

La presente Tesis Doctoral titulada "Caracterización ontogénica y funcional del sistema inmunitario de la dorada (*Sparus aurata* L.)" realizada por D. Iván Mulero Méndez, es un compendio de publicaciones cuyas referencias completas son las siguientes:

Iván Mulero, M. Pilar Sepulcre, Francisco J. Roca, José Meseguer, Alfonsa García Ayala, Victoriano Mulero (2008) Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage colony stimulating factor receptor *Dev Comp Immunol* (en prensa). doi:10.1016/j.dci.2008.03.005.

Iván Mulero, M. Pilar Sepulcre, José Meseguer, Alfonsa García Ayala, Victoriano Mulero (2007) Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19434–19439.

Iván Mulero, Edward J. Noga, José Meseguer, Alfonsa García Ayala, Victoriano Mulero (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 Immunol*. Enviado.

Iván Mulero, Elena Chaves Pozo, Alicia García-Alcázar, José Meseguer, Victoriano Mulero, Alfonsa García Ayala (2007) Distribution of the professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during the ontogeny of lymphomyeloid organs and pathogen entry sites. *Dev Comp Immunol* 31: 1024–1033.

Iván Mulero, M. Pilar Sepulcre, Inmaculada Fuentes, Alicia García-Alcázar, José Meseguer, Alfonsa García Ayala, Victoriano Mulero (2008) Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immunocompetence. *Mol Immunol* (en prensa). doi:10.1016/j.molimm.2008.01.017.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

CARACTERIZACIÓN ONTOGÉNICA Y FUNCIONAL
DEL SISTEMA INMUNITARIO DE LA DORADA
(Sparus aurata L.)

Memoria que presenta
D. Iván Mulero Méndez
para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Murcia
Murcia, abril 2008

A mi familia

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y se han preocupado durante la realización de este trabajo:

A Pepe por darme la oportunidad de incorporarme al grupo de investigación y por su labor de responsabilidad y coordinación de la investigación desarrollada.

A Víctor por tantas cosas que faltaría papel para expresarle mi más sincero agradecimiento. Siempre que lo he necesitado he encontrado su puerta abierta, mañana y tarde, días laborables, festivos y vacaciones, cuando los experimentos salían y cuando no, cuando estaba más ocupado y cuando menos.....Gracias también por los momentos inolvidables fuera del trabajo.

A Alfonsa porque sin ella este trabajo no hubiera sido posible. Su apoyo ha sido constate durante todo este tiempo: consejos, enseñanzas y horas compartidas bajo el microscopio. No puedo olvidarme de sus sabias correcciones en la escritura de este manuscrito y de los trabajos publicados. Todo ello demuestra su larga y excelente trayectoria científica y su calidad humana.

A la Profesoras Pilar García, María Engracia Abad y María Teresa Lozano por su buen humor y las risas compartidas.

A todos los componentes del Servicio de Cultivos, Pepe, Toñi, Dori y Juana por su buen humor y su ayuda.

A todos los componentes del Servicio de Microscopía Electrónica por su ayuda en todo momento y en especial a su directora, María García.

A las Dras. Alicia García Alcázar y Emilia Abellán Martínez por el mantenimiento de los animales en el Instituto Español de Oceanografía de Mazarrón.

A la Dr. María del Carmen Giménez de la empresa Culmarex S.A. (Águilas) por la cesión de animales para este estudio y por la financiación de parte del mismo.

A los Profesores María Amparo Estepa, Beatriz Novoa, Rafael Barrera, María Lucía da S. Ribeiro y Renato A. DaMatta por la cesión de ejemplares y muestras de tejidos usados en este estudio.

A los Profesores Alicia Estévez Toranzo y Juan Luis Barja Pérez por la cepa de *V. anguillarum* usada.

A todos los miembros del Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia.

A mis compañeros de Departamento Alejandro, Jesús, Alberto, Rebeca, Irene, Antonio e Iciar.

A Pili por su inestimable ayuda en muchos de los experimentos, porque sin su colaboración nuestro artículo de la histamina no se hubiera publicado en una revista tan importante y por los buenos momentos vividos en los múltiples viajes a Mazarrón (nuestras canciones de Soraya y nuestras tapitas de ensaladilla). Gracias por todo.

A Inma para la que sólo tengo palabras de agradecimiento. Eres genial, lo tienes todo superordenado, eres responsable, graciosa, guapa y encima te salen las PCRs a la perfección. Muchas gracias por aguantar mis bromas sobre tu pueblo y por tu ayuda en el laboratorio.

A Fran porque a lo largo de estos años has demostrado ser una excelente persona, además de un gran profesional de la cocina. Los malos momentos se han pasado siempre rápido con un buen Brownie. Eres un buen compañero y un inmejorable amigo.

A Azu porque lo hemos pasado pipa en el trocito de pasillo que hay delante de las puertas de los arcones y almacén. Cotilleos, risas.... Gracias por los momentos tan buenos que me has hecho pasar en tu tesina (el baile famoso) y el congreso de Pamplona (cuando no atinabas a ponerte el micrófono).

A Sergio porque me has hecho disfrutar mucho, aunque este año, entre la baja y las clases del CAP, casi no te he visto el pelo. Nuestros desayunos en la biblioteca son una pasada y eso en las empresas no lo pueden hacer. Siempre recordaré tus palabras técnicas del mundo informático y tus seminarios magistrales en inglés.

A Patricia porque en el año y pico que lleva con nosotros hemos vivido muy buenos momentos.

A Gloria porque mientras ha estado en el departamento ha sido la alegría en persona, porque me daba envidia con sus "Western" (a mí no me salían) y por los cotilleos que tanto nos han hecho reír.

A Elena porque me has enseñado todo lo que sé en técnicas de microscopía. Muchas gracias.

A las Arrixacosas Paqui, Esther, Laura y Mónica por el follón que habéis dado en los seminarios y reuniones.

A mis amigos Juan Pedro, Damián y Rosa porque durante todos estos años habéis estado ahí siempre que os he necesitado y por los momentos inolvidables.

A mis padres por su apoyo incondicional y su habilidad para hacer que las cosas parezcan más fáciles.

A mis hermanos por haber acudido a verme allí dónde he estado, por su apoyo y su escepticismo.

A mis cuñadas María Luisa y Caridad por aguantarme y por sus buenos consejos.

A mis sobrinos Víctor, Laura y María, porque sois los que más quiero en este mundo y por haberme dado fuerza y ánimo para llevar a cabo este trabajo.

Abreviaturas	0
Especies	0
Introducción	1
I. SISTEMA INMUNITARIO DE PECES TELEÓSTEOS	4
II. INMUNIDAD INNATA CELULAR	5
II.1. Granulocitos acidófilos	6
II.1.1. Propiedades funcionales de los granulocitos acidófilos	8
II.1.1.1. Fagocitosis	8
II.1.1.2. Regulación de la respuesta inmunitaria	9
II.2. Monocitos-macrófagos	9
II.2.1. Monocitos. Monocitos/macrófagos	9
II.2.2. Macrófagos	10
II.2.3. Propiedades funcionales de los monocitos-macrófagos	11
II.2.3.1. Fagocitosis	11
II.2.3.2. Presentación de antígeno	12
II.2.3.3. Regulación de la respuesta inmunitaria	13
II.3. Mastocitos o células cebadas	13
II.3.1. Distribución tisular y propiedades tintoriales de los mastocitos	13
II.3.2. Propiedades funcionales de los mastocitos	14
II.3.2.1. Contenido granular	14
II.3.2.1.1. Péptidos antimicrobianos (AMPs)	15
II.3.2.1.2. Aminas biógenas: histamina y serotonina	17
II.3.2.2. Activación y reclutamiento al foco de infección	19
III. ONTOGENIA DEL SISTEMA INMUNITARIO DE PECES TELEÓSTEOS	23
III.1. Órganos	26
III.1.1. Riñón	27
III.1.2. Bazo	27
III.1.3. Timo	28
III.2. Tipos celulares	29
III.2.1. Eritrocitos	29
III.2.2. Macrófagos	30

III.2.3. Granulocitos	32
III.2.4. Linfocitos	33
III.2.4.1. Linfocitos B y células plasmáticas	33
III.2.4.2. Linfocitos T	34
III.3. Factores de la inmunidad humoral	35
III.3.1. Inmunoglobulina M	35
III.3.2. Complemento	36
III.3.3. Lisozima	37
III.3.4. Lectinas	38
III.3.5. Otros factores humorales	38
Publicaciones de que consta la tesis	39
Objetivos	103
Material y Métodos	107
I. Animales	109
II. Infecciones experimentales en dorada	110
II.1. Infección experimental con <i>V. anguillarum</i>	110
II.2. Vacunación de larvas y juveniles frente a <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscidida</i> e infección experimental	111
III. Análisis realizados	112
IV. Anticuerpos utilizados	113
V. Microscopía	113
V.1. Microscopía óptica de campo claro	113
V.2. Inmunocitoquímica	114
V.2.1. Marcaje con G7	115
V.2.2. Marcaje con anti-IL-1 β , anti-histamina, anti-serotonina, anti-piscidina 1 y anti-piscidina 3	116
V.2.3. Marcaje con anti-M-CSF-R	116
V.2.4. Método doble inmunocitoquímica	117
V.2.4.1. Marcaje con G7/anti-histamina o G7/anti-piscidina 3	117
V.2.4.2. Marcaje con anti-IL-1 β /G7	117
V.3. Microscopía de fluorescencia	118

V.4. Microscopía electrónica de transmisión	119
V.4.1. Inmunocitoquímica	120
VI. Obtención de suspensiones celulares de riñón cefálico de dorada	120
VI.1. Suspensiones enriquecidas en granulocitos acidófilos	121
VI.2. Aislamiento de macrófagos	121
VII. Extracción del ADN genómico de <i>V. anguillarum</i>	122
VIII. Análisis funcionales	122
VIII.1. Análisis de la actividad fagocítica	122
VIII.1.1. Marcaje de la bacteria <i>V. anguillarum</i>	123
VIII.1.2. Ensayo de fagocitosis	123
VIII.1.3. Citometría de flujo	123
VIII.2. Producción de reactivos intermediarios de oxígeno (ROIs)	124
IX. Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	124
IX.1. Aislamiento del ARN	124
IX.2. Obtención de ADN copia	125
IX.3. PCR	126
X. Ensayos farmacológicos	129
X.1. Ensayos <i>in vivo</i>	129
X.2. Ensayos de contracción del músculo liso intestinal y vascular	130
XI. Determinación del título de IgM específica frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) en dorada	130
XII. Análisis estadístico	131
Resultados y Discusión	133
I. Caracterización de los macrófagos y las células productoras de IL-1 β de dorada en ejemplares sanos e infectados experimentalmente con la bacteria patógena <i>V. anguillarum</i> .	135
I.1. Macrófagos	135
I.2. Células productoras de IL-1 β	136
II. Caracterización de los mastocitos de dorada	137
II.1. Distribución tisular y propiedades tintoriales de los mastocitos	137
II.2. Mediadores inflamatorios de los mastocitos: histamina y serotonina	137
II.3. Efectos farmacológicos de la histamina	138

II.4. Filogenia del almacenamiento de histamina en los mastocitos de vertebrados y su utilización como mediador inflamatorio	139
III. Análisis de piscidinas en células del sistema inmunitario de dorada y de otras especies de teleósteos	140
IV. Caracterización del sistema inmunitario de dorada durante el desarrollo larvario	142
IV.1. Distribución de los fagocitos profesionales	142
IV.2. Patrón de expresión de genes marcadores de la inmunidad	144
V. Análisis de la resistencia natural de larvas y juveniles de dorada frente al patógeno bacteriano <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> y la protección inducida por la vacunación frente a este patógeno	145
Conclusiones	147
Apéndice	151
I. Índice de impacto de las publicaciones. ISI Journal Citation Reports	153
II. Declaración de los colaboradores	165
Bibliografía	180
Publicaciones relacionadas con la Tesis	210
Comunicaciones y participaciones a Congresos	214

ABREVIATURAS

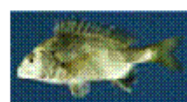
Abs	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa I	desoxirribonucleasa I
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AMPe	monofosfato de adenosina cíclico
AMPs	péptidos antimicrobianos
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
BSA	albúmina de suero bovino
C3	factor C3 del complemento
C3a	anafilotoxina C3a del complemento
C5a	anafilotoxina C5a del complemento
DAB	3,3'-diaminobencidina
DEPC	di etilpirocarbonato
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
dde	días después de la eclosión
ddf	días después de la fecundación
DDSA	anhidrodo decenil succínico
DMP-30	2,4,6,-tris-dimetil amino metil fenol
DTT	ditiotreitól
ECF	factor quimiotáctico de eosinófilos
EGCs	células granulares eosinófilas
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	enzimoinmunoensayo
FcγRIII	receptor de baja afinidad para inmunoglobulina G
FcεRI	receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSC	tamaño celular
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
hdf	horas después de la fecundación
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina

IL	interleuquina
iNOS	sintetasa de óxido nítrico inducible
LPS	lipopolisacárido
LT	leucotrieno
MACS	separación celular activada magnéticamente
M-CSF-R	receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MNA	anhidrido metilnádico
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NCF	factor quimiotáctico de neutrófilos
NK	células citotóxicas naturales
PAF	factor activador de plaquetas
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	tampón fosfato salino
PBG	PBS con BSA y gelatina
PBT	PBS con BSA y Triton X-100
PG	prostaglandina
PMA	forbol miristato acetato
RC	riñón cefálico
RNI	intermediarios reactivos de nitrógeno
ROI	intermediarios reactivos de oxígeno
RPS	porcentaje relativo de supervivencia
RT-PCR	retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SBF	suero bovino fetal
sde	semanas después de la eclosión
sdf	semanas después de la fecundación
SRS-A	sustancia de reacción lenta de anafilaxia
SSC	granularidad celular
TAC	tampón de alta concentración salina
TBC	tampón de baja concentración salina
TCR	receptor de las células T
TF	PBS con EDTA y SBF

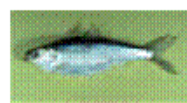
TLR	receptor similar a Toll
TNF	factor de necrosis tumoral
TRICT	tetrametilisotiocianato de rodamina
TSB	caldo de triptona de soja
u.f.c.	unidades formadoras de colonias
UV	luz ultravioleta

ESPECIES

PECES



Acanthopagrus schlegelii (Bleeker, 1854)



Alosa sapidissima (Wilson, 1811)

Sábalo americano



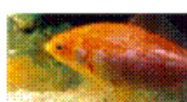
Anarkichas minor Olafsen, 1772

Petro pintado



Anguilla anguilla (Linnaeus, 1758)

Anguila



Carassius auratus (Linnaeus, 1758)

Pez rojo



Clarias gariepinus (Burchell, 1822)

Pez gato africano



Cyclopterus lumpus (Linnaeus, 1758)

Liebre de mar



Cyprinus carpio (Linnaeus, 1758)

Carpa



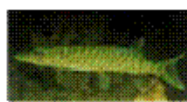
Danio rerio (Hamilton, 1822)

Pez cebra



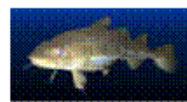
Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)

Lubina



Esox lucius (Linnaeus, 1758)

Lucio



Gadus morhua Linnaeus, 1758

Bacalao



Gambusia affinis (Bairé y Girard, 1853)

Gambusino



Geotria australis Gray, 1851

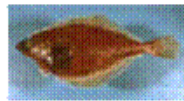


Glyptocephalus cynoglossus (Linnaeus, 1758)

Mendo

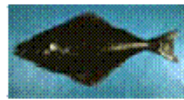


Harpagifer antarcticus Nybelin, 1947



Hippoglossoides platessoides (Fabricius, 1780)

Platija americana

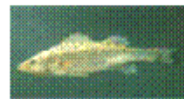


Hippoglossus hippoglossus (Linnaeus, 1758)

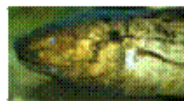
Fletán del Atlántico



Hoplias malabaricus (Bloch, 1794)

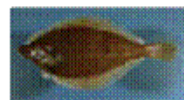


Lateolabrax japonicus (Cuvier, 1828)



Lepidosiren paradoxa Fitzinger, 1837

Pez pulmonado sudamericano



Limanda ferruginea (Storer, 1839)

Limanda

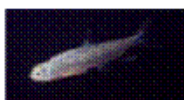


Morone chrysops (Rafinesque, 1820)



Morone saxatilis (Walbaum, 1792)

Lubina estriada



Oncorhynchus kisutch (Walbaum, 1792)



Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792)

Trucha arcciris



Oreochromis mossambicus (Peters, 1882)



Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758)

Tilapia



Pagrus major (Temminck y Schlegel, 1843)

Pargo japonés



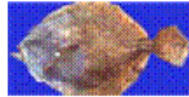
Paralichthys olivaceus (Temminck y Schlegel, 1846)

Falso halibut del Japón



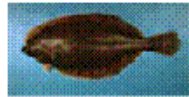
Pleuronectes platessa Linnaeus, 1758

Solla europea



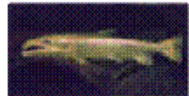
Psetta maxima (Linnaeus, 1758)

Rodaballo



Pseudopleuronectes americanus (Walbaum, 1792)

Solla roja



Salmo salar Linnaeus, 1758

Salmón atlántico



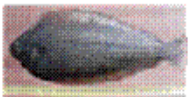
Salmo trutta (Linnaeus, 1758)

Trucha común



Seniola dumerilii (Risso, 1810)

Seniola



Solea senegalensis Kaup, 1858

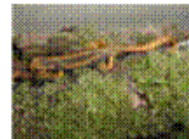
Lenguado



Sparus aurata (Linnaeus, 1758)

Dorada

ANFIBIOS



Cynops orientalis (David, 1871)

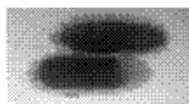
Tritón vientre de fuego



Rana perezi (Seoane, 1885)

Rana común

BACTERIAS



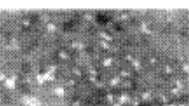
Aeromonas salmonicida



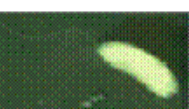
Escherichia coli



Photobacterium damsela subsp. *piscicida*



Renibacterium salmoninarum



Vibrio anguillarum

INTRODUCCIÓN

Debido a que la pesca extractiva no es suficiente para cubrir la demanda mundial de pescado, la acuicultura se perfila como la única posibilidad de que en un futuro próximo dicha demanda pueda ser cubierta. España se sitúa en el puesto 14 del ranking mundial de productores acuícolas. La acuicultura española es una de las más importantes de Europa ya que supone el 35% en volumen de la producción mundial y el 25% de la europea, lo que la hace una de las más importantes de Europa. Así mismo, la práctica de la piscicultura supone el cultivo de un gran número de ejemplares en espacios limitados y una manipulación más o menos periódica (transporte, clasificación, etc.), que desencadenan situaciones de estrés que afectan tanto a los peces adultos como a larvas y juveniles. Todas estas condiciones favorecen el desarrollo de enfermedades infecciosas, que son las responsables de cuantiosas pérdidas económicas. Por ello, el conocimiento del sistema inmunitario de los peces en general, y de las especies objetivo de cultivo en particular, se ha convertido en objetivo prioritario de estudio.

Por otra parte, los peces representan el primer grupo animal que posee un sistema inmunitario innato y adaptativo bien estructurados, por lo que los estudios de inmunología en este grupo de vertebrados tienen un interés científico básico. El sistema inmunitario de vertebrados presenta un patrón común, pero esto no excluye la existencia de diferencias importantes entre ejemplares de una misma especie y entre diferentes especies pertenecientes a este grupo de animales. El predominio de la respuesta inmunitaria innata en peces y de la adaptativa en vertebrados superiores es la más importante de estas diferencias (Anderson, 1992).

En este contexto, el grupo de investigación del que formo parte tiene una larga trayectoria trabajando en el estudio del sistema inmunitario innato de especies de peces mediterráneos, tales como la dorada (*Sparus aurata* L.) y la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.), de gran interés comercial para la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, a nivel nacional y para la Unión Europea. En concreto, las investigaciones de nuestro grupo se han centrado en el estudio de la respuesta inmunitaria innata tanto a nivel celular como molecular.

Esta Tesis Doctoral, ubicada en este marco de conocimiento, se centra en el sistema inmunitario de la dorada, con el interés de estudiar en primer lugar la inmunidad innata celular para lo que hemos caracterizado (i) los macrófagos y las células productoras de

interleuquina-1 β (IL-1 β) en ejemplares sanos e infectados experimentalmente con la bacteria patógena *Vibrio anguillarum*, (ii) los mastocitos de dorada a nivel morfológico, funcional y evolutivo y (iii) hemos determinado la presencia de piscidinas en células del sistema inmunitario de la dorada y de otras especies de teleósteos. En segunda instancia nos propusimos caracterizar el sistema inmunitario de la dorada durante el desarrollo larvario para lo que realizamos un estudio (i) microscópico de los órganos linfomieloides (riñón, bazo y timo), (ii) de la aparición y distribución de los granulocitos acidófilos y (iii) de la expresión de genes marcadores de la inmunidad innata y adaptativa. Por último, nos planteamos determinar la resistencia natural de larvas y juveniles de dorada frente al patógeno bacteriano *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y la protección inducida por la vacunación frente a este patógeno.

I. SISTEMA INMUNITARIO DE PECES TELEÓSTEOS

El sistema inmunitario de peces teleósteos muestra características similares al del resto de vertebrados, presentando respuestas celulares y humorales que poseen las características de ser específicas y de tener memoria (van Muiswinkel, 1995). Por lo tanto, los teleósteos tienen las dos ramas del sistema inmunitario bien diferenciadas. La respuesta innata consta de barreras físicas (epitelios y mucosas), de efectores celulares (fagocitos, células citotóxicas no específicas y mastocitos o células cebadas) y de factores humorales (complemento y otras proteínas de la fase aguda). La respuesta adaptativa, por su parte, engloba a un componente celular (linfocitos) y a otro humoral (anticuerpos).

A pesar de las semejanzas entre el sistema inmunitario de peces teleósteos y el de otros vertebrados, existen diferencias claras. La más importante de estas últimas es que los peces dependen en mayor grado de los mecanismos de defensa innatos que los mamíferos. Esto es especialmente cierto en condiciones ambientales de baja temperatura (los peces son animales poiquilotermos), ya que la respuesta inmunitaria adaptativa es dependiente de la temperatura (Cuchens y Clem, 1977; Avtalion, 1981; Abruzzini y col., 1982; Clem y col., 1984, 1991; Miller y Clem, 1984).

II. INMUNIDAD INNATA CELULAR

Los invertebrados carecen de linfocitos e inmunoglobulinas y por tanto, de un sistema inmunitario adaptativo, pero son capaces de desarrollar respuestas tales como la fagocitosis y la encapsulación. Una gran variedad de tipos de leucocitos están involucrados en la defensa innata celular de los peces. Entre ellos se incluyen los fagocitos (monocitos-macrófagos y granulocitos), las células citotóxicas no específicas y los mastocitos o células cebadas. Los más importantes para la inmunidad innata son los fagocitos, los cuales se encargan de eliminar virus, bacterias y parásitos.

Desde un punto de vista evolutivo, no está del todo claro si los granulocitos y los macrófagos de vertebrados proceden de las células fagocíticas de los invertebrados. Los macrófagos son, probablemente, el tipo celular más antiguo de estos dos grupos. Los linfocitos, monocitos-macrófagos y los restantes tipos de leucocitos que se han encontrado en mamíferos, probablemente aparecieron por primera vez en peces. La marcada similitud entre la mayoría de los tipos de leucocitos de los vertebrados modernos sugiere la existencia de un antecesor común (Reite y Evensen, 2006).

La respuesta celular durante la inflamación en peces teleósteos parece ser bifásica, empezando con un flujo de neutrófilos y terminando con una llegada posterior de monocitos/macrófagos. Los neutrófilos se originan en el riñón cefálico, mientras que los macrófagos que aparecen en los tejidos proceden de los monocitos circulantes en los vasos. Después de la llegada al foco inflamatorio, los macrófagos pueden ser estimulados y su potencial fagocítico y capacidad microbicida aumentados (Rowley y col., 1988; Rowley, 1996).

Algunos teleósteos presentan granulocitos acidófilos y basófilos en sangre periférica, además de neutrófilos, pero otros sólo presentan neutrófilos (Ellis, 1977; Ainsworth, 1992). La nomenclatura utilizada en la clasificación de los leucocitos de peces de acuerdo con su afinidad por colorantes ácidos o básicos, puede no corresponderse con la diversidad funcional existente.

A continuación, describimos con mayor profundidad los granulocitos acidófilos, los monocitos-macrófagos y los mastocitos de peces teleósteos, objetos de estudio de este trabajo.

II.1. Granulocitos acidófilos

En el riñón cefálico se han descrito los mismos tipos de granulocitos que en la médula ósea de mamíferos, distinguiéndose las series granulopoyéticas heterófila, acidófila y basófila, las cuales se establecen en base a sus propiedades de tinción, sus características bioquímicas, su morfología y sus capacidades funcionales (principalmente la capacidad fagocítica) (Bielek, 1981; Fujimaki e Isoda, 1990; Meseguer y col., 1990). Los estadios granulopoyéticos han sido considerados comunes para las tres series. Todas las series inician su desarrollo a partir de una célula común denominada promielocito, la cual se diferencia para dar cada una de las series, que consta de los estadios de mielocito, metamielocito y granulocito maduro (Zapata, 1979; Zuasti y Ferrer, 1988; Meseguer y col., 1990).

Los granulocitos acidófilos son células presentes en sangre y de manera más numerosa en tejidos hematopoyéticos y en exudado peritoneal. También se encuentran en la submucosa intestinal, en la piel, los arcos branquiales, en la parte ventral de la médula espinal, en las meninges y en el contenido periocular (Bullock, 1963; Ezeasor y Stokoe, 1980). Recientemente, se ha demostrado la presencia de este tipo celular en el tejido conectivo que separa el testículo del ovario de la dorada, así como cerca del conducto deferente en la túnica albugínea y en el área intersticial y dentro del compartimento germinal durante los estadios de puesta y post-puesta (Chaves-Pozo y col., 2003). En este mismo trabajo, se indica la ausencia de proliferación de este tipo celular, lo que podría confirmar que los leucocitos de peces infiltran el testículo al final de la puesta y al principio de la post-puesta (Besseau y Faliex, 1994; Bruslé-Sicard y Fourcault, 1997).

Mediante microscopía óptica se observa que los granulocitos acidófilos son más pequeños que los neutrófilos (Weinreb, 1963) y presentan una forma redondeada u oval (Hightower y col., 1984; Romestand y Trilles, 1984; Clifton-Hadley y col., 1987). Su

citoplasma contiene numerosos gránulos que se tiñen de rojo con eosina pero no se tiñen con azul de toluidina (López-Ruiz y col., 1992).

Mediante microscopía electrónica de transmisión se observa que los granulocitos acidófilos son células esféricas que pueden presentar pequeños pseudópodos (Bodammer, 1986; Roncero y col., 1988; Meseguer y col., 1990). El núcleo es excéntrico, redondeado, oval o lobulado (Bodammer, 1986; Fujimaki e Isoda, 1990; Meseguer y col., 1990, 1993) y en raras ocasiones contiene un nucleólo (Bodammer, 1986). En el citoplasma aparecen mitocondrias, cisternas de retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres, un aparato de Golgi, partículas de β -glucógeno, vesículas claras y ocasionalmente vacuolas lipídicas (Zuasti y Ferrer, 1988; López-Ruiz y col., 1992). Lo más destacable es la presencia de gránulos citoplasmáticos que pueden ser redondeados o de contorno irregular y en ocasiones muy electronodensos (Bielek, 1980; Bodammer, 1986; Zuasti y Ferrer, 1988).

En la dorada, los granulocitos acidófilos presentan tres tipos de gránulos citoplasmáticos. Los gránulos tipo I son redondeados, no contienen fosfatasa ácida ni alcalina y son positivos para peroxidasa. Los gránulos tipo II son ovales o redondeados y presentan una zona central electronodensa positiva para fosfatasa ácida y alcalina rodeada por un delgado halo positivo para peroxidasa. Los gránulos tipo III son los más pequeños y se caracterizan por una zona excéntrica electronodensa positiva para fosfatasa ácida y alcalina y para peroxidasa rodeada por un halo positivo para peroxidasa. Teniendo en cuenta sus características citoquímicas, los gránulos tipo I y II se corresponden con los gránulos azurófilos y específicos de los acidófilos de mamíferos, respectivamente (Meseguer y col., 1994a). Los gránulos citoplasmáticos de los acidófilos de muchas especies de peces teleósteos no presentan una estructura cristalina (Davies y Haynes, 1975; Bielek, 1980, 1981; Mainwaring y Rowley, 1985), a diferencia de lo que ocurre en mamíferos.

II.1.1. Propiedades funcionales de los granulocitos acidófilos

II.1.1.1. Fagocitosis

Mediante citometría de flujo e inmunocitoquímica se ha demostrado que los granulocitos acidófilos son el tipo celular fagocítico más numeroso en el riñón cefálico de dorada lo que sugiere que en esta especie representan el equivalente funcional del neutrófilo de mamíferos (Sepulcre y col., 2002).

El proceso de fagocitosis muestra las mismas etapas que el que llevan a cabo los fagocitos de mamíferos, caracterizándose ultraestructuralmente por un primer contacto entre partícula a fagocitar y fagocito, el desarrollo de pseudópodos por parte del fagocito para englobar a la partícula a fagocitar, la formación de vesículas de endocitosis, la posterior formación de fagolisosomas y por último la digestión intracelular del material fagocitado (Esteban y Meseguer, 1994). El último paso de la fagocitosis lleva asociados dos mecanismos responsables de la muerte de los microorganismos fagocitados: (1) la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) con un incremento rápido y brusco en la tasa de consumo de oxígeno que se conoce como explosión o estallido respiratorio y que es independiente de la respiración mitocondrial y (2) la producción de óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno (RNIs), mecanismo que sólo tiene lugar en macrófagos. El primer paso en la explosión respiratoria está catalizado por la NADPH oxidasa, la cual produce la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido que dismuta a peróxido de hidrógeno espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (Abbas y Lichtman, 2005). Otros tipos de ROIs son el radical hidroxilo o el oxígeno singlete que se forman tras la interacción del anión superóxido con el peróxido de hidrógeno. Todos estos productos son producidos por los fagocitos de peces (Nash y col., 1987; Chung y Secombes, 1988; Secombes y col., 1988; Plytycz y col., 1989). También existen evidencias de una actividad NADPH oxidasa en los fagocitos de peces (Secombes y Fletcher, 1992) y que los ROIs producidos durante la explosión respiratoria en estos fagocitos tienen actividad bactericida (Sharp y Secombes, 1993; Skarmeta y col., 1995).

II.1.1.2. Regulación de la respuesta inmunitaria

Recientemente, se ha demostrado que la expresión del gen que determina la IL-1 β aumenta drásticamente en granulocitos acidófilos y macrófagos, después de su activación con varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Sepulcre y col., 2007). Además, se ha demostrado que los granulocitos acidófilos circulantes de animales infectados y los que se encuentran en el testículo producen y acumulan IL-1 β , lo que probablemente, esté relacionado con la regulación hormonal de estas células durante el ciclo reproductor de forma parecida a lo que ocurre en mamíferos (Chaves-Pozo y col., 2003, 2004).

II.2. Monocitos-macrófagos

En el riñón cefálico de peces se han caracterizado los estadios de promonocito, monocito, macrófago y melanomacrófago. Algunos autores utilizan indistintamente los términos monocito y macrófago para designar a un mismo tipo celular (Ellis, 1977). También se utiliza el término monocito/macrófago para referirse a un tipo celular presente en sangre de peces que posee lisosomas secundarios (Savage, 1983). Los monocitos y/o los monocitos/macrófagos (formas circulantes) corresponden al estado inmaduro del macrófago (forma hística) (Hyder y col., 1983).

II.2.1. Monocitos. Monocitos/macrófagos

Los promonocitos presentan morfología de células indiferenciadas, pero ya poseen capacidad fagocítica. En algunos trabajos sobre sangre de peces se demuestra la ausencia de monocitos en ciertas especies, lo que puede ser debido a que estas células se han confundido con granulocitos heterófilos e incluso con linfocitos grandes, sobre todo cuando no presentan lisosomas (Cannon y col., 1980). En algunas especies se ha indicado que los monocitos constituyen el leucocito circulante de mayor tamaño (Weinberg y col., 1972; Bielek, 1988; Fujimaki e Isoda, 1990; Meseguer y col., 1991; López-Ruiz y col., 1992; Burrows y col., 2001; Tierney y col., 2004) y de menor presencia (1% o menos de 1%) (Tierney y col., 2004). En riñón son muy escasos o bien no aparecen (Peters y Schwarzer, 1985), siendo algo más numerosos en el bazo. Igualmente, se ha descrito la presencia de monocitos en el timo de peces teleósteos

(Castillo y col., 1990). Debido a su tendencia a emitir pseudópodos, su forma, tamaño y cantidad de citoplasma son muy variables (Savage, 1983; Romestand y Trilles, 1984) y el núcleo es grande, redondeado, ovoide, arriñonado, indentado o ligeramente lobulado y suele ser eucromatínico y a veces presenta un nucleólo (Savage, 1983; Temmink y Bayne, 1987; Roncero y col., 1988). El citoplasma, teñido de color azul oscuro con Giemsa (López-Ruiz y col., 1992), presenta lisosomas que contienen fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y peroxidasa (Meseguer y col., 1994a), un aparato de Golgi grande, mitocondrias, cisternas de retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres y numerosas vesículas (Zuasti y Ferrer, 1989; López-Ruiz y col., 1992).

II.2.2. Macrófagos

Los macrófagos se han identificado en numerosos tejidos de peces, destacando su abundancia alrededor de los sinusoides del riñón, en el tejido conectivo, en el tejido hematopoyético del riñón cefálico, en el bazo (Bielek, 1980; Temkin y McMillan, 1986; Lieschke y col., 2001), en el exudado peritoneal (Sakai, 1984; Bodammer, 1986; Suzuki, 1986; Olivier y col., 1986, 1992), en la branquia (Page y Rowley, 1984), en el timo y en el mesenterio. Se caracterizan por su gran tamaño, sus numerosas inclusiones fagocíticas (Bielek, 1980), su reacción positiva para la esterasa, fosfatasa ácida y alcalina y peroxidasa (Meseguer y col., 1994a), su actividad fagocítica frente a *Escherichia coli* (Weeks y Warinner, 1984) y su rápida adherencia al vidrio (Saggers y Gould, 1989).

Los macrófagos son células con forma esférica o irregular (Bodammer, 1986). El núcleo es redondeado, central o excéntrico y contiene un nucleólo (Bielek, 1981; Bodammer, 1986; Roncero y col., 1988). Su citoplasma es ligeramente neutrófilo (Hightower y col., 1982) o basófilo y vacuolizado (Romestand y Trilles, 1984) y es bastante parecido al de los monocitos. Se pueden observar mitocondrias, ribosomas, retículo endoplasmático rugoso, un aparato de Golgi y gran cantidad de vesículas (Bielek, 1981; Bodammer, 1986; Roncero y col., 1988; Meseguer y col., 1993). La característica ultraestructural más importante de estas células es la presencia de lisosomas primarios y secundarios y de vesículas heterofágicas (Bodammer, 1986; Roncero y col., 1988).

En los tejidos linfohemopoyéticos y en hígado de teleósteos, con la excepción de salmónidos, están presentes unas células con las características morfológicas de los macrófagos y que contienen el pigmento melanina. A estas células se les denomina melanomacrófagos (Roberts, 1975). Este tipo celular se agrupa para formar los denominados "centros de melanomacrófagos" (Agius, 1980; Herráez y Zapata, 1991). Con microscopía electrónica aparecen como células redondeadas u ovaladas (Meseguer y col., 1994b). Su núcleo tiene forma variable, generalmente se localiza excéntricamente y posee abundante heterocromatina. En el citoplasma destaca la presencia de lisosomas secundarios que contienen numerosos gránulos redondados u ovalados, con un contenido homogéneo de alta electronodensidad que corresponden a gránulos de melanina (Meseguer y col., 1994b). En su interior también aparece lipofuscina y acúmulos de hemosiderina (Agius, 1980; Meseguer y col., 1994b).

