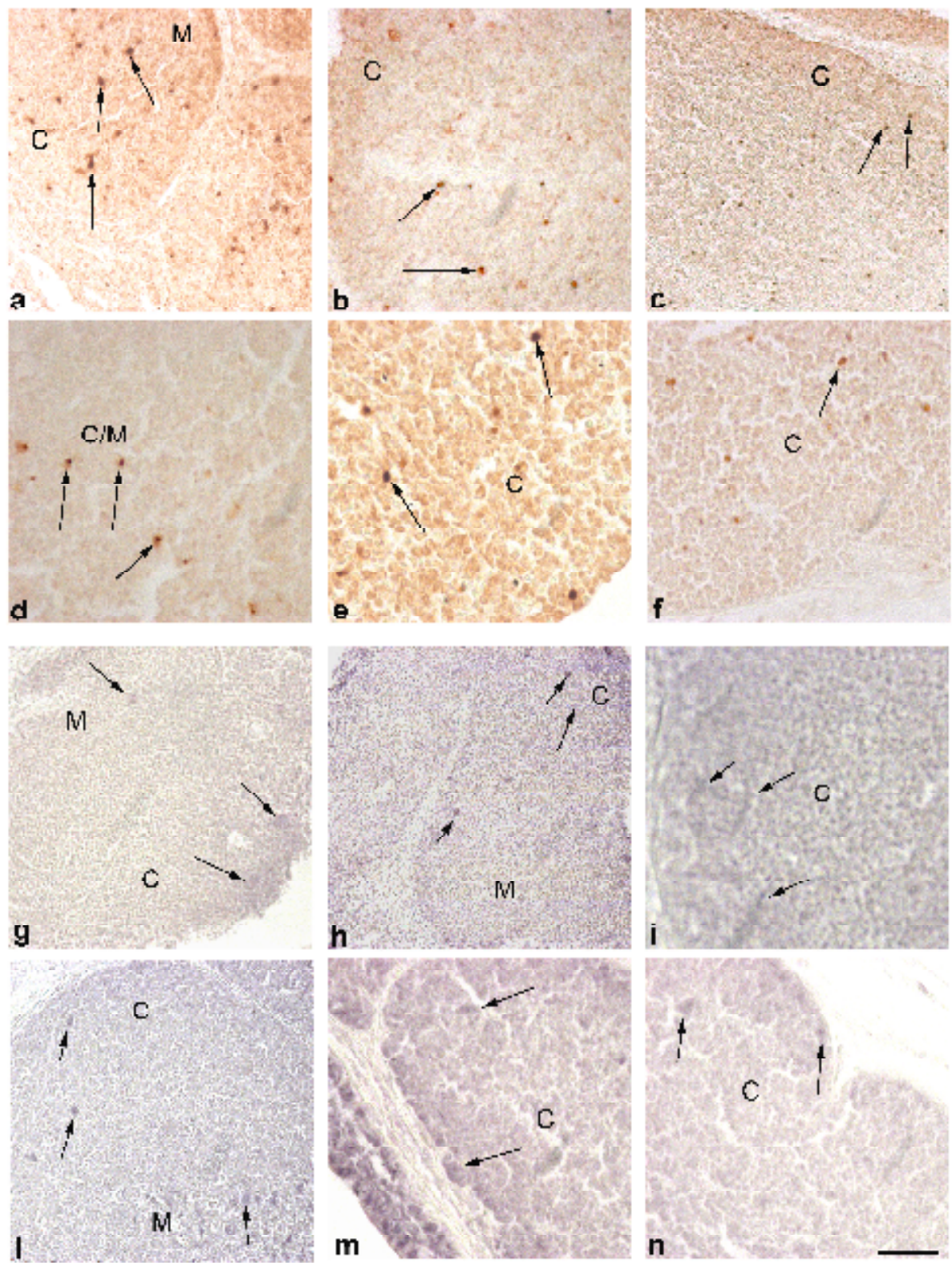


Figura 11. Reazione di apoptosi ed espressione delle HSP70 nel timo della spigola prima e dopo la vaccinazione. (a) A 95 giorni p.s. (pre-trattato) le cellule apoptotiche sono localizzate principalmente nel cortex e nel bordo cortico-medullare (freccette), Bar = 30 μ m. (b) A 165 giorni p.s. negli esemplari di controllo le cellule apoptotiche diminuiscono, mentre nei soggetti vaccinati corrispondenti (c) la densità e la distribuzione di tali cellule si mantiene comparabile a quella dei controlli (freccette), Bar = 30 μ m e Bar = 60 μ m rispettivamente. (d) A 291 giorni p.s. negli esemplari di controllo le cellule apoptotiche sono localizzate soprattutto nel cortex e nel bordo cortico-medullare (freccette) e la loro densità rimane invariata sia negli esemplari vaccinati per i.p. contro *Vibrio* (e) sia in quelli in cui è stato iniettato PBS (f) (freccette), Bar = 20 μ m, Bar = 15 μ m e Bar = 30 μ m rispettivamente.

(g) A 165 giorni p.s. nei soggetti di controllo le cellule che esprimono HSP70 sono distribuite uniformemente nell'organo e a 233 giorni p.s. (h) aumentano di densità (freccette), Bar = 80 μ m. (i) A 233 giorni p.s. nei soggetti vaccinati la densità delle cellule HSP70⁺ aumenta nel cortex in modo significativo (freccette), Bar = 20 μ m. (l) A 291 giorni p.s. nei soggetti di controllo le cellule che esprimono HSP70 aumentano in maniera uniforme nell'organo (freccette), Bar = 30 μ m. A 291 giorni p.s. negli esemplari che hanno subito due richiami (m) i livelli di HSP70 si mantengono elevati, mentre negli esemplari che hanno subito un solo richiamo (n) l'espressione della proteina si abbassa (freccette), Bar = 20 μ m. C = cortex, M = medulla, C/M = bordo cortico-medullare.

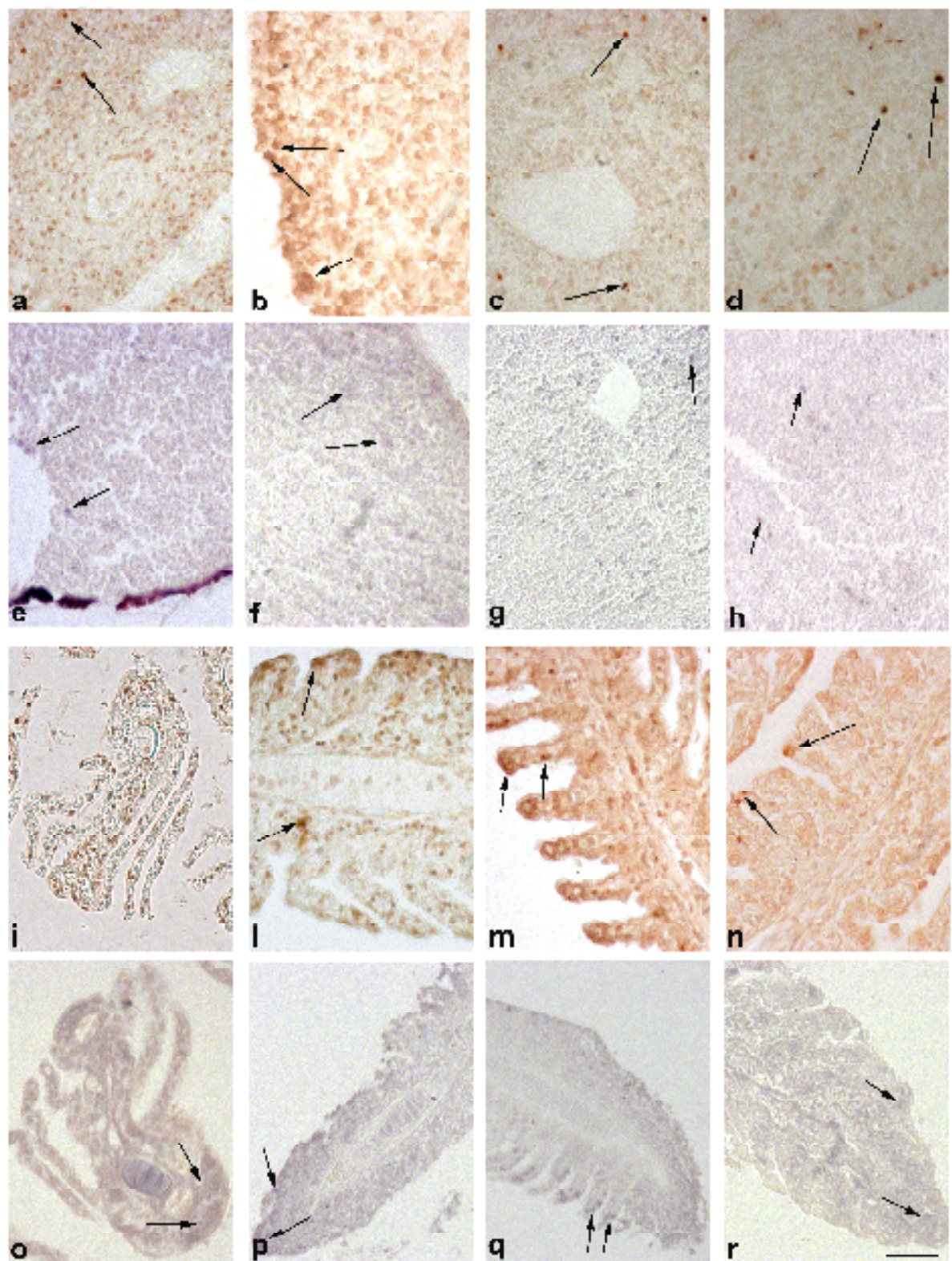


Figura 12. Reazione di apoptosi ed espressione delle HSP70 nel rene cefalico (a-h) e nelle branchie (i-r) di spigola prima e dopo la vaccinazione.

Rene cefalico:

(a) A 95 giorni p.s. (pre-trattamento) le cellule apoptotiche sono localizzate nella porzione più esterna dell'organo (freccie), Bar = 45 μ m. (b) A 233 giorni p.s. negli esemplari di controllo il numero delle cellule apoptotiche non varia rispetto agli stadi precedenti (freccia), Bar = 20 μ m. A 233 giorni p.s. (c) e a 291 giorni p.s. (d) nei soggetti vaccinati la densità di tali cellule è comparabile ai rispettivi controlli (freccie), Bar = 45 μ m.

(e) A 95 giorni p.s. (pre-trattamento) le cellule che esprimono HSP70 sono localizzate nella regione più periferica dell'organo (freccie), Bar = 45 μ m. (f) A 233 giorni p.s. negli esemplari di controllo il numero di tali cellule non varia rispetto agli stadi precedenti (freccie), Bar = 30 μ m. A 233 giorni p.s. (g) e a 291 giorni p.s. (h) nei soggetti vaccinati le cellule positive alle HSP70 rimangono comparabili ai rispettivi controlli (freccie), Bar = 30 μ m.

Branchie:

(i) A 95 giorni p.s. (pre-trattamento) le cellule apoptotiche sono evidenti soprattutto nelle lamelle secondarie, situate nella porzione prossimale della lamella primaria, Bar = 60 μ m. (l) A 165 giorni p.s. nei soggetti di controllo tali cellule diminuiscono rispetto allo stadio precedente (freccia), Bar = 30 μ m. A 165 giorni p.s. (m) e a 291 giorni p.s. (n), nei soggetti vaccinati le apoptosi si mantengono comparabili ai rispettivi controlli (freccie), Bar = 45 μ m e Bar = 20 μ m rispettivamente.

(o) A 95 giorni p.s. (pre-trattamento) le cellule che esprimono HSP70 sono localizzate principalmente nella mucosa delle lamelle secondarie, situate all'apice di quelle primarie (freccie), Bar = 30 μ m. (p) A 165 giorni p.s. nei soggetti di controllo il numero di tali cellule non varia rispetto agli stadi precedenti (freccia), Bar = 60 μ m. A 165 giorni p.s. (q) e a 291 giorni p.s. (r), nei soggetti vaccinati la densità delle cellule HSP70⁺ si mantiene comparabile ai rispettivi controlli (freccie), Bar = 45 μ m.

La valutazione mediante ELISA-sandwich dell'espressione delle HSP70 è stata condotta sull'omogenato dei singoli organi di spigole a 233 e 291 giorni p.s. sia degli esemplari di controllo che vaccinati (V_1 e V_2). I valori basali di HSP70 osservati nel timo e nelle branchie degli esemplari di controllo non sembrano mostrare differenze significative tra loro, sia in termini di distribuzione tissutale che di età delle spigole. Per quanto riguarda invece l'andamento del parametro nei soggetti vaccinati, il timo sembrerebbe essere l'unico organo in cui le differenze di HSP70 risultano piuttosto marcate nei confronti dei gruppi di controllo. In particolare, nelle spigole vaccinate a 95 giorni per immersione e con singolo richiamo a 165 giorni, è stato possibile evidenziare un incremento del livello timico di HSP70 a 233 giorni, con valori che ritornano alle condizioni di controllo a 291 giorni. Nelle spigole sottoposte ad un secondo richiamo intraperitoneale a 233 giorni, invece, i valori timici della proteina rimangono alti, rispetto al controllo, anche nei campioni di 291 giorni.