II.2.3. Propiedades funcionales de los monocitos-macrófagos

II.2.3.1. Fagocitosis

Los monocitos-macrófagos no sólo desempeñan un papel en los sistemas de defensa innatos, sino que también pueden ser el primer paso para la activación y regulación de la respuesta inmunitaria específica (Clem y col., 1985, 1991; Vallejo y col., 1992).

El proceso de fagocitosis se ha descrito en el apartado II.1.1.1., ya que es común a granulocitos acidófilos y macrófagos. Los macrófagos, además de ROIs, producen RNIs, como el óxido nítrico, que se generan cuando los macrófagos son activados por citoquinas, lipopolisacárido (LPS) o parásitos (Nathan, 1992). El óxido nítrico es sintetizado a partir de la oxidación de una arginina por la acción de la forma inducible de la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) (Hibbs y col., 1987; Iyengar y col., 1987). Tanto el óxido nítrico como otra serie de RNIs desempeñan un papel central en los mecanismos de defensa celular contra virus, bacterias, protozoos, helmintos y tumores (Nathan y Hibbs, 1991). Existen evidencias de que los macrófagos de peces son capaces de producir óxido nítrico *in vitro* cuando son activados apropiadamente (Neumann y col., 1995; Wang y col., 1995; Mulero y Meseguer, 1998) y éste parece ser tóxico para las bacterias patógenas de peces *Aeromonas salmonicida* y *Renibacterium*

salmoninarum (Campos-Pérez y col., 1996) y también parece que contribuye de forma significativa en la actividad bactericida de los macrófagos del pez gato norafricano (Yin y col., 1997). Finalmente, se ha clonado el ADN de la iNOS mediante RT-PCR (retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa) de macrófagos activados con LPS procedentes de trucha arcoiris (Hardie y col., 1994; Laing y col., 1999) y una secuencia parcial de este gen en el pez rojo (Laing y col., 1996). Recientemente, también ha sido clonado el gen completo de la iNOS de trucha arco iris (Wang y col., 2001).

La función general de los melanomacrófagos es la destrucción, detoxificación y reciclaje de materiales exógenos y endógenos. Las funciones concretas que se les atribuyen son la limpieza de materiales solubles y particulados, incluyendo microorganismos patógenos de la circulación (Mori, 1980; Herráez y Zapata, 1986; Tsujii, 1988), limpieza de los productos derivados de la degradación tisular (Agius y Roberts, 1981), acumulación de melanina (Agius, 1980), de hierro (Agius, 1981), de pigmentos lipocrómicos de naturaleza ceroides y lipofuscinicos o de microorganismos. También participan en el procesamiento de antígenos y es posible que sean elementos importantes en la producción de anticuerpos.

II.2.3.2. Presentación de antígeno

En peces, al igual que en el resto de vertebrados, se requiere de la presencia de células accesorias para iniciar las respuestas de los linfocitos (Clem y col., 1991; Vallejo y col., 1992). Vallejo y col. (1992) han demostrado que, en el pez gato, el procesamiento y la presentación de antígenos durante la respuesta inmunitaria son similares a mamíferos lo que sugiere que el sistema inmunitario de peces teleósteos está también equipado con células presentadoras de antígeno que endocitan antígenos proteicos exógenos y los presentan a los linfocitos T. En teleósteos, los linfocitos B, los monocitos-macrófagos, las células epiteliales y las células dendríticas son células presentadoras de antígeno (Vallejo y col., 1992; Koppang y col., 2003). Así mismo, se han identificado y caracterizado las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII) en diversas especies de teleósteos (Koppang y col., 2003; Cuesta y col., 2006), moléculas presentes únicamente en las células

presentadoras de antígeno. Los macrófagos pueden actuar como tales capturando y procesando antígenos y presentándolos en su superficie en asociación con moléculas de MHCII o secretando mediadores solubles implicados en la activación de linfocitos como la IL-1 (Vallejo y col., 1992; Ellsaesser y Clem, 1994).

II.2.3.3. Regulación de la respuesta inmunitaria

Una función muy importante de los macrófagos es la regulación de la respuesta inmunitaria mediante la producción de varias citoquinas, como las ILs, los interferones (IFNs), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y los prostanoïdes inflamatorios. La IL-1 es una familia de citoquinas que se compone de cuatro miembros principales: la IL-1 α , la IL-1 β , el antagonista del receptor de la IL-1 y la IL-18. La IL-1 β desempeña un papel crucial en la respuesta inflamatoria iniciando y/o aumentando la expresión de una amplia variedad de genes implicados en este proceso, particularmente otras citoquinas. También interviene en la respuesta frente a invasiones microbianas y en la reparación de daños tisulares. Además, la IL-1 β es un potente activador de la respuesta inmunitaria adaptativa (Nakae y col., 2001). La IL-1 β es producida por numerosos tipos celulares (Oppenheim y col., 1986) entre los que se incluyen los neutrófilos, las células NK, los linfocitos B, los linfocitos T y células del sistema nervioso central, pero las principales productoras son los monocitos y los macrófagos (Lepe-Zuniga y Gery, 1984; Dinarello y col., 1986; Dinarello, 1988; Arend y col., 1989).

II.3. Mastocitos o células cebadas

Los mastocitos o células cebadas han sido observados en todas las clases de vertebrados, incluyendo peces (Roberts y col., 1971; Chiarini-García y Ferreira, 1992; Noya y Lamas, 1996, 1997; Reite, 1996, 2005), anfibios (Chiu y Lagunoff, 1972), reptiles (Sottovia-Filho y Taga, 1973), aves (Selye, 1965) y mamíferos (Galli, 1990; Chiarini-García y Pereira, 1999).

II.3.1. Distribución tisular y propiedades tintoriales de los mastocitos

En varios trabajos se describe la presencia de numerosas células granulares en la submucosa intestinal, en la dermis y en las branquias de muchas familias de peces

teleósteos, como salmónidos (Vallejo y Ellis, 1989; Dorin y col., 1993), ciprínidos (Reite, 1965; Temkin y McMillan, 1986) y eritrínidos (Chiarini-García y Ferreira, 1992; Vicha y Schmale, 1994). Por el contrario, no se han encontrado mastocitos en los mismos tejidos de otras especies de peces (Reite, 2005) o bien aparecen en pequeño número (Buddington y Doroshov, 1986; Williams y Nickol, 1989). Dado que los gránulos citoplasmáticos son habitualmente eosinófilos cuando se utilizan fijadores acuosos, estas células se han denominado durante mucho tiempo células granulares eosinófilas (EGCs). Esta denominación fue introducida en 1971 por Roberts y col. para células de la epidermis de la solla europea que presentaban semejanzas morfológicas con los mastocitos, pero con gránulos teñidos de rojo con hematoxilina y eosina. Sin embargo, en algunas especies, cuando los tejidos son preservados con fijadores alcohólicos, los gránulos citoplasmáticos de estas mismas células muestran la típica tinción metacromática de las células cebadas después de teñirlas con tiónina alcohólica (Michels, 1923; Reite, 1969; Reite y Evensen, 1994) o después de teñirlas con azul de toluidina a bajo pH (Reite, 1996, 1997). Estas células pueden teñirse igualmente con azul de Alcian (Reite, 1996, 1997). Las dos últimas técnicas de tinción (Mayrhofer, 1980; Wingren y Enerbäck, 1983) son las recomendadas para la caracterización de los mastocitos de mamíferos (Enerbäck y col., 1986). Los gránulos de los mastocitos de la carpa, del pez rojo, del lucio, de la trucha común y de *Hoplias malabaricus* también se tiñen metacromáticamente con diferentes protocolos (Chiu y Lagunoff, 1972; Weiss, 1979; Temkin y McMillan, 1986; Chiarini-García y Ferreira, 1992).

II.3.2. Propiedades funcionales de los mastocitos

II.3.2.1. Contenido granular

Las sustancias activas presentes en los gránulos de los mastocitos de mamíferos se clasifican en dos tipos (Figura 1): (i) los mediadores primarios son aquellas sustancias almacenadas previamente en los gránulos y que son rápidamente liberadas tras la activación de los mastocitos y (ii) mediadores secundarios que son aquellos que son sintetizados *de novo* y liberados tras la activación (Eisen, 1980).

Entre los mediadores primarios se encuentran la histamina, la serotonina, la heparina, los factores quimiotácticos para eosinófilos (ECF) y neutrófilos (NCF), la

lisozima, las hidrolasas ácidas (β -glucuronidasa, arilsulfatasa, fosfatasa, etc.) y las proteasas neutras (triptasa y quimasa). Entre los mediadores secundarios se encuentran leucotrienos (denominados en conjunto como sustancia de reacción lenta de anafilaxia, SRS-A), prostaglandinas, el factor activador de plaquetas (PAF), kininas y citoquinas (Eisen, 1980).

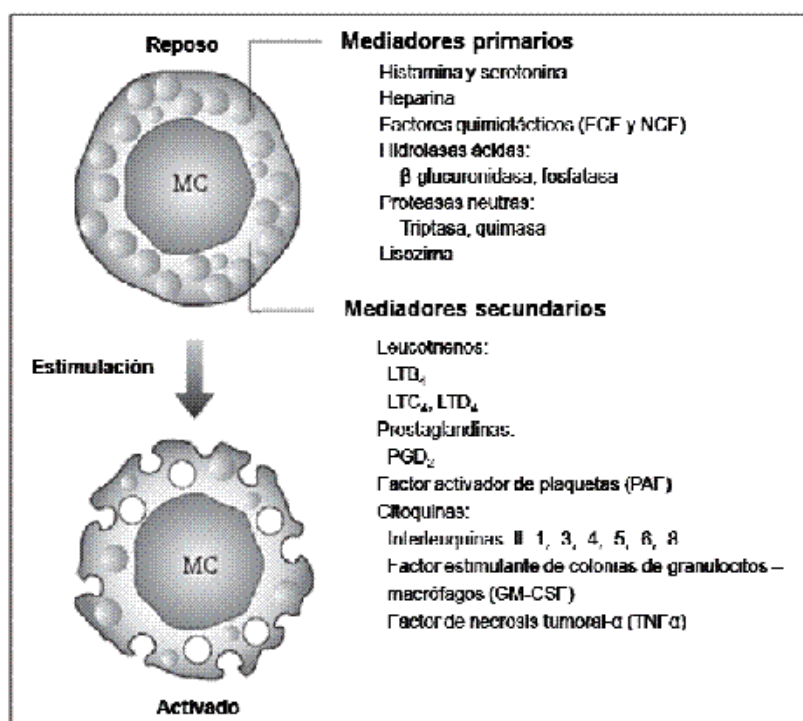


Figura 1. Mediadores primarios y secundarios de un mastocito.

Adaptado de Reeves y Todd, 2000.

En peces, los gránulos de los mastocitos presentan compuestos que también se encuentran en los mastocitos de mamíferos: fosfatasa ácida y alcalina, arilsulfatasa y 5' nucleotidasa (Ezeasor y Stokoe, 1980; Powell y col., 1992), lisozima (Sveinbjørnsson y col., 1996) y péptidos antimicrobianos denominados piscidinas (Silphaduang y Noga, 2001). Sin embargo, los trabajos realizados hasta ahora muestran que los mastocitos de peces y anfibios carecen de histamina.

II.3.2.1.1. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

Los AMPs actúan como primera línea de defensa frente a muchos patógenos. Los genes que determinan estos péptidos se expresan en numerosos tejidos y tipos

celulares de diferentes especies incluyendo mamíferos, anfibios, insectos y peces (Hancock y Chapple, 1999). La mayoría de los AMPs muestran un amplio espectro de acción microbicida, propiedades catiónicas y estructura secundaria anfipática (Lauth y col., 2002). En vertebrados, se han observado en células epiteliales (Hancock y Scott, 2000) o bien son sintetizados y secretados por granulocitos tisulares y circulantes, como leucocitos, neutrófilos y mastocitos (Hancock y Chapple, 1999; Levy, 2000; Silphaduang y Noga, 2001).

En peces teleósteos se han encontrado algunos AMPs. Así, en Salmoniformes se han aislado dos familias de estos péptidos en el salmón atlántico (Douglas y col., 2003) y también en la trucha arcoiris (Zhang y col., 2004). Del mismo modo, en Perciformes se han identificado tres familias de péptidos: moronecidina procedente de la lubina estriada y de *Morone chrysops* (Lauth y col., 2002), piscidina (similar a moronecidina) de un híbrido resultante del cruce entre *M. saxatilis* y *M. chrysops* (Silphaduang y Noga, 2001) y varios AMPs relacionados con hepcidina, procedentes de *M. chrysops* (Shike y col., 2002), del pargo japonés, *Acanthopagrus schlegelii* y *Lateolabrax japonicus* (Iijima y col., 2003). En Pleuronectiformes, se ha demostrado la existencia de AMPs denominados pleurocidinas en la solla roja (Cole y col., 2000; Douglas y col., 2001), en el fletán del Atlántico, en el mendo, en la limanda y en la platija americana (Patrzykat y col., 2003). Pleurocidina y piscidina tienen una marcada homología tanto a nivel genómico como peptídico (Douglas y col., 2001), lo que sugiere una relación evolutiva entre estos genes (Lauth y col., 2002). De hecho, Sun y col. (2007) sugieren que dada la similitud en la estructura génica entre moronecidinas y pleurocidinas, éstas podrían derivar de un mismo gen antecesor. Por tanto, sugieren que se utilice el término piscidina para denominar a estos dos tipos de AMPs. Piscidina y pleurocidina han sido localizados en células epiteliales, branquia e intestino, órganos considerados como portales muy importantes de entrada de patógenos (Ellis, 2001), dónde podrían actuar como una barrera previniendo la invasión microbiana (Cole y col., 1997, 2000; Murray y col., 2003; Silphaduang y col., 2006). Recientemente, se ha demostrado que la acción microbicida de la piscidina se debe a que es una molécula capaz de permeabilizar la membrana bacteriana (Campagna y col., 2007).

II.3.2.1.2. Aminas biógenas: histamina y serotonina

Los gránulos de los mastocitos de mamíferos presentan entre sus mediadores primarios, serotonina e histamina.

La histamina (2-4-imidazoletilamina) (Figura 2) se forma por descarboxilación de L-histidina y se encuentra en los gránulos de mastocitos y basófilos. Cuando es liberada, produce contracción del músculo liso e incremento de la permeabilidad vascular. Estos efectos de la histamina, que requieren concentraciones relativamente bajas de esta molécula, se producen cuando se une al receptor H_1 y son obviamente proinflamatorios. Estos efectos son bloqueados por pirilamina y clorfeniramina, antagonistas del receptor H_1 (Parker, 1984).

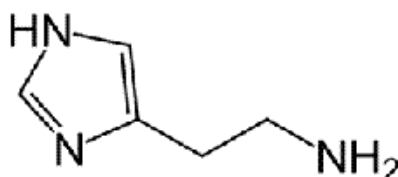


Figura 2. Fórmula química de la histamina.

El receptor H_1 se une a la cadena etilamina de la molécula de histamina y el incremento de la permeabilidad vascular se produce debido a la dilatación de arteriolas terminales y contracción de vénulas postcapilares. Por el contrario, otros efectos de la histamina, como son la estimulación de la producción de ácido gástrico en el estómago, efectos ionotrópicos y cronotrópicos en el corazón y varios efectos sobre leucocitos, están mediados por el receptor H_2 y son bloqueados por los antagonistas cimetidina, metiamida y ranitidina. El receptor H_2 se une a los nitrógenos del grupo imidazol y a otros componentes del anillo pentagonal. Además, la histamina es capaz de actuar sobre la función y migración leucocitaria (Parker, 1984). Por ejemplo, la histamina es capaz de inhibir la proliferación de células T inducida por lectinas o antígeno, la liberación de citoquinas por células T, la inducción de células T citotóxicas, la citólisis por células T citotóxicas maduras, la diferenciación de células B y la liberación de enzimas lisosomales por neutrófilos. Existen, además, otros dos receptores para histamina, los receptores H_3 y H_4 (Arrang y col., 1982; Hough, 2001; Nguyen y col., 2001). El receptor H_3 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central donde regula la propia producción de histamina como neurotransmisor. El receptor H_4 se encuentra aún

en fase de estudio, pero presumiblemente participa en procesos inflamatorios como la alergia y el asma (Liu y col., 2001; Nakamura y col., 2000; Ling y col., 2004). Todos estos efectos sobre los leucocitos pueden ser englobados como efectos antiinflamatorios. Por tanto, teniendo en cuenta todas estas observaciones, la histamina parece que inicialmente activa la respuesta inmunitaria y posteriormente la inhibe (Parker, 1984).

En la década de los 60 se llevaron a cabo los primeros estudios para determinar la presencia de histamina en mastocitos de vertebrados inferiores utilizando métodos espectrofluorométricos (Shore y col., 1959). Los trabajos de Reite (1965) y Takada y col. (1967) muestran que los mastocitos de peces y anfibios carecen de histamina aunque la presencia de esta sustancia, como molécula reguladora de la secreción de ácido gástrico, está generalizada en todos los vertebrados (Reite, 1969). Además, numerosos estudios farmacológicos y fisiológicos mostraron que la mayoría de peces y anfibios eran incapaces de responder a histamina cuando ésta era inyectada intravascularmente (Reite, 1972). De hecho, desde el punto de vista evolutivo se ha postulado que el almacenamiento de histamina en mastocitos y sus potentes acciones sobre el músculo liso han evolucionado juntos en al menos dos ocasiones: en los antecesores inmediatos de los peces pulmonados (orden Dipnoi) y en los antecesores inmediatos de los reptiles primitivos (Reite, 1972). Además, dos observaciones apoyan esta hipótesis: (1) la histamina es almacenada en mastocitos en todos los descendientes de los reptiles primitivos, pero está ausente en peces y anfibios (Reite, 1965; Takada y col., 1967) y (2) muchos experimentos fisiológicos han demostrado que los peces, excluyendo a los peces pulmonados, son incapaces de responder a una inyección intravascular de histamina (Reite, 1972). Hasta ahora, se conoce muy poco sobre los receptores de histamina en peces. Así, en tilapia se ha localizado el receptor H_1 *in vivo* e *in vitro* mediante autorradiografía (Choich y col., 2004) y en el pez rojo se ha demostrado que los antagonistas zolantidina y clorferinamina tienen efectos sobre el aprendizaje que conlleva a evitar estímulos adversos, sugiriendo una presencia potencial de los receptores H_1 y H_2 en peces (Coffiel y Mattioli, 2006). Sin embargo, hasta la publicación en 2007 del trabajo de Pieitsaro y col. no se tenía conocimiento de la identidad molecular de estos receptores en peces. En este trabajo se han identificado y caracterizado los receptores H_1 , H_2 y H_3 en el pez cebra, así como los efectos de sus

ligandos sobre el comportamiento natatorio de dicho pez. El gen que determina el receptor H_1 se expresa en cerebro, intestino, hígado y bazo, el gen que determina el receptor H_2 en cerebro, branquia, corazón y bazo y el que determina el receptor H_3 en cerebro, corazón, bazo, hígado, branquia y ojo.

La serotonina (5-hidroxitriptamina) se forma por hidroxilación y descarboxilación de L-triptófano. Cuando se libera, produce un incremento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso (Eisen, 1980; Parker, 1984). Su distribución y actividad difiere entre especies. Así en ratón, se almacena fundamentalmente en los gránulos de mastocitos y basófilos mientras que en humanos se almacena principalmente en plaquetas, donde es más abundante que en mastocitos. Además, estas especies difieren enormemente en su sensibilidad a serotonina: ratones y ratas son extremadamente sensibles mientras que los humanos lo son muy poco (Einsen, 1980). En peces, la presencia de serotonina en mastocitos sólo ha sido confirmada en la trucha común (Dezfuli y col., 2000).

II.3.2.2. Activación y reclutamiento al foco de infección

La activación “clásica” de los mastocitos de mamíferos se produce por entrecruzamiento de moléculas de inmunoglobulina E (IgE) unidas a receptores de alta afinidad ($Fc\epsilon RI$) cuando éstas interactúan con un antígeno multivalente (Galli y col., 2005). Sin embargo, los mastocitos también pueden ser activados, liberando los mismos mediadores, después de la agregación de receptores de baja afinidad ($Fc\gamma RIII$) causada por complejos formados por IgG y antígeno y después de la exposición a pequeños péptidos, incluyendo quimioquinas, las anafilotoxinas C3a y C5a, y fragmentos de fibrinógeno y fibronectina (Mekory y Metcalfe, 2000; Galli y col., 2005) (Figura 3).

En cualquier caso, una serie de eventos complejos tienen lugar posteriormente: (i) se activan varias enzimas de membrana, (ii) iones de calcio entran en la célula y (iii) los mediadores primarios de los gránulos son liberados por exocitosis. Así mismo, se forman mediadores secundarios, entre los cuales se encuentran los leucotrienos y prostaglandinas que se sintetizan a partir del ácido araquidónico. La primera etapa comprende, por una parte la activación de una serínesterasa seguida de la activación de

metiltransferasas que actúan sobre lípidos de membrana y, por otra, la activación de una adenilatociclasa que produce un aumento de AMPc que activa a proteínaquinasas (Reeves y Todd, 2000).

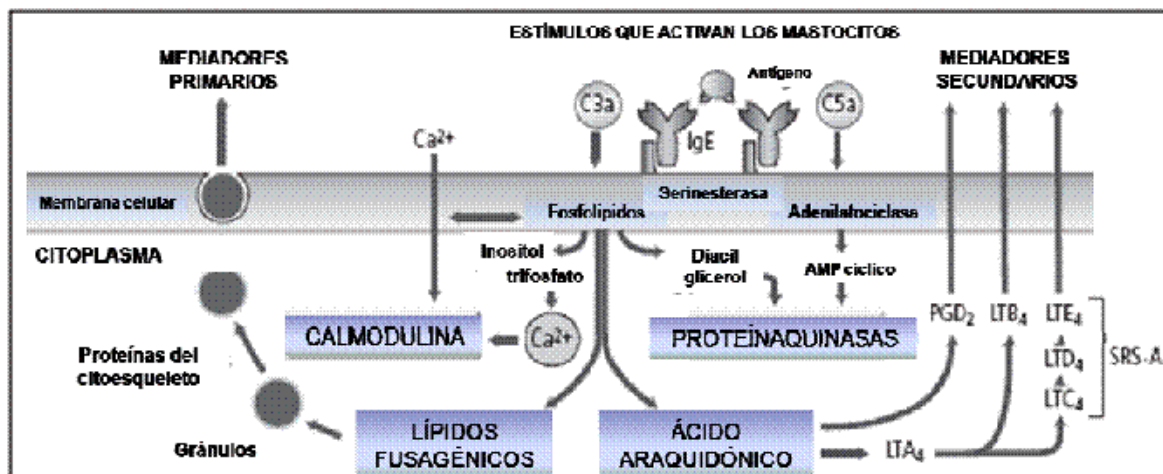


Figura 3. Procesos que intervienen en la activación de los mastocitos de mamíferos y en la liberación de sus mediadores inflamatorios. LT: leucotrieno, PG: prostaglandina, SRS-A: sustancia de reacción lenta de anafilaxia. Adaptado de Reeves y Todd, 2000.

La metilación de fosfolípidos y la actuación de las fosfolipasas conducen también a la activación de proteínquinasas (a través de la generación de diacilglicerol) lo que está relacionado con tres eventos importantes: (i) apertura de canales de calcio presentes en la membrana plasmática y liberación de calcio intracelular, (ii) producción de lípidos fusagénicos que fomentan la fusión de las membranas perigranulares y plasmática y (iii) producción de ácido araquidónico a partir del cual se sintetizan leucotrienos y prostaglandinas. La activación de la adenilato ciclasa es crítica para la liberación de los mediadores inflamatorios. Una vez que el calcio entra en la célula, se une a calmodulina, que incrementa la actividad de varios enzimas y promueve los procesos en los que las proteínas del citoesqueleto producen la contracción de microfilamentos, lo que conduce a la extrusión de los gránulos y de su contenido (Reeves y Todd, 2000).

Finalmente, estos mediadores inflamatorios inician una respuesta inflamatoria local. Esta respuesta se desarrolla en dos etapas: (i) una primera fase caracterizada por contracción del músculo liso, un aumento local de flujo sanguíneo y de la permeabilidad

vascular que rápidamente conducen a la acumulación de fluido y moléculas de anticuerpo en el tejido circundante y (ii) una segunda fase caracterizada por un reclutamiento de macrófagos, eosinófilos y linfocitos efectores (Abbas y Lichtman, 2005). Recientemente, se ha demostrado que la agregación heterotípica con linfocitos T activados (Inamura y col., 1998) y el reconocimiento directo de mediadores solubles derivados de agentes infecciosos, como el LPS, pueden inducir la activación de mastocitos y la liberación de estos mediadores (Nigo y col., 2006).

Los peces carecen de IgE por lo que los mastocitos no pueden activarse por la vía “clásica”. Sin embargo, todas las vías “alternativas” pueden producir la activación de los mastocitos de peces, dado que los receptores para IgM (Stafford y col., 2006), las anafilotoxinas (Boshra y col., 2005) y los mediadores solubles derivados de agentes patógenos (Sepulcre y col., 2007) son funcionales (Figura 4).

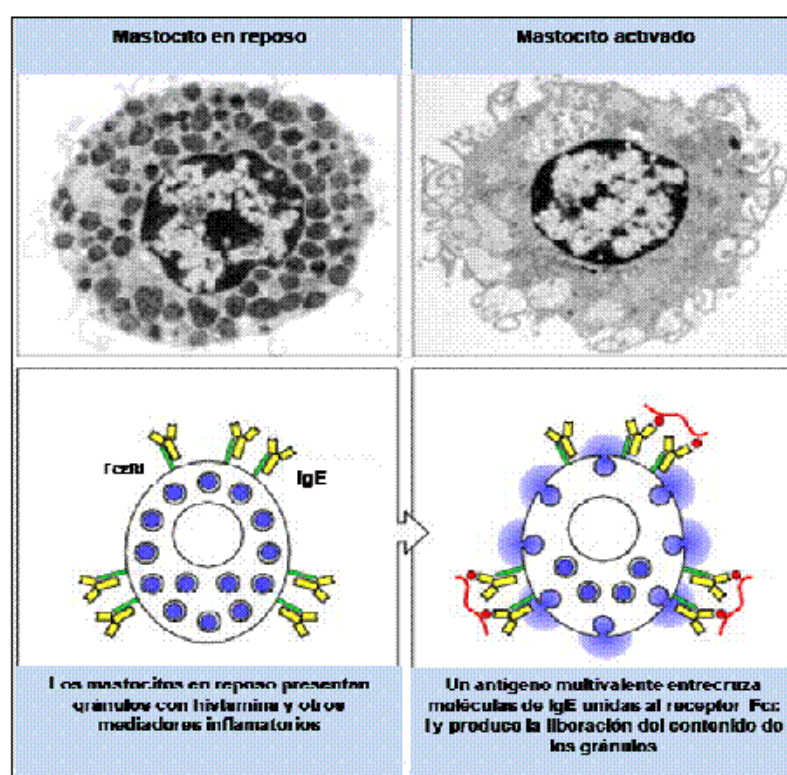


Figura 4. Vía “clásica” de activación del mastocito. Adaptado de Janeway y col., 2005.

La inyección intraperitoneal de *A. salmonicida* inactivada en el salmón atlántico (Reite y Evensen, 1994) y en la trucha común (Reite, 1997) provoca la degranulación de

los mastocitos y esta respuesta va seguida de una reacción inflamatoria con vasodilatación. El compuesto 48/80, un agente capaz de producir la degranulación de los mastocitos de mamíferos y la liberación de histamina, también afecta a los mastocitos de peces (Vallejo y Ellis, 1989). Desde el punto de vista morfológico, la degranulación de mastocitos de teleósteos en respuesta a estímulos agudos es similar a la de mastocitos de mamíferos (Bloom, 1974). Además, la perfusión en el lecho vascular branquial del compuesto 48/80 aumenta la presión sanguínea lo que sugiere que la degranulación de los mastocitos va acompañada de la liberación de sustancias que promueven respuestas vasomotoras (Reite, 1997).

Los corticosteroides pueden afectar a mastocitos de las mucosas de mamíferos (King y col., 1985). En peces se ha demostrado que la hidrocortisona tiene un efecto pronunciado en los mastocitos de la vejiga natatoria de la trucha común, induciendo degranulación (Reite, 1997). La degranulación de los mastocitos va seguida de extravasación de numerosos neutrófilos en pequeños vasos sanguíneos lo que sugiere que se liberan factores quimioatrayentes de leucocitos cuando se produce la degranulación de los mastocitos. Por tanto, estas observaciones, junto con los efectos vasomotores inducidos por el compuesto 48/80, sugieren que la activación de los mastocitos de teleósteos puede dar lugar a la producción o liberación de mediadores de la inflamación.

El reclutamiento de los mastocitos en mamíferos a los focos de inflamación persistentes, es bien conocido. Los precursores de los mastocitos abandonan la médula ósea y a través de la circulación sanguínea llegan a los tejidos en los que tienen lugar las últimas etapas de maduración (Galli, 1990; Kirshenbaum y col., 1991). En teleósteos, algunos estudios han demostrado que las etapas finales de maduración de los mastocitos también tienen lugar en los tejidos (Bergeron y Woodward, 1982, 1983). Así, cuando cultivos de branquia de trucha son infectados experimentalmente con *R. salmoninarum* se produce un aumento en el número de mastocitos. Esta observación indica que precursores no granulares residentes en el tejido pueden dar lugar a mastocitos en presencia de los factores adecuados (Flaño y col., 1996). Además, si se añade LPS y TNF α al medio de cultivo, aumenta el número de mastocitos en los explantes de branquia (Holland y col., 1998). Sin embargo, al igual que ocurre en los mastocitos de

mamíferos (Bloom, 1974), los mastocitos de peces no se dividen (Flaño y col., 1967; Reite, 1998).

En ejemplares de trucha común infectados por cestodos se ha observado una acumulación de mastocitos en el lugar donde se localizan los plerocercoides (Gonzales y col., 1978; Sharp y col., 1989) y un aumento en su abundancia en el intestino y dermis de salmónidos infectados con acantocéfalos y ectoparásitos, respectivamente (Bullock, 1963; Blackstock y Pickering, 1980). Igualmente, el reclutamiento de numerosos mastocitos en el foco de infección también se ha observado en otras especies de peces infectados con helmintos como en catostómidos (Chaicharn y Bullock, 1962; Lester y Daniels, 1972), ciprínidos (Cross y Matthews, 1993; Reite, 2005) y lábridos (Reimschuessel, 1987; Reite, 2005). En el epitelio intestinal de trígidos (Duthie, 1939), gambusino (Bullock, 1967), salmónidos (Reite, 1997) y lábridos (Reite, 2005), los mastocitos migran desde el tejido conectivo subyacente hasta la capa epitelial. Por tanto, el reclutamiento de los mastocitos a los focos de inflamación persistente parece ser una respuesta general en teleósteos.

Por tanto, todos los estudios realizados hasta ahora demuestran que los mastocitos de peces constituyen una población celular heterogénea con una morfología, un contenido granular, una sensibilidad a fijadores y una respuesta a diferentes fármacos muy variables (Reite, 1998; Reite y Evensen, 2006), por lo que su estudio en cada especie, en particular, es necesario para el conocimiento de las funciones que pueden desempeñar en dicha especie.

III. ONTOGENIA DEL SISTEMA INMUNITARIO DE PECES TELEÓSTEOS

Para el estudio de la ontogenia de los órganos linfomioides de teleósteos, hasta el momento actual, se han realizado mayoritariamente estudios morfológicos (Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; O'Neill, 1989; Chantanachookhin y col., 1991; Nakanishi, 1991; Jósefsson y Tatner, 1993; Quesada y col., 1994; Padrós y Crespo, 1996; Liu y col., 2004) y sólo, en algunos de ellos, se han utilizado anticuerpos específicos contra algunos de los tipos celulares que los forman.

Además, es importante tener en cuenta que en algunos de los estudios realizados se han empleado embriones, larvas y juveniles, mientras que en otros solamente larvas, y que, en cada caso, el rango de edades de los ejemplares con los que se trabajó fue variable. El que la presencia de un tipo celular o un órgano en una especie sólo se haya visto en individuos a partir de una determinada edad no indica necesariamente, que no esté en individuos de edades algo menores, pues en muchos casos no ha sido comprobado.

Otro hecho importante a tener en cuenta en el estudio ontogénico de los órganos linfomiélicos es que no se puede considerar el momento de la eclosión como un evento exacto en la ontogenia. Se encuentran grandes diferencias en la velocidad del desarrollo y en la duración del periodo embrionario; así, las expresiones “días antes de la eclosión” y “días después de la eclosión” (dde) tienen un significado distinto de unas especies a otras, lo que da lugar a que las comparaciones sean complejas (Balon, 1981). También son importantes algunas características como el tipo de reproducción, el tamaño de los huevos, la edad a la que las larvas comienzan su alimentación o la duración de su ciclo vital. Por otra parte, el desarrollo larvario de peces está fuertemente afectado por las condiciones del medio como la temperatura, salinidad y fotoperiodo.

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de organismos vivíparos y ovíparos, los huevos de peces eclosionan en fases muy tempranas del desarrollo, por lo que las larvas quedan expuestas a los microorganismos. El comienzo de la exotrofia (apertura de la boca y ano) que en la dorada tiene lugar a los 2 dde, es importante porque puede facilitar la entrada de microorganismos patógenos. De igual forma las escamas, una barrera importante a la entrada de patógenos, no están presentes durante los primeros días del desarrollo, apareciendo a los 70 dde en la dorada (Tabla 1).

Edad (dde)	Longitud (mm)	Observaciones
0	3	Eclosión
1	3,5	Aletas pectorales
2-3	3,8	Empieza la exotrofia (apertura de la boca y ano) Pigmentación del ojo
4	4	La vejiga natatoria empieza a inflarse
14	5	La vejiga natatoria termina de inflarse
16	7	Aleta anal
19	7,5	Se desarrolla el estómago
45	11	Aleta dorsal posterior
50	15	Aleta dorsal anterior y aletas ventrales
60-70	20	Escamas
90	30	Morfología definitiva

Tabla 1. Principales acontecimientos que ocurren durante el desarrollo de la dorada. Adaptado de Moretti y col., 1999.

La defensa inmunitaria de los peces jóvenes parece limitada durante las primeras etapas de vida, y aunque algunos estudios indican que los anticuerpos maternos pueden ser transferidos a través del saco vitelino (Bly, 1986; Mor y Avtalion, 1990), parece que los ejemplares jóvenes dependen fundamentalmente de sus mecanismos de defensa innatos. Los estudios realizados sobre la ontogenia de la inmunocompetencia en peces muestran que el pez es inmunocompetente algún tiempo después de que los órganos linfomieloides se vuelvan linfoides por primera vez (Sailendri, 1973; Ellis, 1977; Botham y col., 1980; Tatner y Manning, 1983; Nakanishi, 1986). Botham y Manning (1981) y Tatner y Manning (1983) demuestran que existe una correlación entre la maduración del timo, la diferenciación de los linfocitos en el riñón y la presencia de pequeños linfocitos en la sangre con el desarrollo de la reactividad aloinmune. De igual forma, recientemente, se ha demostrado que la vacunación contra *P. damselae* subsp. *piscicida* en larvas de dorada de 89 dde produce un retraso y un descenso en la mortalidad causada por este patógeno (Hanif y col., 2005). La vacunación en etapas tempranas tiene ventajas económicas, tales como la reducción de la mortalidad en larvas

y juveniles, la utilización de dosis menores de vacuna y su aplicación directa mediante baño debido a la ausencia de escamas. Sin embargo, la vacunación de peces demasiado jóvenes puede producir tolerancia si el sistema inmunitario no ha madurado completamente (Jóseffson y Tatner, 1993; Petrie-Hanson y Ainsworth, 2001). Por tanto, es necesario estimar la ruta y la edad correctas de vacunación para las diferentes especies de peces, ya que éstas muestran un desarrollo del sistema inmunitario bastante diferente.

III.1. Órganos

Los trabajos realizados hasta el momento sobre la ontogenia de los órganos del sistema inmunitario de peces teleósteos son escasos y en ellos, mayoritariamente, se han utilizado técnicas de microscopía (óptica y electrónica de transmisión), por lo que sólo se ha determinado el momento de su aparición y su morfología. Teniendo en cuenta que el modelo de desarrollo larvario y la duración del periodo embrionario puede variar considerablemente de unas especies a otras, las características morfológicas de las larvas jóvenes y el ritmo de desarrollo de los órganos del sistema inmunitario difieren considerablemente. En general, la secuencia de aparición de los órganos linfoides de peces marinos es la siguiente: riñón, bazo y timo (Chantanachookhin y col., 1991; Jóseffson y Tatner, 1993; Padrós y Crespo, 1996; Schroder y col., 1998; Liu y col., 2004) (Tabla 2). Sin embargo, en peces de agua dulce como la trucha arcoiris, el salmón atlántico y la carpa, aunque el riñón es el primer órgano linfomieloide que se desarrolla, el timo aparece antes que el bazo (Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981). Así mismo, los órganos linfoides de los peces marinos *Harpagifer antarcticus* (O'Neill, 1989), seriola, pargo japonés, falso halibut del Japón (Chantanachookhin y col., 1991) y rodaballo (Padrós y Crespo, 1996) no se observan hasta después de la eclosión mientras que en los peces de agua dulce, trucha arco iris y salmón atlántico, el riñón cefálico y el timo aparecen antes del momento de la eclosión del huevo (Ellis, 1977; Razquin y col., 1990). Por tanto, sería necesario el estudio de los órganos linfomieloideos en cada especie, en particular, para poder establecer un protocolo adecuado de inmunización que tuviera en cuenta el desarrollo del sistema inmunitario.

	Falso halibut del Japón	Bacalao	Rodaballo	Dorada	Lubina	Carpa	Pez cebra
R.C. (tejido hematopoyético)	0 dde	5 dde	0 dde	5 dde	10 dde	2 dde	96 hdf
Bazo	8 dde	5 dde	10 dde	12 dde	18 dde	2 dde	S.D.
Timo	15 dde	28 dde	20-30 dde	29 dde	21 dde	2 dde	54 hdf

Tabla 2. Momento de aparición de los órganos linfomieloides en varias especies de teleósteos. hdf: horas después de la fertilización, dde: días después de la eclosión, R.C.: riñón cefálico, S.D.: sin determinar.

III.1.1. Riñón

El tejido hematopoyético está presente a las 96 horas después de la fecundación (hdf) en el pez cebra, en el momento de la eclosión en el falso halibut del Japón y en el rodaballo mientras que su aparición es posterior en la carpa (2 dde), el bacalao y la dorada (5 dde) y la lubina (10 dde) (Jósefsson y Tatner, 1993; Abelli y col., 1996; Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998; Willett y col., 1999; Liu y col., 2004; Huttenhuis, 2005). Este tejido hematopoyético aparece constituido, fundamentalmente, por grupos de células eritropoyéticas dispersas entre los túbulos renales en larvas de bacalao de 5 dde (Shroder y col., 1998). La masa de tejido hematopoyético incrementa rápidamente conforme el pez crece, especialmente en la parte anterior del riñón. Con la edad, también se observa un incremento de los vasos sanguíneos (Jósefsson y Tatner, 1993; Abelli y col., 1996; Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998; Liu y col., 2004; Huttenhuis, 2005). Los componentes hematopoyético y linfoide se entremezclan sin una regionalización evidente en los primeros estadios de desarrollo en la lubina, la cual se hace evidente en juveniles de 8,5 meses de edad, cuando las áreas linfoides cerca de los centros de melanomacrófagos se organizan alrededor de los vasos sanguíneos del riñón cefálico y se distinguen claramente del tejido mieloide (Abelli y col., 1996).

III.1.2. Bazo

El bazo es identificado por vez primera a los 2 dde en la carpa, pero en el resto de las especies estudiadas su aparición es posterior: 5 dde en el bacalao, 8 dde en el falso halibut del Japón, 10 dde en el rodaballo, 12 dde en la dorada y 18 dde en la lubina

(Jósefsson y Tatner, 1993; Quesada y col., 1994; Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998; Liu y col., 2004; Huttenhuis, 2005). En estas etapas tempranas del desarrollo, aparece constituido por células indiferenciadas y capilares sanguíneos y se localiza en las inmediaciones del tejido pancreático (Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998). A lo largo del desarrollo, el bazo incrementa rápidamente su tamaño y adquiere una forma redondeada (Jósefsson y Tatner, 1993; Quesada y col., 1994; Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998; Liu y col., 2004). Conforme aumenta la edad, el bazo se vuelve rápidamente celular y la cápsula conjuntiva que lo rodea se engruesa (Jósefsson y Tatner, 1993) y el estroma fibrilar incrementa (Jósefsson y Tatner, 1993; Quesada y col., 1994; Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998; Liu y col., 2004). La distinción entre pulpa roja y blanca que se observa en los ejemplares adultos de dorada y lubina, no se observa en larvas de 77 días de dorada (Jósefsson y Tatner, 1993) y es evidente en juveniles de 10 meses de lubina (Quesada y col., 1994).

III.1.3. Timo

El timo se observa por primera vez a las 54 hdf en el pez cebra y a los 2 dde en la carpa (Willett y col., 1997; Romano y col., 1999; Huttenhuis, 2005). Sin embargo, en algunas especies marinas la aparición del timo es posterior: 15 dde en el falso halibut del Japón, 21 dde en la lubina, 28 dde en el bacalao, 20-30 dde en el rodaballo, 29 dde en la dorada (Jósefsson y Tatner, 1993; Abelli y col., 1996; Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998; Liu y col., 2004). Está localizado en la zona dorso-posterior de la cavidad branquial y separado de ella por un epitelio delgado. El timo aparece muy cerca del riñón cefálico en la dorada y el falso halibut del Japón y se han observado células “puente” entre ellos (Jósefsson y Tatner, 1993; Shroder y col., 1998) que en el rodaballo tienen características de células indiferenciadas y migran desde la parte anterior del riñón hasta el timo a través del septo faríngeo (Padrós y Crespo, 1996). Tanto el tamaño como el número de células que forman el timo aumentan con la edad y se distinguen dos regiones, la médula con una densidad celular baja y la corteza con mayor densidad celular, a los 27 dde en la lubina, entre 30 y 70 dde en el rodaballo, a los 65 dde en la dorada y a las 4 semanas después de la fecundación (sdf) en la carpa (Jósefsson y Tatner, 1993; Abelli y col., 1996; Padrós y Crespo, 1996; Shroder y col., 1998; Romano

y col., 1999). La vascularización del timo se observa por primera vez a los 70 días en la dorada (Jósefsson y Tatner, 1993).

III.2. Tipos celulares

Los tipos celulares presentes en los órganos linfomieloides durante su ontogenia han sido poco estudiados. En la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han utilizado exclusivamente técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión, debido, en parte, a la ausencia de marcadores apropiados que permitan su caracterización definitiva. Por ello, el momento del desarrollo en el que aparecen los distintos tipos celulares es variable para las diferentes especies de teleósteos según las observaciones realizadas y, por otra parte, no está del todo claro cuales son estos tipos celulares (Tabla 3). Además, al igual que ocurre con los órganos linfomieloides, también existen diferencias entre especies de agua dulce y de agua salada. Así, el timo y el riñón son completamente linfoides en el momento de la eclosión en trucha arco iris y en salmón atlántico, mientras que no se observan linfocitos hasta después de la eclosión en peces marinos (Ellis, 1977; O'Neill, 1989; Razquin y col., 1990; Chantanachookhin y col., 1991; Padrós y Crespo, 1996). En todas las especies marinas estudiadas se observan linfocitos pequeños primero en el timo y después en el riñón y bazo (Schroder y col., 1998). La estructura de los órganos linfomieloides, así como la presencia de linfocitos dentro de ellos, no se correlacionan con su actividad funcional o madurez, de forma que aunque se observan linfocitos morfológicamente maduros en una edad temprana, el pez puede no ser inmunocompetente hasta una edad más avanzada (Tatner, 1996).

III.2.1. Eritrocitos

Los eritrocitos aparecen en el bazo de larvas de 18 dde en el falso halibut del Japón (Liu y col., 2004), mientras que se observan proeritrocitos en el riñón de larvas de 5 a 10 dde en el rodaballo (Padrós y Crespo, 1996) los cuales tienen una forma esférica u ovalada, cromatina nuclear condensada y numerosos ribosomas libres en el citoplasma. En el rodaballo, los eritrocitos aparecen por primera vez en el bazo en larvas de 10 a 20 dde (Padrós y Crespo, 1996).

		Macrófagos	Granulocitos	Linfocitos		
				B	T	S.D.
Falso halibut del Japón	R.C.:	3 meses de edad (melanomacrófagos)	-	-	-	-
	Bazo:	-	-	-	-	-
	Timo:	-	-	-	-	-
Bacalao	R.C.:	-	-	58 dde	-	-
	Bazo:	-	-	-	-	51 dde
	Timo:	-	-	-	-	28 dde
Rodaballo	R.C.:	-	20-30 dde	-	-	20-30 dde
	Bazo:	10-20 dde	20-30 dde	-	-	30-70 dde
	Timo:	20-30 dde	-	-	-	20-30 dde
Dorada	R.C.:	-	-	-	-	54 dde
	Bazo:	-	-	-	-	54 dde
	Timo:	-	-	-	-	29 dde
Lubina	R.C.:	-	-	87 dde	-	-
	Bazo:	-	-	87 dde	-	-
	Timo:	-	-	-	5-12 dde	-
Carpa	R.C.:	2 ddf	-	2 sde	-	-
	Bazo:	4 ddf	-	2 sde	-	-
	Timo:	7 ddf	-	-	4 ddf	-
Pez cebra	R.C.:	-	-	3 sde	3 sde	-
	Timo:	-	-	3 sde	4 ddf	-
	Saco vitelino:	25 hdf	-	-	-	-
	Vasos:	-	48 hdf (h) 5 ddf (e)	-	-	-

Tabla 3. Momento de aparición de los macrófagos, granulocitos y linfocitos en diversas especies de teleósteos. h: granulocitos heterófilos, e: granulocitos eosinófilos, dde: días después de la eclosión, ddf: días después de la fecundación, hdf: horas después de la fecundación, sde: semanas después de la eclosión, R.C.: riñón cefálico, S.D.: linfocitos B o T.

III.2.2. Macrófagos

Los macrófagos se originan del mesodermo ventrolateral situado en la región anterior a la zona cardiaca en peces cebra de 25 hdf, mientras que en la carpa se observan a los 2 días después de la fecundación (ddf) en el riñón, a los 4 ddf en el bazo y a los 7 ddf en el timo y en el rodaballo entre los 10 y los 20 dde en el bazo y en el riñón y más tarde en el timo (Padrós y Crespo, 1996; Romano y col., 1998; Herbolmel y col., 1999).

En un estudio sobre la ontogenia de los macrófagos realizado en la carpa se demuestra que a los 7 ddf aumenta su número en el riñón y a la 4ª sdf se estabiliza y alcanza los valores del adulto (Romano y col., 1998). En el timo, a la 3ª sdf, se observan numerosos macrófagos, aislados o en pequeños grupos de 2-3 células. Entre la semana 4 y 16 después de la fecundación, un número elevado de macrófagos, con un diámetro considerable, aparece en la zona de transición corteza-médula que desciende en la semana 20 después de la fecundación. En el bazo, a la 2ª sdf, se observan abundantes macrófagos entre células linfoides que se localizan cerca de los capilares esplénicos entre la 3ª y la 6ª semana. Desde la 6ª sdf, el número de macrófagos desciende ligeramente y permanece constante a partir de la 18ª sdf. El tamaño de los macrófagos varía entre los diferentes tejidos e incrementa durante la ontogenia. Además, mediante inmunocitoquímica para microscopía electrónica, se demuestran diferencias morfológicas entre los macrófagos del timo, riñón cefálico e intestino medio en juveniles. Así, se sugiere la existencia de una población heterogénea de macrófagos, pero aún no se sabe si esas diferencias se correlacionan con diferentes funciones. La presencia estable y temprana de los macrófagos en los órganos linfomieloides (principalmente en riñón y timo) sugiere la idea de que los macrófagos de carpa pueden jugar un papel importante en la maduración del sistema inmunitario del pez.

Se observan centros de melanomacrófagos en el riñón a partir de los 3 meses de edad en el falso halibut del Japón (Liu y col., 2004) mientras que no se observan en las larvas de mayor edad estudiadas, 70 y 77 días, en rodaballo y dorada, respectivamente (Jósefsson y Tatner, 1993; Padrós y Crespo, 1996).

En el pez cebra mediante microscopía e hibridación *in situ*, usando dos genes marcadores hematopoyéticos, *draculin* y *plastina específica de leucocitos (L-plastina)*, se demuestra que los macrófagos aparecen en el embrión por lo menos en una etapa tan temprana como los eritrocitos (25 hdf), pero se originan del mesodermo ventrolateral situado en la región anterior a la zona cardíaca. Esos macrófagos precursores migran hacia el saco vitelino y se diferencian. Desde el saco vitelino, muchos invaden el mesénquima de la cabeza, mientras que otros pasan a la circulación (Herbomel y col., 1999). Los macrófagos son funcionales a los 2 ddf ya que son capaces de acumular en su citoplasma carbón microinyectado a los embriones y de eliminarlo de la circulación

(Lieschke col., 2001). Además, los macrófagos embrionarios pueden erradicar infecciones bacterianas (Herbomel y col., 1999) y eliminar cuerpos apoptóticos (Willett y col., 1999). Los macrófagos de riñón y bazo adultos presentan de forma habitual fagosomas grandes que contienen un material de una densidad y apariencia similar al del citoplasma de los eritrocitos, lo que sugiere que la hemofagocitosis no es inusual en peces cebra adultos normales (Lieschke col., 2001).

III.2.3. Granulocitos

Los granulocitos sólo han sido estudiados en el rodaballo y en el pez cebra. En el rodaballo, aparecen en el riñón y en el bazo en larvas de 20 a 30 dde y aumentan en número en larvas de 30 a 70 dde (Padrós y Crespo, 1996).

En el pez cebra se observan células con características de granulocitos heterófilos por primera vez en embriones de 48 hdf, tanto en tejidos como en vasos sanguíneos (Lieschke y col., 2001). La fuerte actividad peroxidasa que muestran los heterófilos aparece a las 33 hdf, particularmente en la superficie del saco vitelino y en la región de la vena ventral. A las 48 hdf, las células positivas para peroxidasa son más evidentes en el plexo venoso ventral, pero son escasas en el resto del embrión. Los estudios en embriones a los que se les corta la cola demuestran que las células positivas para peroxidasa se movilizan y se localizan en el lugar de la inflamación, indicando que esos granulocitos embrionarios son ya funcionales (Lieschke y col., 2001). No se observan células con gránulos típicos de granulocitos eosinófilos en embriones de hasta 5 ddf (Lieschke y col., 2001). El pez cebra adulto presenta dos tipos de granulocitos circulantes. El tipo más abundante tiene un citoplasma pálido y un núcleo multilobulado y segmentado, típico de un granulocito heterófilo de otros ciprínidos (Bielek, 1981; Rowley y col., 1988). El otro tipo celular, menos abundante, tiene un citoplasma eosinófilo con un núcleo periférico no segmentado, típico de un granulocito eosinófilo de ciprínido (Bielek, 1981; Rowley y col., 1988). Los heterófilos se caracterizan por presentar gránulos citoplasmáticos electronodensos y con forma alargada y los eosinófilos por un citoplasma repleto de gránulos más grandes de forma elíptica o redondeada y con electronodensidad variable (Lieschke y col., 2001).

III.2.4. Linfocitos

Mediante estudios de microscopía óptica y/o electrónica de transmisión se ha identificado el momento de aparición de células con características morfológicas y ultraestructurales de linfocitos en el rodaballo, el bacalao y la dorada. En el rodaballo, se observan a los 20-30 dde en riñón y timo y a los 30-70 dde en bazo (Padrós y Crespo, 1996), en el bacalao a los 28 dde en timo y a los 51 dde en bazo (Shroder y col., 1998) y en la dorada a los 29 dde en timo y a los 54 dde en riñón y bazo (Jósefsson y Tatner, 1993).

En el pez cebra, el proceso de desarrollo y maduración de los linfocitos se ha estudiado mediante la detección de la expresión de *ikaros*, que codifica un factor de transcripción que se utiliza como marcador temprano de linfocitos, y de *rag1*, que es un marcador de linfocitos maduros. La expresión de *ikaros* se detecta 1 ddf y después incrementa gradualmente hasta más de dos veces entre los 28 y 42 ddf. Posteriormente, la expresión disminuye hasta que se alcanza un nivel menor que el detectado en el día 1 ddf en peces adultos (105 ddf). Los niveles de expresión de *rag1* incrementan rápidamente (10 veces) entre los 3 y 17 ddf, alcanzando un máximo entre los 21 y 28 ddf. Después, el nivel de expresión decrece gradualmente. Sin embargo, en peces adultos, el nivel de expresión del gen *rag1* es alto y similar al encontrado a los 3 ddf. Mediante hibridación *in situ*, la expresión de *rag1* se detecta en riñón a las 2 sdf (Lam y col., 2004).

III.2.4.1. Linfocitos B y células plasmáticas

Mediante la utilización de anticuerpos específicos, los linfocitos B se detectan por primera vez a la segunda semana después de la eclosión (sde) en el riñón cefálico y bazo de carpa, a los 58 dde en el riñón de larvas de bacalao y a partir de los 87 dde en el bazo y riñón cefálico de larvas de lubina. En el pez cebra, la expresión de la región constante de la cadena ligera de la Ig se detecta en niveles bajos en riñón cefálico y timo desde la 3ª sdf mediante hibridación *in situ* (Koumans-van Diepen y col., 1994; Shroder y col., 1998; Dos Santos y col., 2000; Lam y col., 2004).

En la lubina, la sangre contiene el mayor porcentaje de linfocitos B, seguido del bazo, riñón cefálico, digestivo y timo. El porcentaje de linfocitos B incrementa en sangre y digestivo hasta los 335 dde. El número máximo de linfocitos B en bazo se alcanza a los 208 dde mientras que en riñón cefálico se alcanza entre los 117 y los 208 dde. De los 208 hasta los 335 dde se observa un descenso en el número de linfocitos B en ambos órganos coincidiendo con el otoño y el invierno (Dos Santos y col., 2000). El bazo contiene el mayor porcentaje de células plasmáticas seguido del riñón cefálico (Dos Santos y col., 2000) lo que concuerda con los datos del estudio ultraestructural de riñón cefálico (Meseguer y col., 1991) y de bazo (Quesada y col., 1990) adultos.

En la carpa, el porcentaje de linfocitos B en el riñón y bazo aumenta en animales de un mes de edad. Las células plasmáticas se encontraron en suspensiones celulares de riñón cefálico, pero son raras en suspensiones de bazo y están ausentes, o sólo ocasionalmente presentes, en el timo y en sangre. En larvas de 2 semanas de edad no se observan células plasmáticas en el riñón cefálico y si están ya presentes en animales de 1 mes de edad. El porcentaje de células plasmáticas se incrementa con el desarrollo y alcanza un máximo a los 3 meses de edad (Koumans-van Diepen y col., 1994).

III.2.4.2. Linfocitos T

Las primeras células linfoides que aparecen durante la ontogenia son los linfocitos T (Dos Santos y col., 2000). Mediante la utilización de anticuerpos específicos, los linfocitos T se detectan por primera vez en el timo en distintos momentos del desarrollo: al final del día 4 después de la fecundación en carpa (Koumans-van Diepen y col., 1994) y a los 5-12 dde en la lubina (Dos Santos y col., 2000). En pez cebra, la expresión de la región constante de la cadena α del receptor de linfocitos T se detecta en niveles bajos a los 4 ddf en timo (Danilova y col., 2004) y a la 3ª sdf en el riñón (Lam y col., 2004).

En la lubina, los linfocitos T incrementan en número hasta los 66 dde alcanzando su número máximo a los 101 dde en sangre, bazo y riñón cefálico (Dos Santos y col., 2000). En las primeras etapas del desarrollo, el órgano con mayor porcentaje de linfocitos T es el timo, seguido del tracto digestivo, sangre, riñón y bazo. Además, se encuentran en mayores porcentajes que los linfocitos B en esos mismos

órganos, con la excepción del bazo (Dos Santos y col., 2000). El alto porcentaje de linfocitos T encontrado en sangre puede indicar que ocurre una migración desde el timo hasta otros órganos, como ha sido sugerido por otros autores (Secombes y col., 1983; Tatner, 1985; Jofesson y Tatner, 1993; Abelli y col., 1996).

Los timocitos que se presentan a los 4 ddf en la carpa tienen un núcleo eucromatínico, un citoplasma abundante con numerosos ribosomas y mitocondrias grandes. Durante la 1ª sdf, los timocitos están distribuidos incluso entre las células epiteliales. Desde la 4ª sdf, se observa diferente densidad de timocitos en distintas regiones del timo. La mayoría de los timocitos medulares presentan un núcleo grande irregular y abundante citoplasma comparados con los corticales. En la zona de transición corteza-médula, los timocitos son similares a los corticales. Entre 8 y 30 sdf, la distribución de los timocitos cambia gradualmente. De hecho, no se detectan timocitos en la médula del timo mientras que si aparecen en la corteza (Koumans-van Diepen y col., 1994).

III.3. Factores de la inmunidad humoral

Los estudios realizados hasta el momento sobre la ontogenia de factores de la inmunidad humoral son muy escasos.

III.3.1. Inmunoglobulina M

Las inmunoglobulinas son los factores humorales más importantes de la inmunidad adaptativa. La aparición de IgM citoplásmica y de membrana en los linfocitos B varía entre diferentes especies. Igualmente, la comparación de los datos publicados es muy complicada debido a los diferentes métodos usados para la detección de IgM: inmunocitoquímica, hibridación *in situ*, citometría de flujo, ELISA y *Western blot*. En general, la IgM aparece antes en el desarrollo en peces de agua dulce que en peces marinos. Así, en peces de agua dulce como la trucha arcoiris y el pez gato se detecta IgM de membrana a la 1ª sde (Castillo y col., 1993) y en el pez cebra se detectan anticuerpos mediante *Western blot* y mediante purificación de inmunoafinidad entre la 4ª y la 6ª sdf (Lam y col., 2004). Por el contrario, en el pez marino denominado perro pintado se detecta IgM entre la 1ª y la 4ª sde (Grøntvedt y Espelid, 2003). Sin embargo,

la capacidad para desarrollar una respuesta humoral mediada por anticuerpos no se correlaciona necesariamente con la primera detección de IgM. Por tanto, puede existir un lapso entre la detección de IgM y la inmunocompetencia funcional, como ha sido demostrado en varias especies de peces (Dos Santos y col., 2000; Petrie-Hanson y Ainsworth, 2001).

La aparición relativamente tardía de IgM autóloga podría estar compensada con la IgM transferida a la descendencia por parte de la madre. Se ha demostrado la existencia de transferencia materna de IgM en los ovocitos y embriones de varias especies como en la solla europea (Bly y col., 1986; Mor y Avtalion, 1988; Takemura, 1993; Suzuki y col., 1994; Breuil y col., 1997; Olsen y Press, 1997; Picchietti y col., 2004), *Oreochromis mossambicus*, la carpa, la lubina y el salmón atlántico. Sin embargo, en diferentes estudios se ha demostrado que esta IgM materna no protege a larvas y juveniles pudiendo desempeñar un papel diferente (Lillehaug y col., 1996; Tanaka y col., 1999). Posiblemente, proteja frente a una transferencia vertical de ciertos patógenos, ayude a la fagocitosis o a la activación del complemento o actúe simplemente como nutriente en el saco vitelino.

III.3.2. Complemento

El sistema del complemento es un sistema de defensa constituido por 20-30 proteínas diferentes y varios receptores. Cuando es activado, unos componentes van activando a otros de forma secuencial. Las funciones principales del complemento son la opsonización (eliminación de antígenos recubiertos de componentes del complemento por fagocitos), la lisis de microorganismos y células infectadas y la inflamación (producción de péptidos biológicamente activos con actividad anafilotóxica y quimiotáctica). Existen algunos trabajos sobre la ontogenia de diversos componentes del complemento en el bacalao (Lange y col., 2004a), en el pez perro pintado (Ellingsen y col., 2005), en el fletán del Atlántico (Lange y col., 2004b), en la trucha arcoiris (Løvoll y col., 2006) y en el salmón atlántico (Løvoll y col., 2007). En la mayoría de los casos, solo se ha estudiado la ontogenia del componente C3 del complemento después de la eclosión del huevo. Mediante inmunocitoquímica, en el fletán del Atlántico se detecta el componente C3 desde el día 5 dde en varios tejidos y órganos (Lange y col., 2006)

mientras que en el bacalao presenta una localización similar, pero aparece en una fase más temprana del desarrollo (1 dde) (Lange y col., 2004). En el perro pintado, en la carpa, en la trucha y en el salmón atlántico, el C3 se detecta en huevos no fertilizados mediante *Western blot* (Ellingsen y col., 2005; Huttenhuis y col., 2006; Løvoll y col., 2006, 2007) y mediante PCR a tiempo real, el transcrito del C3 se observa en carpa inmediatamente después de la fertilización (Huttenhuis y col., 2006), en trucha a partir del día 7 después de la fertilización y en salmón atlántico a partir de los 14 ddf (Løvoll y col., 2006, 2007). Por tanto, el conocimiento existente en la actualidad sobre el sistema del complemento de peces es bastante escaso y está basado principalmente en estudios inmunocitoquímicos y de *Western blot* en unas pocas especies.

III.3.3. Lisozima

La lisozima es una enzima muy importante en la defensa innata y se encuentra ampliamente distribuida en vertebrados e invertebrados. Entre sus funciones, destaca la hidrólisis del enlace β -(1, 4) del glicósido unido al peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Aunque inicialmente se asoció con la defensa frente a bacterias Gram positivas, también se halla implicada en la defensa frente a bacterias Gram negativas, parásitos y virus (Ingram, 1980; Jolles y Jolles, 1984; Alexander e Ingram, 1992). La lisozima está presente en el mucus, en tejidos linfoides, suero y otros fluidos corporales de la mayoría de las especies de peces. Los estudios realizados hasta la fecha sobre la ontogenia de esta enzima son muy escasos. La lisozima ha sido detectada en ovocitos, huevos fertilizados y estadios larvarios de diversas especies de peces, por ejemplo, ovocitos de salmónidos, en *O. mossambicus*, en lubina y en otras especies de peces (Murray y Fletcher, 1976; Kudo, 1991, 1992; Yousif y col., 1991, 1994a; Takemura y Takano, 1995; Takemura, 1996; Brown y col., 1997; Cecchini y col., 2000). Mediante inmunocitoquímica, la lisozima se detecta por vez primera a 6 dph en el primordio de la vejiga natatoria, el saco vitelino y el hígado de *O. mosambicus* (Takemura, 1996). En huevos fertilizados de trucha arcoíris, la lisozima se encuentra en la envuelta de fertilización que desempeña un papel protector del embrión y contiene varias enzimas fungicidas y bactericidas (Kudo, 1991).

III.3.4. Lectinas

Las lectinas, como las lectinas tipo C y pentraxinas, son proteínas que unen carbohidratos e interaccionan con estructuras de las superficies patogénicas produciendo opsonización, fagocitosis o activación del complemento. Se han aislado varias lectinas de ovocitos de la lubina (Topliss y Rogers, 1985) y *Oncorhynchus kisutch* (Yousif y col., 1994b), de ovocitos y huevos fertilizados de la trucha arcoiris (Bildfell y col., 1992; Tateno y col., 2002) y de ovocitos de la liebre de mar (Fletcher y col., 1981).

III.3.5. Otros factores humorales

Los inhibidores de proteasas pueden desempeñar un papel en la defensa frente a patógenos que secretan enzimas proteolíticas (Zuo y Woo, 1997). La α -2-macroglobulina ha sido estudiada únicamente en carpa mediante PCR a tiempo real y se detecta inmediatamente después de la fertilización (Huttenhuis y col., 2006). Otros factores humorales como inhibidores de cisteínproteasas (Yamashita y Konagaya, 1991, 1996; Kudo, 1998) e inhibidores del crecimiento bacteriano (Macey y col., 1982) han sido detectados en huevos de varias especies de peces y en el plasma de larvas de *Geotria australis*, respectivamente. Por último, también han sido aislados péptidos inhibidores y promotores del crecimiento tumoral en ovocitos del sábalo americano (Sheid y col., 1989).

Por tanto, los datos disponibles sobre la ontogenia de los factores humorales de peces son muy escasos y son necesarios muchos más estudios a nivel de expresión génica y de proteómica para conocer los factores humorales presentes en peces y la función que desempeñan.

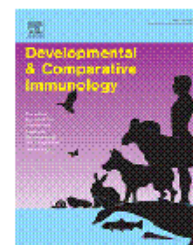
PUBLICACIONES DE QUE CONSTA LA TESIS



Available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci



Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor

Iván Mulero, M. Pilar Sepulcre, Francisco J. Roca, José Meseguer, Alfonso García-Ayala, Victoriano Mulero*

Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

Received 6 February 2008; received in revised form 6 March 2008; accepted 6 March 2008

KEYWORDS

Innate immunity;
Infection;
Vibrio anguillarum;
Acidophilic granulocytes;
Interleukin-1 β ;
European seabass;
Teleosts

Summary

Two major professional phagocyte populations have been described in fish, namely granulocytes and monocytes/macrophages. Although the distribution and localization of macrophages have been documented in several teleost species using mainly light and/or electron microscopy, the lack of appropriate markers for these cells has hampered our in-depth knowledge of their biology. We report here the generation of a monospecific rabbit polyclonal antibody against the gilthead seabream macrophage colony-stimulating factor receptor (Mcsfr), which is an excellent marker of macrophages in mammals and the zebrafish. The anti-Mcsfr has been found to be very useful in immunohistochemistry (IHC) to specifically immunostain the purified macrophages (adherent cells) obtained from the head-kidney as well as different cell populations in paraffin-embedded organs, including the head-kidney, spleen, thymus, gills and liver. Unexpectedly, however, no Mcsfr immunoreactive (Mcsfr⁺) cells were observed in the brain and intestine of the gilthead seabream. We also show that the distribution of Mcsfr⁺ cells in the head-kidney and the spleen is unaltered following infection with the fish pathogenic bacterium *Vibrio anguillarum* and that the IL1 β -producing cells in these two organs after infection are exclusively acidophilic granulocytes. Finally, as the epitope recognized by the anti-Mcsfr is well conserved, we illustrate the potential usefulness of this antibody in other teleost species, such as the European seabass.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; IHC, immunohistochemistry; IL, interleukin; Mcsfr, macrophage colony-stimulating factor receptor; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PBS, phosphate-buffered saline; PBT, PBS+BSA+Triton X-100; Tlr, toll-like receptor; Tnf, tumor necrosis factor; TEC, thymic epithelial cell.

*Corresponding author. Tel.: +34 968 367581; fax: +34 968 363963.

E-mail address: vmulero@um.es (V. Mulero).

0145-305X/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.dci.2008.03.005

Please cite this article as: Mulero I, et al. Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. Dev Comp Immunol (2008), doi:10.1016/j.dci.2008.03.005

Introduction

Phagocytes are cells principally dedicated to the recognition and elimination of invading organisms and damaged tissues. In fish, two major professional phagocyte populations have been described: granulocytes (particularly neutrophils) and mononuclear phagocytes (circulating monocytes and tissue macrophages) [1]. Their movement to the sites of microbial invasion is an early event in the inflammatory response, and the role of host-derived factors as attractants, such as eicosanoids and chemokines, has been reported [2]. Fundamental to the protection offered by the phagocytes is their bactericidal activity, which is closely associated with the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates [3].

Macrophages of adult fishes and their ontogeny have been studied in several teleost species using mainly light and/or electron microscopy due to the lack of appropriate markers for specific cell populations in most species. In mammals, the macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (*Mcsfr*) has been used as a marker of macrophages, since its expression in embryonic and adult mice is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage [4,5]. In fact, this receptor has been shown to regulate the survival, proliferation and differentiation of mononuclear phagocytic cells, and is the primary regulator of mononuclear phagocyte production *in vivo* [6]. Similarly, the zebrafish *mcsfr* gene is expressed in macrophages [7], but is also strongly expressed in neural crest derivatives [8]. We have also demonstrated that the expression of the *mcsfr* gene is restricted to the monocyte/macrophage lineage in the gilthead seabream, an immunologically tractable bony fish model [9].

One important function of macrophages is the regulation of the immune response through the production of a variety of cytokines, such as interleukins (ILs), interferons and tumor necrosis factor (Tnf), and inflammatory prostanoids. IL1b plays a pivotal role in the inflammatory response, where it induces the expression of a wide variety of genes that are characteristically expressed during inflammation, particularly other cytokines [10]. To further understand the role played by macrophages in the fish immune response, we report here the generation of a monospecific rabbit polyclonal antibody generated against the *Mcsfr* of the gilthead seabream and its usefulness for studying the distribution and localization of *Mcsfr*⁺ cells in different organs. We also describe the distribution of *Mcsfr* immunoreactive (*Mcsfr*⁺) cells and IL1b-producing cells in this species following infection with the fish pathogenic bacterium *Vibrio anguillarum*. Finally, we illustrate the usefulness of the anti-*Mcsfr* in other teleost species such as the European seabass.

Materials and methods

Animals

Gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Actinopterygii, Sparidae) specimens were kept in 260 l of running seawater aquaria (flow rate 1500 l/h) at 23°C under a 12-h light/dark cycle and fed with a commercial pellet diet (Skretting) at a feeding rate of 15 g of dry diet per kilogram biomass of fish

per day. European seabass (*Dicentrarchus labrax* L., Perciformes, Moronidae) and Senegalese sole (*Solea senegalensis* K., Pleuronectiformes, Soleidae) specimens were obtained from the Murcia Oceanographic Centre (IEO). All animal studies were carried out in accordance with the European Union regulations for animal experimentation.

Isolation of macrophages

Gilthead seabream head-kidney cell suspensions obtained as described elsewhere [11] were incubated overnight in serum-free medium in six-wells cell culture plates. Macrophage monolayers were then repeatedly washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2–7.4) to remove the non-adhering cells, fixed in 4% paraformaldehyde solution for 30 min and subjected to an avidin biotin immunohistochemistry (IHC) method (see below). The identity of the obtained monolayers was confirmed from the expression of the *mcsfr* gene [9].

Experimental infection

Gilthead seabream specimens were injected i.p. with 1 ml PBS alone or containing a sublethal dose (10^8) of exponentially growing *V. anguillarum* R82 cells (serogroup 01) [12]. Head-kidney, spleen, liver, gills, brain, intestine and thymus fragments were obtained and processed for light microscopic studies (see below) at 4, 24, 48 and 72 h post-infection.