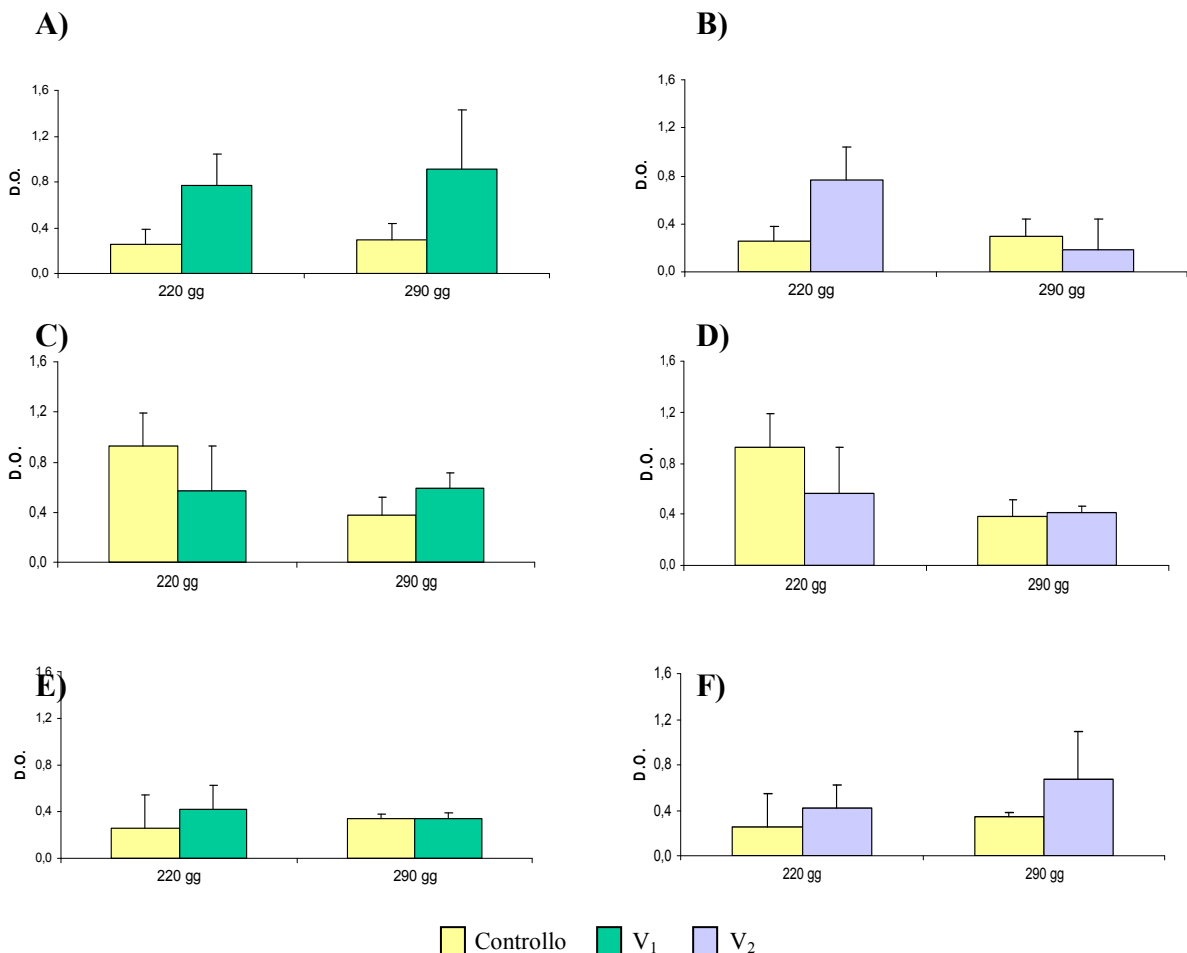


Figura X. Andamento dell'espressione dell'HSP70 nell'ELISA-sandwich: A) nel timo degli esemplari di controllo e nel gruppo V_1 ; B) nel timo degli esemplari di controllo e nel gruppo V_2 C) nel rene cefalico degli esemplari di controllo e nel gruppo V_1 ; D) nel rene cefalico degli esemplari di controllo e nel gruppo V_2 ; E) nelle branchie degli esemplari di controllo e nel gruppo V_1 ; F) nelle branchie degli esemplari di controllo e nel gruppo V_2 .

DISCUSSIONE

La spigola è una delle specie più sensibili alle infezioni provocate da *Vibrio anguillarum* e numerosi sono i vaccini commerciali che offrono un'efficace protezione nei confronti di questo patogeno. Tuttavia, durante l'allevamento intensivo, la manipolazione e le avverse condizioni dell'acqua possono provocare l'insorgenza della patologia in vasca, con perdite animali spesso cospicue (Wedemeyer et al., 1996; Vijayan et al., 1997a; Håstein et al., 2005). Questo può essere dovuto all'instaurarsi di una immunodepressione dovuta a condizioni di stress cui è sottoposto il pesce (Ellis, 1981, Anderson, 1990; Barton e Iwama, 1991 Schreck, 1996; Harris e Bird, 2000), ma anche dal fatto che spesso i cicli vaccinali risultano poco efficienti nella protezione al patogeno nel tempo (Ellis, 2001). E' noto che soggetti immunizzati contro la vibriosi sviluppano una risposta anticorpale specifica nei confronti di *Vibrio anguillarum* (Smith, 1985; Salinas et al., 2004; Salati, 2005; Angelidis, 2006; Angelidis et al., 2006), ma questa risposta è dipendente dalla taglia e dalla modalità di vaccinazione cui è sottoposto l'animale (Moore et al., 1998; Nakanishi e Ototake, 1997; do Santos et al., 2001). Generalmente negli impianti ittici la vaccinazione si effettua per bagno su spigole di 4-10 grammi (Angelidis, 2006; Angelidis et al., 2006; Viale et al., 2006), anche se una taglia maggiore potrebbe dare risultati migliori visto che al crescere del pesce aumentano il numero dei leucociti (Romano et al., 1997b) o dei siti per la captazione antigenica in grado di processare grandi quantità di vaccino (Tatner e Horne, 1983). Grazie a nuove informazioni sullo sviluppo del sistema immunitario della spigola (Abelli et al., 1997; Picchiotti et al., 1997, 2008; dos Santos et al., 2000a; Buonocore et al., 2008) potrebbe essere possibile ridurre la taglia di vaccinazione intorno ad 1 grammo (circa tre mesi post-schiusa). Attualmente però non sono disponibili indicazioni precise sull'efficacia e durata di tale vaccinazione e se, attuando richiami vaccinali, possa aumentare l'efficienza e la durata della risposta antigenica al patogeno (Galeotti et al., 2001). Nel presente lavoro è stata valutata l'efficacia di cicli vaccinali contro *Vibrio anguillarum* (ciclo completo: due vaccinazioni per bagno ed una iniezione per i.p.; ciclo incompleto: solo due vaccinazioni per bagno) sul sistema immunitario specifico e non specifico in giovanili di spigola dal 95° al 291° giorno p.s. Parallelamente è stata indagata la possibilità di utilizzare come indicatori di efficacia di risposta immunitaria l'analisi del processo di induzione apoptotica e l'espressione di una delle proteine dello shock termico, HSP70, negli organi immunitari più superficiali e quindi maggiormente esposti alla vaccinazione per bagno.

Immunità specifica

Il sistema immunitario specifico della spigola è diretto dai linfociti T e B, che posseggono molte caratteristiche comparabili con quelle dei mammiferi (Romano et al., 1997a, 2005, 2007; Buonocore et al. 2007, 2008; Picchietti et al., 2008). Inoltre per tale specie sono disponibili anticorpi monoclonali che riconoscono le due sottopopolazioni (Scapigliati et al., 1995, 1996; dos Santos et al., 1997, 2000b). In particolare l'anticorpo DLIg3 riconosce la maggior parte dei linfociti B e plasmacellule degli organi linfoidei (tessuti linfoidei associati) della spigola (Abelli et al., 1996; Romano et al., 1997c; Scapigliati et al., 2002). Tra i tessuti ematopoietici il rene cefalico, la milza e il sangue presentano il maggior numero di linfociti B rispetto ai T (Romano et al., 1997a) e probabilmente rene e milza sono responsabili della produzione, differenziamento e localizzazione dei centri di "memoria immunologica" (Romano et al., 1997a, 1998a; Pastoret et al., 1998). I risultati del ciclo di vaccinazione per bagno hanno dimostrato che la percentuale di linfociti B aumenta significativamente in entrambi gli organi e questo è accompagnato ad un aumento di immunoglobuline sieriche specifiche anti-*Vibrio anguillarum* rispetto ai controlli non vaccinati. Questo risultato indicherebbe che la vaccinazione per bagno di per se è efficace nell'aumentare la protezione al patogeno. Il test di agglutinazione ha confermato l'efficienza della vaccinazione in quanto le Ig specifiche sieriche di tutti gli individui vaccinati sono in grado di riconoscere ed agglutinare il *Vibrio* in modo più efficiente rispetto ai controlli. Inoltre è interessante notare che un ulteriore richiamo intraperitoneale non provoca sostanziali variazioni in tale efficienza. Non è infatti significativa la differenza tra la capacità agglutinante dei vaccinati intraperitoneo con *Vibrio* ed i vaccinati intraperitoneo con PBS. Il test di agglutinazione è stato messo a punto dal nostro gruppo per la spigola (Romano et al., Progetto Europeo STREP: WEALTH N. 501984) e si è rivelato efficace nel valutare la capacità funzionante delle immunoglobuline specifiche anti-*Vibrio* presenti nel siero. Analogamente altri gruppi hanno utilizzato tale analisi su altre specie marine e di acqua dolce (Hatanaka et al., 2007; Sahoo et al., 2008; Vega et al., 2008; Azimuddin et al., 2008).

Immunità non specifica

Una risposta immunitaria non specifica efficiente è in grado di contrastare di per se un patogeno (Magnadóttir, 2006), inoltre è accertato che le tipologie di risposta immunitaria di tipo specifico e non specifico sono coordinate dall'azione umorale e cellulare delle cellule fagocitarie (Abbas et al., 2000). Ad esempio, gli anticorpi riconoscono il patogeno e mediano la sua eliminazione tramite l'attivazione di cellule fagocitarie o del complemento (via classica) (Abbas et al., 2000). Analogamente a quanto accade nei mammiferi, i fagociti dei

pesci (granulociti e macrofagi) inglobano il batterio e lo eliminano tramite la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Neumann *et al.*, 2001) oltre che ad emettere le proteine del complemento, peptici antimicrobici e lectine (Yano, 1996; Ellis, 1999; Plouffe *et al.*, 2005). Il saggio di chemiluminescenza, basato sull'utilizzo del luminol, è una tecnica sensibile per la misurazione di varie specie di prodotti reattivi dell'ossigeno, come lo ione superossido, il perossido di idrogeno e l'ossigeno singoletto, rilasciati dai leucociti (Hasegawa *et al.*, 1997). Questa tecnica è stata già applicata per saggi di misurazione del *burst* ossidativo di cellule ottenute da organi linfatici di pesce, stimolate *in vitro* con sostanze immunostimolanti o antigeni batterici (Angelidis *et al.*, 1988; Clerton *et al.*, 1998; Vazzana *et al.*, 2003). La valutazione dell'efficacia del rilascio di ROS da parte dei leucociti purificati da rene cefalico e milza è stata effettuata in seguito a stimolazioni con diverse sostanze mitogene: vaccino commerciale contro la vibriosi, Forbolo Miristato Acetato (PMA), *Micrococcus luteus* ed LPS. La stimolazione più consistente si è avuta con il PMA (vedi sezione materiali e metodi) ed in misura minore con il *Micrococcus luteus*. Questi dati suggeriscono che il PMA probabilmente riesce a stimolare velocemente il “*burst* ossidativo”, mentre il *Micrococcus luteus* deve essere riconosciuto da recettori di superficie che innescano una risposta in tempi più lunghi. La capacità di rilascio di ROS da parte dei leucociti purificati e stimolati con PMA aumenta significativamente da 95 a 291 giorni p.s. sia nei controlli che nei vaccinati, dimostrando che l'aumento è dipendente principalmente dal fattore tempo, e quindi dalla crescita del pesce. La considerazione che i ROS aumentino in generale di efficienza durante lo sviluppo è un dato originale rispetto a lavori precedentemente condotti su individui adulti (Barnes *et al.*, 2002; Sarmiento *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2005) ed è in accordo con le ipotesi di un progressivo miglioramento della capacità di risposta immunitaria del pesce durante la crescita (Chistiakov *et al.*, 2007). Tuttavia, una differenza significativa è stata riscontrata tra i controlli ed i vaccinati. In particolare, nei gruppi vaccinati a 233 e 291 giorni p.s. la capacità dei ROS è significativamente ($P < 0.01$) maggiore rispetto ai controlli, dimostrando che anche il sistema immunitario non specifico beneficia, nella sua funzionalità, del ciclo vaccinale. A 165 giorni p.s. si osserva un'inversione di efficienza ROS tra gruppi, questo dato però deve essere considerato poco indicativo in quanto prima del campionamento a 165 giorni p.s. si è verificata nella vasca dei controlli un episodio di fotobatteriosi che ha probabilmente innalzato la capacità di risposta non specifica.

Apoptosi e HSP70

Dalla letteratura è noto che l'apoptosi può essere indotta in seguito ad infezione batterica suggerendone un ruolo nella patogenesi di alcune infezioni (Moss *et al.*, 1999; Weinrauch e

Zychlinsky, 1999). L'apoptosi rappresenta quindi non solo un evento naturale di maturazione, ma anche un processo indotto che causa l'eliminazione delle cellule immuni facilitando così l'invasione e la diffusione degli agenti infettivi. Nel presente lavoro il timo dei soggetti di controllo evidenziano una localizzazione principalmente corticale e di bordo cortico-medullare, in accordo con precedenti osservazioni (Abelli et al., 1998; capitolo II e III di questa tesi); inoltre si osserva una diminuzione progressiva delle cellule apoptotiche durante tutto l'iter sperimentale. Parallelamente le HSP70 vengono espresse con continuità senza che vi sia un incremento significativo. Tale risultato è in accordo con precedenti studi (Poltronieri et al., 2007). Prese insieme queste osservazioni suggeriscono che il processo maturativo dei linfociti intratimici avviene principalmente per apoptosi e che l'espressione delle HSP70 intervenga solo marginalmente. Anche per quanto riguarda le branchie e il rene cefalico la valutazione del fenomeno apoptotico e dell'espressione delle HSP70 ha evidenziato che non vi sono particolari differenze nel tempo, suggerendo che dai 95 giorni p.s. in poi la possibile eliminazione di linfociti autoreattivi è pressoché completata. L'apoptosi è ritenuta un processo fondamentale nella maturazione dei linfociti intratimici (Mc Donald e Lee, 1990; Cohen et al., 1991; Golstein et al., 1991) e tale processo sembra essere regolato dall'espressione delle HSP70 (Samali e Orrenius, 1998; Garrido et al., 2001; Sreedhar e Csermely, 2004; Beere, 2005; Kim et al., 2006; Didelot et al., 2006). Anche un evento stressante, come una impropria manipolazione degli animali e in definitiva la vaccinazione stessa, può causare un fenomeno apoptotico (do Vale et al., 2003). Accanto all'apoptosi la produzione delle heat shock proteins, in particolare dell'HSP70, sembra essere in relazione con il controllo della mortalità degli immunociti (linfociti e fagociti) in seguito ad eventi stressanti (Mosser et al., 2000; Arya et al., 2007). Nel presente studio si è quindi ritenuto necessario valutare da una parte la possibilità che la vaccinazione possa produrre uno stress e dall'altra valutarne l'effettiva entità e la capacità dell'individuo di rispondere a tale stress. E' infatti noto che stress limitati nel tempo possono stimolare il sistema endocrino a rispondere, migliorando l'efficienza dei processi fisiologici inclusi quelli relativi al sistema immunitario (Maule e Schreck, 1990; Weyts et al., 1998; Vizzini et al., 2007). Il fenomeno apoptotico valutato negli individui vaccinati non ha evidenziato particolari differenze rispetto agli individui di controllo. Tale valutazione evidenzia che il procedimento di vaccinazione per bagno non provoca di per se uno stress. A supporto di tale ipotesi vi sono studi precedenti su trota (*Oncorhynchus mykiss*) che hanno evidenziato che lo stress da manipolazione non ha effetto sull'espressione delle HSP70 (Vijayan et al., 1997a, b; Washburn et al., 2002). Tuttavia nel timo degli individui vaccinati, già al secondo richiamo per bagno si osserva un significativo aumento delle HSP70

a carico della porzione corticale e cortico-medullare. Tale incremento è ulteriormente rimarcato negli individui vaccinati per i.p. con *Vibrio anguillarum*, mentre nel gruppo che ha ricevuto per i.p. PBS non vi sono incrementi. Anche l'analisi ELISA dell'omogenato dei singoli organi ha confermato tale andamento. Questo suggerisce che l'espressione dell'HSP70 potrebbe essere in relazione all'attivazione dei centri di memoria timici e dell'attivazione del processo selettivo. E' stato infatti più volte suggerito che il cortex e il bordo cortico-medullare sono implicati nel processo di maturazione dei linfociti (Abelli et al., 1996; Romano et al., 1997b; 1999b, 2005, 2007; Picchietti et al., 2008). Inoltre nel presente lavoro l'espressione delle HSP70 nella porzione medullare non presenta in nessun gruppo differenze significative. Tale osservazione sembra avvalorare il ruolo delle HSP70 come chaperoni coinvolti nell'attivazione del sistema immunitario (Binder et al., 2001, 2004; Todryk et al., 2003; Delneste et al., 2004; Calderwood et al., 2008). E' interessante notare che le HSP70 non subiscono variazioni nei gruppi vaccinati in organi come branchie e rene cefalico, suggerendo che la vaccinazione ha un effetto sulla spigola sui linfociti ("centri di memoria"?) localizzati principalmente nel timo.