Light microscopy and IHC

Tissue fragments were fixed overnight in Bouin fluid or 4% paraformaldehyde solution, embedded in Paraplast Plus (Sherwood Medical, Albuta, Canada) and sectioned at a thickness of 5 µm. After being dewaxed and rehydrated, some sections were stained with haematoxylin and eosin, while others were subjected to an IHC method [13] using purified rabbit polyclonal antisera raised against synthetic peptides corresponding to an internal epitope of the extracellular domain of the gilthead seabream *Mcsfr* (SLRVVRKEGEDYLLPC) or to the C-terminus of the gilthead seabream IL1b (RRHRIFKFLPPKPEVEGGEC) (both from Pacific Immunology). The sections for the *Mcsfr* immunostaining were incubated in ethylenediaminetetraacetic acid (1 mM, pH 8.0) at 95°C for 20 min to retrieve the antigen. After cooling, they were incubated for 40 min in peroxidase-quenching solution (H₂O₂ in methanol, 1:9) to eliminate the endogenous peroxidase activity and then rinsed in PBS and in PBS containing 0.01% bovine serum albumin (BSA) and 0.2% Triton X-100 (PBT). After 30 min incubation with PBS containing 0.5% BSA to block the non-specific reaction, they were rinsed in PBT and incubated for 2 h at room temperature with a 1:100 dilution of the anti-*Mcsfr* or the anti-IL1b. After washing in PBT, the sections were exposed to anti-rabbit IgG (whole molecule)-biotinylated antibody produced in swine (Dako Cytomation) diluted 1:100 for 1 h at room temperature. Afterwards, the samples were washed in PBT and incubated for 1 h at room temperature with the avidin-biotinylated peroxidase complex (Dako Cytomation) according to the manufacturer's instructions.

All the samples were then washed in PBT and in 0.5 M Tris HCl buffer (pH 7.6), and the peroxidase activity was revealed by incubation for 5 min at room temperature with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in Tris HCl buffer containing 0.05% H₂O₂. The specificity of the reactions was determined by omitting the first antibody and incubating the primary antibody with a 10-fold molar excess of the synthetic peptide used to raise it. Some of the sections were slightly counterstained with haematoxylin, dehydrated, mounted in DPX and examined under an Axiolab microscope (Zeiss). The photographs were obtained with a digital camera CoolSNAP (RS Photometrics) using a Pentium III computer with a CoolSNAP (RS Photometrics) software.

For the immunofluorescence technique, sections were incubated with the anti-Mcsfr antibody, followed by tetramethylrhodamine isothiocyanate-labelled anti-rabbit IgG (Dako) diluted 1:30. Samples were mounted in glycerine and immediately examined and photographed using an Axiolab fluorescence microscope (Zeiss).

Other sections were subjected to a double IHC method using the anti-Il1b together with the G7mAb, which is specific to gilthead seabream acidophilic granulocytes [11]. Sections were exposed to the anti-Il1b antibody as described above and then incubated for 1 h at room temperature with an anti-rabbit IgG (whole molecule)-alkaline phosphatase antibody produced in goat (Sigma) diluted 1:50. The samples were then washed in PBT and 0.5 M Tris HCl buffer, and the alkaline phosphatase activity was revealed by incubation for 5 min at room temperature with Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma). The sections were mounted in glycerine and immediately examined and photographed. After identification of the Il1b positive cells, a second immunostaining reaction was performed on the same sections, which were then incubated for 2 h at room temperature with the G7mAb diluted 1:100. After that, the sections were exposed to anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat (Sigma) diluted 1:200 for 1 h at room temperature. The peroxidase activity was revealed by incubation for 5 min at room temperature with DAB as described above. The sections were again mounted in glycerine, examined and photographed. Finally, the sections were slightly counterstained with haematoxylin, dehydrated (the red staining from the alkaline phosphatase activity is lost after dehydration), mounted in DPX, re-examined and photographed.

Results

Mcsfr immunoreactive cells are observed in the head-kidney, spleen, liver, gills and thymus of healthy gilthead seabream specimens

We first analyzed the usefulness of the anti-Mcsfr antiserum in head-kidney adherent cells, which have been shown to be mainly constituted by macrophages according to the expression of the macrophage marker *mcsfr* [9] and the induction of several phagocyte markers upon activation with different pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), including toll-like receptor 9 (*tlr9*), *tlr5*, *il1b*, cyclooxygenase 2 and Tnf α (*tnfa*) [14]. The results showed that the cell membrane of non-permeabilized macrophages was strongly immunostained with the anti-Mcsfr antibody (Figure 1A).

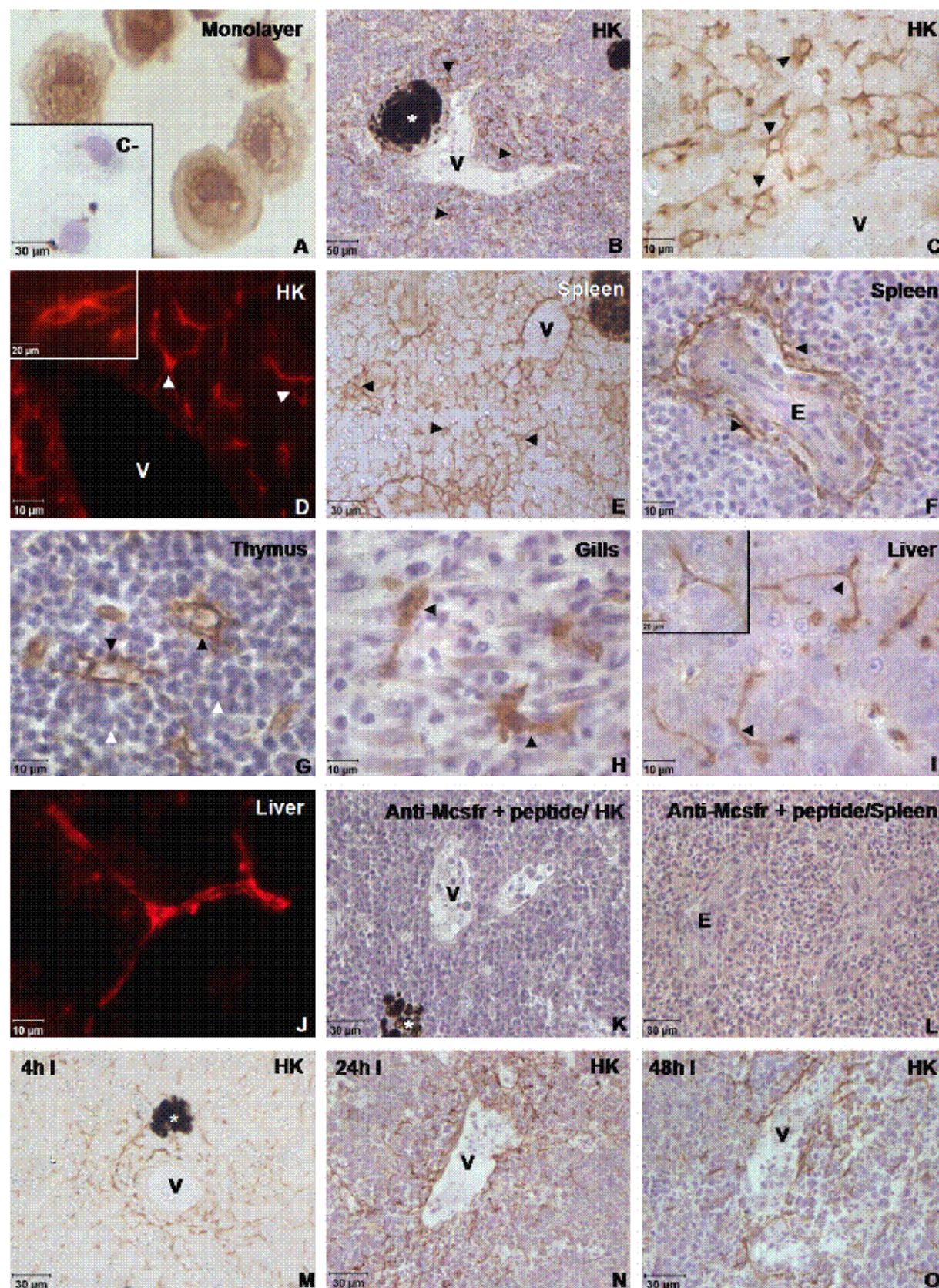
These results prompted us to analyze the anti-Mcsfr in sections from different organs. In the head-kidney, numerous Mcsfr⁺ cells showing long thin cell processes were observed distributed throughout the stroma of this organ, although they were more abundant in the vicinity of the blood vessels (Figures 1B D). In the spleen, numerous small Mcsfr⁺ cells were found to form a cellular network in the white pulp (Figure 1E). Notably, Mcsfr⁺ cells were also observed surrounding the ellipsoids present in the white pulp of this organ (Figure 1F). In the thymus, scattered Mcsfr⁺ cells showing long thin cell processes, a large nucleus and a nucleolus were observed (Figure 1G). Several rounded gill Mcsfr⁺ cells were also observed mainly in the gill filaments (Figure 1H). In the liver, scarce Mcsfr⁺ cells showing long and very thin cell processes were found among the hepatocytes (Figures 1I and J). No immunostaining was observed in the head-kidney and spleen sections when the primary antibody was pre-adsorbed with a 10-fold molar excess of the Mcsfr peptide used to raise it (Figures 1K and L). Importantly, no Mcsfr⁺ cells were observed in the brain and intestine of the specimens (data not shown).

The distribution of Mcsfr immunoreactive cells is not altered in the head-kidney and spleen of infected gilthead seabream specimens

We have previously shown that an experimental infection of gilthead seabream specimens with *V. anguillarum* results in the mobilization of acidophilic granulocytes from the head-kidney to the inflammatory site and the spleen [12]. Therefore, we studied whether *V. anguillarum* infection might also cause any changes in the distribution and localization of Mcsfr⁺ cells in the head-kidney and spleen. Unexpectedly, the localization of Mcsfr⁺ did not change upon infection (Figures 1M O and data not shown).

Acidophilic granulocytes but not Mcsfr immunoreactive cells produce Il1b in infected specimens

Previous studies have shown that the *il1b* gene expression is drastically up-regulated in the two professional phagocytic cell types of the gilthead seabream, namely acidophilic granulocytes and macrophages, upon activation with several PAMPs [14]. In addition, it has also been shown that circulating acidophilic granulocytes from infected animals accumulate Il1b [15]. Therefore, we investigated whether Mcsfr⁺ cells were also able to produce Il1b in this species. As expected, no Il1b immunoreactive (Il1b⁺) cells were seen in the head-kidney and spleen of PBS-injected specimens (data not shown). However, we observed scarce round-shaped Il1b⁺ cells located close and inside the blood vessels in the head-kidney (Figure 2A C) and spleen (Figure 2G and J) of infected specimens at 4, 24, 48 and 72 h post-infection. Interestingly, the round shape of Il1b⁺ cells differed substantially from that of Mcsfr⁺ cells (Figure 2B and C). In fact, using a double IHC method with the anti-Il1b together with the G7mAb, it was observed that some acidophilic granulocytes (G7⁺ cells) of the head-kidney (Figures 2D F) and spleen (Figures 2G L) of injected specimens were



immunostained with the anti-IL1b. Notably, all IL1b⁺ cells were acidophilic granulocytes (Figures 2D L).

The anti-Mcsfr cross-reacts with head-kidney and spleen cells of the European seabass but not with cells of the Senegalese sole

As the epitope recognized by the anti-Mcsfr is highly conserved among different teleost species belonging to phylogenetically distant orders (Figure 3A), we studied whether it may cross-react with the Mcsfr of other species and, therefore, whether it could be considered as a useful tool for studying the localization of Mcsfr⁺ cells in different teleost species. Figure 3B shows that the anti-Mcsfr immunostained a few rounded cells located close to the blood vessels in the head-kidney of the European seabass, which belongs to the same order (Perciformes), but a different family (Moronidae), as the gilthead seabream (Sparidae). However, numerous small Mcsfr⁺ cells were observed in the spleen of this species, where they seemed to form a cellular network in the white pulp (Figure 3C), as in the gilthead seabream (Figures 1B D). The reaction was specific, since no immunostaining was observed in the head-kidney (Figure 3D) or spleen (Figure 3E) of seabass when the anti-Mcsfr was pre-adsorbed with a 10-fold molar excess of the Mcsfr peptide.

We also examined the ability of the anti-Mcsfr antibody to cross-react with head-kidney and spleen cells from the Senegalese sole, which belongs to a different phylogenetic order (Pleuronectiformes), and found that the antibody failed to cross-react with cells of these tissues (data not shown).

Discussion

The development of comparative immunology, and particularly in fish, has been hampered by the lack of appropriate markers to unequivocally identify, isolate and functionally characterize the different immune cell types of non-mammalian species. The production of specific antibodies to fish macrophages has been particularly difficult, and only antibodies against macrophages from common carp [16,17] and rainbow trout [18] have been reported to date. However, most of these antibodies have been shown to also recognize other immune cell types, namely granulocytes

[16] or thrombocytes [17]. We experienced the same difficulties when attempting to raise a specific antibody to gilthead seabream macrophages by immunizing mice with head-kidney or peritoneal exudate suspensions or purified macrophages (unpublished results). For this reason, a different strategy was followed here and we raised a monospecific rabbit polyclonal antibody to a synthetic peptide deduced from the seabream *mcsfr* gene, whose expression has been found to be restricted to macrophages [9]. The anti-Mcsfr has been found to be very useful in IHC to specifically immunostain the purified macrophages (adherent cells) obtained from the head-kidney and different cell populations in paraffin-embedded organs, including the head-kidney, spleen, thymus, gills and liver. The specificity of the reactions was always confirmed by pre-adsorption of the anti-Mcsfr with the specific peptide used to generate it. Unfortunately, however, the antibody failed to detect the Mcsfr polypeptide in western blot and to immunostain live cell suspensions obtained from the head-kidney. These observations, together with the fact that the tissue sections are required to be heated at high temperatures to retrieve the antigen, suggest that the epitope is not accessible in the native Mcsfr polypeptide. Anyway, these are important limitations to its use as a more general tool, for example for isolating macrophages and quantifying them in different tissues after an immune challenge. Nevertheless, as the Mcsfr epitope recognized by the anti-Mcsfr is well conserved among different teleost species belonging to distant phylogenetic orders, we showed that this antibody might be useful for studying the localization and distribution of Mcsfr⁺ cells (e.g. macrophages) in other teleost species, as illustrated with the European seabass. However, the anti-Mcsfr did not cross-react with lymphomyeloid tissues from the Senegalese sole, a species belonging to a different order (Pleuronectiformes) from the gilthead seabream and the European seabass (both Perciformes). Unfortunately, we cannot speculate on the ability of the anti-Mcsfr to recognize different variants of the epitope since the *mcsfr* sequence of the European seabass and the Senegalese sole is unknown. Therefore, the usefulness of this antibody has to be tested in each particular species. However, its failure to cross-react with Senegalese sole tissues suggests that it may not be useful in more phylogenetically distant species, such as the rainbow trout (Salmoniformes) and the goldfish and the zebrafish (Cypriniformes).

Figure 1 Distribution of Mcsfr⁺ cells in gilthead seabream immune tissues. Head-kidney macrophage monolayers (A, inset) immunostained with the anti-Mcsfr antibody (A). Sections of the gilthead seabream head-kidney (B D, K, M O), spleen (E, F, L), thymus (G), gills (H) and liver (I, J) from healthy (A L) and *V. anguillarum*-infected (M O) specimens were immunostained with the anti-Mcsfr antibody alone (B J, M O) or pre-adsorbed with a 10M excess of the Mcsfr peptide (K, L). (A) Macrophage monolayer strongly immunostained with the anti-Mcsfr. Inset: no immunostaining was observed when the primary antibody was omitted. (B, C) Numerous Mcsfr⁺ cells (black arrowheads) are seen around the blood vessels (V). *: Melanomacrophage center. (D) Immunofluorescence showing head-kidney Mcsfr⁺ cells (white arrowheads). Inset: Detail of a head-kidney Mcsfr⁺ cells showing several long thin cell processes. V: Blood vessel. (E) Numerous small Mcsfr⁺ cells (black arrowheads) forming a cellular network are seen in the spleen. V: Blood vessel. (F) Mcsfr⁺ cells (black arrowheads) surrounding the splenic ellipsoids (E) of the white pulp. (G) Numerous Mcsfr⁺ cells (black arrowheads) with thin cell processes, a large nucleus and a peripheral nucleolus among the thymocytes (white arrowheads). (H) Gill round-shaped Mcsfr⁺ cells (black arrowheads) showing thick cell processes. (I, J) Mcsfr⁺ cells in the liver (black arrowheads) showing numerous long thin cell processes. Inset: Detail of a Mcsfr⁺ cell from the liver. (K, L) No cells were immunostained in the presence of a 10M excess of the Mcsfr peptide. V: Blood vessel, E: ellipsoid. (M O) The distribution of head-kidney macrophages is not altered by infection and they are mainly found close to the blood vessels (V). *: Melanomacrophage center.

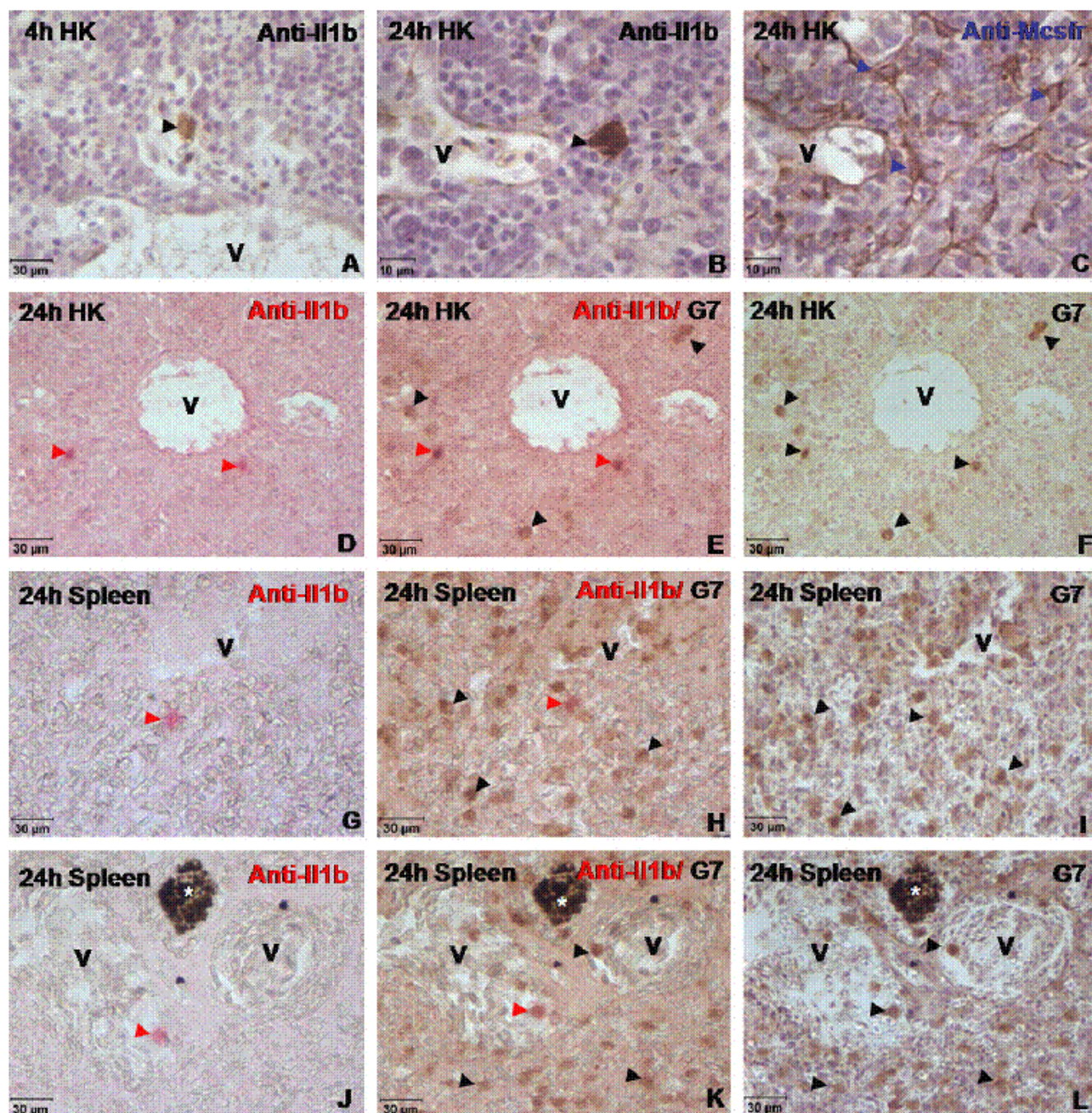


Figure 2 Acidophilic granulocytes but not macrophages produce II1b in infected specimens. Sections of the head-kidney (HK) (A–F) and spleen (G–L) from *V. anguillarum*-infected specimens were incubated with the anti-II1b antibody (A, B, D, G, J), with the anti-Mcsfr antibody (C), with the anti-II1b and the G7 mAb (E, H, K) or with the G7 mAb alone (F, I, L). (A) An II1b⁺ cell is seen close to the blood vessels (V) in the head-kidney of an infected specimen at 4 h post-infection. (B, C) Consecutive sections showing an II1b⁺ cell (black arrowhead) and numerous macrophages (blue arrowheads). V: Blood vessel. (D–F) Only a few head-kidney acidophilic granulocytes (G7⁺, black arrowheads) immunoreact with the II1b antibody (red arrowheads). Note that the same section is shown in the three pictures. V: Blood vessel. (G–I) Only one acidophilic granulocyte (G7⁺, black arrowheads) located in the white pulp of the spleen of an infected specimens immunoreacts with the II1b antibody (red arrowhead). Note that the same section is shown in the three pictures. V: Blood vessel. (J, K, L) A circulating acidophilic granulocyte (G7⁺, black arrowheads) is also positive for II1b (red arrowhead). V: Blood vessels. *: Melanomacrophage center. Note that the same section is shown in the three pictures.

The IHC study of the head-kidney and spleen of the gilthead seabream using the anti-Mcsfr shows that Mcsfr⁺ cells mainly appeared close to the blood vessels in both tissues and are more abundant in the white pulp of the

spleen. Their long thin cell processes that seem to contact those of neighboring cells allow them to form a cellular network. Notably, the anti-Mcsfr also immunostained the layer of cells that surround the ellipsoids of the spleen,

A

S. aurata (Perciformes, Sparidae)
O. tangerina (Perciformes, Cichlidae)
F. rubripes (Tetraodontiformes, Tetraodontidae)
T. nigroviridis (Tetraodontiformes, Tetraodontidae)
O. mykiss (Salmoniformes, Salmonidae)
D. rerio (Cypriniformes, Cyprinidae)

Consensus

SLRVVRKEGEDYLLPC
 SLQVVAKEGESYLLPC
 SLRVVRKEGEDYLLPC
 SVSVVRKEGEDYLLPC
 SLRVVRKEGEDHLLPC
 SLRYVRKEGEDLLPC
 *: * ****. ****

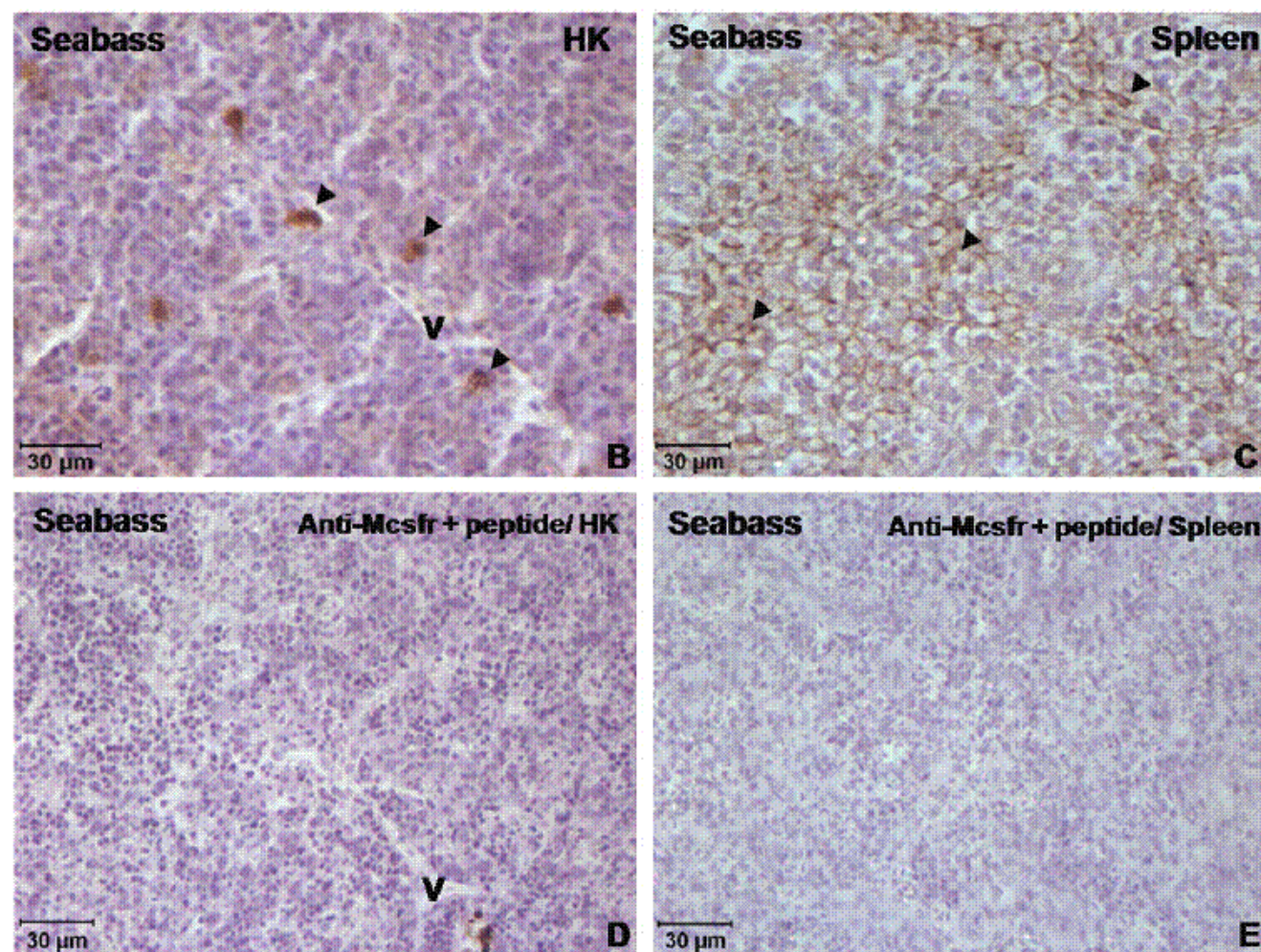


Figure 3 The anti-Mcsfr antibody cross-reacts with European seabass lymphomyeloid tissues. (A) Alignment of the gilthead seabream Mcsfr epitope used to generate the anti-Mcsfr antibody with those of different teleost species. Identical (*) and similar (.) residues identified in all proteins are shown in different colors. The accession numbers for Mcsfr sequences are CA138865 for *Sparus aurata*, ABW24990 for *Oreochromis tangerina*, AAC60063 for *Fugu rubripes*, CAG06279 for *Tetraodon nigroviridis*, CAD10625 for *Oncorhynchus mykiss* and CAM73160 for *Danio rerio*. (B-E) Sections of seabass head-kidney (B, D) and spleen (C, E) were incubated with the anti-Mcsfr antibody alone (B, C) or in the presence of a 10 M excess of the Mcsfr peptide (D, E). (B, C) Scattered Mcsfr+ cells (black arrowheads) are observed close to the blood vessels (V) in the head-kidney, while they are more numerous and seem to form a cellular network in the spleen. (D, E) No Mcsfr+ cells were observed after the pre-adsorption of the antibody with a 10 M excess of the Mcsfr peptide. V: Blood vessel.

which further confirms the specificity of this antibody since these structures have been described by light and electron microscopy as terminations of arterioles with a narrow lumen that runs through a sheath of reticular fibers, reticular cells and macrophages [19]. In addition, the antibody also reacts with a few rounded cells located in

the gill filaments as well as with cells showing long and very thin cell processes in the liver which may represent the gilthead seabream Kupffer cells. Unexpectedly, the anti-Mcsfr also reacted against large cells that showed thin cell processes, a large nucleus and a peripheral nucleolus, which had previously been considered as the thymic epithelial cells

(TECs) of this species [20]. Confirmation of the definitive origin, nature and functional relevance of these cells as well as whether they might express the *Mcsfr* must wait for the availability of appropriate TEC markers in this species, such as the *foxn1* gene, whose expression is restricted to TECs in mammals and the zebrafish [21]. Anyway, further experiments using this antibody are now under way to establish the functions of the *Mcsfr*⁺ cells present in all these immune relevant tissues.

The anti-*Mcsfr* antibody also shows that no *Mcsfr*⁺ cells are observed in the brain and intestine of the gilthead seabream. This contrasts with previous developmental studies in the zebrafish that show that early macrophages (i.e. *Mcsfr*⁺ cells) invade the brain, especially the optic tectum [22]. In fact, the *mcsfr* gene must be required for this behavior, since in the *panther* mutant, which lacks a functional *mcsfr*, early macrophages differentiate and apparently behave normally in the yolk sac, but then fail to invade embryonic tissues [7]. Similarly, the presence of macrophages has also been reported using IHC in the lamina propria of the intestine of larval and adult specimens of the common carp [22,23]. It is likely, therefore, that macrophages are present in the brain and the intestine of the gilthead seabream. Should this be the case, the resident macrophages of these two tissues would not express the *Mcsfr* polypeptide.

Another unexpected and interesting observation of this study was that the distribution and localization of *Mcsfr*⁺ cells in the head-kidney and spleen of the gilthead seabream were unaffected upon infection with *V. anguillarum*. This sharply contrasts with the rapid and strong mobilization of acidophilic granulocytes from the head-kidney to the inflammatory site (i.e. the peritoneal cavity) and the spleen following infection with this bacterium [12,15]. In addition, we also found that *Mcsfr*⁺ cells of the head-kidney and the spleen did not accumulate *Il1b* after infection, while some acidophilic granulocytes were strongly immunostained with the anti-*Il1b* antibody. This observation is surprising since it has previously been shown that *il1b* gene expression is drastically up-regulated, and to the same extent, in both acidophilic granulocytes and macrophages after being activated *in vitro* with several PAMPs [14]. However, we cannot exclude the possibility that *Mcsfr*⁺ cells, i.e. macrophages, also produce and quickly release *Il1b* after *in vivo* infection. This would explain our inability to detect *Il1b* inside these cells by IHC. This notion is supported by a recent report by Greten and coworkers [24] that has demonstrated that in murine macrophages enhanced pro-*Il1b* processing depends on caspase-1, while in neutrophils *Il1b* secretion is caspase-1 independent and depends on serine proteases. Whatever the case, these results together with the different gene expression profiles observed for each cell type following stimulation [14,25] suggest different roles for professional phagocytes of fish in the recognition and elimination of pathogens and in the regulation of adaptive immune responses.

Acknowledgments

We thank I Fuentes for her excellent technical assistance, A García-Alcázar for providing the specimens, and AE Toranzo

and JL Barja for the R-82 strain of *Vibrio anguillarum*. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Grant BIO2005-05078 to V.M.), Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Grant 08BIO2005-01-6471 to V.M.), and Fundación Séneca-Murcia (fellowship to I.M.).

References

- [1] Secombes CJ, Fletcher TC. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Ann Rev Fish Dis* 1992;2:53–71.
- [2] Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. *Dev Comp Immunol* 2004;28:443–60.
- [3] Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworth AJ, Belosevic M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol* 2001;25:807–25.
- [4] Hume DA, Monkley SJ, Wainwright BJ. Detection of *c-fms* protooncogene in early mouse embryos by whole mount in situ hybridization indicates roles for macrophages in tissue remodeling. *Br J Haematol* 1995;90:939–42.
- [5] Lichanska AM, Browne CM, Henkel GW, Murphy KM, Ostrowski MC, McKercher SR, et al. Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood* 1999;94:127–38.
- [6] Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 2004;14:628–38.
- [7] Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a *M-CSF* receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* 2001;238:274–88.
- [8] Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, Johnson SL. An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 2000;127:3031–44.
- [9] Roca FJ, Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J, Mulero V. The colony-stimulating factor-1 receptor is a specific marker of macrophages from the bony fish gilthead seabream. *Mol Immunol* 2006;43:1418–23.
- [10] Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:253–65.
- [11] Sepulcre MP, Pelegrin P, Mulero V, Meseguer J. Characterisation of gilthead seabream acidophilic granulocytes by a monoclonal antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell Tissue Res* 2002;398:97–102.
- [12] Chaves-Pozo E, Muñoz P, López-Muñoz A, Pelegrin P, García Ayala A, Mulero V, et al. Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res* 2005;320:61–8.
- [13] Mulero I, Sepulcre MP, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19434–9.
- [14] Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J, Mulero V. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Mol Immunol* 2007;44:2009–16.
- [15] Chaves-Pozo E, Pelegrin P, García-Castillo J, García-Ayala A, Mulero V, Meseguer J. Acidophilic granulocytes of the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) produce interleukin-1beta following infection with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res* 2004;316:189–95.

- [16] Nakayasu C, Omori M, Hasegawa S, Kurata O, Okamoto N. Production of a monoclonal antibody for carp (*Cyprinus carpio* L.) phagocytic cells and separation of the cells. *Fish Shellfish Immunol* 1998;8:91–100.
- [17] Romano N, Picchietti S, Taverne-Thiele JJ, Taverne N, Abelli L, Mastrolia L, et al. Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Anat Embryol* 1998;198:31–41.
- [18] Köllner B, Blohm U, Kotterba G, Fischer U. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol* 2001;11:127–42.
- [19] Press CM, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9:309–18.
- [20] Mulero I, Chaves-Pozo E, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V, García Ayala A. Distribution of the professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during the ontogeny of lymphomyeloid organs and pathogen entry sites. *Dev Comp Immunol* 2007;31:1024–33.
- [21] Boehm T, Bleul CC, Schorpp M. Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. *Immunol Rev* 2003;195:15–27.
- [22] Rombout JH, Taverne-Thiele AJ, Villena MI. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Dev Comp Immunol* 1993;17:55–66.
- [23] Huttenhuis HB, Taverne-Thiele AJ, Grou CP, Bergsma J, Saeij JP, Nakayasu C, et al. Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system. *Dev Comp Immunol* 2006;30:557–74.
- [24] Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 2007;130:918–31.
- [25] López-Castejón G, Sepulcre MP, Roca FJ, Castellana B, Planas JV, Meseguer J, et al. The type II interleukin-1 receptor (IL-1RII) of the bony fish gilthead seabream *Sparus aurata* is strongly induced after infection and tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. *Mol Immunol* 2007;44:2772–80.

Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response

Iván Mulero, M. Pilar Sepulcre, José Meseguer, Alfonso García-Ayala, and Victoriano Mulero*

Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

Edited by Martin Flajnik, University of Maryland, College Park, MD, and accepted by the Editorial Board October 23, 2007 (received for review May 15, 2007)

Mast cells are important as initiators and effectors of innate immunity and regulate the adaptive immune responses. They have been described in all classes of vertebrates and seem to be morphologically and functionally similar. However, early studies had shown that fish and amphibian mast cells were devoid of histamine. In this study, we take a fresh look at the evolution of histamine and find that the mast cells of fish belonging to the Perciformes order, the largest and most evolutionarily advanced order of teleosts, are armed with histamine. More importantly, histamine is biologically active in these fish where it is able to regulate the inflammatory response by acting on professional phagocytes. In addition, the actions of histamine in these immune cells seem to be mediated through the engagement of H_1 and H_2 receptors, which, together with the H_3 receptor, are well conserved in bony fish. We propose that the storage of histamine in vertebrate mast cells and its use as an inflammatory messenger was established in primitive reptiles (Lepidosauria) ~276 million years ago. This same feature seems to have developed independently in Perciform fish much more recently in the Lower Eocene, between 55 and 45 million years ago, a short period during which the great majority of Percomorph families appeared.

lung fish amphibians inflammation eosinophilic granule cells phylogeny

The presence of mast cells (MCs) has been reported in all classes of vertebrates, including fish (1–4), amphibians (5), reptiles (6), birds (7), and mammals (8, 9). Several reports have described numerous granular cells in the intestinal mucosa, dermis, and gills of many teleost fish families, such as salmonids (10, 11), cyprinids (12, 13), and erythrinids (2, 14). In contrast, other studies have failed to find granular cells in the same tissues of other fish species (4) or have observed only very few granular cells (15, 16). Anyway, all these studies have shown that fish MCs constitute a heterogeneous cell population, which is exemplified by their heterogeneous morphology, granular content, sensitivity to fixatives, and response to drugs (17, 18). As regards this heterogeneity, one of the most controversial aspects is related to the staining properties of the cytoplasmic granules of MCs, which are frequently described as either basophilic or eosinophilic. Because of this, different authors have referred to them in different species as: mast cells, basophilic granular cells, or acidophilic/eosinophilic granule cells (EGCs) (17, 19).

Despite this heterogeneity, the main functional properties of MCs in teleosts are fairly similar to those of MCs in mammals. Thus, the granules of fish MCs are also known to contain components common to their mammalian counterparts, e.g., alkaline and acid phosphatases, arylsulphatase and 5'-nucleotidase (20, 21), lysozyme (22), and peptide antibiotics known as piscidins (23). As regards the two biogenic amines present in the granules of mammalian MCs, namely serotonin and histamine, all of the studies performed to date in fish have shown that fish MCs contain the former but lack the latter (12, 24, 25). In fact, it has been hypothesized that the storage of histamine in MCs and the powerful

actions of histamine on smooth muscle have evolved together at least twice: in the immediate ancestors of lungfish and in the immediate ancestors of primitive reptiles (24). This hypothesis is upheld by (i) the observation that histamine is stored in the MCs of all studied descendants of primitive reptiles but absent from fish and amphibians (12, 26) and (ii) many physiological experiments have demonstrated that fish, excluding lungfish, are unable to respond to the intravascular injection of histamine (24). However, the presence of histamine in the gastric mucosa, as a regulatory molecule of acid gastric secretion, is a general feature in all vertebrates (27). In this study, we look again at the evolution of histamine and find that MCs of fish belonging to the Perciformes order, the largest and most evolutionarily advanced order of teleosts, are endowed with histamine. More importantly, histamine is biologically active in these fish and able to regulate the inflammatory response by acting on professional phagocytic granulocytes.

Results

Gilthead Seabream MCs Are Found in the Gills and Intestine. We observed numerous cells in the connective tissue of the gills and intestine with the morphological and staining features of teleost MCs, i.e., the presence of numerous cytoplasmic granules that were strongly stained with eosin (Fig. 1*A* and *B*). Interestingly, two different eosinophilic cell types were observed in these organs by using the G7 monoclonal antibody (mAb), which is specific to gilthead seabream acidophilic granulocytes (AGs) (28): MCs (G7⁺ cells) and AGs (G7⁺ cells) (Fig. 1*B*). MCs were numerous in the gill arch, in the connective tissue surrounding the central cartilage of the gill filaments (Fig. 1*B*), and in the end of the gill filaments. In the intestine, MCs were numerous in the submucosa layer (Fig. 1*A*). Neither MCs nor AGs of gilthead seabream showed the metachromatic staining characteristic of mammalian MCs after being stained with toluidine blue at low pH (Fig. 1*C*).

Gilthead Seabream MCs Contain Histamine but Lack Serotonin. It is widely accepted that teleost fish and amphibians MCs lack histamine and, therefore, it is believed that the storage of histamine in these cells evolved in the immediate ancestors of primitive reptiles (24). Surprisingly, however, we found that gilthead seabream MCs (i.e., eosinophilic and G7⁺ cells) were strongly immunostained with an antibody against histamine (Fig. 1*D–L*). The specificity of the reaction was confirmed by preabsorption of anti-histamine with histamine [supporting information (SI) Fig. 6]. In contrast, gilthead seabream MCs were not immunostained with an antibody against serotonin (Fig. 1*M–O*), which, however, stained serotonergic

Author contributions: I.M. and V.M. designed research; I.M. and M.P.S. performed research; I.M., M.P.S., J.M., A.G.-A., and V.M. analyzed data; and I.M. and V.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission. M.F. is a guest editor invited by the Editorial Board.

To whom correspondence should be addressed. E-mail: vmulero@um.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0704535104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

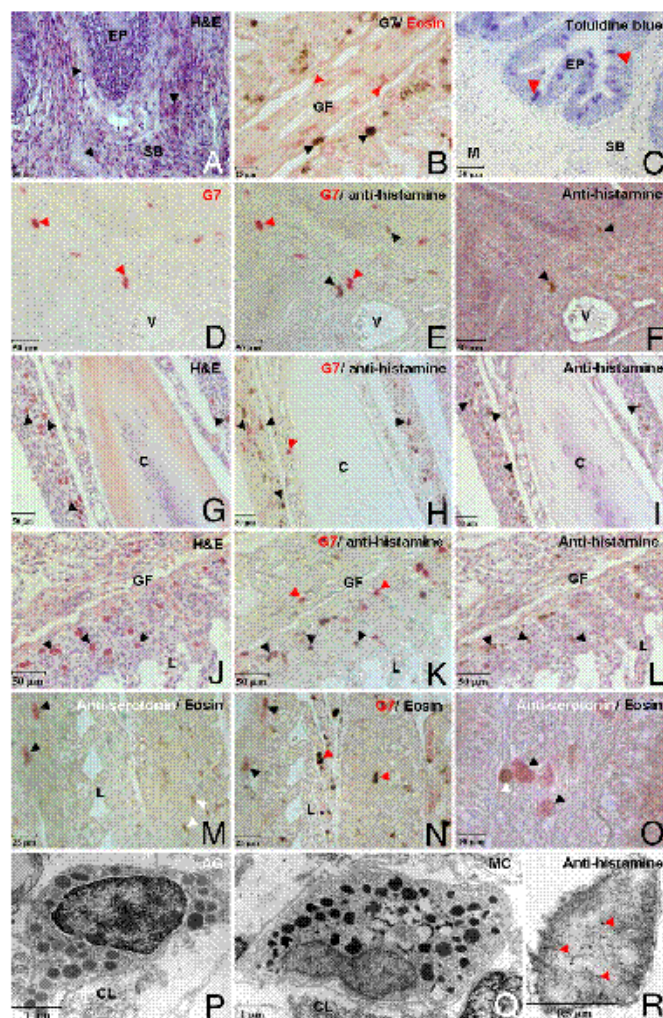


Fig. 1. Gilthead seabream MCs contain histamine and lack serotonin. (A–C) Sections of intestine (A and C) and gills (B) were stained with H&E (A), immunostained with the G7 mAb and slightly counterstained with eosin (B), or stained with toluidine blue at low pH (C). (D–F) Section of the intestine immunostained with the G7 mAb (D), with the G7 mAb and the anti-histamine antibody (E), or with the anti-histamine antibody alone (F). (G–L) Consecutive sections of healthy (G–I) or hyperplastic (J–L) gills were stained with H&E (G and J), immunostained with the G7 and the anti-histamine antibodies (H and K), or immunostained with the anti-histamine antibody (I and L). (M–O) Sections of the gills were immunostained with the anti-serotonin antibody (M and O) or with the G7 mAb (N) and then counterstained with eosin. M and N are consecutive sections. (P–R) Transmission electron micrographs of granular cells present in intestinal submucosa (P and Q) and immunoelectron microscopy using the anti-histamine antibody (R). (A) Cells showing a strong staining with eosin (black arrowheads) are numerous in the submucosa layer (SB) of the intestine. EP, intestinal epithelium. (B) AGs (black arrowheads, G7⁺) and MCs (red arrowheads, G7[−]) are seen in the gill filament. Note that both cell populations are eosinophilic but that only AGs are immunostained with the G7 mAb. (C) The cytoplasmic granules of MCs and AGs found in the intestine do not show metachromasia when stained with toluidine blue at low pH after being fixed in 10% formalin and 5% acetic acid in methanol. Note the strong metachromatic reaction of the goblet cells (red arrowheads) of the intestinal epithelium (EP). M, smooth muscle layer. SB, submucosa. (D–F) MCs present in the intestinal submucosa contain histamine (black arrowheads, G7⁺), whereas AGs (red arrowheads, G7[−]) do not. V, blood vessel. (G–I) Eosinophilic MCs (black arrowheads, G7[−]) observed in the connective tissue surrounding the cartilage (C) of the gill filament contain histamine. An AG (G7⁺) lacking histamine is depicted with a red arrowhead. Note that H and I correspond to the same section. (J–L) Eosinophilic MCs (black arrowheads, G7[−]) containing histamine (black arrowheads) were numerous in gills showing hyperplasia in the secondary lamellae (L). Several AGs (G7⁺) lacking histamine are depicted with red arrowheads. Note that K and L correspond to the same section. GF, gill filament. (M–O) Eosinophilic MCs (black arrowheads, G7[−]) lack serotonin. AGs (red arrowheads, G7⁺) and serotonergic neuroepithelial cells of the gills (white arrowheads) are observed. (P–R) Two granular cell types are observed in intestinal submucosa: a granular cell type showing the ultrastructural features of AGs and whose granules are not immunostained with the anti-histamine antibody (P) and a larger granular cell type with a more heterogeneous granular population (Q), which is ImmunoGold-labeled with the anti-histamine antibody (R). CL, collagen.

neuroepithelial cells in the gills (Fig. 1 M and O) and the fibers that innervate the smooth muscle of the intestine (data not shown). Importantly, AGs were negative for both histamine (Fig. 1 E, H, and K) and serotonin (Fig. 1 M and N), as shown by a double immunohistochemistry (IHC) using either the anti-histamine or anti-serotonin antibodies together with the G7 mAb. We also found that the number of MCs containing histamine, as well as the number of AGs, increased considerably in some specimens that naturally showed slight hyperplasia of the secondary lamellae of the gills (Fig. 1 J–L). Finally, two granular cell populations were found in the intestinal submucosa by transmission electron microscopy (Fig. 1 P and Q). One of them showed the ultrastructural features described for seabream AGs (28), whereas the other is larger (10 vs. 5 μ m) and showed a more heterogeneous granule population. Notably, only the granules of the latter are immunostained with the anti-histamine antibody (Fig. 1 R).

Histamine Kills Gilthead Seabream When Injected i.p. and Induces Contraction of the Intestinal Smooth Muscle *ex Vivo*. The above results prompted us to investigate whether histamine was able to exert any pharmacological effect on the gilthead seabream, because earlier studies showed that histamine had no great impact on the cardiovascular system, including blood pressure, heart rate, vascular smooth muscle, and permeability of capillaries or in the contraction of extravascular smooth muscle (24). We observed that gilthead seabream specimens rapidly died upon i.p. injection of 500 mg/kg of body weight of histamine, although lower concentrations had no effect (SI Table 1). Interestingly, compound 48/80, which is a potent histamine-releasing agent primarily from MCs (29), was also lethal at concentrations known to promote histamine release (SI Table 1). In addition, this effect was also induced by the H₂ receptor agonist dimaprit, but not with the H₁ receptor agonist pyridylethylamine or the H₃ receptor agonist immethridine (SI Table 2). However, we were unable to block this systemic effect of histamine and dimaprit by using nonlethal concentrations of different histamine receptor antagonists (SI Table 3). Therefore, we used the well established intestinal smooth muscle contraction assay to further study the pharmacological effects of histamine in the gilthead seabream. Again, it was observed that histamine, dimaprit, and compound 48/80 caused a strong contraction of the intestinal smooth muscle and constriction of branchial blood vessels, whereas pyridylethylamine failed to do so (Fig. 2 A–F and SI Table 4). In addition, all these effects of histamine were reversibly blocked by the H₂ receptor antagonist ranitidine (SI Table 4). Strikingly, *ex vivo* incubation of intestine and gill fragments with compound 48/80 resulted in the degranulation of MCs from both tissues (Fig. 2 J and K), whereas i.p. injection of this agent caused the degranulation of gill MCs (Fig. 2 L and M).

Histamine Regulates the Respiratory Burst of Gilthead Seabream Leukocytes. The presence of histamine in the granules of gilthead seabream MCs suggests that this molecule might play a role in the regulation of the fish inflammatory response, as occurs in higher vertebrates. Therefore, we stimulated total head kidney leukocytes and purified AGs with VaDNA in the presence of histamine or the specific H₁ and H₂ receptor agonists. The results show that histamine inhibited the *Vibrio anguillarum* (VaDNA)-primed respiratory burst of total head kidney leukocytes (Fig. 3A) and purified

gill filament. (M–O) Eosinophilic MCs (black arrowheads, G7[−]) lack serotonin. AGs (red arrowheads, G7⁺) and serotonergic neuroepithelial cells of the gills (white arrowheads) are observed. (P–R) Two granular cell types are observed in intestinal submucosa: a granular cell type showing the ultrastructural features of AGs and whose granules are not immunostained with the anti-histamine antibody (P) and a larger granular cell type with a more heterogeneous granular population (Q), which is ImmunoGold-labeled with the anti-histamine antibody (R). CL, collagen.

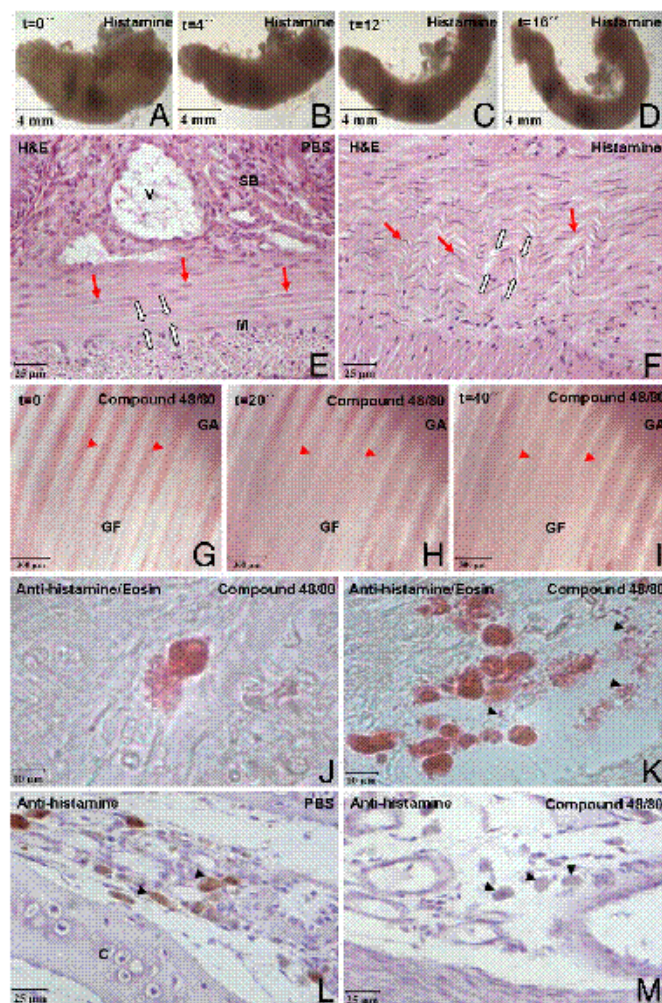


Fig. 2. Histamine regulates smooth muscle contraction in gilthead seabream. (A–D) An intestine fragment was treated with 5 mg/ml histamine, and images were taken every 4 s. (E and F) Sections of intestinal fragments treated for 1 min with PBS (E) or histamine (5 mg/ml) (F) were stained with H&E. Smooth muscle cells of intestine are relaxed (white arrows) and show round-oval nuclei (red arrows) after being incubated with PBS, whereas they are contracted (white arrows) and show very thin nuclei (red arrows) after being incubated with histamine. (G–I) A gill fragment was treated with 7.5 mg/ml compound 48/80, and images were taken every 20 s. Note that blood moves away from the branchial arteries after the addition of compound 48/80. (J and K) Sections of a gill fragment treated with compound 48/80 was immunostained with the anti-histamine serum and then counterstained with eosin. Note that eosin-positive cells show a strong degranulation (arrowheads), and a few of them are weakly immunostained for histamine. (L and M) Sections of the gill arch from PBS- (L) or compound 48/80-injected (M) fish were immunostained with the anti-histamine antibody. Note that cells showing immunoreactivity with the anti-histamine antibody are not observed in the gill of compound 48/80-injected fish, but several cells with the morphological features of MCs are present (black arrowheads). C, cartilage; GA, gill arch; GF, gill filament; SB, submucosa; M, smooth muscle layer; V, blood vessel.

AGs (Fig. 3B) in a dose-dependent manner. Interestingly, the H_1 agonist pyridylethylamine exerted the same effect and with a potency similar to histamine, whereas the H_2 agonist dimaprit at 10^{-4} M had the opposite effect and further increased the respiratory burst of gilthead seabream phagocytes (Fig. 3A and B). Cell viability was not significantly affected by the treatments and was $\approx 90\%$, except with 10^{-3} M (SI Fig. 7) and 10^{-2} M (data not shown) dimaprit, which reduced cell viability to 70 and 20% in total head kidney leukocytes, and 22 and 3% in AGs, respectively (data not

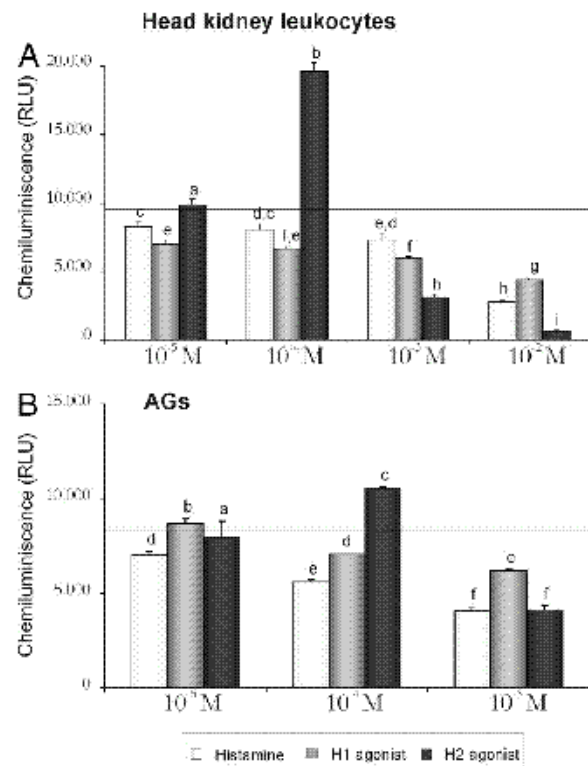


Fig. 3. Histamine regulates the respiratory burst of gilthead seabream phagocytes. Total head kidney leukocyte (A) or purified AG (B) suspensions were stimulated for 16 h with 50 μ g/ml VaDNA in the absence or presence of 10^{-5} to 10^{-2} M histamine, pyridylethylamine (H_1 receptor agonist), or dimaprit (H_2 receptor agonist). The respiratory burst activity was then measured as the luminol-dependent chemiluminescence triggered by PMA (1 μ g/ml). Data are presented as mean $\pm$ SE of triplicate cultures and are representative of three independent experiments. Different letters denote statistically significant differences between the groups according to a Waller Duncan test. The groups marked with "a" did not show statistically significant differences from cells stimulated with VaDNA alone, which is indicated with a horizontal line. RLU, relative light units.

shown and SI Fig. 7). Notably, only $\approx 20\%$ of live AGs were responsible for the chemiluminescence response of these cells after being treated with 10^{-3} M dimaprit, suggesting that the highest concentrations of this compound led to a strong activation of AGs that, in turn, induced their death. In addition, only AGs, but not lymphocytes, died in the presence of 10^{-3} M dimaprit, ruling out a toxic effect of this concentration of the compound on seabream leukocytes (SI Fig. 7).

Histamine Is Present Only in MCs of Perciformes Fish. We next studied whether MCs of the other main phylogenetic groups of teleosts and of lungfish also contain histamine. First, we studied the European seabass, which also belongs to the Perciformes order but to a different family (Moronidae), and found that MCs are quite similar to those of the gilthead seabream. Thus, seabass MCs were numerous in the gills and intestine, and their cytoplasmic granules were strongly stained with eosin (Fig. 4A), contained histamine (Fig. 4B), and were devoid of serotonin (data not shown). In sharp contrast, the granules of MC from the rainbow trout, which belongs to the order Salmoniformes, were not stained red with eosin but were stained purple with Giemsa (Fig. 4C), as described (30). These cells were observed in the connective tissue surrounding the gill filaments (data not shown) and in the intestine (Fig. 4C), where they formed a layer of one or two rows of cells between the stratum compactum and the circular muscle layer. More interestingly,

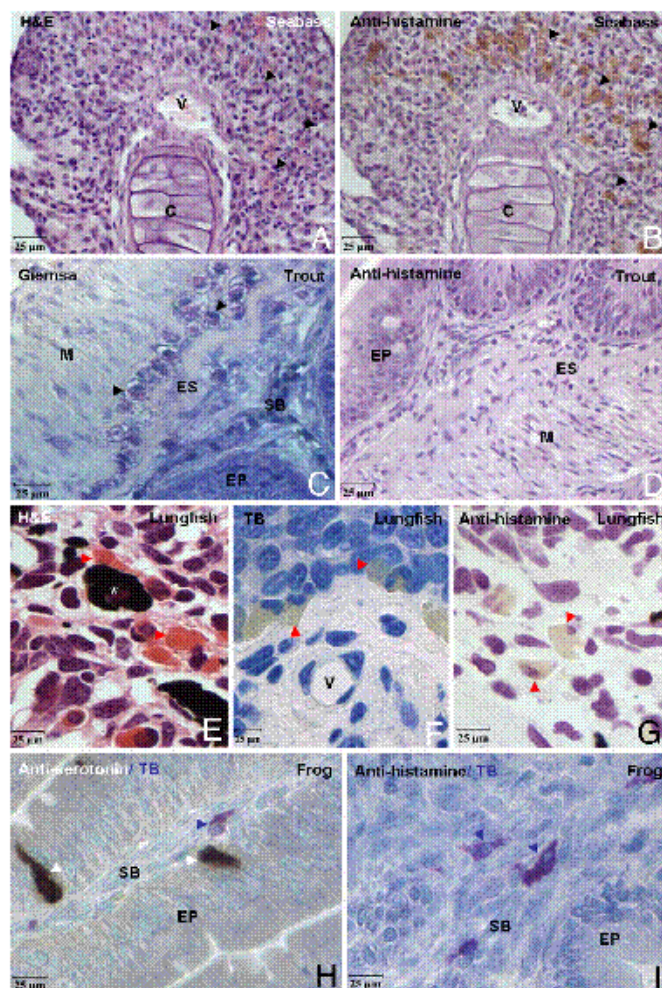


Fig. 4. Histamine is present only in MCs of Perciformes. Consecutive sections of seabass gills were stained with H&E (A) or immunostained with the anti-histamine antibody (B). Sections of rainbow trout intestine were stained with Giemsa (C) or immunostained with the anti-histamine antibody (D). Sections of lungfish intestine (E and G) and gills (F) were stained with H&E (E), toluidine blue (F), or anti-histamine antibody (G). Sections of frog intestine (H and I) immunostained with the anti-serotonin (H) or anti-histamine (I) antibodies and then counterstained with toluidine blue (TB). (A and B) Numerous eosinophilic MCs containing histamine (black arrowheads) are observed at the end of the gill filaments. C, cartilage; V, blood vessel. (C and D) Numerous MCs (black arrowheads) showing purple granules are seen between the smooth muscle layer (M) and the stratum compactum (ES) in the intestine. No histamine-positive cells are found in the intestine. EP, intestinal epithelium; SB, submucosal layer. (E–G) Numerous eosin-positive and metachromatic-negative MCs (red arrowheads) showing birefringent granules are observed in the intestinal submucosa and gills. No histamine-positive cells are found in the intestine. V, blood vessel; asterisk, pigment cell. (H and I) Several MCs located in the intestinal submucosa (SB) showing metachromasia after being stained with toluidine blue (blue arrowheads). Metachromatic MCs are not immunostained with anti-serotonin or anti-histamine sera. Note the presence of two serotonin-immunoreactive enteroendocrine cells (white arrowheads) in the intestinal epithelium (EP).

rainbow trout MCs were devoid of histamine (Fig. 4D) and serotonin (data not shown). Similarly, we did not find any histamine-positive cells in the gills and intestine from any of the other species analyzed, including zebrafish (Cypriniformes), European eel (Anguilliformes), and turbot and Senegalese sole (both Pleuronectiformes) (data not shown). In addition, both H&E and Giemsa staining failed to identify "typical" MCs, i.e., those showing eosinophilic granules, in the gills and intestine of all these species.

Notably, no serotonin-immunoreactive cells were found in the intestinal submucosa of all these species, although a few serotonin-immunoreactive enteroendocrine cells were located in the intestinal mucosa of trout and eel (data not shown). Finally, numerous eosin-positive/metachromatic-negative cells were observed in the intestinal submucosa and gills of lungfish (Fig. 4E and F), but they were devoid of histamine (Fig. 4G) and serotonin (data not shown).

We also extend our study to two of the main groups of amphibians: frogs and newts. MCs of the intestinal submucosa of the frog showed metachromasia after being stained with toluidine blue at low pH but are devoid of histamine and serotonin (Fig. 4H and I). Although no histamine-immunoreactive cells were observed in the intestine of the frog, some enteroendocrine cells located in the intestinal epithelium were immunostained with the anti-serotonin antibody (Fig. 4H). Similar results were obtained in the newt; that is, MCs showed metachromasia after being stained with toluidine blue but they do not contain histamine or serotonin (data not shown). Strikingly, the i.p. injection of up to 500 mg/kg of histamine and 15 mg/kg of compound 48/80 are not lethal for the frogs, and both molecules failed to induce the contraction of the intestinal smooth muscle of this species (data not shown).

Discussion

MCs are present in adult mammals in virtually all vascularized tissues (31). They have been described in all classes of vertebrates and seem to be morphologically and functionally similar to their mammalian counterparts. Perhaps one of the most controversial aspects of the biology of MCs of early vertebrates concerns the presence of histamine in their granules. Using a spectrofluorometric method (32), earlier studies had shown that fish and amphibian MCs were devoid of histamine (12, 26), whereas its presence in the gastric mucosa, as a regulatory molecule of acid gastric secretion, was a general feature of all vertebrates (27). More recently, however, the presence of very low amounts of histamine in the granules of frog MCs has been revealed by IHC (33). More importantly, these observations were further supported by numerous physiological and pharmacological studies showing that most fish and amphibian species were unable to significantly respond to the intravascular injection of histamine (24). To the best of our knowledge, however, no Perciformes species were included in any of these pharmacological studies and most morphological studies involving histamine (24). In the present study, we use IHC to describe the presence of histamine in the MCs of teleost fish belonging to the order Perciformes, the largest and most evolutionarily advanced order of teleosts, as well as the absence of this molecule in lungfish and amphibian MCs. We also show that teleost, lungfish and amphibian MCs are devoid of serotonin, another important inflammatory mediator released by mammalian MCs upon activation (7, 8). In addition, these morphological observations are accompanied by several functional assays that demonstrate that histamine is able to induce specimen death, contraction of the intestinal smooth muscle, and constriction of branchial blood vessels in gilthead seabream. Strikingly, compound 48/80, which is a powerful histamine-releasing agent from mammalian MCs (29), induced the degranulation of seabream MCs and exerted the same physiological effects as histamine, suggesting that the release of endogenous histamine from seabream MCs mediates the observed pharmacological effects of this agent. In sharp contrast, however, histamine and compound 48/80 were not lethal for frog, which further supports our observation on the absence of histamine in amphibian MCs. Further, all of the observed action of histamine in seabream MCs may be mediated by the engagement of H_2 receptor, because only the H_2 agonist dimaprit, but not H_1 or H_3 agonists, was also able to induce specimen death and smooth muscle contraction. Although future studies aimed at the characterization of the fish histamine receptors are required, well conserved (60% amino acid similarity between fish and mammals) homologues for H_1 , H_2 , and H_3 receptors have been identified in the zebrafish, shown to be

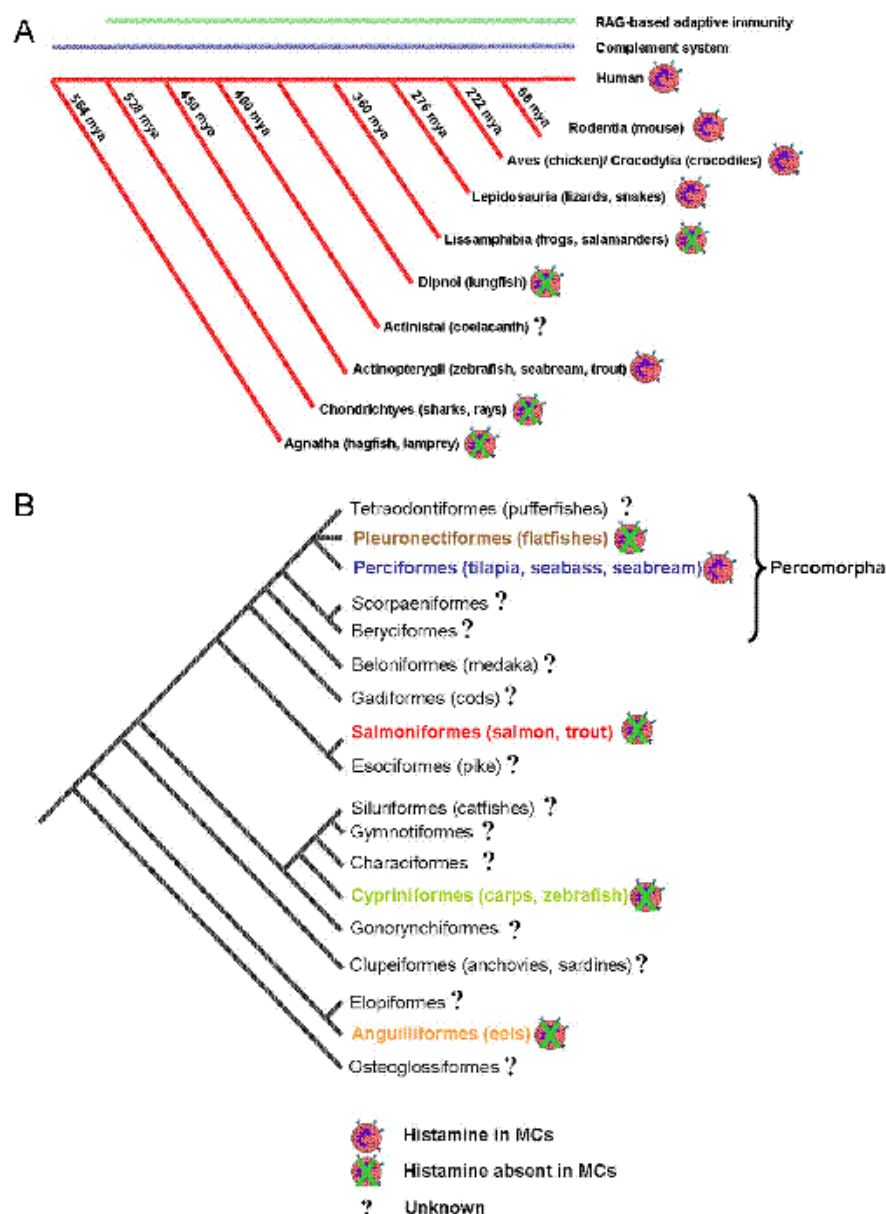


Fig. 5. Evolutionary model for the storage of histamine in vertebrate MCs and its utilization as an inflammatory messenger. (A) Phylogeny showing the dates of the last common ancestors between the represented classes and human beings. Dates are given as molecular clock estimates (44), and commonly used model species are enclosed in parentheses. The emergence of various physiological and immunological features is shown at the top of the figure. Adapted from DeVries et al. (45). (B) Cladogram showing the phylogenetic relationships between the most important orders of ray-finned fishes (Actinopterygii). Adapted from Trapani (46). The orders analyzed in this study are shown in different colors.

expressed in the brain and a few other tissues, and found to regulate swimming behavior of young larvae (34). In addition, it has been reported that several antagonists specific for human histamine receptors can effectively inhibit fruit fly histamine receptors *in vivo* and *ex vivo* (35). Collectively, these data support our pharmacological experiments and, therefore, strongly suggest a role for histamine in fish.

We also show that histamine is important in the regulation of fish professional phagocyte activity. Histamine and the H_1 receptor agonist pyridylethylamine were both found to strongly inhibit the phagocyte respiratory burst activity primed by bacterial DNA, whereas an H_2 agonist had the opposite effect; that is, it further increased this activity. Hence, histamine may regulate fish phagocyte functions in a complex manner through the engagement of different receptors, as has been shown in murine macrophages,

where histamine acting on H_1 and H_2 receptor restricts the growth of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin via the production of interleukin-18 (36). In contrast, in an *Escherichia coli* infectious peritonitis model, histamine acting on H_1 and H_2 receptors impaired neutrophil recruitment, which delayed the elimination of bacteria (37). Whatever the outcome, our results suggest that fish phagocyte functions may be regulated by the release of histamine from MCs upon their activation. One interesting question that remains to be clarified is the mechanism by which fish MCs are activated, because IgE is not present in this group of animals, and the “classical” activation mechanism of mammalian MCs involves engagement of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) by IgE bound to specific antigens (38). Nevertheless, apart from activation via FcεRI, MCs are also activated to release some of the same mediators after the aggregation of surface FcγRIII by IgG/antigen

complexes and after exposure to a range of small peptides, including chemokines, the anaphylatoxins C3a and C5a, and fragments of fibrinogen and fibronectin (31, 38). More recently, heterotypic aggregation with activated T cells (39) and the direct recognition of soluble mediators derived from infectious agents, such as lipopolysaccharide, have also been found to induce MC activation and mediator release (40). All these "alternative" mechanisms may operate in the activation of fish MCs, because the presence of receptors for IgM (41), anaphylatoxins (42) and soluble mediators derived from infectious agents (43) are all functional in these animals.

Based on our data, we propose an alternative model for the origin and evolutionary history of histamine in MCs (Fig. 5). It is possible that although the storage of histamine in MCs and its use as an inflammatory messenger was established in primitive reptiles (Lepidosauria) ≈ 276 mya (44), this same feature developed independently in Perciform fish in the Lower Eocene, between 55 and 45 mya, a short period during which the great majority of Percomorph families appeared (47). It is striking that piscidins had a similar evolutionary history, because only the MCs of Perciformes are endowed with these antimicrobial peptides (48). However, a related family of antimicrobial peptides, called pleurocidins, are synthesized by MCs of the Atlantic halibut (49), a flat fish belonging to the order Pleuronectiformes and the family Pleuronectidae. This sharply contrasts with our results in two fish species representative of the order Pleuronectiformes, turbot (*Scophthalmidae*) and Senegalese sole (*Soleidae*), whose MCs are not stained with eosin and lack histamine. Collectively, these results suggest great heterogeneity in the mediators produced by the MCs of different species and point to the complexity of the evolutionary history of these immune cells.

Materials and Methods

Animals. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Perciformes, Sparidae) specimens (10–150 g) were kept in 260 liters of running-seawater aquaria (flow rate 1,500 liter/h) at 23°C under a 12-h light/dark cycle and fed with a commercial pellet diet (Skretting) at a feeding rate of 15 g of dry diet per kilogram biomass of fish per day. Zebrafish (*Danio rerio* H., Cypriniformes, Cyprinidae) of the

TL genetic background were kindly provided by the Zebrafish International Resource Center and maintained as described in the Zebrafish handbook (50). Other fish and amphibian species used in this study are described in *SI Materials and Methods*.

Microscopy and IHC. Intestine and gill sections were subjected to an indirect IHC method (51) using the G7 mAb, which is specific to gilthead seabream AGs (28), or the polyclonal antibodies against histamine (Sigma) and serotonin (TNC). Sample processing, section staining and IHC protocols are described in detail in *SI Materials and Methods*.

Pharmacological Assays. This section is described in *SI Materials and Methods*.

Respiratory Burst Assay. Total gilthead seabream head kidney leukocytes were obtained as described (28). AGs, the professional phagocytic granulocytes of this species, were isolated by magnetic-activating cell sorting (MACS) using the G7 mAb (28). Total head kidney leukocyte or purified AG suspensions were stimulated for 16 h with 50 μ g/ml phenol-extracted genomic DNA from the bacterium *Vibrio anguillarum* ATCC19264 (VaDNA) in the absence or presence of 10^{-5} to 10^{-2} M histamine, pyridylethylamine, or dimaprit. The respiratory burst activity of phagocytes was then measured as the luminol-dependent chemiluminescence triggered by phorbol myristate acetate (PMA) (43). Cell viability was checked in parallel samples by flow cytometry analysis of cells stained with 40 μ g/ml propidium iodide.