In conclusione, questo studio ha valutato l'efficacia di diversi cicli vaccinali, suggerendo che la precoce vaccinazione per bagno, seguita da una seconda dopo tre mesi, può rappresentare una buona copertura al patogeno senza ricorrere a procedure vaccinali più stressanti come quella per iniezione. Inoltre tale studio ha suggerito la possibilità di avvalersi di indicatori per monitorare/migliorare la modalità di somministrazione del vaccino. Tali indicatori potrebbero essere per il sistema immunitario specifico la valutazione dell'efficienza di agglutinazione e l'espressione timica delle HSP70 e per quanto riguarda il sistema immunitario non specifico la produzione di ROS per PMA.

CAPITOLO V

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni la massiccia espansione delle pratiche di acquacoltura ha reso evidente la problematica legata al benessere e alla salute dei pesci allevati in relazione all'ambiente e alle strategie di vaccinazione applicate. Questo ha reso necessario da una parte l'attuazione di condizioni di allevamento che mirino a mantenere l'equilibrio omeostatico del pesce e dall'altra il miglioramento delle pratiche di vaccinazione al fine di prevenire patologie e mantenere quindi elevata la produttività. Sulla base di queste problematiche sono stati condotti esperimenti per valutare gli effetti della temperatura sullo stato di salute in spigole durante lo sviluppo e l'efficacia di cicli vaccinali sul sistema immunitario specifico e non specifico di spigole giovanili.

Nel capitolo II, per valutare la localizzazione di possibili processi di selezione nel timo di diverse specie di Teleostei (durante lo sviluppo e in età adulta), è stato effettuato uno studio comparativo sulla presenza di cellule apoptotiche intratimiche in diverse specie di pesci. I risultati di questo studio hanno dimostrato che, in specie di Teleostei di acque temperate durante lo sviluppo del timo, il numero delle cellule apoptotiche aumenta progressivamente e tali cellule risultano essere maggiormente concentrate nel cortex e nel bordo cortico-medullare. Tuttavia, in tutti gli esemplari giovanili di queste specie il processo apoptotico diminuisce di intensità e rimane confinato nella porzione corticale.

Quindi si può concludere che nel timo dei pesci Teleostei di acque temperate il cortex ed il bordo cortico-medullare rivestono un ruolo fondamentale nella selezione negativa di linfociti autoreattivi come già indicato in studi precedenti (Abelli et al., 1998; Romano et al., 1999b, 2007; Picchietti et al., 2008). Inoltre la valutazione del fenomeno apoptotico nel timo di pesci naturalmente adattati a temperature estreme come quelli antartici, ha dimostrato un aumento di 4-7 volte (in dipendenza dalla specie analizzata) rispetto ai pesci di acque temperate. Il cortex in questo caso è la regione timica maggiormente esposta alle fredde acque polari (circa $-1\div 2^{\circ}\text{C}$) e probabilmente l'adattamento di queste specie sta, non solo nella estesa vascolarizzazione dell'organo (Romano et al., 2004) e quindi nell'attiva circolazione delle proteine anti-congelanti (Eastman e De Vries, 1996), ma anche in un'attiva eliminazione di linfociti T eventualmente danneggiati.

La spigola è una specie molto importante nella produzione ittica ed è ritenuta abbastanza sensibile alle variazioni di temperatura (Rottland et al., 2003; Bagni et al., 2005). Nella sperimentazione trattata nel capitolo III i risultati hanno confermato tale sensibilità ed hanno fornito in modo originale informazioni sullo stress da temperatura. Infatti lo stress procurato a 50 giorni p.s., un periodo larvale molto delicato per la maturazione del sistema immunitario, provoca una forte alterazione dell'apoptosi e dell'espressione delle HSP70. Tali risultati suggeriscono quindi che entrambi questi parametri potrebbero essere utilizzati nella spigola come efficaci indicatori di stress termico.

Tenendo conto di questa importante informazione, è stata allestita una sperimentazione atta a migliorare l'efficienza della vaccinazione nella spigola, ad individuare possibili indicatori utilizzabili per valutare l'acquisizione di immunità dopo somministrazione vaccinale ed infine controllare che le procedure di vaccinazione non inducano stress, secrezione di cortisolo (Weyts et al., 1998) e quindi possibile immunodepressione (Bly et al. 1991). Allo scopo, nel capitolo IV è stata fatta un'analisi della variazione di alcuni parametri di immunità specifica e non specifica in seguito a vaccinazione contro *Vibrio anguillarum*, dimostrando l'efficacia della vaccinazione stessa nei confronti del patogeno. I risultati hanno suggeriscono che due vaccinazioni per bagno sono già sufficienti per mantenere una protezione contro il patogeno (test di agglutinazione), anche se la produzione di immunoglobuline specifiche viene notevolmente incrementata in seguito a richiamo per i.p. (test ELISA). Per quanto riguarda l'analisi dell'attivazione del sistema immunitario non specifico, il ROS test ha dimostrato un notevole aumento già negli individui vaccinati per bagno. Tuttavia, non è stata ancora dimostrata nel pesce l'effettiva protezione indotta dalla vaccinazione in seguito ad infezione sperimentale con il *Vibrio* in quanto non è stato possibile procedere ad un *challenge* con il batterio. La sperimentazione è infatti ancora *in itinere* e si concluderà nel 2009. Attualmente sono in corso reazioni di immunoistochimica sui gruppi vaccinati e non contro *Vibrio anguillarum* per indagare anche sull'espressione di recettori per il complemento (CR1 o CD35) e per la porzione Fc delle immunoglobuline (FcR o CD16) espressi dalle cellule fagocitarie ed avvalorare ulteriormente l'ipotesi di attivazione del sistema immunitario non specifico in seguito a vaccinazione. Inoltre i risultati ottenuti sembrano evidenziare che il procedimento di vaccinazione per bagno può non essere considerato tra le possibili fonti di stress nelle pratiche di allevamento in quanto non è stato rilevato alcun significativo incremento delle apoptosi e dell'espressione delle HSP70 negli organi linfoidei esaminati. Tuttavia, il timo presenta un evidente incremento dell'espressione dell'HSP70 senza che vi sia una variazione del fenomeno apoptotico. Questo dato

sembrerebbe suggerire un ruolo di questi chaperoni nell'attivazione dei processi attivazione/selezione dei linfociti T, come per altro già dimostrato nei mammiferi (Binder et al., 2001, 2004; Todryk et al., 2003; Delneste et al., 2004; Calderwood et al., 2008). Sicchè la possibilità di utilizzare come “indicatori di efficacia di risposta immunitaria” indotta dalla vaccinazione stessa, l'espressione timica delle HSP70, l'efficienza di agglutinazione (sistema immunitario specifico) e la produzione di ROS (sistema immunitario non specifico), potrebbero aiutare l'allevatore/ricercatore a migliorare l'efficienza dei richiami vaccinali.

Nella pratica di laboratorio il test ROS e l'agglutinazione risultano essere relativamente semplici da eseguire, mentre il sistema di rilevazione dell'espressione dell'HSP70 potrebbe essere migliorato utilizzando delle tecniche che possano velocizzare le analisi, come ad esempio il dot-blot.

Inoltre è interessante notare che, analizzando i livelli di espressione della forma costitutiva dell'HSP70 registrati negli esemplari di controllo, da 47 a 70 giorni p.s. (capitolo III), e quelli negli esemplari da 95 a 291 giorni p.s. (capitolo IV), la quantità di tale proteina espressa durante lo sviluppo risulta essere maggiore rispetto a quella osservata in età giovanile. Tale osservazione è in accordo con il ruolo svolto dalle HSP nella regolazione dello sviluppo e nel differenziamento. Le HSP infatti, non hanno solo un ruolo di chaperone molecolare, ma intervengono nel normale programma di sviluppo sia nei mammiferi che nei Teleostei (Krone et al., 1997, 2003; Deane et al., 2003; Christians et al., 2003; Murtha et al., 2003; Evans et al., 2004).

BIBLIOGRAFIA

- Abbas A.K., Andrew H.L., Jordan S.P. (2002). Immunologia cellulare e molecolare. Piccin, Padova.
- 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.
- Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L, Scapigliati G (1997). Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 235-245.
- Abelli L., Baldassini M.R., Meschini R., Mastrolia L. (1998). Apoptosis of thymocytes in developing sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunology*, 8: 13-24.
- Abelli L., Baldassini M.R., Mastrolia L., Scapigliati G. (1999). Immundetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a teleost, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Immunol.*, 191: 152–160.
- Abelseth T.K., Stensvag K., Espelid S., Nygaard R., Ellingsen T., Bøgwald J., Dalmo R.A. (2003). The spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) complement component C3: isolation, characterisation and tissue distribution. *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 13-27.
- Acosta F., Real F., Ellis A.E., Tabraue C., Padilla D., Ruiz de Galarreta C.M. (2005). Influence of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 18: 31-38.
- Afonso A., Gomes S., da Silva J., Marques F., Henrique M. (2005). Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.*, 19(1): 1-16.
- Agius C. (1985). The melano-macrophage centres of fish: a review. In: *Fish Immunology*, (Manning, M.J. e Tatner, M. F. eds), London and San Diego: Academic Press, pp. 85-105.
- Albert M.L., Pearce S.F.A., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L. and Bhardwaj N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp.Med.*, 188(7): 1359-1368.
- Alcorn W.S., Murray A.L., Pascho R.J. (2002). Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish & Shellfish Immunology*, 12: 303-334.
- Altmann S.M., Mellon M.T., Distel D.L., Kim C.H. (2003). Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.*, 77: 1992-2002.

- Alvarez R. (1990). Thymus of *Rana perizi*: presence of interdigitating cells. *J. Morphol.*, 204: 305-312.
- Anderson D.P., (1990). Immunological Indicators: Effects of Environmental Stress on Immune Protection and Disease Outbreaks. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 8: 38-50.
- Angelidis P., Baudin Laurencin F., Youinou P. (1988). Effects of temperature on chemiluminescence of phagocytes of sea bass (*D. labrax* L.). *J. of Fish Disease*, 11: 281-288.
- Angelidis P. (2006). Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 90(1-2): 46-9.
- Angelidis P., Karagiannis D., Crump E.M. (2006). Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquart. Organ.*, 71(1): 19-24.
- Angelucci A. (2006). Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate. *Caleidoscopio italiano*, n° 198.
- Aoki T., Hirono I. (2006). Immune relevant genes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1(1): 115-21.
- API, Associazione Piscicoltori Italiani (2006). Programma di monitoraggio della situazione sanitaria degli impianti di acquacoltura marina e salmastra. Regione Toscana. I quaderni dell'Acquacoltura.
- Ardavin C.F., Zapata A. (1988). On the structural morphology of lampreys: a morphofunctional equivalent of the vertebrate thymus. *Thymus*, 11: 59-65.
- Arends M.J., Wyllie A.H. (1991). Apoptosis: Mechanism and role in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 32: 223-254.
- Arya R., Mallik M., Lakhota S.C. (2007). Heat shock genes-integrating cell survival and death. *J. Biosci.*, 32(3): 595-610.
- Avilès-Trigueros M., Quesada J.A. (1995). Presence of interdigitate cells in thymus of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleost). *J. Morphol.*, 224: 199-203.
- Azimuddin K , Hayakawa K , Kanazawa T , Adachi Y. (2008). Comparison of the hemagglutination of formalinized American channel catfish (*Ictalurus punctatus*) erythrocytes between formalinized and live *Aeromonas hydrophila* isolated from the catfish rearing in Kasumigaura lake in Japan. *J Vet. Med. Sci.*, 70(1): 111-4.
- Bacso Z., Everson R.B., Eliason J.F.(2000). The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res.*, 60(16): 4623-8.

- Bagni M., Romano N., Finoia M.G., Abelli L., Scapigliati G., Tiscar P.G., Sarti M., Marino G. (2005). Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunology*, 18: 311-25.
- Barnes A.C., Guyot C., Hansen B.G., Horne M.T., Ellis A.E. (2002). Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. *Fish Shellfish Immunology*, 12: 181-186.
- Barton B., Iwama G.K., (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- Barton B.A. (2002). Stress in fish: a diversity of response with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Soc. Integ. Comp. Biol.*, 42: 517-525.
- Becker J., Craig E.A. (1994). Heat Shock Proteins as molecular chaperones. *European Journal of Biochemistry*, 219: 11-23.
- Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T., Taylor P., Morimoto R.I., Cohen G.M., Green D.R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.*, 2: 469-475.
- Beere H.M. (2004). "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117: 2641-2651.
- Beere H.M. (2005). Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.*, 115: 2633-2639.
- Belosevic M., Hanington P.C., Barreda D.R. (2006). Development of goldfish macrophages in vitro. *Fish Shellfish Immunology*, 20: 152-171.
- Benedict C.A., Banks T.A., Ware C.F. (2003). Death and survival: viral regulation of TNF signalling pathways. *Current Opinion*, 15: 59-65.
- Bengtén E., Clem L.W., Miller N.W., Warr N.W., Warr G.W., Wilson M. (2006). Channel catfish immunoglobulins: repertoire and expression. *Dev. Comp. Immunol.*, 30: 77-92.
- Bernard D., Six A., Rigottier-Gois L., Messiaen S., Chilmonczyk S., Quillet E., Boudinot P., Benmansour A. (2006). Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *J. Immunol.*, 176: 3942-3949.
- Bigaj J., Plytycz B. (1984). Cytoarchitecture of the thymus gland of the adult frog *Rana temporaria*. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 22: 63-70.
- Binder J.R., Blachere N.E., Srivastava P.K. (2001). Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 17163-71.