Statistical Analysis. Data were analyzed by ANOVA, and a Waller-Duncan multiple range test was used to determine differences between groups.

We thank Drs. B. Novoa (Instituto de Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain), A. Estepa (Miguel Hernandez University, Spain), R. Barrera (Valenciana de Acuicultura, Spain), M. L. Ribeiro (Universidade Federal do Pará, Brazil) and R. DaMatta (Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brazil) for providing some of the specimens or tissue samples used in this study. This work was supported by Spanish Ministry of Education and Science Grant BIO2005-05078 (to V.M.) and a Fundación Séneca-Murcia Fellowship (to J.M.).

1. Roberts RJ, Young H, Milne JA (1971) *J Fish Biol* 4:87–98.
2. Chiamini-García H, Ferreira RMA (1992) *Bloch J Fish Biol* 41:155–157.
3. Reite OB (1996) *Fish Shellfish Immunol* 6:363–369.
4. Reite OB (2005) *Fish Shellfish Immunol* 19:253–267.
5. Chiu H, Lagunoff D (1972) *Histochem J* 4:135–144.
6. Saito Y, Filha D, Taga R (1973) *Arch Histol Jap* 36:79–84.
7. Selye H (1965) *The Mast Cells* (Butterworths, Washington DC).
8. Galli SJ (1990) *Lab Invest* 62:5–33.
9. Chiamini-García H, Pereira FM (1999) *Tissue Cell* 31:318–326.
10. Vallejo AN, Jr, Ellis AE (1989) *Dev Comp Immunol* 13:133–148.
11. Dorin D, Sire MF, Vernier JM (1993) *Bol Cell* 79:219–224.
12. Reite OB (1965) *Nature* 206:1334–1336.
13. Temkin RJ, McMillan DB (1986) *J Morphol* 190:9–26.
14. Vicha DL, Schmale MC (1994) *Anticancer Res* 14:947–952.
15. Buddington RK, Doroshov SI (1986) *J Morphol* 190:201–213.
16. Williams JA, Nickol BB (1989) *J Fish Biol* 35:359–372.
17. Reite OB (1998) *Fish Shellfish Immunol* 8:489–513.
18. Reite OB, Evensen O (2006) *Fish Shellfish Immunol* 20:192–208.
19. Ellis AE (1977) *Fish Biol* 11:453–491.
20. Ezeasor DN, Stokoe WM (1980) *J Fish Biol* 17:619–634.
21. Powell MD, Briand HA, Wright GM, Burka JF (1992) *Histol Histopathol* 7:301–305.
22. Sveinbjörnsson B, Olsen R, Paulsen S (1996) *J Fish Dis* 19:349–355.
23. Silphaduang U, Naga EJ (2001) *Nature* 414:268–269.
24. Reite OB (1972) *Physiol Rev* 52:778–819.
25. Dezfali BS, Arrighi S, Dameneghini C, Bosi G (2000) *J Fish Dis* 23:265–273.
26. Takada K, Fujita T, Endo K (1967) *Nature* 215:776–777.
27. Reite OB (1969) *Experientia* 25:276–277.
28. Sepulcre MP, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J (2002) *Cell Tissue Res* 308:97–102.
29. Lagunoff D, Martin TW, Read G (1983) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:331–351.
30. Reite OB (1997) *Fish Shellfish Immunol* 7:567–584.
31. Mekori YA, Metcalfe DD (2000) *Immunol Rev* 173:131–140.
32. Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH (1959) *J Pharmacol Exp Ther* 127:182–186.
33. Chieffì-Baccari G, Paulis A, Di Mateo L, Gentile M, Marone G, Minucci S (1998) *Cell Tissue Res* 292:151–162.
34. Peisaro N, Sundvik M, Anichtchik OV, Kaslin J, Panula P (2007) *Biochem Pharmacol* 73:1205–1214.
35. Gisselmann G, Pusch H, Hovemann BT, Hall H (2002) *Nat Neurosci* 5:11–12.
36. Megyeri K, Buzas K, Miczak A, Buzas E, Kovacs L, Szeprenyi G, Falus A, Mandi Y (2006) *Microbes Infect* 8:1035–1044.
37. Hori Y, Nihei Y, Kurokawa Y, Kuramasu A, Makabe-Kobayashi Y, Terui T, Doi H, Satomi S, Sakurai E, Nagy A, et al. (2002) *J Immunol* 169:1978–1983.
38. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M (2005) *Annu Rev Immunol* 23:749–786.
39. Inamura N, Mekori YA, Bhattacharyya SP, Bianchini PJ, Metcalfe DD (1998) *J Immunol* 160:4026–4033.
40. Nigo YI, Yamashita M, Hirahara K, Shimokawa R, Inami M, Kimura M, Hasegawa A, Kohno Y, Nakayama T (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2286–2291.
41. Stafford JL, Wilson M, Nayak D, Quinlan SM, Clem LW, Miller NW, Bengten E (2006) *J Immunol* 177:2505–2517.
42. Bashra H, Wang T, Hove-Madsen L, Hansen J, Li J, Matlapudi A, Secambes CJ, Tort L, Sunyer JO (2005) *J Immunol* 175:2427–2437.
43. Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J, Mulero V (2007) *Mol Immunol* 4:2019–2026.
44. Kumar S, Hedges SB (1998) *Nature* 392:917–920.
45. DeVries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Robinson J, Kelvin DJ (2006) *J Immunol* 176:401–415.
46. Trapani J (2001) *Copeia* 1:35–51.
47. Johnson GD, Patterson C (1993) *Bull Mar Sci* 52:554–626.
48. Silphaduang U, Colom A, Naga EJ (2006) *Dis Aquat Organ* 72:241–252.
49. Murray HM, Gallani JW, Douglas SE (2002) *Cell Tissue Res* 312:197–202.
50. Westerfield M (2000) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* (Univ of Oregon Press, Eugene, OR).
51. Sternberger LA (1986) *Immunocytochemistry* (Wiley, New York), 3rd Ed.

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.

Iván Mulero¹, Edward J. Noga², José Meseguer¹, Alfonsa García-Ayala¹ and Victoriano Mulero^{1,*}

¹Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, University of Murcia, 30100 Murcia. Spain.

²Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, 4700 Hillsborough Street, Raleigh, North Carolina 27606, USA

*To whom correspondence should be sent at: Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, University of Murcia. 30100 Murcia. Spain. Tel: +34 968 367581; Fax: +34 968 363963; E-mail: vmulero@um.es

Running head: Role of piscidins in fish phagocytes

Keywords: mast cells, acidophilic granulocytes, piscidins, phagocytosis, evolution

Submitted to: Developmental & Comparative Immunology

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are increasingly recognized as a critical first line of defence against many pathogens. The genes encoding these peptides are expressed in numerous tissue and cell types from a wide variety of different species including mammals, amphibians, fish and insects. In this study, we report that the AMPs called piscidins were primarily present in the mast cells (MCs) of fish and were only identified in fish belonging to the Order Perciformes. It is striking that histamine was seen to have a similar evolutionary history, since the only piscine MCs endowed with this molecule are in the Perciformes. We also show that both MCs and professional phagocytic granulocytes are armed with different piscidin molecules. Thus, the granules of MCs contained piscidin 1 and 3, together with histamine, while phagocytic granulocytes, which are devoid of histamine, were only immunostained with the piscidin 3 antibody. In contrast, macrophages are devoid of both piscidins. More importantly, we also show by immunoelectron microscopy that piscidin 3 is delivered to the bacteria-containing phagolysosome of AGs upon phagocytosis, suggesting a role for these AMPs in the killing of both extracellular and intracellular pathogenic bacteria.

INTRODUCTION

Antimicrobial peptides (AMPs) are increasingly recognized as a critical first line of defence against many pathogens. The genes encoding these peptides are expressed in numerous tissue and cell types from a wide variety of different species including mammals, amphibians, insects, and fish [1]. Most AMPs share the broad spectrum of antimicrobial activity, cationic properties and an amphipathic secondary structure [2].

Several AMPs have been found in teleostean fish. In Salmoniformes, two peptide families were identified from Atlantic salmon, *Salmo salar* [3] and from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [4]. In Perciformes, the most evolutionary advanced Order of fish, three families of AMPs have also been identified: moronecidin from *Morone saxatilis* and *Morone chrysops* [2], piscidin (also named moronecidins) from hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) [5], and several hepcidin-related AMPs, from *M. chrysops* [6], *Chrysophrys major* [7], *Acanthopagrus schlegelii* and *Lateolabrax japonicus* [8,9]. In Pleuronectiformes (flatfishes), several pleurocidins have been reported from *Pseudopleuronectes americanus* [10,11], *Hippoglossus hippoglossus*, *Glyptocephalus cynoglossus*, *Limanda ferruginea*, and *Hippoglossoides platessoïdes* [12]. Pleurocidin and moronecidin share a remarkable degree of homology in both peptide and genomic organization [11,13], suggesting an evolutionary relationship between these two AMPs [2].

In higher vertebrates, many of these peptides have been found to be associated with epithelial layers [14] or are synthesized and secreted by circulating neutrophils and/or tissue mast cells (MCs) [1,5,15]. In fish, although the presence of piscidins has been demonstrated in the MCs of Perciformes, it is unknown whether fish professional phagocytes are armed with piscidin. In this study, we report the presence of piscidins in immune cells of the teleost fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Perciformes, Sparidae) and the finding

that both MCs and professional phagocytic granulocytes, namely acidophilic granulocytes (AGs), are armed with different piscidin molecules. In contrast, gilthead seabream macrophages are devoid of these AMPs. In addition, the immune cells of all other teleostean Orders tested, including Anguilliformes (European eel), Cypriniformes (zebrafish), Salmoniformes (rainbow trout) and Pleuronectiformes did not contain piscidins. These results suggest that piscidins and histamine had a similar evolutionary history, since only the MCs of Perciformes are endowed with histamine. Finally, we also show by immunoelectron microscopy that piscidin 3 is delivered to the bacteria-containing phagolysosome of AGs upon phagocytosis, suggesting a dual role for these AMPs in the killing of both extracellular and intracellular pathogenic bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Perciformes, Sparidae) specimens with a body weight of 150 g were kept in 260 liter, running seawater aquaria (flow rate 1,500 liter/h) at 23 °C under a 12-h light/dark cycle and fed with a commercial pellet diet (Skretting) at a feeding rate of 15 g of dry diet per kilogram biomass of fish per day. Zebrafish (*Danio rerio* H., Cypriniformes, Cyprinidae) of the TL genetic background were kindly provided by the Zebrafish International Resource Center and maintained as described in the Zebrafish handbook [16]. Senegalese sole (*Solea senegalensis* K., Pleuronectiformes, Soleidae) were obtained from Murcia Oceanographic Centre (IEO). Turbot (*Psetta maxima* L., Pleuronectiformes, Scophthalmidae) samples were kindly provided by Dr. B. Novoa, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., Salmoniformes, Salmonidae) by Dr. A. Estepa and European eel (*Anguilla anguilla* L., Anguilliformes, Anguillidae) by Dr. R. Barrera. Head-kidney, spleen, gill and intestine fragments were obtained and processed for light microscopic studies (see below). All animal studies were carried out in accordance with the European Union regulations for animal experimentation (86/609/EU).

Phagocytosis assay

Phagocytosis by gilthead seabream head-kidney AGs was studied by flow cytometry, as described elsewhere [17]. Briefly, aliquots of 5×10^7 head-kidney cells were challenged with 10^9 FITC (Sigma)-labeled *Vibrio anguillarum* strain R-82 (kindly provided by Dr. A.E. Toranzo) or 2.5×10^8 Texas Red-conjugated *Escherichia coli* strain K-12 (Invitrogen), centrifuged at $300 \times g$ for 5 minutes, resuspended and incubated for 60

minutes at 25°C in a light-protected environment. After the incubation period, the phagocytosis was stopped in ice-cold PBS and the fluorescence of non-ingested bacteria was quenched with a solution of 0.4% trypan blue in PBS. The number of green and red fluorescent cells (phagocytic cells) was analyzed by flow cytometry and then the cells were processed for electron microscopy (see below).

Microscopy and immunohistochemistry (IHC)

Head kidney, spleen, gills and intestine fragments from gilthead seabream were fixed overnight in Bouin fluid, embedded in Paraplast Plus (Sherwood Medical) and sectioned at a thickness of 5 µm. After being dewaxed and rehydrated, some sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) while others were subjected to an IHC method using affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against synthetic peptides of piscidin 1 (diluted 1:50), piscidin 3 (diluted 1:200) [18] and Mcsfr (diluted 1:100; which is specific to gilthead seabream macrophages [19]); or with a commercial rabbit antibody against histamine (Sigma) or the G7 mAb, which is specific to gilthead seabream AGs [20]. Production of specific antibodies to piscidin 3 were prepared as described for piscidin 1 [18]. Briefly, a synthetic peptide constituting the C-terminus of piscidin 3 (HAGRSIGRFLTG) was conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and then injected into rabbits. The antiserum was then affinity purified by running over a column having the 12-mer piscidin fragment conjugated to cyanogen bromide-activated agarose as an immunosorbent. The resulting titer of the affinity-purified Ab was 1:13,000 via ELISA. The peptide-specific antibody had less than 1% cross-reactivity by ELISA, where 1% cross-reactivity is 100 times more antibody than is required to produce the same optical

density with either free KLH, conjugated KLH, or free peptide that shares less than 3 amino acids in the sequence.

The sections for the Mcsfr immunostaining were incubated in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1 mM, pH 8.0) at 95 °C for 20 minutes to retrieve the antigen and then cooled to room temperature [19]. For tests with all antibodies, the samples were incubated for 40 min in peroxidase quenching solution (H_2O_2 in methanol, 1:9) to eliminate the endogenous peroxidase activity and then rinsed in PBS (pH 7.2-7.4) and in PBS containing 0.01% BSA and 0.2% Triton X-100 (PBT). After 30 min incubation with PBS containing 0.5% BSA to block any non-specific reaction, they were rinsed in PBT and incubated for 2 h at room temperature with the different specific antibodies detailed above. After washing in PBT, the sections were exposed for 1 h at room temperature to anti-rabbit IgG (whole molecule)-biotinylated antibody produced in swine (Dako Cytomation) diluted 1:100. Afterwards, the samples were washed in PBT and incubated for 1 h at room temperature with the avidin-biotinylated peroxidase complex (Dako Cytomation) according to the manufacturer's instructions.

All of the samples were then washed in PBT and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) and the peroxidase activity was revealed by incubation for 5 min at room temperature with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in Tris-HCl buffer containing 0.05% H_2O_2 . The specificity of each reaction was determined by omission of the first antibody; no immunostaining was observed in these negative controls. The sections were lightly counterstained with haematoxylin, dehydrated, mounted in DPX and examined under an Axiolab microscope (Zeiss). The photographs were obtained with a digital camera CoolSNAP (RS Photometrics) using a Pentium III computer with a CoolSNAP (RS Photometrics) software.

Other sections were subjected to a double IHC method using the G7 mAb antibody together with the anti-piscidin 3 [21]. Sections were exposed to the G7 mAb as described above and then incubated for 1 h at room temperature with an anti-mouse IgG (whole molecule)-alkaline phosphatase antibody produced in goat (Sigma) diluted 1:50. The samples were then washed in PBT and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) and the alkaline phosphatase activity revealed by incubation for 5 min at room temperature with Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma). The sections were mounted in glycerine and immediately examined and photographed. After identification of the AGs, a second immunostaining reaction was performed on the same sections, which were then incubated with the anti-piscidin 3 as described above. The sections were again mounted in glycerine and photographed. Finally, the sections were lightly counterstained with hematoxylin, dehydrated (the red staining from the alkaline phosphatase activity is lost after dehydration), mounted in DPX, re-examined and photographed.

For immunoelectron microscopy, cells from the phagocytosis assay and fragments of gills of about 1 mm³ were fixed in 2.5% glutaraldehyde and some of them were then postfixated in 1% OsO₄ (both in 0.1% cacodylate buffer, pH 7.2-7.4). After dehydration, the samples were embedded in Epon and sectioned. Ultrathin sections were placed on nickel grids, oxidized with sodium metaperiodate to restore specific labeling, rinsed with distilled water, and treated with 50 mM PBS-glycine for 10 min followed by three successive rinses with PBS containing 0.2% gelatin and 0.5% BSA (PBG). The grids were then incubated overnight at 4 °C with the anti-piscidin 3 diluted in PBG (1:20-1:100). After six successive rinses with PBG, the sections were exposed for 1 h at 20°C to goat anti-rabbit IgG-gold conjugate, 10 nm (Sigma) diluted 1:25 in PBG. The grids were rinsed six times with PBG, three times with PBS-glycine, and finally with distilled water. The sections were then

contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined with Zeiss EM 10C transmission electron microscope. The specificity of each reaction was determined by omission of the first antibody; no immunostaining was observed in these negative controls.

RESULTS

Gilthead seabream MCs and AGs are armed with piscidin 3

We first analyzed the localization of antimicrobial peptide piscidin 3 in intestine, gills and head-kidney. We have previously shown that there are two different eosinophilic cell populations in the intestine and gills of the gilthead seabream that can be differentiated by using either the mAb G7, which is specific to the AGs of this species [20], or a commercial polyclonal antibody to histamine. These two populations are: AGs (G7⁺/His⁻ cells) and MCs (G7⁻/His⁺ cells) [21]. MCs of the submucosa layer of the intestine (Figs. 1A and B) and of the gill arches (data not shown) were positive for piscidin 3, as were circulating (Figs. 1C and D) and head-kidney AGs (Figs. 1G and H). In contrast, macrophages, the other professional phagocytic cell type of the gilthead seabream, did not contain piscidin 3 (Figs. 1K and L).

We next studied whether piscidin 3 was present in the other major phylogenetic groups of teleosts, finding that piscidin 3 positive cells did not occur in the intestine or gills from any of the other species analyzed, including European eel (Anguilliformes), zebrafish (Cypriniformes), rainbow trout (Salmoniformes), and turbot and Senegalese sole (both Pleuronectiformes) (data not shown).

Piscidin 3 is delivered to the bacteria-containing phagosome in AGs

We next studied by transmission electron microscopy the immunolocalization of piscidin 3 in AGs following phagocytosis of killed *E. coli* or *V. anguillarum*. An efficient uptake of the bacteria by AGs was confirmed by flow cytometry (data not shown), as described previously [20]. As expected, numerous cells with the ultrastructural features of gilthead seabream AGs [20,22,23] contained ingested *E. coli* within phagosomes that were

adjacent to several round to oval, cytoplasmic granules with a dense core surrounded by a electron-dense halo (Fig. 2A). These granules have been described as the type II granules of gilthead seabream AGs and seem to correspond to the specific granules found in mammalian acidophils [24,25]. Strong immunostaining was only observed with the anti-piscidin 3 Ab in the electron-dense halo of the type II granules, whereas the core of these granules was not immunogold-labeled (Fig. 2B). Interestingly, the anti-piscidin 3 Ab labeled the ingested bacteria after phagocytosis, suggesting that the piscidin 3 was delivered to the bacteria-containing phagosomes by their fusion with the type II granules (Fig. 2C). Gold particles were seen over the electron-dense bacterial contents (Fig. 2C). We obtained the same results when AGs were incubated with *V. anguillarum* (data not shown).

Piscidin 1 is present in gilthead seabream MCs, but not AGs

The N-terminal of piscidin 3 is also shared with piscidin 1, the founder member of the piscidin family that has previously been identified in the granules of MCs of Perciformes fish [5,18]. Therefore, we used an antibody against the conserved N-terminal epitope of piscidin 1 in gilthead seabream tissues. Unexpectedly, the anti-piscidin 1 failed to immunostain spleen and head-kidney AGs (Figs. 3A and H). Similarly, no piscidin 1 positive MCs or AGs were observed in the submucosa layer of the intestine (data not shown) even though these cells immunoreacted with the anti-piscidin 3 (Figs 1A-D). However, eosinophilic MCs of the gill filaments immunoreacted with this antibody (Figs. 3C and D) and the anti-histamine (Figs. 3E and F). Furthermore, gill MCs were also positive for piscidin 1 and piscidin 3 (Figs. 3G and H).

DISCUSSION

We report for the first time in the teleost fish gilthead seabream that two immune cells of different origin, tissue distribution and defense functions, namely MCs and AGs, are armed with piscidin AMPs. More importantly, the specific granule population of AGs, the type II granules, contained piscidin 3, which is released into the phagosome where it might contribute to the killing of ingested pathogenic bacteria. Using the antibody to the highly conserved N-terminus of the piscidin family, we confirmed and extended the results of a previous study [18], which showed that piscidins were primarily present in the MCs of fish and were only identified in fish belonging to the Order Perciformes. These results suggest that piscidins are evolutionarily widespread within the Order Perciformes, the largest and most evolutionarily advanced order of teleosts and the largest living vertebrate order (Fig. 4). It is striking that histamine was seen to have a similar evolutionary history, since the only piscine MCs endowed with this molecule are in the Perciformes [21]. Unexpectedly, we found that MCs of the intestinal submucosa and AGs were negative for piscidin 1 but positive for piscidin 3. While the piscidin 1 antibody should theoretically react with all piscidins, the piscidin 3 antibody is specific for the C-terminus of piscidin 3, which differs considerably for piscidins 1 and 2. Although the immunoreactivity also depends upon the affinity of the antibodies for the specific epitopes in the target cells, which is related to the actual sequences of these AMPs in gilthead seabream, our results suggest that there might be a different subfamily of AMPs that are not necessarily expressing the conserved N-terminus of the piscidin family but rather might be defined by the C-terminus of piscidin 3.

Piscidins and pleurocidins have been localized in epithelial cells in skin [10,18,27] and intestine [10,18] where they might act as a barrier to antimicrobial invasion at the

epithelial interface. We found piscidins in the MCs of the gills and intestine of the gilthead seabream, which also suggests a protective effect against microbial invasion in these organs that are considered as important portal of entry for fish pathogens [28]. MCs may afford protection not only at gills and intestine, but also in tissues where circulating MCs migrate as a result of injury or inflammation. MCs are generally thought to be involved in the non-specific innate defense systems of fish and have been shown to degranulate in response to numerous immunological challenges or chemical stimulations, e.g., inoculation with *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* toxins, compound 48/80, formalin-killed *A. salmonicida*, substance P, and capsaicin [21,29-31]. MCs have also been noted to respond, by migration and degranulation, to parasitized intestine, gills, and skin [32]. Similarly, others have shown that the products of degranulating MCs appear to be involved in stimulating neutrophil migration to sites of inflammation and may also be involved in a cytotoxic response against tumor cells [31, 33]. Further studies have also indicated that these cells respond to short-term stress, such as handling, by migrating to specific tissue sites, notably the gills [34]. Implants or injections of cortisol, however, inhibit the degranulation of MCs in tilapia swim bladder membrane [35]. This suggests potential differences in the response of MCs to short-term versus long-term stress and generally indicates that these cells are an important part of the short-term inflammatory response in fish. Importantly, different piscidin members are found in the MCs of different tissues. Thus, piscidin 1 is found in gill MCs but not in those of the intestine. According to previous studies, there is an interspecific heterogeneity in fish MCs, which is exemplified by their heterogeneous morphology, granular content, sensitivity to fixatives, and response to drugs [32,36]. Our data also suggest an intraspecific heterogeneity with several different populations of MCs in gilthead seabream armed with diverse types of piscidins. Whatever

the case, the presence of piscidins in gilthead seabream MCs of gills and intestine provides evidence suggesting that this AMP is also utilized as part of the antimicrobial repertoire of specific inflammatory cells in this species.

One of the major contributions of this study is the finding that piscidins are not only found in MCs but also in AGs, the main professional phagocytic cell type of the gilthead seabream [20]. In contrast, macrophages did not react with the antibodies against piscidin 1 and 3, which reflects an important difference in the antimicrobial repertoire and the killing mechanisms of the two professional phagocytic cell populations of this species. Strikingly, AGs contain piscidin 3 but not piscidin 1. Piscidin 3 is stored in the cytoplasmic type II granule of acidophilic granulocytes, a granule population that seems to correspond to the specific granules found in mammalian acidophils [25]. Interestingly, after phagocytosis, the bacteria-containing phagosomes are strongly immunostained with the anti-piscidin 3, suggesting that the membrane of type II granules fuse to that of the endocytic vesicle and release large amounts of piscidin 3 into the phagolysosome. These results strongly suggest that piscidin 3 contributes in an active form to the killing of ingested bacteria by fish professional phagocytes. Therefore, piscidins would play a dual role in the clearance of bacterial infections in fish: they would not only act as powerful AMPs in the extracellular space upon the activation and degranulation of MCs but would also act as part of the intracellular killing mechanisms of the phagocytes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank I Fuentes for her excellent technical assistance, Drs. A. García-Alcázar, B. Novoa, A. Estepa and R. Barrera for providing some of the specimens, and AE Toranzo and JL Barja for the R-82 strain of *V. anguillarum*. This work was supported by the Spanish

Ministry of Education and Science (grant BIO2005-05078 to V.M.), Fundación Séneca-Murcia (fellowship to I.M.), and North Carolina Fishery Research Grant (Project #06-AM-04) and the National Research Initiative of the USDA Cooperative State Research, Education and Extension Service (Grant number #2006-35204-17508) to E.J.N.

REFERENCES

- [1] Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1317-1323.
- [2] Lauth X, Shike H, Burns JC, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Nizet V, Taylor SW, Shimizu C, Bulet P. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J Biol Chem* 2002; 277: 5030-5039.
- [3] Douglas SE, Gallant JW, Liebscher RS, Dacanay A, Tsoi SCM. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev Comp Immunol* 2003; 27: 589-601.
- [4] Zhang A, Zou J, Chang CI, Secombes CJ. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 101: 259-269.
- [5] Silphaduang U, Noga EJ. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 2001; 414: 268-269.
- [6] Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Shimizu C., Bulet P, Burns JC. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2232-2237.
- [7] Iijima N, Tanimoto N, Emoto Y, Morita Y, Uematsu K, Murakami T, Nakai T. Purification and characterization of three isoforms of chrysophrin, a novel antimicrobial peptide in the gills of red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur J Biochem* 2003; 270: 675-686.

- [8] Ren HL, Wang KJ, Zhou HL, Yang M. Cloning and organisation analysis of a hepcidin-like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus*. Fish Shellfish Immunol 2006; 21: 221-227.
- [9] Yang M, Wang KJ, Chen JH, Qu HD, Li SJ. Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B). Fish Shellfish Immunol 2007; 23: 1060-1071.
- [10] Cole AM, Darouiche RO, Legarda D, Connel N, Diamone G. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. Antimicrob. Agents Chemother 2000; 44: 2039-2045.
- [11] Douglas SE, Gallant JW, Gong Z, Hew C. Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). Dev Comp Immunol 2001; 25: 137-147.
- [12] Patrzykat A, Gallant JW, Seo JW, Pytyck J, Douglas SE. Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes. Antimicrob. Agents Chemother 2003; 47: 2464-2470.
- [13] Sun BJ, Xie HX, Song Y, Nie P. Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins. J Fish Dis 2007; 30: 335-343.
- [14] Hancock RE, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 8856-8861.
- [15] Levy O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. Blood 2000; 96: 2664-2672.
- [16] Westerfield M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). Univ of Oregon Press, Eugene, OR, 2000.

- [17] Esteban MA, Mulero V, Muñoz J, Meseguer J. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell Tissue Res* 1998; 293: 133-141.
- [18] Silphaduang U, Colomi A, Noga EJ. Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Dis Aquat Organ* 2006; 72: 241-252.
- [19] Mulero I, Sepulcre MP, Roca FJ, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. Characterization of macrophages of the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage stimulating colony factor receptor. *Dev Comp Immunol* 2008. Article in press.
- [20] Sepulcre MP, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. Characterization of gilthead seabream acidophilic granulocytes by a monoclonal antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell Tissue Res* 2002; 308: 97-102.
- [21] Mulero I, Sepulcre MP, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104, 19434-19439.
- [22] López-Ruiz A, Esteban MA, Meseguer J. Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Anat Rec* 1992; 234: 161-171.
- [23] Meseguer J, Esteban MA, Muñoz J, López-Ruiz A. Ultrastructure of exudate peritoneal cells of seawater teleost, gilthead seabream *Sparus aurata* (L.) and sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Tissue Res* 1993; 273: 301-307.
- [24] Bloom W, Fawcett DW. Bone marrow and blood cell formation. In: Fawcett DW, editor. *A text book of histology*. Saunders, Philadelphia, 1986. p. 239-264.

- [25] Meseguer J, López-Ruiz A, Esteban MA. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry* 1994; 102: 37-44.
- [26] Trapani J. Position of developing replacement teeth in teleosts. *Copeia* 2001; 1: 35-51.
- [27] Cole AM, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem* 1997; 272: 12008-12013.
- [28] Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 2001; 25: 827-39.
- [29] Powell MD, Wright GM, Burka JF. Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Cell Tissue Res* 1991; 266: 469-474.
- [30] Powell MD, Briand HA, Wright GM, Burka JF. Ultrastructural localization of acid phosphatase in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following degranulation with capsaicin. *Histol Histopathol* 1992; 7: 301-305.
- [31] Matsuyama T, Iida T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. *Dev Comp Immunol* 1999; 23: 451-457.
- [32] Reite, O.B. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish Shellfish Immunol* 1998; 8: 489-513.

- [33] Cammarata M, Vazzana M, Cervello M, Arizza V, Parrinello N. Spontaneous cytotoxic activity of eosinophilic granule cells separated from the normal peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol* 2000; 10: 143-154.
- [34] Holland JW, Rowley AF. Studies on the eosinophilic granule cell in the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol [C]* 1998; 120: 321-328.
- [35] Matsuyama T, Kurogi J, Iida T. Inhibitory effect of cortisol on the degranulation of eosinophilic granular cells in tilapia. *Fish Pathol* 2000; 35: 61-65.
- [36] Reite OB, Evensen Ø. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20: 192-208.

Figure 1. Gilthead seabream MCs and AGs contain piscidin 3. Sections of intestine (**A-D**), gills (**E, F**) and head-kidney (**G-J**) were either stained with H&E (**A**), or immunostained with either the G7 mAb (**C, G**), the anti-piscidin 3 antibody (**B, F, H, J**), the anti-Mcsfr antibody (**I**) or the G7 mAb with the anti-piscidin 3 antibody (**D**). All sections were counterstained with haematoxylin

A, B: Cells that are eosinophilic via H&E (**A**, white arrowheads) show strong staining with the anti-piscidin 3 antibody (black arrowheads) and are very numerous in the submucosa layer (SB) of the intestine. EP: intestinal epithelium.

C, D: AGs (red arrowheads, $G7^+$) and MCs (black arrowheads, $G7^-$) of the submucosa layer of the intestine are both immunostained with the anti-piscidin 3. Note that **C** and **D** are the same section.

E, F: Consecutive sections showing circulating AGs (red arrowheads, $G7^+$) that are positive for piscidin 3 (black arrowheads).

G, H: Consecutive sections showing numerous AGs ($G7^+$) positive for piscidin 3 around a blood vessel (V) of the head-kidney. *: melanomacrophage centre.

I, J: Consecutive sections showing numerous macrophages (black arrowheads, $Mcsfr^+$) around a blood vessel which are not immunostained with the anti-piscidin 3 antibody while several AGs are piscidin 3-positive (blue arrowheads).

Figure 2. Piscidin 3 is delivered to the bacteria-containing phagosomes in AGs. Transmission electron micrographs of head-kidney AGs upon phagocytosis of killed *E. coli*. Sections **B** and **C** were immuno-gold labeled using the anti-piscidin 3 antibody.

A: Cytoplasm of an AG showing two ingested *E. coli* (EC) contained within two phagolysosomes. Note the presence of several type II granules (GII). N: nucleus.

B: A type II granule showing a strong immuno-gold labeling in the electron-dense halo (H) of the granule whereas the dense core (C) is not immuno-gold labeled.

C: An ingested bacterium (black arrow) and an adjacent type II granule (blue arrow). Note the strong immuno-gold labeling of the bacteria and of the electron-dense halo of the type II granule.

Figure 3. Gilthead seabream MCs contain piscidin 1. Sections of spleen (A), head-kidney (B) and gills (C-H) were immunostained with either anti-piscidin 1 (A, B, D, F, H), anti-histamine (F) or anti-piscidin 3 (G) antibodies, or were stained with H&E (C). All IHC sections were counterstained with haematoxylin.

A, B: No immunostaining is observed with the anti-piscidin 1 in spleen and head kidney. E: ellipsoid, *: melanomacrophage centre.

C, D: Consecutive sections of gills showing several eosinophilic cells (red arrowheads) that are positive for piscidin 1 (black arrowheads).

E, F: Gill MCs (histamine⁺, black arrowheads) also immunoreact with the anti-piscidin 1 (black arrowheads).

G, H: Positive MCs for piscidin 3 (blue arrowheads) are also positive for piscidin 1 (black arrowheads). Note the gill hyperplasia with fusion of secondary lamellae (L). V: blood vessel.

Figure 4. Phylogenetic tree showing the fish species whose immune cells are armed with piscidins. The cladogram showing the phylogenetic relationships between the most important orders of ray-finned fishes (Actinopterygii) has been adapted from Trapani [26]. The orders analyzed in this study are shown in different colors.

FIGURA 1

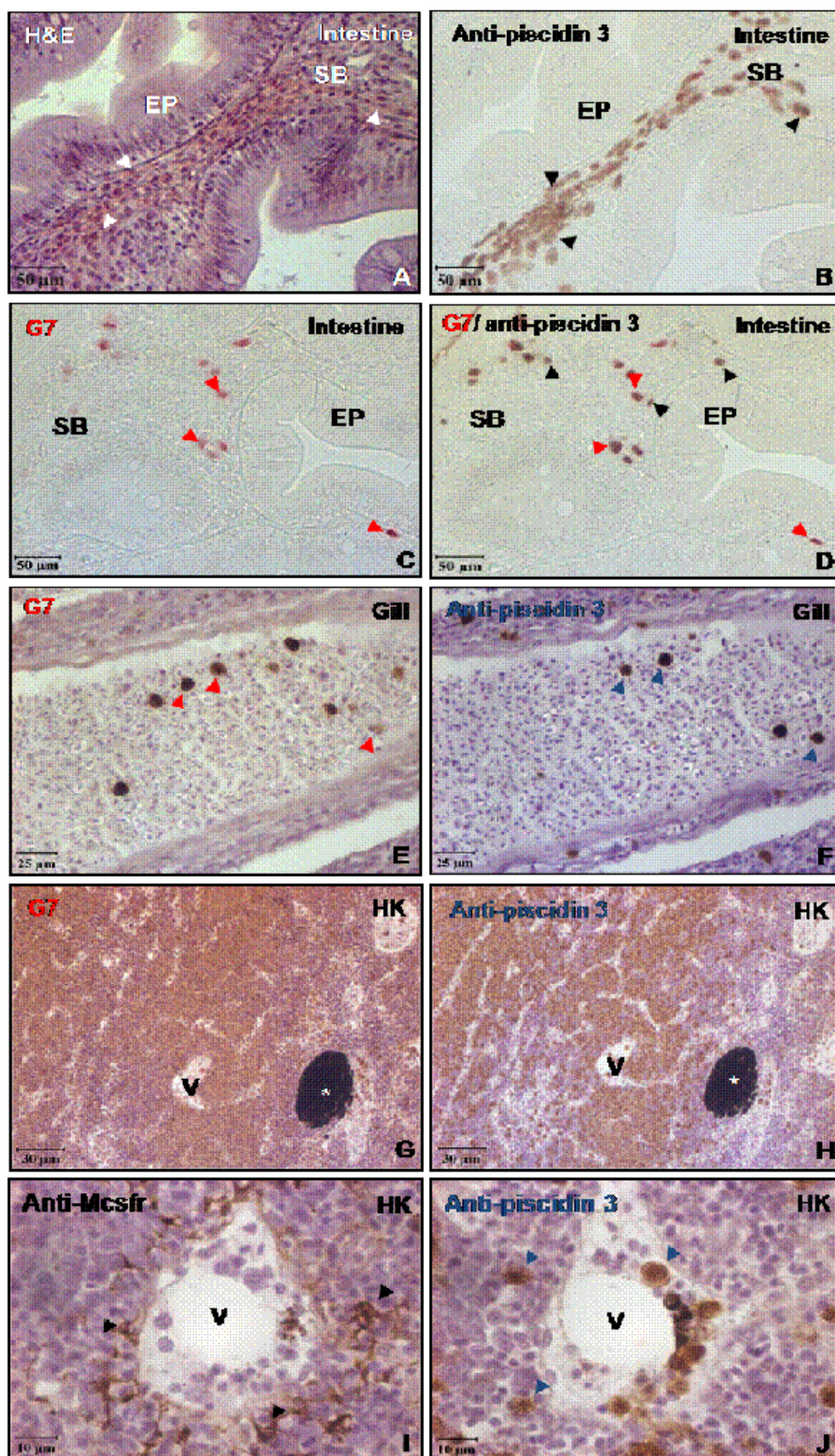


FIGURA 2

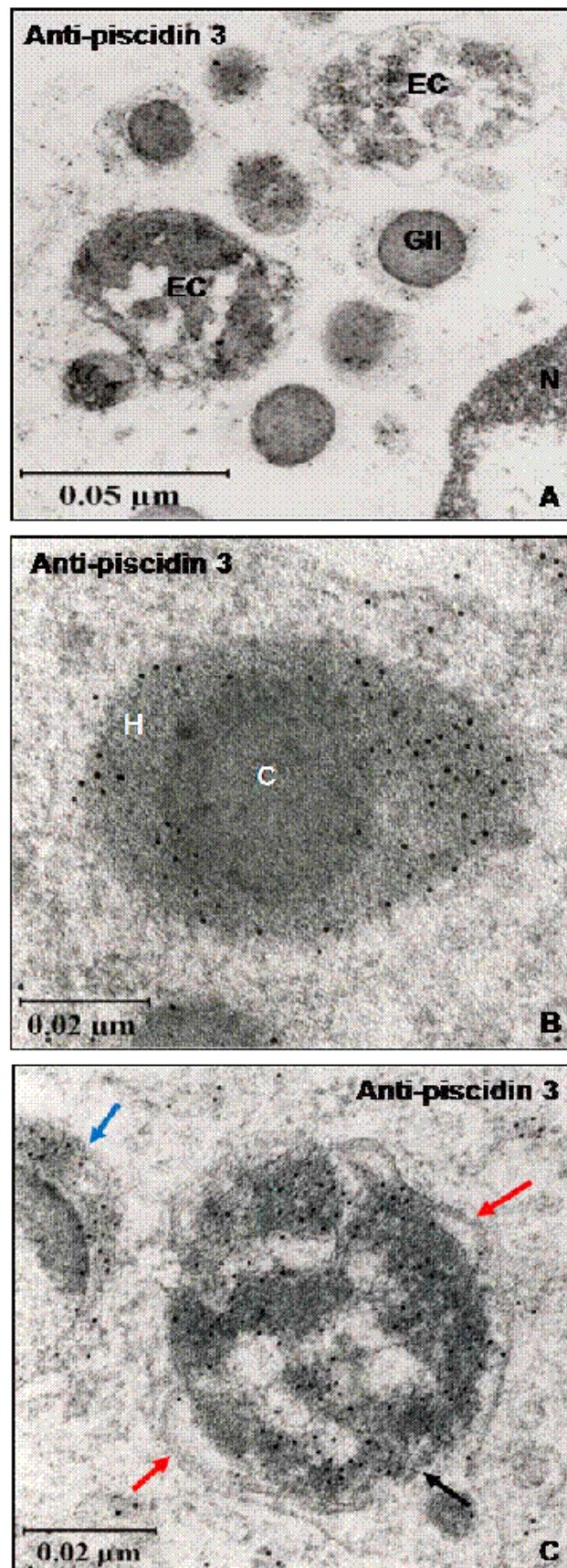


FIGURA 3

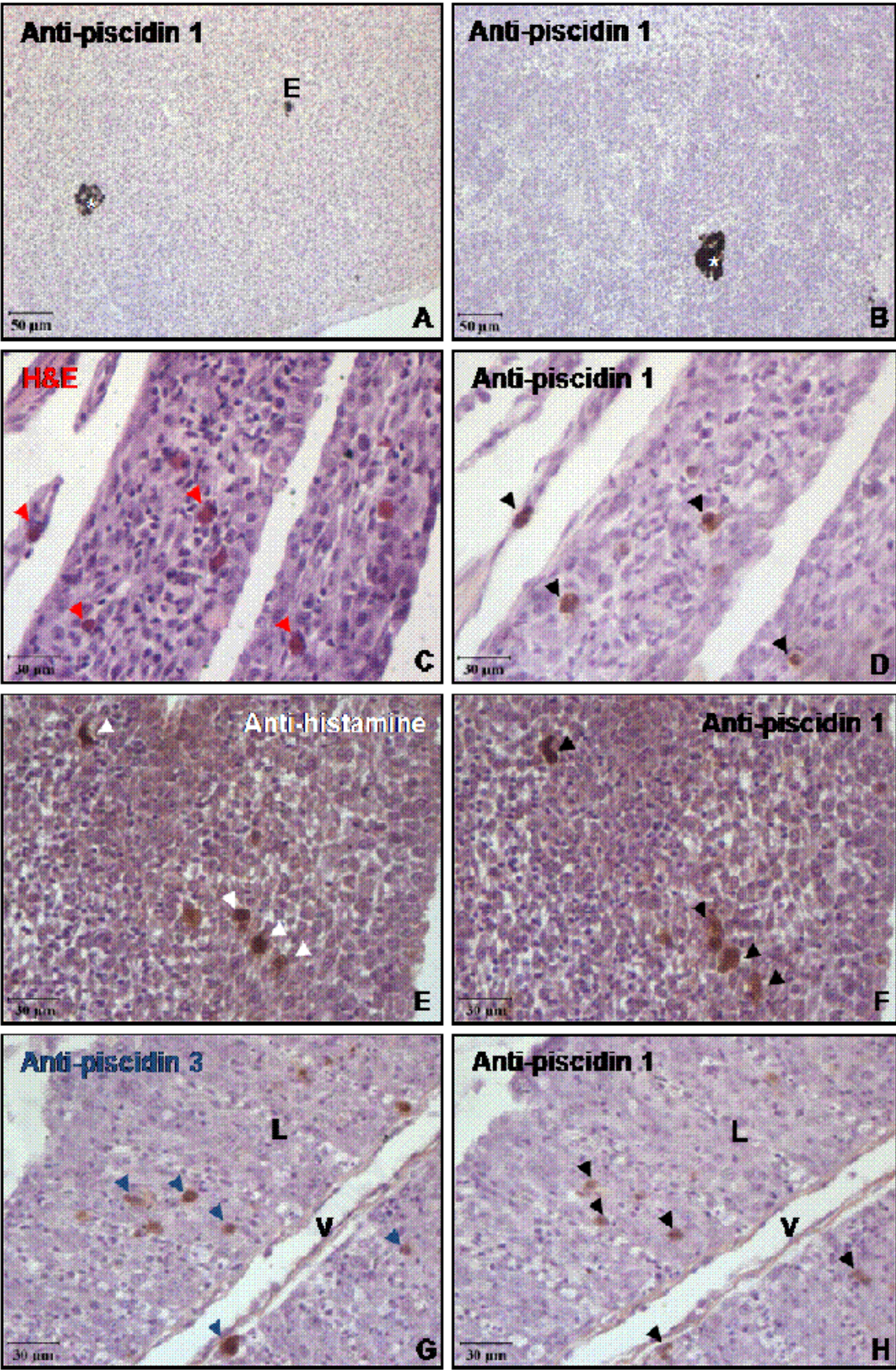


FIGURA 4



Distribution of the professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during the ontogeny of lymphomyeloid organs and pathogen entry sites

Iván Mulero^a, Elena Chaves-Pozo^a, Alicia García-Alcázar^b, José Meseguer^a,
Victoriano Mulero^{a,*}, Alfonso García Ayala^a

^aDepartment of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus Universitario Espinardo, 30100 Murcia, Spain

^bSpanish Oceanographic Institute (IEO), Murcia Oceanographic Centre, Mazarrón, Spain

Received 11 October 2006; received in revised form 15 November 2006; accepted 18 November 2006

Available online 28 December 2006

Abstract

Although it is believed that fish fry depend fundamentally on their innate defence mechanisms, the ontogeny of fish innate immune cells is poorly understood. In the present study, we have used a specific monoclonal antibody against acidophilic granulocytes (AGs), the main professional phagocytic cell type of the bony fish gilthead seabream, to study their localization during the development of the main lymphomyeloid organs, namely the head kidney, spleen and thymus, and of the two major portals for pathogen entry, namely the gills and intestine. AGs were observed in the posterior intestine and in the blood earlier than in the haematopoietic kidney (21 vs. 27 days post-hatching, dph). AGs were observed scattered between other cells of the haematopoietic lineage in the head kidney of larvae, but were grouped around the blood vessels of this organ in juveniles and adults, where they were also much more numerous. In the spleen and in the thymus, AGs were observed much later (62 dph) and appeared scattered. AGs were also observed in the gill lamella and the posterior intestine near the anus throughout development.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Innate immunity; Head kidney; Spleen; Thymus; Gills; Intestine; Ontogeny; Teleosts

1. Introduction

Fish eggs are released and embryos hatch into a pathogenically hostile environment, at a time when their immunological capacity is still severely limited. Although some studies suggest that maternal antibodies can be transferred through the yolk sac [1,2], it seems that young specimens depend fundamentally on their innate defence mechanisms.

Abbreviations: AGs, acidophilic granulocytes; BSA, bovine serum albumin; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; dph, days post-hatching; H&E, haematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemistry; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; PBT, PBS + BSA + Triton X-100.

*Corresponding author. Tel.: +34 968 367581;
fax: +34 968 363963.

E-mail address: vmulero@um.es (V. Mulero).

The ontogeny of the immune cells and the lymphomyeloid organs that home them has been studied in several teleost species using mainly light and/or electron microscopy because of the lack of appropriate markers for specific cell populations of most of the species studied [3–13]. These studies have shown that, although the basic developmental mechanisms of teleosts are largely similar, there are differences with respect to the timing of developmental events. These differences are not only due to the widely varying duration of the embryonic period and larva development between teleost species, but also to the fact that larval development is strongly affected by culture conditions, such as temperature, salinity and photoperiod [14]. However, it must be emphasised that the structure of lymphomyeloid organs, as well as the presence of lymphocytes within them, does not correlate with their functional activity or degree of maturity [3,15–17].

The acidophilic granulocytes (AGs) of the adult marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) are the most abundant of circulating granulocytes and are rapidly recruited from the head kidney, the main haematopoietic organ in fish, to the infection site [18,19]. In addition, their main role is the phagocytosis of bacteria, which is accomplished by coordinating their attachment and internalization to the release of reactive oxygen intermediates into the phagocytic vacuole [18,19]. Therefore, these cells have been considered functionally equivalent to the neutrophils of higher vertebrates [18–20]. We report here the ontogeny of AGs in the gilthead seabream using the G7 monoclonal antibody (mAb) [18], which specifically recognizes these cells. This mAb allowed us to establish the time of appearance and the distribution of AGs in the main lymphomyeloid organs of gilthead seabream larvae, juvenile and adult specimens as well as in the major pathogen entry sites.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Gilthead seabream (*S. aurata* L., Actinopterygii, Sparidae) fry were maintained at the Murcia Oceanographic Centre (IEO) using the “green water” technique in a 5000 l round tank with an initial density of about 60 eggs/l. Natural seawater (38‰ salinity) was heated at the beginning to $17 \pm 1^\circ\text{C}$ and filtered through mechanical and biological substrates. The temperature naturally increased and reached 26°C at the end of the

experiment. Water renewal was limited to 2% daily during the first 20 days of culture and was achieved by the addition of 70 ml/m³ of a microalgae concentrated solution (Phytobloom, Necton) containing 80% of *Nannochloropsis oculata*. Afterwards, continuous water renewal (30%/h) and light aeration were provided in the tank. During the experiment the light intensity was 1000 lx at the water surface and the photoperiod 16:8. Larvae were successively fed with enriched (Selco, Inve Animal Health) rotifers from 6 to 24 days post-hatching (dph), *Artemia* nauplii (Inve Animal Health) from 20 to 35 dph, enriched Instar II *Artemia* from 31 to 58 dph, and commercial dry pellet diet (Skretting) from 54 dph onward. Larvae were sampled 2, 6, 8, 10, 13, 21, 27, 34, 48, 62 and 76 dph, and juveniles 92, 111, 132 and 146 dph.

Adult fish (150 g mean weight) were kept in 260 l running-seawater aquaria (flow rate 1500 l/h) at 23°C under a 12 h light/dark cycle and fed with a commercial pellet diet (Skretting) at a feeding rate of 15 g dry diet/kg biomass of fish per day. All animal studies were carried out in accordance with the European Union regulations for animal experimentation.

2.2. Light microscopy and immunohistochemistry (IHC)

Larvae (2–76 dph) and juveniles of 92 dph (5 specimens of each age) were processed without further dissection while juveniles of 111–146 dph were sectioned into two parts before processing. Adults (3 specimens) were bled and the head kidney, spleen, thymus, gills and posterior intestine were removed and processed. Samples were fixed overnight in Bouin Hollande fluid or 4% buffered paraformaldehyde solution, embedded in Paraplast Plus (Sherwood Medical) and sectioned at 5 μm . After being dewaxed and rehydrated, sections fixed in Bouin Hollande fluid were stained with haematoxylin and eosin (H&E), while sections fixed in paraformaldehyde solution were subjected to an indirect immunocytochemical method [21] using the G7 mAb, which is specific to gilthead seabream AGs [19]. The samples were incubated for 40 min in peroxidase quenching solution (H_2O_2 in methanol, 1:9) to eliminate the endogenous peroxidase activity and then rinsed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2–7.4) and in PBS containing 0.01% bovine serum albumin (BSA) and 0.2% Triton X-100 (PBT). After a 30 min incubation with PBS containing 0.5% BSA to block the non-specific reaction,

they were rinsed in PBT and incubated for 2 h at room temperature with the G7mAb diluted 1:100. After washing in PBT, the sections were exposed to anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat (Sigma) diluted 1:200 for 1 h at room temperature. All the samples were then washed in PBT and in 0.5 M TRIS-HCl buffer (pH 7.6), and the peroxidase activity revealed by incubation for 5 min at room temperature with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in TRIS-HCl buffer containing 0.05% H₂O₂. The specificity of the reaction was determined by omission of the first antibody. No immunostaining was observed in these negative controls. The sections were slightly counter-stained with haematoxylin and examined with an Axiolab microscope (Zeiss). The photographs were obtained with a digital camera CoolSNAP (RS Photometrics) using a Pentium III computer with a CoolSNAP (RS Photometrics) software.

3. Results

3.1. Head kidney

Although a renal tubule was already observed 2 dph located anterior to the digestive tract anlage and dorsal to the yolk sac (Fig. 1(a)), cells showing the morphological features of haematopoietic cells (round in shape with a high nucleus/cytoplasm ratio and an euchromatinic nucleus) were only found 6 dph when they could be seen in a ventral position relative to the tubules and next to the mesothelium that limited the peritoneal cavity (Fig. 1(b)). By 21 dph, the number of haematopoietic cells had increased and their location had changed to the dorsal area of the kidney, by which time blood vessels with erythrocytes could also be observed (Fig. 1(c)). From 21 to 62 dph, haematopoietic cells increased in number and they migrated gradually to the anterior area of the kidney (Fig. 1(d)), where they were also found in the adult. From 62 dph onwards, the head kidney increased in size and the only remarkable morphological events were an increase in the number of blood vessels and the appearance of small melanomacrophage centres in 92 day-old juveniles (Fig. 1(e)). The immunohistochemical study showed that although AGs were not present until 27 dph in this organ (Fig. 1(g)), they were found in the blood vessels adjacent to the kidney (data not shown). Notably, AGs were observed scattered between other cells of the haematopoietic lineage in larvae (Figs. 1(g) and

(h)), but were grouped around blood vessels in juveniles (Fig. 1(f)) and adults (Fig. 1(i)), where they were also much more numerous.

3.2. Spleen

The spleen primordium was observed for the first time 8 dph in the peritoneal cavity close to the pancreatic tissue and the intestine, where it was formed by a small group of undifferentiated and basophilic cells (Fig. 2(a)). By 13 dph, the size of the spleen and its number of cells had increased and the first erythrocytes were observed (Fig. 2(b)). The spleen acquired an elongated shape and a connective capsule 48 dph, when numerous erythrocytes were also seen (Fig. 2(c)). Cells showing the morphological features of lymphocytes were observed from 62 dph (Fig. 2(i)). By 76 dph (Fig. 2(d)), the connective stroma and the capsule were more developed and the first ellipsoids (terminations of arterioles with a narrow lumen that runs through a sheath of reticular fibres, reticular cells and macrophages) were seen. Melanomacrophage centres were firstly observed in the spleen of 92 (Fig. 2(e)) and 111 day-old juveniles (Fig. 2(f)), by which time this organ had drastically increased in size and the first sinusoids could be observed in the core of the organ, while the periphery showed a higher cell density. In adults, the connective capsule was thicker and showed small trabecula extending into the parenchyma of the organ, which could be clearly divided into a white and a red pulp. The white pulp appeared in the outer area of the organ and was formed by lymphoid cells dispersed among the parenchyma and ellipsoids (Fig. 2(g)). The red pulp, which occupied most of the organ, was formed by melanomacrophage centres and a complex network of sinusoids (Fig. 2(h)). Using IHC, AGs were observed for the first time dispersed in the parenchyma 62 dph (Fig. 2(i)), increasing in number during development. In adults, AGs were abundant and appeared scattered principally in the white pulp (Fig. 2(j)).

3.3. Thymus

The thymus was not observed until 34 dph in the dorsal-posterior area of the branchial cavity and was constituted by small basophilic cells showing the morphological features of thymocytes surrounded by a squamous epithelium (Fig. 3(a)). As the fish grew, the number of thymocytes increased

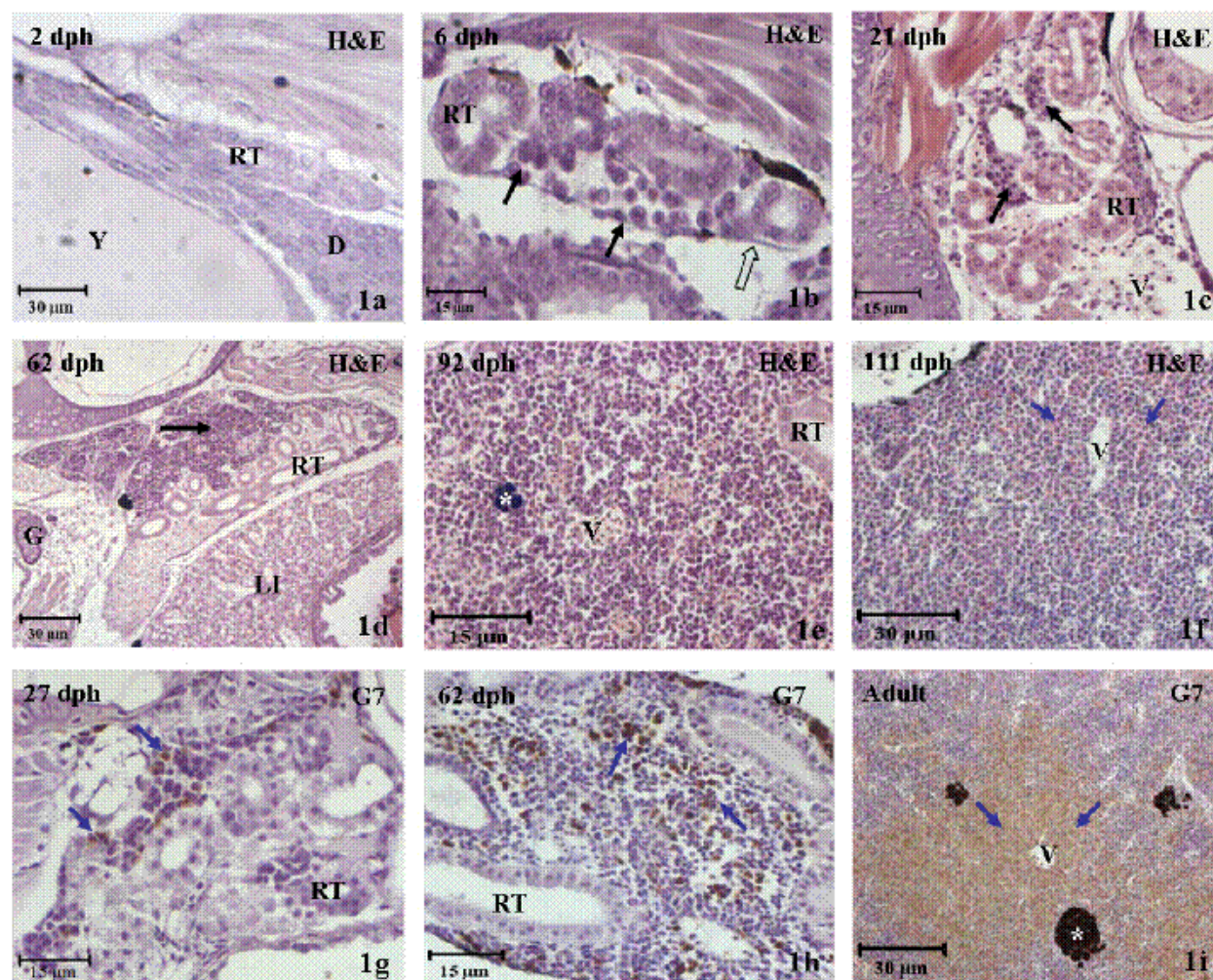


Fig. 1. Ontogeny of head kidney acidophilic granulocytes. Sagittal sections of 2 (a), 6 (b), 21 (c), 27 (d) and 62 dph (d) and (h) larvae; 92 (e) and 111 dph (f) juveniles; and head kidney of an adult specimen (i) stained with H&E (a) (f) or immunostained with the G7 mAb (g) (i). (a) The kidney, formed by a single renal tubule (RT), is located dorsal to the yolk sac (Y) and anterior to the undifferentiated digestive tract (D). (b) Cells showing the morphological features of haematopoietic cells (black arrows) are observed ventral to the renal tubules (RT). Note the presence of the mesothelium (open arrow). (c) Groups of haematopoietic cells (black arrows) dorsal to the renal tubules (RT) and some blood vessels (V). (d) Numerous haematopoietic cells (black arrow) are located antero-dorsal to the renal tubules (RT). LI: liver. G: gills. (e) Melanomacrophage centres (*) are observed in the haematopoietic area of the kidney for the first time at this stage of the development. RT: renal tubule. V: blood vessel. (f) A abundant eosinophilic cells (blue arrows) were seen grouped around the blood vessels (V). (g) Scattered AGs (blue arrows) among other haematopoietic cells are observed in the head kidney. RT: renal tubule. (h) Numerous AGs (blue arrows) are distributed randomly between haematopoietic cells. (i) A abundant AGs (blue arrows) were seen observed around the blood vessels (V).

(Figs. 3(b) and (d)). By 62 dph, the thymus had differentiated into two zones: (i) an inner area called the medulla, with a low density of thymocytes and with abundant large epithelial cells, which stained weakly and showed thin cytoplasmic processes, a large nucleus, and a patent and peripheral nucleolus (Fig. 3(b), inset); and (ii) an outer area called the cortex, with a higher density of thymocytes (Fig. 3(b)). The position of these two areas changed during development (Fig. 3(c)), although they

finally returned to their original position in juveniles, where the medulla was again surrounded by the cortex (Fig. 3(d)). In adults, however, the thymus was constituted by small groups of thymocytes located between the filaments of the pseudo-branch at the branchial cavity (Figs. 3(e) and (f)). Lastly, the immunohistochemical study revealed that a very few scattered AGs were observed 62 dph for the first time among thymocytes of the cortex (Fig. 3(g)). Notably, although the number of

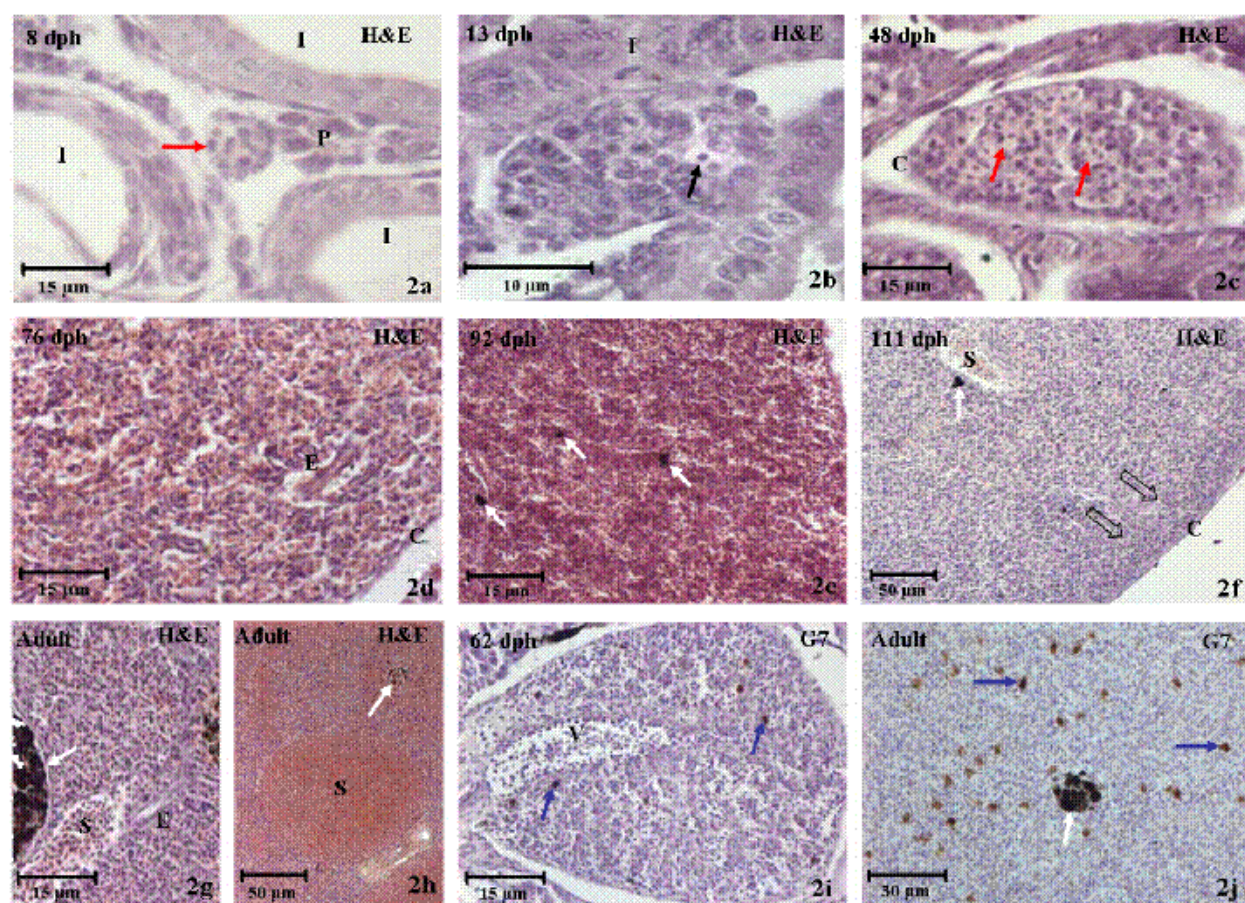


Fig. 2. Ontogeny of splenic acidophilic granulocytes. Sagittal sections of 8 (a), 13 (b), 48 (c), 62 (i) and 76 dph (d) larvae; 92 (e) and 111 dph (f) juveniles, and spleen of an adult specimen (g), (h) and (j) stained with H&E (a) (h) or immunostained with the G7 mAb (i) and (j). (a) The spleen primordium (red arrow) is observed between the pancreatic tissue (P) and the intestinal sections (I) and it is constituted by a small group of undifferentiated and basophilic cells. (b) The spleen is larger and erythrocytes are observed within it for the first time (black arrow). I: intestine. (c) Numerous erythrocytes (red arrows) are seen in the spleen, which is surrounded by a connective capsule (C). (d) The ellipsoids (E) are observed for the first time at this stage of the development in the periphery of the organ close to the connective capsule (C). (e) Small melanomacrophage centres (white arrows) are seen for the first time in the splenic parenchyma. (f) Sinusoids (S) are observed for the first time. At this stage of development, the periphery of the spleen shows a higher cell density (open arrows). Note the presence of a small melanomacrophage centre (white arrow). (g) A melanomacrophage centre (white arrow), a sinusoids (S) and a ellipsoid (E) are observed in the white pulp of the spleen of an adult specimen. (h) Detailed view of the red pulp of the spleen of an adult specimen showing large sinusoids (S) containing numerous erythrocytes in the lumen. White arrow: melanomacrophage centre. (i) A few scattered AGs (blue arrows) are observed in the splenic parenchyma. V: blood vessel. (j) Numerous AGs (blue arrows) are found dispersed in the white pulp of the spleen of an adult specimen. White arrow: melanomacrophage centre.

AGs in the thymic cortex and medulla was scarce in all stages of development (Figs. 3(g) and (h)), they were most numerous in the connective tissue that surrounded the groups of thymocytes that constituted the thymus of adult specimens (Fig. 3(h)).

3.4. Gills and digestive tract as important portals of pathogen entry

The ontogeny of the digestive tract [22] and the structure of the adult gills [23,24] of the gilthead

seabream have been studied previously. Therefore, the present study is focused on the localization of AGs during the ontogeny of these organs. The primordium of the gills was observed in the branchial cavity for the first time 6 dph (Fig. 4(a)) and was exclusively formed by the gill arches. At 27 dph (Fig. 4(b)), the first gill filaments were seen and small lamellae appeared soon after (34 dph) (Fig. 4(c)). AGs were observed for the first time 34 dph in the lamellae (Fig. 4(c)). In older larvae (Fig. 4(d)), juveniles (data not shown) and adults

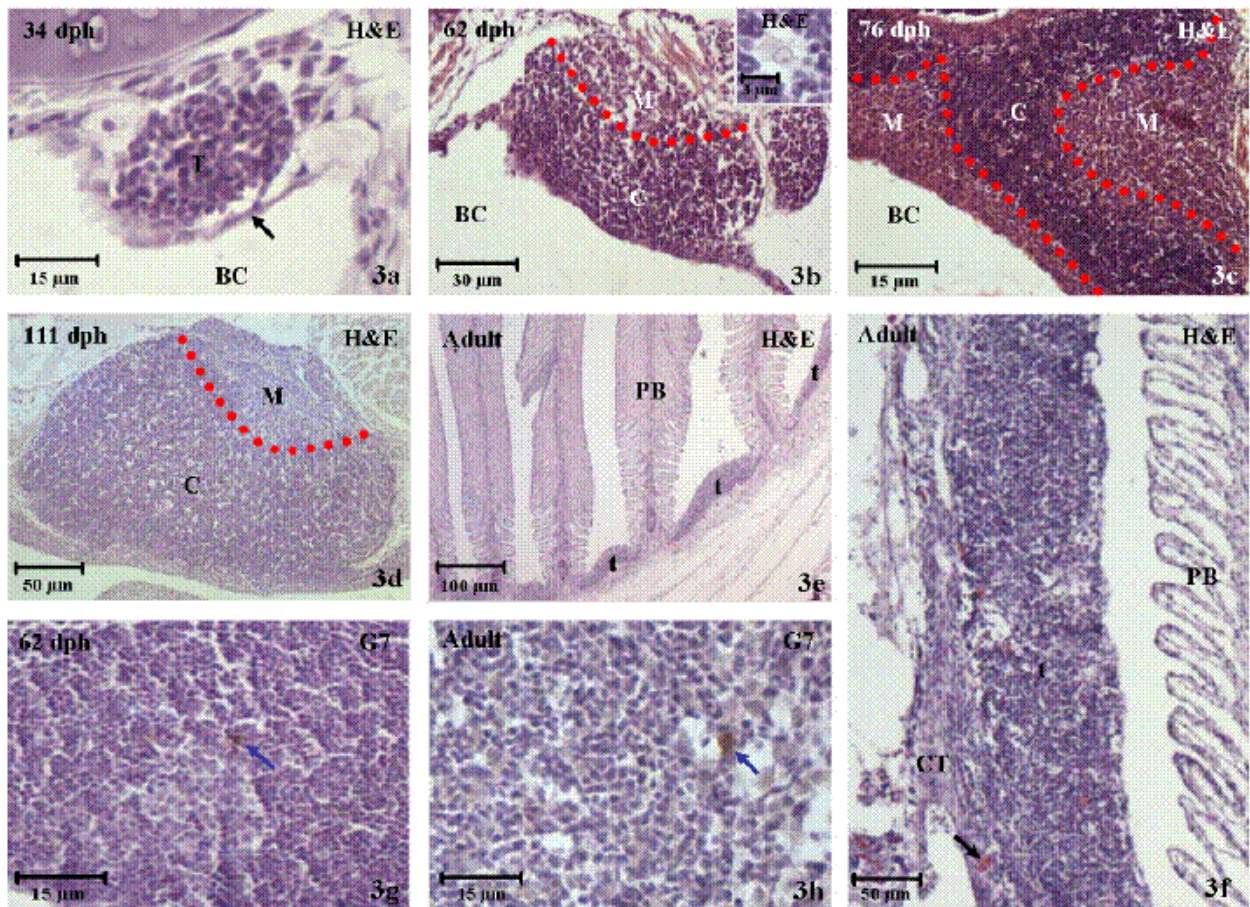


Fig. 3. Ontogeny of the thymic acidophilic granulocytes. Sagittal sections of 34 (a), 62 (b) and (g), and 76 dph (c) larvae; 111 dph (d) juvenile; and thymuses of adult specimens (e), (f) and (h) stained with H&E (a) (f) or immunostained with the G7 mAb (g) and (h). (a) The thymus primordium (T) is constituted by small, basophilic cells surrounded by a squamous epithelium (black arrow). BC: branchial cavity. (b) Two different areas are distinguished at this stage of development in the thymus: the cortex (C) or outer area with a higher density of thymocytes and the medulla (M) or inner area with a low density of thymocytes and with abundant epithelial cells. Inset: detail of an epithelial cell surrounded by the thymocytes. The limit between medulla and cortex is indicated with a red dotted line. (c) and (d) The localization of the medulla (M) and cortex (C) changes during development. Note that the cortex is surrounded by the medulla in 76 dph larvae, while it returned to its original position in 111 dph juveniles. The limit between medulla and cortex is indicated with a red dotted line. (e) The thymus is reduced to several groups of thymocytes (t) located between the pseudobranchial filaments (PB) in adults. (f) Higher magnification of the thymus of an adult specimen showing numerous thymocytes (t) grouped near the pseudobranchial filaments (PB) and some eosinophilic cells (black arrow) in the surrounding connective tissue (CT). (g) Scarce AGs are found dispersed between thymocytes in the cortex (blue arrow). (h) Scarce AGs (blue arrow) are seen between thymocytes in an adult specimen.

(Fig. 4(e)), AGs increased in number and were mainly observed in the lumen of the blood vessels of gill filaments and lamellae.

In larvae ranging from 8 to 62 dph, the intestine was formed only by a mucosa and a layer of connective tissue while the submucosa, the smooth muscle layers and the serosa developed later [22]. Scarce AGs were observed for the first time 21 dph in the lamina propria of the intestinal mucosa (Fig. 4(f)) but were most numerous in 27, 34, 48 and 62 dph larvae, where they were located mainly in the

posterior intestine near the anus (Figs. 4(g) and (h)). In adults, AGs were scarce and were located in the submucosa of the posterior intestine (Fig. 4(i)).