- Binder J.R., Vatner R., Srivastava P. (2004). The heat-shock protein receptor: some answers and more questions. *Tissue Antigens*, 64: 442-51.
- Bird S., Zou J., Wang T., Munday B., Cunningham C., Secombes C.J. (2002). Evolution of interleukin-1 β . *Cyt. Growth Factor*, 13: 483-502.
- Blachere E.N., Li Z., Chandawarkar R.Y., Suto R., Jaikaria S.N., Basu S., Udono H., Srivastava K.P. (1997). Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 186: 1315-22.
- Bly J.E., Clem L.W. (1991). Temperature-mediated process in Teleost immunity: *in vitro* immunosuppression induced by *in vivo* low temperature in channel catfish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 28: 365-377.
- Bobe J., Goetz F.W. (2001). Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 129: 475-81.
- Botham, J.W., Manning, M.J. (1981). Histogenesis of the lymphoid organs in the carp, *Cyprinus carpio* L., and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J. Fish Biol.*, 19: 403-414.
- Bowden T.J., Butler R., Bricknell I.R. (2004). Seasonal variation of serum lysozyme levels in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 17: 129-135.
- Bowden T.J., Cook P., Rombout J.H. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 413-427.
- Brattgjerd S., Evensen Ø. (1996). A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in the head kidney phagocytes of experimentally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Veterinary Pathology* 33: 55-65.
- Buonocore F., Randelli E., Bird S., Secombes C.J., Costantini S., Facchiano A., Mazzini M., Scapigliati G. (2006). The CD8alpha from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cloning, expression and 3D modelling. *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 637-646.
- Buonocore F., Randelli E., Casani D., Costantini S., Facchiano A., Scapigliati G., Stet R.J. (2007). Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II beta chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 23(4):853-66.
- Buonocore F., Randelli E., Casani D., Guerra L., Picchietti S., Costantini S., Facchiano A.M., Zou J., Secombes C.J., Scapigliati G. (2008). A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization and structural analysis. *Mol. Immunol.*, 45(11): 3168-77.

- Busfield S., Comrack C., Yu G., Chickering T., Smutko J., Zhou H., et al. (2000). Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics*, 66: 213–6.
- Caccia E., Romano N., Strickler P., Ficca A.G., Vasta G. (2008). Ontogeny of antimicrobial peptides expression in a bony zebra fish (*Brachidanio rerio*). Manuscript in preparation.
- Calderwood S.K., Gong J., Theriault J.R., Mambula S.S., Gray P.J. Jr. (2008). Cell stress proteins: novel immunotherapeutics. *Novartis Found Symp.*, 291: 115-131; discussion 131-140.
- Carlson R.E., Anderson D.P., Bodammer J.E. (1993). *In vivo* cortisol administration suppresses the *in vitro* primary immune response of winter flounder lymphocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 3: 299-312.
- Castillo A., Lopez-Fierro P., Alvarez F., Zapata A., Villena A.J., Razquin B.E. (1991). Post-hatching development of the thymic microenvironment in the rainbow trout *Salmo gairdneri*: an ultrastructural study. *Am. J. Anat.*, 190: 299-307.
- Castillo A., Razquin B., Villena A.J., Zapata A.G., López-Fierro P. (1998). Thymic barriers to antigen entry during the post-hatching development of the thymus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 157-170.
- Cecchini, S., Saroglia, M. (2002). Antibody response in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in relation to water temperature and oxygenation. *Aquaculture Research*, 33: 607-613.
- Chantanachookhin C., Seikai T. Tanaka M. (1991). Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture*, 99: 143-155.
- Charlemagne J., Fellah J.S., De Guerra A., Kerfour F., Partula S. (1998). T-cell receptors in ectothermic vertebrates. *Immunology Rev.*, 166: 87-102.
- Chavin W. (1996). Adrenal histochemistry of some freshwater and marine teleosts. *Gen. Comp. Endocr.*, 6: 183-194.
- Chen L., De Vries A.L., Cheng C.H.C. (1997). Cold adaptation parameters derived from cDNA sequencing and molecular modelling of evastase from antarctic fish *Notothenia neglecta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 94: 3817-3822.
- Cheng C.A., John J.A., Wu M.S., Lee C.Y., Lin C.H., Chang C.Y. (2006). Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA of its heavy chain. *Vet. Immunol. Immunophatol.*, 109: 255-265.
- Chien Y.H., Jores R., Crowley M.P. (1996). Recognition by γ/δ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 511-32.
- Chilmonczyk S. (1992). The thymus in fish: Development and possible function in the immune response. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2: 181-200.

- Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M. (2007). Review on the immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Vet. Immunol. and immunopath.*, 177: 1-16.
- Christians E.S., Zhou Q., Renard J.P., Benjamin I.J. (2003). Heat shock proteins in mammalian development. *Seminars in Cell Dev. Biol.*, 14: 283–290.
- Clem L.W., Sizemore R.C., Ellsaesser C.F., Miller N.W. (1985). Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev. Comp. Immunol.*, 9: 803-809.
- Clem L.W., Miller N.W., Bly J.E. (1991). Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions, and temperature sensitivities. In *Phylogensis of immune functions* (G. Warr and N. Cohen, eds), pp. 191-213. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Clerton P., Troutaud D., Deschaux P. (1998). The chemiluminescence response of leukocytes isolated from the gut of rainbow trout (*O. mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 73-76.
- Cohen J.J. (1991). Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.*, 50: 55-85.
- Cohen J.J., Duke R.C., Fadok V.A., Sellins K.S. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 267–93.
- Criscitello M.F., Kamper S.M., Churchill McKinney E. (2004). Allelic polymorphism of TCR α chain constant domain genes in the bicour damselfish. *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 781-792.
- Cuesta A., Esteban M.A., Meseguer J. (2005). Molecular characterization of the non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity. *Dev. Comp. Immunol.*, 29: 637-650.
- Dalmo R.A., Ingebrigtsen K., Bøgwald J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. Fish Dis.*, 20: 241-273.
- Danilova N, Hohman VS, Sacher F, Ota T, Willett CE, Steiner LA (2004). T cells and the thymus in developing zebrafish. *Dev Comp Immunol.*, 28:755–767.
- Davina J.H.M., Rijkers G.T., Rombout J.H.M.W., Timmermans L.P.M., Van Muiswinkel B. (1980). Lymphoid and non lymphoid cells in the intestine of cyprinid fish. In: Orton, J.D. (ed). *Development and differentiation of the vertebrate lymphocytes*. Elsevier North Holland Biomedical Press Amsterdam pp. 129-140.
- Deane E.E., Woo N.Y. (2003). Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. *Life Science*, 72(7): 805-18.
- Deane E.E., Woo N.Y. (2004). Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287(5): 1054-63.

- Delneste F. (2004). Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation. *Biochemical Society Transaction*, 32(4): 633-5.
- Del Rio-Tsonis K., Tsonis P.A., Zarkadis I.K., Tsagas A.G., Lambris J.D. (1998). Expression of the third component of complement, C3, in regenerating limb blastema cells of urodeles. *J. Immunol.*, 161: 6819-24.
- Demand J., Lüders J., Höhfeld J.(1998). The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 2023–2028.
- Didelot C., Schmitt E., Brunet M., Maingret L., Parcellier A., Garrido C. (2006). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 171-198.
- Dinarello C.A. (1997). Interleukin-1. *Cyt. Growth Factor Rev.*, 8: 253-65.
- Dinarello C.A. (1998a). Interleukin 1b, interleukin-18 and the interleukin-1b converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856: 1-11.
- Dinarello C.A. (1998b). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor agonists. *Inter. Rev. Immunol.*, 16: 457-99.
- Dixon B., Shum B., Adams E.J., Magor K.E., Hedrick R.P., Muir D.G., et al. (1998). CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Rev.*, 166: 341-8.
- Doñate C., Roher N., Balasch J.C., Ribas L., Goetz F.W., Planas J.V., Tort L., MacKenzie S. (2007). CD83 expression in sea bream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 877-885.
- Dorin D., Sire M.-F. & Vernier J.-M. (1994). Demonstration of an antibody response of the anterior kidney following intestinal administration of soluble protein antigen in trout. *Comp. Bioch. Phys.*, 109B: 499-509.
- Do Vale A., Marques F., Silva M.T. (2003). Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 129-144.
- dos Santos N.M.S., Taverne N., Taverne-Thiele J.J., De Sousa M., Rombout, J.H.W.M. (1997). Characterization of monoclonal antibodies specific for sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) IgM indicates the existence of B cell subpopulations. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 175-191.
- dos Santos N.M., Romano N., de Sousa M., Ellis A.E., and Rombout J.H. (2000a). Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 583-596.

- dos Santos N.S., Hermsen T, Rombout J.H.W.M, Pilström L., Stet R.J.M. (2000b). Ig light chain variability in DNP₄₉₄-KLH immunised sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): evidence for intra-molecular induced suppression. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 387-401.
- dos Santos N.M., Taverne-Thiele J.J., Barnes A.C., van Muiswinkel W.B., Ellis A.E., Rombout J.H. (2001). The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 65-74.
- Douglas S.E., Gallant J.W., Liebscher R.S., Dacanay A., Tsoi S.C.M. (2003) Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 589-601.
- do Vale A., Afonso A., Silva M.T., (2002). The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish Shellfish Immunol.*, 13: 183-198.
- Duijvestijn A.M., Hoefsmit E.C.M (1981). Ultrastructure of the rat thymus: the microenvironment of T lymphocyte maturation. *Cell Tissue Res.*, 218: 279-292.
- Du Pasquier L. (1993). Evolution of the immune system. In: Raul, W.E., ed. *Fundamental immunology*. New York: Raven Press pp.199-233.
- Eastman J.T., De Vries A.L. (1996). Antarctic fishes. *Sci.Am.*, 255: 96-103.
- El Deeb S.O., Saad A.H.M. (1990). Ontogenic maturation of the immune system in reptiles. *Dev. Comp. Immunol.*, 14: 151-159.
- El-Nabi Kamel M.A., Shehata M. (2008). Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. *Br J Biomed Sci.*, 65(2): 75-9.
- Ellis A.E. (1977). Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*: Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity. In J.B. Solomon, J.D. Horton (eds.): “*Developmental Immunology*”. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, pp. 225-231.
- Ellis A. E. (1980). Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Diseases*, 3: 413-426.
- Ellis A.E. (1981). Non specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. *Dev. Biol. Stand.*, 49: 337-52.
- Ellis A.E. (1997). The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.*, 11: 453-491.
- Ellis A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish immunology*, 9: 291-308.
- Ellis A.E. (2001). Innate host defense 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.
- Enes P., Panserat S., Kaushik S., Oliva-Teles A. (2006). Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate source after heat shock stress. *Comp. Biochem. Physiol A-Mol. Integr. Physiol.*, 145: 73-81.
- Engelsma M.Y., Stet R.J., Schipper H., Verburg-van Kemenade B.M. (2001). Regulation of interleukin 1b RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 195-203.
- Engelsma M.Y., Huising M.O., van Muiswinkel W.B., Flik G., Kwang J., Savelkoul H.F.J., Verburg-van Kemenade B.M.L. (2002). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87: 467-479.
- Engelsma M., Hougee S., Nap D., Hofenk M., Rombout I.H.V.M., van Muiswinkel W.B., Verburg-van Kemenade B.M.L. (2003). Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish & Shellfish Immunology*, 15: 397-410.
- Espelid S., Lokken G.B., Steiro K., Bogwald J. (1996). Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 6: 95-110.
- Espenes A., Press C. McL., Dannevig B.H., Landsverk T. (1995a). Investigation of the structural and functional features of splenic ellipsoids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.*, 279: 469-474.
- Espenes A., Press C. McL., Dannevig B.H., Landsverk T. (1995b). Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.*, 282: 41-48.
- Evans D.L., Harris D.T., Jaso-Friedmann L. (1992). Function associated molecules on non-specific cytotoxic cells: role in calcium signalling, redirected lysis, and modulation of cytotoxicity. *Dev. Comp. Immunol.*, 16: 383-94.
- Evans D.L., Jaso-Friedmann L. (1992). Non specific cells as effectors of immunity in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 109-21.
- Evans T.G., Yamamoto Y., Jeffery W.R., Krone P.H. (2004). Zebrafish HSP70 is required for embryonic lens formation. *Cell stress & Chaperones*, 10(1): 66-78.
- Fadok V.A., Savill J.S., Haslett C., Bratton D.L., Doherty D.E., Campbell P.A., Henson P.M. (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.*, 149: 4029-4035.

- Falco A., Chico V., Marroqui L., Perez L., Coll J.M., Estepa A. (2008). Expression and antiviral activity of a defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences. *Molecular Immunology*, 45: 757–765.
- Fänge R. (1982). A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. *Developmental Comparative Immunology Suppl.*, 2 : 23-33.
- Fänge R., Pulsford A. (1985). The thymus of the angler fish (*Lophius Piscatorius* <<Pisces: Teleostei>>). A light and electron microscopic study. In *Fish Immunology*, Manning M.J. and Tatner M.F. (eds). Academic Press, London, pp.293-311.
- Farr A.G., Anderson S.K., Marrack P., Kappler J.W. (1995). Expression of antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptors by cortical and medullary thymocytes *in situ*. *Cell*, 43: 543-550.
- Fast M.D., Muise D.M., Easy R.E., Ross N.W., Johnson S.C. (2006). The effects of *Lepeophtheirus salmonis* infections on the stress response and immunological status of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 21: 228-41.
- Fearon D.T. and Locksley R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272: 50-53.
- Feder M.E, Hofmann G.E. (1999). Heat Shock Proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Reviews Physiology*, 61: 243-82.
- Feng S., Woo P.T. (1996). Cell-mediated immune response and T-like cells in thymectomized *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) infected with or vaccinated against the pathogenic haemoflagellate *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *Parasitol. Res.*, 82 (7): 604-11.
- Fishelson L. (1995). Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in Cichlid Fishes (Cichlidae, Teleostei). *J. Morph.*, 223: 175-190.
- Fischer U., Ototake M., Nakanishi T. (1998). In vitro cell-mediated cytotoxicity against allogeneic erythrocytes in ginbuna crucian carp and goldfish using a non-radioactive assay. *Dev. Comp. Immunol.*, 22: 195-206.
- Flajnik M.F., Ohta Y., Namikawa-Yamada C., Nonaka M. (1999). Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates. *Immunology Rev.*, 167: 59-67.
- Fonfria J., Barrutia A., Villena A., Zapata A. (1982). Ultrastructural study of interdigitating cells in the thymus of the spotless starling *Sturnus unicolor*. *Cell Tissue Res.*, 225: 687-691.
- Fowlker B.J., Pardoll D.M. (1989). Molecular and cellular events of T cell development. *Adv. Immunol.*, 44: 207-264.
- Freeman, B.C., Myers M.P., Schumacher R., Morimoto R.I. (1995). Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.*, 14: 2281–2292.

- Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T. (1999). Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization. *Immunogenetics*, 49: 909-14.
- Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T. (2000). Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 229-42.
- Fullop G.M.E., Mc Millan D.B. (1984). Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. *J. Morph.*, 179: 175-95.
- Galeotti M., Volpatti D., Berton D., Beraldo P., Contessi B., Gusmani L., (2001). Patologie in acquacoltura. In Acquicoltura Responsabile, Ed. Unimar-Uniprom, Roma, 198- 238.
- Garcia K.C., Teyton L., Wilson I.A. (1999). Structural basis of T cell recognition. *Ann. Rev. Immunol.*, 17: 369–397.
- Garcia-Castillo J., Pelegrin P., Mulero V., Mesguer J. (2002). Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics*, 54: 200-7.
- Garrido C., Gurbuxani S., Ravagnan L., Kroemer G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 433–442.
- Garrido C., Schmitt E., Candè C., Vahsen N., Parcellier A., Kroemer G. (2003). Spotlight on Heat Shock Proteins HSP27 and HSP70 Potentially Oncogenic Apoptosis Inhibitors. *Cell Cycle*, 2(6): 579-584.
- Gething M.J., Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355: 33-45.
- Goetz F.W., Planas J.V., MacKenzie S. (2004). Tumor necrosis factors. *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 487-97.
- Golstein P., Ojcius D.M., Young J.D.E. (1991). Cell death mechanism of the immune system. *Immunol. Rev.*, 121: 29-65.
- Gorgollon P. (1983). Fine structure of the thymus in the adult cling fish *Sicyases sanguineus* (Pisces, Gobiessocidae). *J Morphol*, 177: 25-40.
- Gornati R., Papis E., Rimoldi S., Terova G., Saroglia M., Bernardini G. (2004). Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*, 341: 111-118.
- Gotoh T., Terada K., Oyadomari S., Mori M. (2004). Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.*, 11: 390–402.
- Grace M.F., Manning M.J. (1980). Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Rich. 1836. *Developmental Comparative Immunology*, 4: 255-265.

- Grace M.F., Botham J.W., Manning M.J. (1981). Ontogeny of lymphoid organ function in fish. In J.B. Solomon (ed): “*Aspects of Developmental Comparative Immunology*”. Oxford and New York: Pergamon Press, pp. 467-468.
- Graham S., Secombes C.J. (1990). Do fish lymphocytes secrete interferon- γ ? *J. Fish Biol.*, 36: 563-573.
- Gravieli Y., Sherman Y., Shmuel A.B.S. (1992). Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.*, 119: 493-501.
- Grimm A.S. (1985). Suppression by cortisol of the mitogen-induced proliferation of peripheral blood leukocytes from plaice, *Pleuronectes platessa* L. In: *Fish Immunology*. Manning M.J. and Tatner M.F., eds. Academic Press, London.
- Grove S., Tryland M., Press C.M., Retain L.J. (2006). Serum immunoglobulin M in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): characterisation of the American Fisheries Society. 20: 97-112.
- Haas W., Pereira P. and Tonegawa S. (1993). γ/δ Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 637.
- Hacker G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, 301: 5–17.
- Haire R.N., Rast J.P., Litman R.T., Litman G.W. (2000). Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell receptor alpha in zebrafish. *Immunogenetics*, 51: 915-923.
- Hancock R.E.W., Diamond G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol.*, 8: 402.
- Hansen J.D., Zapata A.G. (1998). Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol Rev*, 166: 199–220.
- Hansen J.D., Strassburger P. (2000). Description of an Ectothermic TCR Coreceptor, CD8 α , in Rainbow Trout. *Journal of Immunology*, 164: 3132-3139.
- 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(19): 6919–24.
- Harris J., Bird D.J., (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77: 163-176.
- Hartl F.U., Hayer-Hartl M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295: 1852–1858.
- Hart S., Wrathmell A.B., Harris J.E., Grayson T.H. (1988). Gut immunology in fish: a review. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 453-480.

- Hasegawa H., Suzuki K., Nakaji S., Sugawara K. (1997). Analysis and assessment of the capacity of neutrophils to produce reactive oxygen species in a 96-well microplate format using lucigenin- and luminal-dependent chemiluminescence. *Journal of Immunological methods*, 210: 1-10.
- Håstein T., Scarfe A.D., Lund V.L. (2005). Science-based assessment of welfare: aquatic animals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24: 529-547.
- Hatanaka A., Umeda N., Yamashita S., Hirazawa N. (2007). Identification and characterization of a putative agglutination/immobilization antigen on the surface of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology.*, 134(9): 1163-74.
- Haugarvoll E., Thorsen J., Laane M., Huang Q., Koppang E.Q. (2006). Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83+ teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Res.*, 19: 214-25.
- Hawke N.A., Rast J.P., Litman G.W. (1996). Extensive Diversity of Transcribed TCR- β in a phylogenetically primitive vertebrate. *Journal of Immunology*, 156: 2458-2467.
- Hayday A.C. (2000). γ/δ Cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.*, 18:975.
- Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-6.
- Hernández A., Tort L. (2003). Annual variation of complement, lysozyme and haemoagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15: 479-481.
- Hightower L.E. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, 66: 191-197.
- Hine P.M. (1992). The granulocytes of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 2: 79-98.
- Hirono I, Nam BH, Kurobe T, Aoki T. (2000). Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Immunol.*, 165: 4423-7
- Hofmann G.E., Buckley B.A., Airaksinen S., Keen J.E., Somero G.N. (2000). Heat shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae). *The Journal of Experimental Biology*, 203: 2331-2339.
- Hogquist K.A., Baldwin T.A., Jameson S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*, 5: 772-782.
- Holland M.C., Lambris J.D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 399-422.

- Hopken Uta E. and Lipp Martin (2004). All roads lead to Rome: triggering dendritic cell migration. *Immunity*, 20(3):244-6.
- Hordvik I., Jacob A.L., Charlemagne J., Endresen C. (1996). Cloning of T-cell antigen receptor beta chain cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*, 45: 9-14.
- Hordvik I., Thevarajan J., Samdal I., Bastani N., Krossoy B. (1999). Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand. J. Immunol.*, 50: 202-210.
- Hou Y.Y., Suzuky Y., Aida K. (1999). Effects of steroid hormones on immunoglobulin M (IgM) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem*, 20: 155-162.
- Huang P.-H., Chen J.-Y., Kuo C.-M. (2007). Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expression and biological functions. *Mol. Immunol.*, 44: 1922-2134.
- Huising M.O., Stet R.J.M., Savelkoul H.F.J., Verburg-van Kemenade B.M. (2004). The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 395-413.
- Huntingford F.A., Adams C., Braithwaite V.A., Kadri S., Pottinger T.G., Sandoe P., Turnbull J.F. (2006). Review Paper: Current issues in fish welfare. *J. Fish Biol.*, 68: 332-372.
- Hutchinson T.H., Manning M. (1996). Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, U.K. *Fish & Shellfish Immunology*, 6: 473-482.
- Huttenhuis H.B.T, Ribeiro A.S., Bowden T.J., Van Bavel C., Taverne Thiele A.J., Rombout J.H. (2006a). The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shell. Immun.*, 21(3):261-271.
- Huttenhuis H.B.T, Taverne-Thiele A.T., Grou C.P.O., Bergsma J., Saeij J.P.J., Nakayasu C., Rombout J.H.W.M. (2006b). Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 30(6): 557-574.
- Igawa D., Sakai M., Savan R. (2006). An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol. Immunol.*, 43: 999-1009.
- Ingerslev H.C., Cunningham C., Wergeland H.I. (2006). Cloning and expression of TNF-alpha, IL-1beta and COX-2 in an anadromous and landlocked strain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the smolting period. *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 450-61.
- Ingram, G. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. *J. Fish Biol.*, 16: 23-60.

- Inoue Y., Haruta C., Usui K., Moritomo T., Nakanishi T. (2003). Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA. *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 275-81.
- ISMEA, 2007. La fase primaria: la pesca e l'acquacoltura. In: Il settore ittico in Italia e nel mondo: le tendenze recenti. pp.123-163.
- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B., Vijayan M.M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish*, 8: 35-36.
- Iwama G.K., Afonso L.O.B., Todgham A., Ackermann P., Nakano K. (2004). Are HSPs suitable for indicating stressed states in fish? *J. Exp. Biol.*, 207: 15-19.
- Jaattela M., Wissing D., Bauer P.A., Li G.C. (1992). Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.*, 11: 3507-3512.
- Jaattela M., Wissing D. (1993). Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of selfprotection. *J. Exp. Med.*, 177: 231-236.
- Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T., Egeblad M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.*, 17: 6124-6134.
- Janeway C. (1989). Immunogenicity signals 1,2,3, . and 0. *Immunol Today*, 10: 283-6.
- Jang S.L., Hardie L.J., Secombes C.J. (1995). Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *J. Leukoc. Biol.*, 57 (6): 943-7
- Jankovic D., Liu Z., Gause W.C. (2001). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.*,: 450-457.
- Jankovic M., Casellas R., Yannoutsos N., Wardemann H., Nussenzweig M.C. (2004). RAGs and regulation of autoantibodies. *Annu. Rev. Immunol.*, 22: 485-501.
- Jaso-Friedman L., Leary 3rd J.H., Evans D.L. (1997). NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost non specific cytotoxic cell. *Mol. Immunol.* 34: 955-965.
- Johnson E.O., Kamilaris T.C., Chrousos G.P., Gold P.W. (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioural homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16: 115-130.
- Joosten, P.H.M. (1997). Immunological aspects of oral vaccination in fish. Ph. D. thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Kaattari S.L., Holland N. (1990). The one way mixed lymphocyte reaction. In: *Techniques in fish immunology* (J.S. Stolen et al, eds) pp. 165-172. Fair Haven NJ: SOS Publ.
- Kappler J.W., Roehm N., Marrack P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 49: 273-280.

- Karlseder J., Wissing D., Holzer G., Orel L., Sliutz G., Auer H., Jaattela M., Simon M.M. (1996). HSP70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin-induced G2 cell cycle arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 220: 153–159.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). A basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br.J. Cancer*, 26: 239-357.
- Kendal M.D., Frazier J.A. (1979). Ultrastructural studies on erythropoiesis in the avian thymus. I. Description of cell types. *Cell Tissue Res.*, 199: 37-61.
- Kendal M.D. (1981). Cells of the thymus. In M.D. Kendal (ed): *The Thymus Gland*. London: Accademic Press, pp. 63-83.
- Kim H.P., Morse D., Choi A.M. (2006). Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin. Ther. Targets*, 10: 759–769.
- Kizaki H., Tadakuma T. (1993). Thymocyte Apoptosis. *Microbiol. Immunol.*, Minireview, 37(12): 917-925.
- Klausner R.D., Lippincott-Schwartz J., Bonifacino J.S. (1990). The T-cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev. Cell Biol.*, 6: 403-31.
- Knut Schmidt-Nielsen (1997). *Adaptation and environment*. Animal Physiology, 5° edizione.
- Koumans-van Diepen J.C.E., van Lisdonk M.H.M., Taverne-Thiele J.J., Verburg van Kemenade B.M.L., Rombout J.H.W.M. (1994). Characterization of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 45-56.
- Koumans–van Diepen J.C.E., Egberts E., Peixoto B., Taverne N., and Rombout, J. (1995). B cell immunoglobulin heterogenicity in carp (*Cyprinus carpio* L.): an immuno(cyto)chemical study. *Dev. Comp. Immunol.*, 19: 97–108.
- Krone P.H., Lele Z., Sass J.B. (1997). Heat shock genes and the heat shock response in zebrafish embryos. *Biochem. Cell Biol.*, 75: 487-497.
- Krone P.H., Evans T.G., Blechinger S.R. (2003). Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14: 267–274.
- Kumari J., Sahoo P.K., Swain T., Sahoo S.K., Sahu A.K., Mohanty B.R. (2006). Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. *Aquaculture*, 252: 121-127.
- Laing K.J., Wang T., Zou J., Holland J., Hong S., Bols N., et al. (2001). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *E. J. Bioch.*, 268: 1315-22.
- Laing K.J., Zou J.J., Wang T., Bols N., Hirono I., Aoki T., et al. (2002). Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 433-44.

- Lamers C.H.J., De Haas M.J.H. (1985). Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Tissue Res.*, 242: 491–498.
- Lamers C.H.J. (1986). Histophysiology of a primary immune response against *Aeromonas Hydrophylan* in carp *Cyprinus carpio* (l.). *J. Exp. Zool.*, 238: 71-80.
- Lambert I.A., Ritter M.A. (1988). In *The Microenvironment of the Human Thymus*. Kendall, M.A. and Ritter, M.A. (ed.), *Thymus Update* (Annual Review Series), 1, p. 5, Harwood Academic, London.
- Lange S., Bambir S., Dodds A.W., Magnadottir B (2004a). An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 593-601.
- Lange S., Dodds A.W., Magnadottir B. (2004b). Isolation and characterization of complement component C3 from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 227-39.
- Langenau DM, Ferrando AA, Traver D, Kutok JL, Hezel J-PD, Kanki JP, et al. (2004). In vivo tracking of Tcell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*;101(19):7369–74.
- Langston A.L., Hoare R., Stefansson M., Fitzgerald R., Wergeland H., Mulchay M. (2002). The effects of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 12: 61-76.
- Lanzavecchia A., Sallusto F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 106: 263.
- Lauth X., Shike H., Burns J.C., Westerman M.E., Ostland V.E., Carlberg J.M., Van Olst J.C., Nizet V., Taylor S.W., Shimizu C., Bulet P. (2002). Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J. Biol. Chem.* 277, 5030–5039.
- Leceta J., Villena A., Razquin B., Fonfria J., Zapata A. (1984). Interdigitating cells in the thymus of turtle *Mauremys caspita*. Possible relationships to macrophages. *Cell Tissue Res.*, 238: 381-385.
- Lee E.Y., Park H.H., Kim Y.T., Choi T.J. (2001). Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceous*). *Gene*, 274: 237-43.
- Lee W.H., Park Y.M, Kim J.I., Park W.I., Kim S.H., Jang J.J., Seo J.S. (1998). Expression of heat shock protein 70 blocks thymic differentiation of T cells in transgenic mice. *Immunology*, 95(4): 559-65.
- Le Morvan C., Clerton P., Deschauk P., Troutaud D. (1997). Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp. *Fish & Shellfish Immunology*, 7: 209-212.

- Le Morvan C., Troutand D., Descaux P. (1998). Differential effects of temperature on specific and nonspecific defenses in fish. *J. Exp. Biol.*, 201 (Part 2): 165-8.
- Lewin B., Cassimeris L., Lingappa V.R., Plopper G. (2008). *Cellule*. Zanichelli
- Lewis S., Handy R.D., Cordi B., Billinghamurst Z., Depledge M.H. (1999). Stress proteins (HSPs): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8: 351-68.
- Lin H, Ho A, Haley-Vicente D, Zhang J, Bernal-Fussell J, Pace A, et al. (2001). Cloning and characterization of IL-1HY2, a novel interleukin-1 family member. *J Biol Chem*, 276: 20597-602.
- Lindquist S., Craig E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual Reviews Genetic*, 22: 631-677.
- Litman, G.W. (1976). Physical properties of immunoglobulins of lower species: A comparison with immunoglobulins of mammals. In *Comparative Immunology*, Marchalonis, J.J. (eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 239-275.
- Litman G.W., Cannon J.P., Dishaw L.J. (2005). Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat. Rev. Immunol.*, 5: 866-79.
- Liu C.H., Yang C.C., Lin D.P., Wu M.H., Tsa K.J. (2004). Stored of Hsp 72/73 in germinal vesicle-stage mouse oocytes. *Reproduction Domestic Animals*, 39(1): 19-24.
- Liu M., Reimschuessel R., Hassel B.A. (2002). Molecular cloning of the fish interferon stimulated gene, 15 kDa (ISG15) orthologue: a ubiquitin-like gene induced by nephrotoxic damage. *Gene*, 298: 129-39.
- Loeffler M, Kroemer G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell. Res.*, 256(1): 19-26.
- Long S., Wilson M., Bengten E., Bryan L., Clem L.W., Miller N.W., et al. (2004). Identification of a cDNA encoding channel catfish interferon. *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 97-111.
- Long S., Milev-Milovanovic I., Wilson M., Bengten E., Clem L.W., Miller N.W., et al. (2006). Identification and expression analysis of cDNAs encoding channel catfish type I interferons. *Fish Shellfish Immunol.*, 21: 42-59.
- Luer C.A., Walsh C.J., Bodine A.B., Wyffels J.T., Scott T.R. (1995). The elasmobranch thymus: anatomical, histological and preliminary functional characterization. *Journal of Experimental Zoology*, 273: 342-352.
- Luft J.C., Dix D.J. (1999). Hsp70 expression and function during embryogenesis. *Cell Stress Chaperones*, 4(3): 162-70.

- Luster A. (2002). The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Cur. Op. Immunol.*, 14: 129-35.
- Mac Donald H.R., Lees R.K. (1990). Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature*, 343: 642-644.
- Macdougall K.C., Mericko P.A. and Burnett K.G. (1999). Antigen receptor-mediated activation of extracellular related kinase (ERK) in B lymphocytes of teleost fishes. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 221-230.
- Magnadottir B. (2006). Innate immunity of fish. Overview, *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 137-151.
- Malikova M.A., Van Stry M., Symes K. (2007). Apoptosis regulates notochord development in *Xenopus*. *Dev. Biol.*, 311(2): 434-448.
- Manley N.R. (2000). Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol*, 12: 421-8.
- Manley NR, Blackburn CC. (2003) A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr Opin Immunol*, 15: 225-32.
- Manning M.J. (1981). A comparative view of the thymus in vertebrates. In: *The Thymus Gland*, Kendall, M.D. (ed.). Academic Press, London, pp. 7-20.
- Manning M.J., Horton J.D. (1982). RES structure and function of the Amphibia. In: Cohen, N., Sigel, M., eds. *The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise. Vol. 3. Phylogeny and ontogeny.* New York: Plenum Press, pp. 423-459.
- Manning M.J. (1994). Fishes. In: *Immunology: A comparative approach*, (Turner R.J. ed.), Chichester: John Wiley and Sons Ltd. Pp. 69-100.
- Marchalonis J.J., Ealey E.H.M., Diener E. (1969). Immune response of the tuatara *Sphedon punctatum*. *Journal of Experimental Biological and Medical Sciences*, 47: 367-380.
- Marino G., Di Marco P., Mandich A., Cataudella S. (2001). Change in plasma cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Appl. Ichthyol.*, 17: 1-6.
- Mathew J.A., Guo Y.X., Goh K.P., Chan J., Verburg van Kemenade B.M., Kwang J. (2002). Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1beta and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish Shellfish Immunol.*, 13: 85-95.
- Matsunaga T., Tormanen V., Karlsson K., Andersson E. (1994). Evolution of teleost antibody genes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 712: 42-54.

- Matsushita M, Fujita T (1995). Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. *Immunobiology*, 194: 443-8.
- Maule A.G., Schreck C.B. (1990). The glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77: 448-455.
- Mayer M.P, Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.*, 62: 670–684.
- Mazzi V. (1977). Manuale di tecniche istologiche ed istochimiche. Piccin ed. Padova.
- McConkey D.J., Nicotera P. & Orrenius S. (1994). Signalling and chromatin fragmentation in Thymocyte apoptosis. *Immunological Review*, 142. 343-363.
- Mc Donald H.R., Lees R.K. (1990). Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature*, 343: 642-644.
- McIntyre C.M., Ellis T., North B.P., Turnbull J.F. (2008). The influence of Water Quality on the Welfare of Farmed Rainbow Trout: a Review. In: *Fish Welfare*. Branson E.J. (ed.) Blackwell Publishing. UK, pp. 150-184.
- Medzhitov R., Janeway Jr C.A. (1998). An ancient system of host defence. *Curr Opin Immunol*, 10: 12-5.
- Medzhitov R., Janeway Jr C.A. (2002). Decoding the patterns of self and non self by the innate immune system. *Science*, 296: 298-300.
- Merrifield R.B., Merrifield E.L., Juvvadi P., Andreu D., Boman H.G. (1994). Design and synthesis of antimicrobial peptides. *Antimicrobial peptides*. Wiley Press, Chichester (Ciba Foundation Symposium 186), pp 5-26.
- Metz J.R., Van den Burg E.H., Wendelaar Bonga S.E., Flick G. (2003). Regulation of branchial Na⁺/K⁺-ATPase in common carp (*Cyprinus carpio* L.) acclimated to different temperatures. *J. Exp. Biol.*, 206: 2273-2280.
- Miosge L., Zamoyska R. (2007). Signaling in T-cell development: is it all location, location, location? *Curr. Opin. Immunol.*, 19: 194-199.
- Miyadai T., Ootani M., Tahara D., Aoki M., Saitoh K. (2004). Monoclonal antibodies recognising serum immunoglobulins and surface immunoglobulin-positive cells of puffer fish, torafugu (*Takifugu rubripes*). *Fish Shellfish Immunol*, 17(3): 211–22.
- Molinaro M., Rizzoli C., Siracusa G., Stefanini M. (1997). Istologia di V. Monesi. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M., Moon T.W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews In Fish Biology and Fisheries*, 9: 211-268.

- Moore J.D., Ototake M., Nakanishi T. (1998). Particulate antigen uptake during immersion immunisation. *Fish Shellfish Immunol.*, 8(6): 393-407.
- Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. (1990). Stress protein in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- Moss J.E., Aliprantis A.O., Zychlinsky A. (1999). The regulation of apoptosis by microbial pathogens. *Int. Rev. Cytol.*, 187: 203-259.
- Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 17: 5317-5327.
- Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Meriin A.B., Sherman M.Y., Morimoto R.I., Massie B. (2000). The chaperone function of HSP70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(19): 7146-59.
- Mulero J, Pace A, Nelken S, Loeb D, Correa T, Drmanac R, et al. (1999). IL1HY1: a novel interleukin-1 receptor antagonist gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 263: 702-6.
- Mulero I., Noga E.J., Meseguer J., Garcia-Ayala A., Mulero V. (2008). The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis. *Dev. Comp. Immunology*, 32: 1531-1538.
- Murtha J.M., Keller E.T. (2003). Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental Gerontology*, 38: 683-691.
- Muzio M, Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Dixit V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol. Chem.*, 273(5): 2926-30.
- Nagarsekar A., Greenberg R.S., Shah N.G., Singh I.S., Hasday J.D. (2008). Febrile-range hyperthermia accelerates caspase-dependent apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.*, 181(4): 2636-43.
- Nagata S., Golstein P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267: 1449-1456.
- Nakanishi T., Ototake M., (1997). Antigen uptake and immune response after immersion vaccination. In *Fish Vaccinology*, pp. 9-68. Developments in Biological Standardization. Basel: Karger.
- Nakanishi T., Fischer U., Dijkstra J.M., Hasegawa S., Somamoto T., Okamoto N., Ototake M. (2002). Cytotoxic T cell function in fish. *Dev. Comp. Immunology*, 26(2): 131-139.
- Nakao M., Mutsuro J., Obo R., Fujiki K., Nonaka M., Yano T. (2000). Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. *Eur. J. Immunol.*, 30: 858-66.

- Nam Bo-Hye, Hirono I., Aoki T. (2003). The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR α -, β -, γ -, and δ -chains. *J. Immunol.*, 170: 3081-3090.
- Navratil J.S., Ahearn J.M. (2001). Apoptosis, clearance mechanisms, and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.*, 3: 191-8.
- Nelson McMillan D., Secombes C. (1997). Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 527-54.
- Neumann N.F., Stafford J.L., Barreda D., Ainsworth A.J., Belosevic M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 807-25.
- Nikoskelainen S., Bylund G., Lilius E. (2004). Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev. Comp. Immunology*, 28: 581-592.
- Nover L. (1984). Heat shock response of eucaryotic cells. (Berlin: Springer-Verlag).
- Nylandsted J., Gyrð-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Hoyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jaattela M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.*, 200: 425–435.
- Ohta Y., Landis E., Boulay T., Phillips R.B., Collet B., Secombes C.J., Flajnik M.F., Hansen J.D. (2004). Homologs of CD83 from Elasmobranch and Teleost Fish. *The Journal of Immunology*, 173: 4553-4560.
- Oreste U., Coscia M.R. (2002). Specific features of immunoglobulin V_H genes of the Antarctic Teleost *Trematomus bernacchii*. *Gene*, 295: 199-204.
- Ottaviani E., Franchini A., Franceschi C. (1997). Evolution of neuroendocrine thymus: studies on POMC- derived peptides, cytokines and apoptosis in lower and higher vertebrates. *J. Neuroimmunol.*, 72(1): 67-74.
- Page M., Rowley A.F. (1982). A morphological study of pharyngeal lymphoid accumulations in larval lampreys. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.*, 2: 35-40.
- Palenzuela O., Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. (1996). Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunology*, 6: 81-94.
- Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin D, Zhong A, Filvaroff E, et al. (2001). IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine*, 13: 1–7.
- Park C.I., Hirono I., Aoki T. (2005). Molecular characterization of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* CD33 and evolution of the CD3 cluster. *Dev. Comp. Immunol.*, 29: 123-33.

- Parnes J.R. (1989). Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.*, 44: 265–311.
- Partula S., De Guerra A., Fellah J.S., Charlemagne J. (1995). Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. *J Immunol*, 155: 699-706.
- Partula S., De Guerra A., Fellah J.S., Charlemagne J. (1996). Structure and diversity of the TCR alpha-chain in a teleost fish. *J Immunol* 157: 207-212.
- Pastoret P.P., Griebel P., Bazin H., Govaerts A. (1998). Immunology of fishes. In *Handbook of Vertebrate Immunology*, San Diego: Academic Press: 3-62.
- Peatman E., Liu Z. (2006). CC chemokines in zebrafish: evidence for extensive intrachromosomal gene duplications. *Genomics*, 88: 381-5.
- Peleteiro M.C., Richards R.M. (1985). Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairderi*. *J. Fish Dis.*, 8: 161-172.
- Picchiatti S, Terribili F.R., Mastrolia L, Scapigliati G, Abelli L (1997). Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat Embryol* 196: 457-463.
- Picchiatti S., Guerra L., Selleri L., Buonocore F., Abelli L., Scapigliati G., Mazzini M., Fausto A.M. (2008). Compartmentalisation of T cells expressing CD8 alpha and TcR beta in developing thymus of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 32: 92-99.
- Pickering A.D. (1981). Introduction: the concept of biological stress. In: *Stress and fish*. A.D. Pickering (Ed.) Academic Press, New York, USA, pp. 1-7.
- Pickering A.D. (1984). Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 53: 252-259.
- Piergentili R., Ficca A.G., Caccia E., Ceccarelli G., Missinato M.A., Mastrolia L. e Romano N. (2008). Cloning and characterization of T-cell receptor gamma gene in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Manuscript in preparation.
- Plouffe D.A., Hanington P.C., Walsh J.G., Wilson E.C., Belosevic M. (2005). Comparison of selected innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*, 12: 266-277.
- Poltronieri C., Maccatrozzo L., Simontacchi C., Bertotto D., Funkenstein B., Patruno M., Radaelli G. (2007). Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of HSP70 in sea bass *Dicentrarchus labrax* exposed to transport stress. *European Journal of Histochemistry*, 51(2): 125-136.

- Praveen K., Leary III J.H., Evans D.L., Jaso-Friedmann L. (2006). Nonspecific cytotoxic cells of teleosts are armed with multiple granzymes and other components of the granule exocytosis pathway. *Mol. Immunol.*, 43: 1152-62.
- Press C. McL., Evensen Ø., Reitan L. J., Landsverk T. (1996). Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon *Salmo salar* L., following different routes of administration. *Journal of Fish Diseases* 19: 215–224.
- Press C. McL., Evensen Ø. (1998). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immun.*, 9: 309-318.
- Pucci B., Coscia M.R., Oreste U. (2003). Characterization of serum immunoglobulin M of the Antarctic Teleost *Trematomus bernacchii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 135: 349-357.
- Quesada J., Villena M.I., Navarro V. (1994). Ontogeny of the sea bass spleen (*Dicentrarchus labrax* L.): a light and electron microscopy study. *Journal of Morphology*, 221: 161-176.
- Randall D. J., Perry S. F. (1992). Catecholamines. In *Fish Physiology*, vol. 12B (Hoar W. S., Randall D. J. & Farrell A. P., eds), pp. 255-300. San Diego: Academic Press.
- Rast J.P., Litman G.W. (1994). T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 91: 9248-9252.
- Rast J.P., Haire R.N., Litman R.T., Pross S., Litman G.W. (1995). Identification and characterization of T-cell antigen receptor related genes in phylogenetically diverse vertebrate species. *Immunogenetics*, 42: 204-212.
- Rast J.P., Anderson M.K., Strong S.J., Luer C., Litman R.T. and Litman, G.W. (1997). α , β , γ and δ T-cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunology*, 6: 1.
- Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S.A., Maise C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J.M., Garrido C., Kroemer G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis inducing factor. *Nat. Cell. Biol.*, 3: 839–843.
- Reite O.B. (1997). Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 567-584.
- Reite O.B., Evensen O. (2006). Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 192-208.

- Rijkers G.T., Frederix-Wolters E.M.H., Van Muiswinkel W.B. (1980). The immune system of cyprinid fish. Kinetics And temperature dependence of antibody producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunol.*, 41: 91-97.
- Ritter M.A., Crispe I.N. (1992). In: Rickwood D., Male D. (eds) The thymus. Oxford Univesity Press, pp 1-85.
- Roberts R.J. (1975a). Melanin containing cells of teleost fish and their relation to disease. In *The pathology of Fishes*. Ribelin, W.E. and Migaki, G. (eds.). University of Wisconsin Press, Madison, pp. 399-428.
- Roberts R.J. (1975b). The effects of temperature on disease and their histopathological manifestations in fish. In: *The Pathology of Fishes*. Ribelin W.E. & Migaky G. (eds.) University of Wisconsin Press, Wisconsin. pp. 477-496.
- Roberts R.J. (1989). In *Fish Pathology*, 2nd edn. London: Baillière tindall.
- Robertsen B., Bergan V., Rokenes T., Larsen R., Albuquerque A. (2003). Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interf. Cyt. Res.*, 23: 601-12. 118
- Robertsen B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish shellfish Immunol.*, Review, 20 (2):172-91.
- Rodrigues P.N., Hermsen T.T., van Maanen A., Taverne-Thiele A.J., Rombout J.H., Dixon B., et al. (1998). Expression of MhcCyca class I and class II molecules in the early life history of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 22: 493-506.
- Rogers P., Matossian-Rogers A. (1982). Differential sensitivity of lymphocytes subsets ot corticosteroids treatment. *Immunology*, 46: 841-848.
- Roitt I., Brostoff J., Male D. (2003). *Immunology*, 5rd edition, Gower Med. Publ., London.
- Romagnani S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today*, 18: 263-266.
- Romano N., Casini P., Abelli L., Mastrolia L., Aita M. (1996). Influence of partial decerebration and hypophyseal allograft on differentiation of thymic epithelial cells in chick embryos: an ultrastructural study. *Anatomy and Embryology.*, 193: 593-600.
- Romano N, Abelli L, Mastrolia L, Scapigliati G (1997a). Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax* (L). *Cell Tissue Res*, 289(1): 163-171.
- Romano N., Taverne-Thiele J.J., van Maanen J.C., Rombout J.H.M.W. (1997b). Distribution of leucocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.): immunocytochemical studies. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 439–453.

- Romano, N., Abelli, L., Mastrolia, L. and Scapigliati, G. (1997c). Cytomorphology of thymocytes and Ig- bearing cells in lymphoid tissues of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) by using specific monoclonal antibodies. *Cell and Tissue Research*, 289: 163-171.
- Romano N. (1998). Ontogeny of the immune system of fish using specific markers. (PhD thesis), Ponsen & Looijen, B.V., Wageningen (NL).
- Romano N, Picchietti S, Taverne-Thiele JJ, Abelli L, Mastrolia L, Verburg-van Kemenade BML, Rombout JHWM (1998a) Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Anat. Embryol*, 198: 31-41.
- Romano N., Fanelli M., Del Papa G.M., Scapigliati G., Mastrolia L. (1999a). Histological and cytological studies on the developing thymus of sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*. *J Anat.*, 194: 39-50
- Romano N., Taverne-Thiele, J.J., Fanelli M., Baldassini M.R., Abelli L., Mastrolia L., van Muiswinkel W.B., Rombout J.H.M.W. (1999b). Ontogeny of the thymus in a teleost, *Cyprinus carpio* L.: Developing thymocytes in the epithelial microenvironment. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 123-137.
- Romano N., Ceccariglia S., Mazzini M., Mastrolia L. (2000). Histological studies on lymphoid organs of the Antarctic fish *Trematomus nicolai* and *Chionodraco hamatus* (Teleostei: Notothniidae). *Polar Biol.*, 23: 321-328.
- Romano N., Ceccariglia S., Abelli L., Baldassini M.R., Picchietti S., Mazzini M., Mastrolia L. (2004). Adaptation of fish lymphomyeloid organs to polar water. *Chem. Ecol.*, 20: 65-77.
- Romano 2004-2007: Progetto Europeo STREP: “Welfare and health in sustainable aquaculture” (acronimo: WEALTH) N.501984.
- Romano N., Baldassini M.R., Buonocore F., Picchietti S., Mastrolia L., Abelli L. (2005) In vivo allograft rejection in a bony fish *Dicentrarchus labrax* (L.): characterisation of effector lymphocytes. *Cell Tissue Res.*, 321: 353–363.
- Romano N., Rossi F., Abelli L., Caccia E., Piergentili R., Mastrolia L., Randelli E., Buonocore F. (2007). Majority of TcR β ⁺ T-lymphocytes located in thymus and midgut of the bony fish, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Tissue Res.*, 329(3): 479-89.
- Rombout J.H.W.M., Lamers C.H.J., Helfrich M.H., Dekker A., Taverne-Thiele J.J. (1985). Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell Tissue Res.*, 239: 519–530.
- Rombout J.H.W.M., Bot H.E., Taverne-Thiele J.J. (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp II. Characterization of mucosal leucocytes. *J. Fish Biol.*, 35: 167-78.

- Rombout J.H.W.M., Taverne N., van de Kamp M., Taverne-Thiele A.J. (1993a). Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 309-17.
- Rombout J.H.W.M., Taverne-Thiele A.J. and Villena M.I. (1993b). The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 55-66.
- Rombout J.H.W.M., Koumans-van Diepen J.C.E., Emmer P.M., Taverne-Thiele J.J. (1996). Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *Journal Fish Biology*, 49: 521-531.
- Rombout J.H.W.M., Van de Wal J.W., Companjen A., Taverne N., Taverne-Thiele J.J. (1997). Characterization of a T cell lineage marker in carp, *Cyprinus carpio* L. *Develop. Comp. Immunol.*, 21: 35-46.
- Rombout J.H.W.M., Huttenhuis H.B.T., Picchiatti S., Scapigliati G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 441-455.
- Romestand B., Breuil G., Bourmaud C.A.F., Coeurdacier J.L., Bouix G. (1995). Development and characterization of monoclonal antibodies against sea bass immunoglobulins *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 347-357.
- Rottlant J., Ruane N.M., Caballero M.J, Montero D., Tort L. (2003). Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 136(A): 613-620.
- Rowley A.F., Hunt T.C., Page M., Mainwaring G. (1988). In Vertebrate blood cells (Rowley, A.F. and Ratcliffe, N.A., eds) pp. 18-127. Cambridge: Cambridge University Press (UK).
- Sacedòn R., Varas A., Hernández-Lopez C., Gutiérrez-deFrías C., Crompton T., Zapata A.G., et al. (2003). Expression of hedgehog proteins in the human thymus. *J. Histochem. Cytochem.*, 51: 1557-66.
- Saha, N.R., Suetake, H., Kikuchi, K., Suzuki, Y. (2004). Fugu immunoglobulin D: a highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region. *Immunogenetics*, 56: 438-447.
- Sahoo P.K., Mahapatra K.D., Saha J.N., Barat A., Sahoo M., Mohanty BR., Gjerde B., Odegård J., Rye M., Salte R. (2008). Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol*, 25(1-2): 163-9.
- Sakai M., Kono T., Savan R. (2005). Identification of expressed genes in carp (*Cyprinus carpio*) head kidney cells after in vitro treatment with immunostimulants. *Developmental Biology* (Basel), 121: 45-51.

- Salati F. (2005). Valutazione di crescita e titolo anticorpale di spigole immunizzate in allevamento con un vaccino commerciale contro la vibriosi. *Il Pesce* (3).
- Saleh A., Srinivasula S.M., Balkir L., Robbins P.D., Alnemri E.S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell. Biol.*, 2: 476–483.
- Salerno G., Parrinello N., Roch P., Cammarata M. (2007). cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 146: 521–529.
- Salinas I., Lockhart K., Bowden T.J., Collet B., Secombes C.J., Ellis A.E. (2004). An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 17: 159-170.
- Salinas I., Rodriguez A., Meseguer J., Esteban M.A. (2007). Adenosine arrest apoptosis in lymphocytes but not in phagocytes from primary leucocytes cultures of the teleost fish, *Sparus aurata* L. *Dev Comp. Immunol.*, 31: 1233-1241.
- Samali A., Orrenius S. (1998). Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 3: 228–236.
- Samuel C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin. Microb. Rev.*, 14(4): 778-809.
- Sanchez C., Alvarez A., Castillo A., Zapata A., Villena A., Dominguez J. (1995). Two different subpopulations of Ig-bearing cells in lymphoid of rainbow trout. *Dev Comp. Immunol.*, 19: 79-86.
- Sanders B.M.(1993). Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective. *Critical Review Toxicology*, 23(1): 49-75.
- 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-1 receptor cDNA. *Eur. J. Biochem.*, 267: 7031-7.
- Sarmasik A. (2002). Antimicrobial Peptides: A Potential Therapeutic Alternative for the Treatment of Fish Diseases. *Turk. J. Biol.*, 26: 201-207.
- Sarmiento A., Marques F., Ellis A.E., Afonso A. (2004). Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activation factor(s) and lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 79-92.
- Saurabh S., and Sahoo P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune function system. *Aquaculture Research*, 39, 223-239.
- Savan R., Aman A., Sato K., Yamaguchi R., Sakai M. (2005a). Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur. J. Immunol.*, 35: 3320-3331.

- Savan R., Aman A., Nakao M., Watanuki H., Sakai M. (2005b). Discovery of a novel heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio*). *Immunogenetics*, 57: 458-463.
- Savill J. (1998). Phagocytic docking without shocking. *Nature.*, 392: 442–443.
- Savill, J. 1997. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br. Med. Bull.*, 53: 491–508.
- Scapigliati G., Mazzini M., Mastrolia L., Romano N., Abelli L. (1995). Production and characterization of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 393-405
- Scapigliati G., Romano N., Picchiatti S., Mazzini M., Mastrolia L., Scalia D., Abelli L. (1996). Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L) immunoglobulins: Immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish Shellfish Immunol.*, 6: 383-401.
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L. (1998). Monoclonal antibodies in Teleost fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture*, 172: 3-28.
- Scapigliati G., Scalia D., Marras A., Meloni S., Mazzini M. (1999). Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* L. in relation to age, season, and water oxygenation. *Aquaculture*, 174: 207–212.
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L, Meloni S., Ficca, A.G., Buonocore F., Bird S., Secombes C.J. (2000). Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 10: 329-341.
- Scapigliati G., Romano N., Buonocore F., Picchiatti S., Baldassini M.R., Prugnoli D., Galice A., Meloni S., Secombes C.J., Mazzini M., Abelli L. (2002). The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 151-160.
- Scapigliati G., Meloni S., Buonocore F., Bossu P., Prugnoli D., Secombes C.J. (2003). Immunopurification of B lymphocytes from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Mar Biotechnol* (NY), 5 (3): 214-221.
- Schneider B. (1983). Ontogeny of fish lymphoid organs. *Developmental Comparative Immunology*, 7: 739-740.
- Schreck C.B., (1996). Immunomodulation: Endogenous factors. In: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Iwama G. and Nakanishi T. eds. Academic Press, San Diego, pp 311-337.
- Secombes C.J., Manning M.J. (1980). Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians. I. Antigen localization in the carp *Cyprinus carpio*. *J. Fish Dis.*, 3: 399–412.

- Secombes C.J., Fletcher T.C. (1992). The role of phagocytes in the protective mechanism of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2: 53-71.
- Secombes C.J. (1994). Macrophage activation in fish. *Modulat. Fish Immune Responses*, 1: 49-57.
- Secombes C.J. (1996). The Nonspecific Immune System: Cellular Defenses. In: Iwama G. and Nakanishi T. (eds). *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press, San Diego, pp. 63-103.
- Secombes C.J., Wang T., Hong S., Peddie S., Crampe M., Laing K.J., Cunningham C., Zou J. (2001). Cytokines and innate immunity of fish. *Develop. Comp. Immunol.*, 25: 713-723.
- Secombes C.J., Bird S., Zou J. (2005). Adaptive Immunity in Teleosts: Cellular Immunity. Midilying PJ (ed): *Progress in Fish Vaccinology*. Dev. Biol. Basel, Karger, vol. 121: pp 25-32.
- Sepulcre M.P., Pellegrin P., Mulero V., Messeguer J. (2002). Characterisation of gilthead seabream acidophilic granulocytes granulocytes by a monoclonal antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell Tissue Res.*, 308: 97-102.
- Shang N., Sun X.F., Hu W., Wang Y.P., Guo Q.L. (2008). Molecular cloning and characterization of common carp (*Cyprinus carpio*) TcR γ and CD3 γ/δ chains. *Fish Shellfish Immunol.*, 24: 412-425.
- Shephard K.L. (1994). Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol Fisheries*, 4: 401-29.
- Shi Y., Bissonnette R.P., Parfrey N., Szalay M., Kubo R.T., Green D.R. (1991). *In vivo* administration of monoclonal antibodies to the CD3 T cell receptor complex induces cell death (apoptosis) in immature thymocytes. *Journal of Immunology*, 146: 3340–3346.
- Shi J., Camus A.C. (2006). Hecidins in amphibians and fishes: antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? *Dev. Comp. Immunol.*, 30: 746–755.
- Simon M.M, Reikerstorfer A., Schwarz A., Krone C., Luger T.A., Jaattela M., Schwarz T. (1995). Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J. Clin. Invest.*, 95: 926–933.
- Smith P.D. (1985). Vaccination against Vibriosis. In: Ellis AE, editor. *Fish vaccination*. London: Academic Press; p. 67 e 84.
- Smith D, Renshaw B, Ketchem R, Kubin M, Garka K, Sims J. (2000). Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem*, 275: 1169–75.

- Sollid J., Nilsson G.E. (2006). Plasticity of respiratory structures-Adaptive remodelling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 154: 241–251.
- Sreedhar A.S., Csermely P. (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 101: 227–257.
- Stafford J.L., McLauchlan P.E., Ellis A.E., Secombes C.J., Belosevic M. (2001). Generation of primary monocyte-like cells from rainbow trout head kidney leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 447-459.
- Stankiewicz A.R., Lachapelle G., Foo C.P., Radicioni S.M., Mosser D.D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.*, 280: 38729–38739.
- Stave J.W., Roberson B.S. (1985). Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of striped bass phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 9: 77-84.
- Stevenson R.M.W., Raymond B. (1990). Delayed-type hypersensitivity skin reactions. In *Techniques in fish immunology* (J.S. Stolen et al. eds.) pp. 173-178. Fair Haven NY: SOS Publ. (USA).
- Stolte E.H., Nabuurs S.B., Bury N.R., Sturm A., Flik G., Savelkoul H.F.J., Verburg-van Kemenade B.M.L. (2008). Stress and innate immunity in carp: Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. *Molecular Immunology*, 46: 70–79.
- Strand H.K. & Dalmo R.A. (1997). Absorption of immunomodulating $\alpha(1,3)$ -glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.*, 20: 41-49.
- Stuge T.B., Miller N.W., Clem L.W. (1995). Channel catfish cytotoxic effector cells from peripheral blood and pronephroi are different. *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 469-71.
- Subramaniam S., Stansberg C., Olsen L., Zou J., Secombes C.J., Cunningham C. (2002). Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 415-31.
- Sumpter J.P. (1997). The endocrinology of stress. In: *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Iwama G.K. (ed.). University Press, Cambridge, pp. 95-118.
- Sunyer J.O., Zarkadis I.K., Sahu A., Lambris J.D. (1996). Multiple forms of complement C3 in trout, that differ in binding to complement activators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8546-51.
- Sunyer J.O., Tort L., Lambris J.D. (1997). Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochem J*, 326: 877-81.
- Swain P., Dash S., Sahoo P.K., Routray P., Sahoo S.K., Gupta S.D., Meher P.K., Sarangi N. (2007). Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 38-43.

- Tanck M.W.T., Booms G.H.R., Eding E.H., Wendelaar Bonga S.E., Komen J. (2000). Cold shocks: a stressor for common carp. *J Fish Biol.*, 57: 881–94.
- Tatner M.F., Manning M.J. (1982). The morphology of the trout *Salmo gairdneri* Richardson, thymus: some practical and theoretical considerations. *Journal of Fish Biol.*, 21: 27-32.
- Tatner M.F., Manning M.J. (1983). Growth of the lymphoid organs in rainbow trout from one to fifteen of age. *Lond. Journal of Zoology*, 199: 503-520.
- Tatner M.F., Horne M.T. (1983). Factors influencing the uptake of ¹⁴C-labelled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 22: 585-591.
- Tatner M.F., Manning M.J. (1985). The ontogenetic development of the reticulo-endothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Richardson. *Journal Fish Dis.*, 8: 35-41.
- Tatner M.F. (1996). Natural changes in the immune system of fish. In *The fish immune system: organism, pathogen and environment* (series: *fish physiology*) (Iwana, G. and Nakanishi, T. eds.) pp. 255-287. Academic Press. Inc. S.Diego (CA; USA).
- Temmink J.H.M., Bayne C.J. (1987). Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 11: 125-37.
- Thompson C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462.
- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*, 356: 768-74.
- Todryk S.M., Gough M.J., Pockley A.G. (2003). Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology*, 110: 1-9.
- Tonegawa S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 558–575.
- Tort L., Rottlant J., Liarte C., Acerete L., Hernández A., Ceulemans S., Coutteau P., Padros F. (2004). Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229: 55-65.
- Trede NS, Zapata A, Zon LI. (2001). Fishing for lymphoid genes. *Trends Immunol.*, 22: 302-7.
- Tsujii T., Seno S. (1990). Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (Teleost): morphologic studies on its formation and possible function. *Anatomical Record* 226: 60–470.
- Uchida N., Nakano H., Hagimoto R., Nishide E. (1992). Biological activities of fish skin collagen thrombocyte aggregation-inducing activity and affinity for fibronectin. *Bulletin of College of Agricultural and Veterinary Medicine (Nihon University)*, 49: 111-6.

- Uchida D., Yamashita M., Kitano T., Iguchi T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.*, 137(1): 11-20.
- Ullal A.J., Litaker R.W., Noga E.J. (2008). Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Dev. Comp. Immunol.*, 32: 1301-1312.
- Van Ewijk W. (1988). Cell surface topography of thymic microenvironments. *Lab. Invest.* 59: 579-590.
- Van Loon, J.J.A., Van Oosterom, R., van Muiswinkel, W.B (1981). Development of the immune system in carp (*Cyprinus carpio*). In J.B. Solomon (ed): Aspects of Developmental Comparative Immunology. Oxford and New York: Pergamon Press, pp. 469-470.
- Van Muiswinkel WB (1995). The piscine immune system: innate and acquired immunity. In Woo, P.T.K. (ed). *Fish disease and disorders* (Vol.1): *Protozoan and metazoan infections*, CAB International publisher, Wallingford, Oxon OX10-8DE, UK, pp. 729-750.
- Varsamos S., Flik G., Pepin J.F., Bonga S.E.W., Breuil G. (2006). Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 83-96.
- Vazzana M., Parrinello D., Cammarata M., (2003). Chemiluminescence response of beta-glucan stimulated leukocytes isolated from different tissues and peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 423-434.
- Vega V., Zepeda A., Ramírez S., Morales V., Fernández P., de Oca R.M., Guerra-Infante F.M., de Jesús de Haro-Cruz M., Blackall P.J., Soriano E.V. (2008). Hemagglutinating activity of serovar reference strains of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Vet Diagn Invest.*, 20(3): 353-5.
- Veldman J.E. (1970). Histophysiology and Electron Microscopy of the Immune Response. Part 1 and 2. Ph.D. Thesis. Groningen.
- Veldman J.E., Kaiserling E. (1980). Interdigitating cells. In I. Carr and W.T. Daems (eds): The reticuloendothelial System. A Comprehensive Treatise, Vol.1. *Morphology*. New York: Plenum, pp. 381-416.
- Venkatesh B., Ning Y., Brenner S. (1999). Late changes in spliceo-somal introns the fine clades in vertebrate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 10267-10271.
- 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.

- Viale I., Cubadda C., Angelucci G., Salati F. (2006). Immunization of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, fingerlings with a commercial vaccine against vibriosis. A One Year Survey on Antibody Level, Diseases and Growth. *J. Applied Aquaculture*, 18(3): 53-67.
- Vijayan M.M, Pereira C., Forsyth R.B., Kennedy C.J., Ywana G.K. (1997a). Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β -Naphthoflavone. *Life Sciences*, 61(2): 117-127.
- Vijayan M.M., Pereira C., Forsyth R.B., Kennedy C.J., Ywana G.K. (1997b). Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation heat-shock-cognate HSC71 gene from rainbow trout. *Eur. J. Biochem.*, 204: 893-900.
- Vizzini A., Vazzana M., Cammarata M., Parrinello N. (2007). Peritoneal cavity phagocytes from the teleost sea bass express a glucocorticoid receptor (cloned and sequenced) involved in genomic modulation of the in vitro chemiluminescence response to zymosan. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 150: 14-123.
- Volpatti D., Rusva M., D'Angelo L., Manetti M., Galeotti M. (1996). Evaluation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) lymphocytes proliferation after in vitro stimulation with mitogens. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, 8: 22-26.
- Von Boehmer H., Teh H.S., Kisielow P. (1989). The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol. Today*, 10: 57-61.
- Warr G.W., Marchalonis J.J. (1982). Molecular basis of self / non-self discrimination in the ectothermic vertebrates. In *The Reticuloendothelial System, Vol. 3: Phylogeny and Ontogeny*, Cohen, N. and Sigel, M.M. (eds.) Plenum press, New York, pp. 541-567.
- Warr G. (1995). The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 19:1-12.
- Warr G.W., Pilstrom L. (1999). Light chain variable region diversity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev Comp Immunol* 23:231-240.
- Washburn B.S., Moreland J.J., Slaughter A.M., Werner I., Hinton D.E., Sanders B.M. (2002). Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 557-560.
- Weather P.R., Burkitt H.G., Daniels V.G. (1987). *Istologia ed anatomia microscopica*. Casa editrice ambrosiana Milano.
- Wedemeyer G.A. (1996). Physiology of fish in intensive culture. In: *Fish stress and health aquaculture*. Wedemeyer, A.D. ed., Chapman and Hall, New York.
- Weinrauch Y., Zychlinsky A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 155-187.
- Welch W.J. (1993). How cells respond to stress. *Sci. Am.*, 268: 56-64.
- Wendelaar Bonga S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.

- Weyts F.A.A, Flik G., Rombout J.H.W.M., Verburg-van Kemenade B.M.L. (1998). Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev. Comp. Immunol.*, 22: 551-562.
- Wilson M.R., Warr G.W. (1992). Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annu Rev Fish Dis.*, 2:201–221.
- Wilson M.R., Bengten E., Miller N.W., Clem L.W., De Pasquier L., Warr G.W. (1997). A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4593-4597.
- Wilson M.R., Zhou H., Bengten E., Clem L.W., Stuge T.B., Warr G.W., Miller N.W.(1998). T-cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR alpha and beta genes. *Mol Immunol*, 35: 545-557.
- Wyllie A.H. (1980). Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284: 259-267.
- Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.*, 68: 251–306.
- Yang M., Wang K.-L., Chen J.-H., Qu H.-D., Li S.-J., (2007). Genomic organization and tissue expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B.). *Fish Shellfish Immunol.*, doi:10.1016/j.fsi.2007.04.011.
- Yano T., 1996. The non specific immune system: Humoral defence. In: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Iwama G. and Nakanishi T. eds. Academic Press, San Diego, pp. 105-157.
- Yamashita M., Hirayoshi K., Nagata K. (2004). Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene*, 336: 207-218.
- Yassine F., Feddecka-Bruner B., Dieterlen-Lièvre F. (1989). Ontogeny of the chick embryo spleen: A cytological study. *Cell Diff. Dev.*, 27: 29-45.
- Yu M.L., Kiley C.W., Sarot D.A. e Perlmutter A. (1971). Regulation of haemosiderin to erythropoiesis in the blue gourami (*Trichogaster tricopterus*). *J. Fisheries Res.*, Board Canada. 28, 47-48.
- Zapata A.G., Cooper E.L. (1990). “The Immune System Comparative Histophysiology”. John Wiley and Sons, Chichester.
- Zapata A.G., Chibà A, Varas A (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama Q, Nakanishi T. (eds) *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press, San Diego, pp. 1–62.

- Zapata A., Amemiya C.T. (2000). Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Cur. Topics Microb. Immunol.*, vol. 248: 67-107.
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-de Frias C, Cortes A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20(2): 126–36.
- Zarkadis I.K., Sarrias M.R., 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(1): 11-24.
- Zhang Y.A., Zou J., Chang C.I., Secombes C.J. (2004). Discovery and characterization of two types of liver expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2). *Vet. Immunol. Immunopathol*, 101: 259-269.
- Zou J., Grabowski P.S., Cunningham C., Secombes C.J. (1999). Molecular cloning of interleukin 1b from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Cytokine*, 11: 552-60.
- Zou J., Wang T., Hirono I., Aoki T., Inagawa H., Honda T., et al. (2002). Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 161-72.
- 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: 845-58.

PUBBLICAZIONI SU RIVISTE SCIENTIFICHE NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

Lavori in preparazione

- 1) Romano N., Ceccarelli G., Baldassini M.R., Caprera C., Marino G., Rombout J.M.W, Mastrolia L. & Abelli L. “Apoptosis in thymus during development in Teleost”.
- 2) Ceccarelli G., Brunetti A. Tiscar P.G., Galeotti M., Volpatti D., Mastrolia L. & Romano N. “Apoptosis and HSP70 are suitable markers to monitor stress adaptation in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)”.
- 3) Piergentili R., Ficca A.G., Caccia E., Ceccarelli G., Missinato M.A., Mastrolia L. & Romano N. “Cloning and characterization of T-cell receptor gamma gene in sea bass, *Dicentrarchus labrax*”.

RINGRAZIAMENTI

Inizio col ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione sperimentale di questa tesi: la Prof.ssa Nicla Romano, la Prof.ssa Lucia Mastrolia, il Prof.re Giuseppe Scapigliati (Università della Tuscia), il Prof.re Luigi Abelli, il Dott. Fabrizio Bertoni (Università di Ferrara), il Prof.re Marco Galeotti, la Dott.ssa Donatella Volpatti, la Dott.ssa Chiara Bulfon (Università di Udine), il Prof.re Pietro Giorgio Tiscar e il Dott. Francesco Mosca (Università di Teramo). Ringrazio inoltre la Dott.ssa Anna Grazia Ficca (Università della Tuscia), per la disponibilità, i consigli e soprattutto per la fiducia che in più occasioni mi ha dimostrato.

Un grazie particolarmente sentito va alle mie colleghe di laboratorio: Elisabetta Caccia (la nostra Bettina), Rita Piergentili (la futura mamma), Maria Azzurra Missinato e Cecilia Caprera (le “ternane” del laboratorio) per l’aiuto nel lavoro, la pazienza, i preziosi consigli ed il sostegno morale che non mi hanno mai fatto mancare, ma soprattutto per l’amicizia dimostrata. Infine voglio ringraziare Andrea Brunetti, il maschietto del laboratorio, forse il più sfortunato perché ha dovuto “sopportarmi” da solo nel periodo più difficile: mi ha aiutato negli esperimenti, mi ha incoraggiato nei momenti di maggiore sconforto e ha provato in tutti i modi a farmi restare calma, che dire...”EVVIVA LE GILLS”!!! Con queste persone ho condiviso i momenti più belli, ma anche quelli più brutti di questa esperienza, ho imparato a conoscerle e a volergli bene: grazie di cuore per tutto.

Un ringraziamento speciale ad Amleto che mi è stato sempre vicino, ha creduto in me e, a modo suo, mi ha incoraggiato ad andare sempre avanti, e alla mia famiglia per la stima dimostrata e l’infinita pazienza.