4. Discussion

The major aim of this study was to investigate the time of appearance of AGs, the main phagocytic cells in the gillhead seabream and considered functionally equivalent to mammalian neutrophils [18–20], during the ontogeny of the gillhead

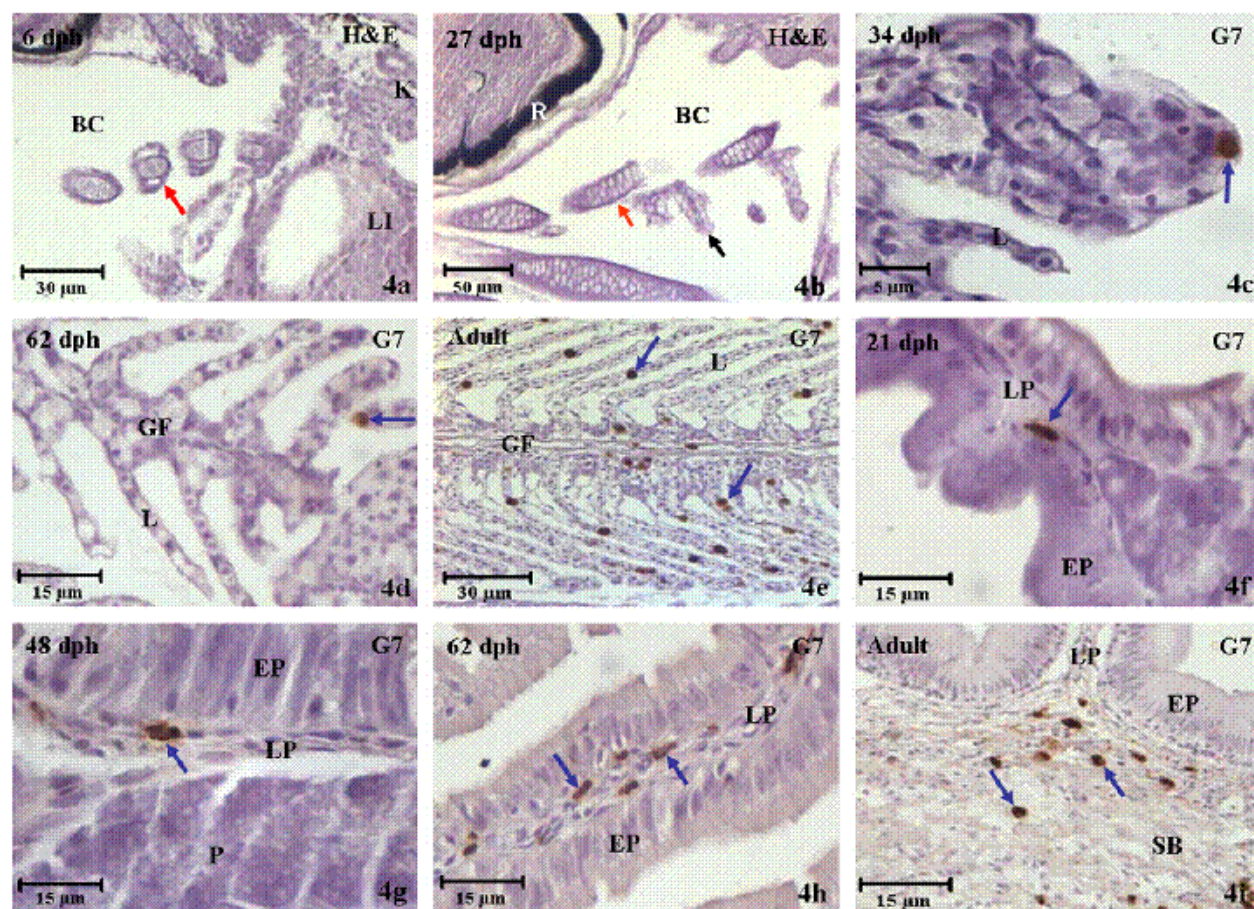


Fig. 4. Ontogeny of acidophilic granulocytes in the gills and digestive tract. Sagittal sections of 6 (a), 27 (b), 34 (c) and 62 dph (d) larval gill; gills of an adult specimen (e); 21 (f), 48 (g) and 62 (h) larval intestine, and intestine of adult specimens (i) stained with H&E (a) and (b) or immunostained with the G7 mAb (c) (i). (a) The gills are formed by the gill arches (red arrow) located in the branchial cavity (BC). K: kidney. LI: liver. (b) The gill filaments (black arrow) are originated from the gill arches (red arrow). BC: branchial cavity. R: retin. (c) and (d) An AG (blue arrow) is seen in the gill lamellae (L). GF: gill filament. (e) Numerous AGs (blue arrows) are observed in the gills of adult specimens. GF: gill filament, L: gill lamellae. (f) (h) Scarce AGs (blue arrows) are visible in the lamina propria (LP) of the posterior intestine. P: pancreatic tissue. EP: intestinal epithelium. (i) Some AGs (blue arrows) are observed in the submucosa (SB) of the intestine of an adult specimen. LP: lamina propria, EP: intestinal epithelium.

seabream using the G7mAb, which is specific to these cells. Surprisingly, AGs were firstly observed 21 dph in the posterior intestine and in the blood vessels adjacent to the kidney, while they were seen in the haematopoietic kidney some time later (27 dph). Although this time frame seems to be quite narrow, the AGs were found to appear earlier in the intestine than in the kidney in all specimens examined. These results might suggest that during the early developmental stages of the gilthead seabream, haematopoiesis takes place in a site other than the head kidney, as has been shown for the zebrafish. In this species, the embryonic haematopoiesis occurs in the intermediate cell mass, which is

located in the trunk ventral to the notochord, and in the ventral wall of the dorsal aorta, while definitive haematopoiesis (4 days post-fertilization) mainly takes place in the head kidney [25,26]. However, further studies using appropriate granulocyte markers are required to unequivocally show the organs where haematopoiesis takes place in the gilthead seabream throughout development.

Our results confirmed that the order of appearance of the lymphomyeloid organs in the gilthead seabream is head kidney, spleen and thymus, as described earlier by Jósefsson and Tatner [9]. This pattern is common to other marine teleost species [7,12,13,27], but differs from the development found

in freshwater species like the Atlantic salmon [3], rainbow trout [4] and carp [5], where the head kidney is the first lymphomyeloid organ observed, but the thymus appears before the spleen.

Although the renal tubules were already observed in 2 day-old gilthead seabream larvae, the earliest time sampled, the first cells showing the morphological features of haematopoietic cells were seen 6dph in a ventral position relatively to the renal tubules. However, definitive confirmation of the haematopoietic nature of these cells must await the availability of specific stem cell markers for this species. In other species, such as the turbot [12] and the Japanese flounder [13], cells with morphological features of haematopoietic cells were present in the kidney at hatching, while they appeared 2dph in carp [5], 5dph in cod [27] and 10dph in sea bass [11]. Anyway, the head kidney of the gilthead seabream seems to be completely developed in 111 day-old juveniles when AGs were grouped around the blood vessels and the melanomacrophage centres also appeared fully developed, as occurred in adults [19,20]. As it has recently been shown that head kidney AGs are rapidly mobilized to the inflammatory foci upon infection [19] and to the testis during post-spawning [28], it is tempting to speculate that the localization of head kidney AGs around blood vessels is necessary for their rapid mobilization. If this is true, the head kidney might not be fully functional in larvae of this species.

The spleen was the second lymphomyeloid organ to appear during the development of the gilthead seabream. It was first observed 8dph in this species while it appears 5dph in carp [5] and cod [27], 8dph in Japanese flounder [13], 10dph in turbot [12] and 18dph in seabass [10]. Scarce AGs were found to be dispersed in the splenic parenchyma of young larvae of gilthead seabream (62–76dph), although they were more abundant and appeared preferentially dispersed in the white pulp when the regionalization of the organ started (111–146dph). Importantly, ellipsoids and melanomacrophage centres were observed 76 and 92dph, respectively, while the definitive morphology of the spleen was reached in juveniles (111–146dph) when red and white pulp could be clearly observed. Therefore, it is possible that the immune system of larvae is less effective until these structures are developed, since ellipsoids have been implicated in the clearance of blood-borne substances and immune complexes in several fish species [29–32], and in the recruitment into the spleen of gilthead seabream AGs pre-loaded with

particulate antigens from the inflammatory foci [19]. In addition, melanomacrophage centres are believed to form the teleost analogue to the germinal centres of mammalian lymph nodes [33], where specialized antigen-presenting dendritic cells interact with T-cells, thereby initiating adaptive immune responses [34]. Dendritic cells have nevertheless not been identified in teleosts, although the expression of the dendritic cell specific marker CD83 has been confirmed in teleosts and sharks [35]. Strikingly, a recent report has shown that the Atlantic salmon leukocyte cell line SHK-1 expressed mRNAs specific for a CD83 homologue and synthesized melanin as a result of the expression of Dcl/Trp-2 and tyrosinase [36]. Nevertheless, the functional relevance of these observations needs further study.

The thymus was observed in 34 day-old gilthead seabream larvae for the first time. In contrast, it appeared 2dph in carp [37], 15dph in Japanese flounder [13], 21dph in sea bass [11], 28dph in cod [27] and 20–30dph in turbot [12]. In gilthead seabream, AGs were found to be very scarce in the thymus and were observed for the first time in 62 day-old larvae. In seabass, myelopoietic areas are observed among reticuloepithelial cells in the inner region of adult thymus and they contain both granulopoietic and erythropoietic series [38]. However, the scarce number of AGs observed in the gilthead seabream thymus suggests that granulopoiesis does not take place in this organ in larvae or adults. However, as stated above, further studies are required to confirm this preliminary observation. Notably, we did not observe thymic epithelial cells until 62dph when they seemed to harbour several thymocytes. These cells were previously found in the thymus of gilthead seabream larvae older than 70dph [9] and, bearing in mind their important role in the development and maturation of T cells, it is likely that the thymus is not fully functional before 62dph in this species. In addition, two areas can also be distinguished in the thymus of fish older than 62dph: the medulla or inner area and the cortex or outer area, this latter being closer to the branchial cavity. However, the position of these two areas changes during development although they finally return to their original position in juveniles, the medulla being surrounded by the cortex. Variations in the organization and distribution of these two areas during ontogeny have been described in other teleost species [4,6,37]. Lastly, the position and organization of the adult thymus change from species to species, as found in this

study for the gilthead seabream. Thus, three groups of thymocytes appear over the third gill arch in the Atlantic salmon [3], a single organ between the second and the third gill arch in the common carp [5], while in the rainbow trout the thymus is located between the first and the second gill arch [4]. Interestingly, our data show that the thymus is reduced to small groups of thymocytes located between the filaments of the pseudobranch, a gill-like structure often fused to the anterior area of the opercular cavity, constituted by cells showing some resemblance to the gill chloride cell and whose functions are still open to speculation [39].

The gills and the intestine have been considered as important portal of entry for fish pathogens [40]. AGs were seen for the first time in the gills of 34 day-old larvae, although they were scarce and mainly located in the lumen of blood vessels of gill filaments and lamellae. Therefore, AGs might act as a second line of defence after the mucus [40]. As regards the digestive tract, AGs appeared principally in the posterior intestine close to the anus and also dispersed in the lamina propria of the mucosa. This observation also suggests an important role for AGs in the immunosurveillance of the gut, in good agreement with the recent findings of Picchielli and coworkers [41] on the increased number of B cells and AGs in the gut of gilthead seabream fed with a probiotic-supplemented diet. Future studies aimed at the localization of gilthead seabream macrophages during ontogeny need to be performed once a specific antibody against these cells is available in order to clarify further the development of innate immunity of this teleost species.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Grant 08BIO2005-01-6471 to VM), Fundación Séneca-Murcia (fellowship to IM) and University of Murcia (fellowship to EC-P).

References

- [1] Bly JE, Grimm AS, Morris IG. Transfer of passive immunity from mother to young in a teleost fish haemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comp Biochem Physiol* 1986;84A:309–13.
- [2] Mor A, Avtalion RR. Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo tilapia. *J Fish Biol* 1990;37: 249–55.
- [3] Ellis AE. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity. In: Solomon JB, Horton JD, editors. *Developmental immunobiology*. Amsterdam: Elsevier, North Holland, Biomedical Press; 1977. p. 225–31.
- [4] Grace MF, Manning MJ. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Dev Comp Immunol* 1980;4:255–64.
- [5] Botham JW, Manning MJ. Histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenic development of allograft reactivity. *J Fish Biol* 1981;19: 403–14.
- [6] O'Neill JG. Ontogeny of the lymphoid organs in an Antarctic teleost, *Harpagifer antarcticus* (Notothenioidae: Perciformes). *Dev Comp Immunol* 1989;13:25–33.
- [7] Chantanachookhin C, Seikai T, Tanaka M. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture* 1991;99:143–55.
- [8] Nakanishi T. Ontogeny of the immune system in *Sebastes marmoratus*: histogenesis of the lymphoid organs and effect of the thymectomy. *Environ Biol Fish* 1991;30:135–45.
- [9] Jósefsson S, Tatner MF. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Fish Shellfish Immunol* 1993;3:35–49.
- [10] Quesada J, Villena MI, Navarro V. Ontogeny of the sea bass spleen (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopic study. *J Morphol* 1994;221:161–76.
- [11] Abelli L, Picchielli S, Romano N, Mastrolia L, Scapiliati G. Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 1996; 6:493–505.
- [12] Padrós F, Crespo S. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquaculture* 1996;144:1–16.
- [13] Liu Y, Zhang S, Jiang G, Yang D, Lian J, Yang Y. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months. *Fish Shellfish Immunol* 2004;16:621–32.
- [14] Falk-Petersen JB. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunol* 2005;19:397–412.
- [15] Botham JW, Grace MF, Manning MJ. Ontogeny of first and second set alloimmune reactivity in fishes. In: Botham MJ, Manning MJ, editors. *Phylogeny of immunological memory*. Elsevier, North Holland, Biomedical Press; 1980. p. 83–92.
- [16] Tatner MF, Manning MJ. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev Comp Immunol* 1983;7:69–75.
- [17] Nakanishi T. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissue of the marine teleost, *Sebastes marmoratus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 12:213–21.
- [18] Sepulcre MP, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. Characterization of gilthead seabream acidophilic granulocytes by a monoclonal antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell Tissue Res* 2002; 308:97–102.
- [19] Chaves-Pozo E, Muñoz P, López-Muñoz A, Pelegrín P, García Ayala A, Mulero V, et al. Early innate immune

- response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res* 2005;320:61–8.
- [20] Chaves-Pozo E, Pelegrín P, García-Castillo J, García Ayala A, Mulero V, Meseguer J. Acidophilic granulocytes of the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) produce interleukin-1 β following infection with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res* 2004;316:189–95.
- [21] Sternberger LA. Immunocytochemistry. 3rd ed. New York: Wiley; 1986.
- [22] Elbal MT, García Hernández MP, Lozano MT, Agulleiro B. Development of the digestive tract of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 2004;234:215–38.
- [23] Meseguer J, Agulleiro B, Hernández F. Ultraestructura de los diferentes tipos celulares de la branquia de dorada (*Sparus aurata*, L.). *Morfol Norm Patol A Histol* 1981;5:173–99.
- [24] Meseguer J, Agulleiro B, Hernández F. Ultraestructura de las células de cloruro branquiales de *Sparus aurata*, L. (Teleosteo). *Morfol Norm Patol A Histol* 1982;6:139–52.
- [25] Brownlie A, Zon LI. The zebrafish as a model for the study of hematopoiesis. *Bioscience* 1999;49:382–92.
- [26] Davidson AJ, Zon LI. The "definitive" (and "primitive") guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* 2004;23:7233–46.
- [27] Schröder MB, Villena AJ, Jørgensen TØ. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev Comp Immunol* 1998;22:507–17.
- [28] Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J, García-Ayala A. Professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream display functional adaptation to testicular microenvironment. *J Leukoc Biol* 2005;78:345–51.
- [29] Espenes A, Press CM, Dannevig BH, Landsverk T. Investigation of the structural and functional features of splenic ellipsoids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 1995;279:469–74.
- [30] Espenes A, Press CM, Dannevig BH, Landsverk T. Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 1995;282:41–8.
- [31] Espenes A, Press CM, Van Rooijen N, Landsverk T. Apoptosis in phagocytotic cells of lymphoid tissues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following administration of clodronate liposomes. *Cell Tissue Res* 1997;289:323–31.
- [32] Arnesen SM, Schreeder MB, Dalmø RA, Begwald J. Antigen uptake and immunoglobulin production in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol* 2002;13:159–70.
- [33] Agius C, Roberts RJ. Melanomacrophage-centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 2003;26:499–509.
- [34] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245–52.
- [35] Ohta Y, Landis E, Boulay T, Phillips RB, Collet B, Secombes CJ, et al. Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *J Immunol* 2004;173:4553–60.
- [36] Haugravoll E, Thorsen J, Laane M, Huang Q, Koppang EO. Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83 teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Res* 2006;19:214–25.
- [37] Romano N, Taverne-Thiele AJ, Fanelli M, Baldassini MR, Abelli L, Mastrolia L, et al. Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment. *Dev Comp Immunol* 1999;23:123–37.
- [38] Avilés-Trigueros M, Quesada JA. Myelopoiesis in the thymus of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (teleost). *Anat Rec* 1995;242:83–90.
- [39] Bridges CR, Berenbrink M, Muller R, Waser W. Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998;119:67–77.
- [40] Ellis AE. Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 2001;25:827–39.
- [41] Picchiotti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM, Mulero V, et al. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:57–67.



Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immunocompetence

Iván Mulero^a, M. Pilar Sepulcre^a, Inmaculada Fuentes^a, Alicia García-Alcázar^b,
José Meseguer^a, Alfonsa García-Ayala^a, Victoriano Mulero^{a,*}

^a Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

^b Spanish Oceanographic Institute (IEO), Murcia Oceanographic Centre, Mazarrón, Spain

Received 16 January 2008; accepted 18 January 2008

Abstract

Fish eggs are released and embryos hatch into a pathogenically hostile environment, at a time when their immunological capacity is severely limited. Although the eggs are initially protected by the envelope as well as by several innate and adaptive immune substances, which are transferred to eggs during fish vitellogenesis, it seems that young specimens depend fundamentally on their innate defence mechanisms. Here we show in the gilthead seabream, an immunologically tractable teleost fish model, that the first lymphocyte marker genes, those coding for the two subunits of the recombination activating gene, were detected by RT-PCR around 21–27 days post-hatching (dph). In addition, the transcripts coding for the α and β subunits of the T-cell receptor and the light and heavy chains of immunoglobulin M were detected at 27–48 dph. However, most innate immune genes analyzed were already expressed at hatching, including those coding for the toll-like receptors, pro- and anti-inflammatory molecules, antiviral and antibacterial factors, and phagocyte markers. Using the information from the gene expression study, we also examined the achievement of immunocompetence by analyzing the protection induced by a bacterin against the pathogenic bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. The results show that vaccination of young larvae of this species by either immersion or oral routes resulted in increased susceptibility to infection of the specimens, and point to the lack of correlation between the achievement of immunocompetence and detection of the adaptive immunity markers.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ontogeny; Vaccination; Bacterial infection; Teleost

1. Introduction

While mammals are protected during the early stages of their development by maternal immunity, the highly vascularized gills of fish larvae are constantly exposed to millions of different microbes (Bergh et al., 1989; Breitbart et al., 2002) from the moment they hatch from their protective chorions. Although fish larvae are initially protected by several innate and adaptive immune substances which are transferred to eggs during fish vitellogenesis (Magnadottir et al., 2005), it seems that young specimens depend fundamentally on their innate defence mechanisms.

Earlier morphological studies on the development of the immune system of fish have shown that, although the basic developmental mechanisms of teleosts are largely similar, there are differences with respect to the timing of developmental events (reviewed by Mulero et al., 2007a). These differences are not only due to the widely varying duration of the embryonic period and rate of larva development between teleost species, but also due to the fact that the development of larvae is strongly affected by culture conditions, such as temperature, salinity and photoperiod (Falk-Petersen, 2005). Furthermore, it must also be emphasised that the structure of lymphomyeloid organs, as well as the presence of lymphocytes within them, does not correlate with their functional activity or degree of maturity. In fact, earlier studies demonstrated that the immunization of 4-week-old common carp induced tolerance, which was particularly evident when T-dependent antigens were used (Mughal

* Corresponding author. Tel.: +34 968 367581; fax: +34 968 363963.
E-mail address: vmulero@um.es (V. Mulero).

Table 1
Gene accession numbers and primer sequences used for gene expression analysis

Gene	Accession number	Primer name	Nucleotide sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)
<i>slr9</i>	AY751797	F	GGAGGAGAGGGACTGGAT	60
		R	GATCACACCGTCACTGTCTC	
<i>slr5</i>	AM296028	F	CCTGTCTGCAACTGTCAAGGA	60
		R	TGTGGATCTGGTTCAAGCTG	
<i>slr22</i>	AM920660	F	GCGAATCTGATTTTCCCTCAA	60
		R	GGGTGCCACTGATTTGATTT	
<i>mx</i>	AF491302	F	ATGAACACTCTGAACCAGCAG	54
		R	TCCCTCCTTCTTCTCTTCAT	
<i>igf1</i>	AY962254	F	CATGAAGAGACATGATGAAGTGC	55
		R	CAACACACAAACAACAATCTG	
<i>igf9</i>	AM920661	F	AAAGGCAACCGAGTTTTTGT	60
		R	ATGCGGAACATGGTTTAGC	
<i>igf30</i>	AM920662	F	TGAGGTGGGCTCTACTAT	60
		R	GTTGCCAGACATTCCTGTT	
<i>c3</i>	CB177126	F	CTACTGTCCGAAAAGGC	53
		R	GCAGTTCTCTTCAGCACATG	
<i>lyz</i>	AM749959	F	CCAGGGCTGGAATCAACTA	60
		R	CCAACATCAACCTGCAAC	
<i>hamp</i>	AM749960	F	CCGTCTGCTCACCTTTATT	60
		R	CAGGAGTCTCTGGCATCTC	
<i>lbpbpi</i>	AM920663	F	CGGCACTCAAGAGAACTC	60
		R	CACTGACGATGTTGGCAATC	
<i>prf1</i>	AM920664	F	TCTCCTCTTGCTGGTCTGT	60
		R	CAGAGTTGCTGAGCCACAGA	
<i>mcsfr</i>	AM050293	F3	CTGOCCTACAATGACAAG	55
		R4	TCAGACATCAGAGCTTCC	
<i>ncf4</i>	AM749961	F	GCGGAGTTGAACTGAAGAG	60
		R	TCACCTTCTGTGTGCTGTC	
<i>scra</i>	AY751745	F	GGAAGTGGAACAGACTGAACG	56
		R	CATCACTCTGAGGCACAGGACG	
<i>scrb</i>	AM261209	F	GCTTCTTCAATGGGACAGGA	60
		R	CCGTAGACACAGCCCTTGAT	
<i>igl</i>	AY619988	F	TTACTACTGTCAGAGTTTC	55
		R	ACTOCAGTGTGAGGGGAAGC	
<i>ighm</i>	AM493677	F	CAGCCTCGAGAAGTGGAAAC	60
		R	GAGGTTGACAGGTTGGTGT	
<i>spau-daa</i>	AY292462	F	AGCTGTTCACTGTCCCATCC	60
		R	GACCCACAGTCAGACCCAGT	
<i>iclp</i>	AM920665	F	AOCAGAGACCCAACTCCT	60
		R	GAGACTGGATGTGCTCTC	
<i>il1b</i>	AJ277166	F2	GGGCTGAACAACAGCACTCTC	60
		R3	TTAACACTCTCCACCCCTCA	
<i>caspl</i>	AM490060	ORF1-F	GAAATGGCAGCTAAGGAGCTT	54
		R3	TTGAAAATTGTTGATGGGG	
<i>p2rx7</i>	AJ887997	F5	CACAGTCTCATCAAAAAC	55
		R11	CGAACAAAGGAGATGAGGTGA	
<i>igfb1</i>	AF424703	F	AGAGACGGGCAGTAAAGAA	60
		R	GCCTGAGGAGACTCTGTTGG	
<i>tnfa</i>	AJ413189	PE1	TGTTTCAGAGTCTCCTGCAG	60
		RE3	TGCGCTACTCAGAGTCCATG	
<i>cox2</i>	AM296029	F	GAGTACTGGAAGCCGAGCAC	60
		R	GATATCACTGCCGCTGAGT	

Table 1 (Continued)

Gene	Accession number	Primer name	Nucleotide sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)
<i>rag1</i>	EF095657	F	TTAATGGGGCTCTCTGGATGG	60
		R	TGATGTCTCTCTCCAGATCC	
<i>rag2</i>	EF562633	F	AGCGATGGAGAACTGGACAC	60
		R	TAGTACGGCTCCAGGTGTT	
<i>actb</i>	X89920	F	ATCGTGGGGGGGCCCCAGGCACC	55
		R	CTCCTTAATGTCAAGCAGGATTTCC	
<i>rps18</i>	AM490061	F	AGGGTGTTGGCAGACGTTAC	60
		R	CTTCTGCTCTGTGAGGAACC	

et al., 1986), despite the fact that the head–kidney, thymus and spleen are present 2 days post-fertilization (dpf) (Romano et al., 1998, 1999), and that T and B lymphocytes are found 4 dpf and 2 weeks post-fertilization (wpf), respectively (Koumans-van Diepen et al., 1994; Romano et al., 1999). Similarly, it has been recently reported that zebrafish are able to produce antibodies to T-independent and T-dependent antigens 4 and 6 wpf, respectively (Lam et al., 2004), indicating that immunocompetence is achieved sometime after the formation of the lymphomyeloid organs and the appearance of the different leukocyte populations. Collectively, these results indicate that detailed studies using several complementary approaches should be performed for each species in order to develop effective immunization protocols.

The gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) is a teleost species that is becoming increasingly important in Mediterranean aquaculture, which has led to the generation of a wide knowledge of its biology, including fundamental aspects such as nutrition, reproduction and pathology. Thus, several infection models are available and its immune response is relatively well known at both cellular and molecular levels (Chaves-Pozo et al., 2005; Hanif et al., 2005; Mulero et al., 2007b; Sepulcre et al., 2007). In the present study, we take advantage of our knowledge of the gilthead seabream immune response and the already available tools, i.e. gene sequences and infection models, to establish a correlation between the expression pattern of several immune-related genes during ontogeny, the natural resistance of the fry against the bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phd) and the protection induced by a vaccine against this bacterium.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Gilthead seabream (*S. aurata* L., Actinopterygii, Sparidae) fry were maintained at the Murcia Oceanographic Centre (IEO) using the “green water” technique in a 5000-l round tank with an initial density of about 60 eggs/l. Natural seawater (38‰ salinity) was heated at the beginning to $17 \pm 1^\circ\text{C}$ and filtered through mechanical and biological substrates. The temperature increased naturally and had reached 26°C by the end of the experiment. Water renewal was limited to 2% daily during the first 20 days of culture by the addition of 70 ml/m³

of a microalgae-concentrated solution (Phytobloom, Necton) containing 80% of *Nannochloropsis oculata*. Afterwards, continuous water renewal (30%/h) and light aeration were provided in the tank. During the experiment the light intensity was 1000 lx at the water surface and the photoperiod 16:8. Larvae were successively fed with enriched (Selco, Inve Animal Health) rotifers from 6 to 24 days post-hatching (dph), *Artemia* nauplii (Inve Animal Health) from 20 to 35 dph, enriched Instar II *Artemia* from 31 to 58 dph, and commercial dry pellet diet (Skretting) from 54 dph onward. All animal studies were carried out in accordance with the European Union regulations for animal experimentation.

2.2. RNA isolation, production of cDNA and PCR

Total RNA was extracted from pooled larvae at 1, 2, 6, 8, 10, 13, 21, 27, 34, 48, 62 and 76 dph using Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions and treated with DNase I, amplification grade (1 unit/μg RNA, Invitrogen). The SuperScript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used to synthesize first strand cDNA with oligo-dT18 primer from 1 to 5 μg of total RNA at 50°C for 60 min. The cDNA preparations were used in PCR amplification with primers specific for innate and adaptive immune-related genes (Table 1), including toll-like receptors 9 (*tlr9*), *tlr5* and *tlr22*, macrophage colony-stimulating factor receptor (*mcsfr*), the p40^{phox} subunit of the NADPH oxidase (*ncf4* gene), lysozyme (*lyz*), hepcidin (*hamp*), complement component 3 (*c3*), bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein (*lbpl/bpl*), myxovirus (influenza) resistance gene (*mx*), interferon-regulatory factors 1 (*irf1*), *irf9*, interferon γ inducible protein 30 (*ip30*), perforin (*prf1*), recombination activating gene 1 (*rag1*) and 2 (*rag2*), T-cell receptor α (*tcra*) and β (*tcrb*) chains, immunoglobulin light (*igl*) and heavy (*ighm*) chains, major histocompatibility complex II α (*spau-daa*) and γ chains (*iclp*), cyclooxygenase 2 (*cox2*), tumor necrosis factor α (*tnfa*), transforming growth factor β 1 (*tgfb1*), interleukin-1 β (*il1b*), purinergic P2X γ receptor (*p2rx7*), caspase-1 (*casp1*), β -actin (*actb*) and ribosomal protein S18 (*rps18*). Amplification was performed in 25 μl samples containing 2.5 μl of PCR reaction buffer (10 $\times$, Invitrogen), 2 μl forward and reverse primers (10 mM each), 0.5 μl dNTP mix (2.5 mM each), 1.25 μl MgCl₂ (50 mM), 0.25 μl TaqDNA polymerase (5 U/μl, Invitrogen), 15.25 μl DNase/RNase-free

distilled water (Sigma) and 2 μ l cDNA template (corresponding to 10 ng of RNA). The cycling reaction was performed in a MasterCycler Gradient (Eppendorf) using the annealing temperatures indicated in Table 1. The PCR products were separated in a 1% agarose (Pronadisa, Spain) gel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide (Sigma) and visualised under UV light.

Real-time PCR was performed with an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). Reaction mixtures were incubated for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C, and finally 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and, 15 s at 95 °C. For each mRNA, gene expression was corrected by the *rps18* content in each sample.

2.3. Vaccination and experimental infections

Four experimental vaccination procedures were set up based on the immune gene expression data and tested in duplicate tanks. Three groups were bath vaccinated for 1 h with a commercial vaccine against Phd (Ichthovac-PD, Hipra, Spain) diluted 1:500 according to the manufacturer's recommendations. The first group was vaccinated 11 and 25 dph (B11+25), the second group 46 and 67 dph (B46+67), and the third group 102 and 130 dph (B102+130). A fourth group was vaccinated at 46 and 67 dph by oral delivery of Instar II *Artemia* fed overnight with heat-killed (60 °C, 3 h) Phd strain PC-435.1 (kindly provided by Dr. A.E. Toranzo) (O46+67). The protection was evaluated 1–3 months post-vaccination by exposing 100, 25 or 15 specimens, depending on their ages (70, 103, 125 and 155 days old), from each experimental group and a non-vaccinated group to 7.2×10^5 or 7.2×10^6 cfu/ml Phd strain PC-435.1 for 1 h (Hanif et al., 2005). Mortality was recorded daily for 10 days and the relative percent survival (RPS) was calculated: $RPS = (1 - (\% \text{ mortality of immunized larvae} / \% \text{ mortality of control non-immunized larvae})) \times 100$. Samples were also collected 1, 3 and 7 days post-vaccination for real-time PCR gene expression analysis as described above.

2.4. Determination of specific antibody titer

Serum samples obtained from 150-day-old juveniles, the earlier time when enough amounts of blood could be collected, were assessed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated monoclonal antibody against seabream IgM (Aquatic Diagnostics Ltd.), according to the manufacturer's instructions.

2.5. Statistical analysis

The SPSS 13.0.1 statistical software package was used for all statistical analysis. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and a Tukey multiple range test to determine differences between groups.

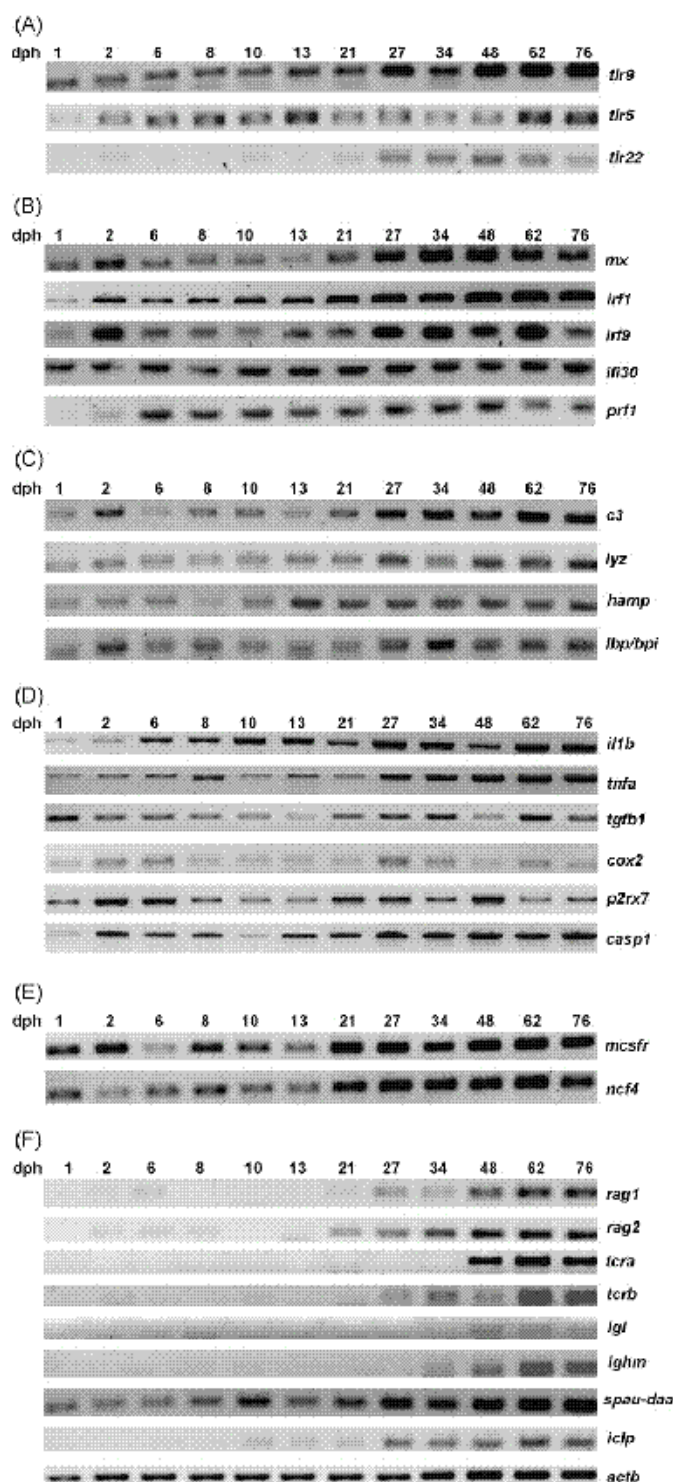


Fig. 1. Expression profile of immune gene during ontogeny. Ethidium bromide-stained agarose gels of toll-like receptors (A), antiviral (B) and antibacterial (C) factors, regulatory molecules (D), innate cellular immunity (E), and adaptive immunity (F) amplification products obtained from whole larvae of the indicated ages. The amplification product of the housekeeping gene *actb* is also shown in (F).

3. Results

3.1. Innate immune gene expression profiles during development

We first evaluated the expression of several TLRs, which are transmembrane proteins that recognize conserved pathogen structures to induce innate immune effector molecules. The transcript of *tlr9*, a bacterial DNA sensing receptor, and that of *tlr5*, which senses flagellin, were detected 1 dph. However, the transcript of *tlr22*, which codes for an orphan receptor with no apparent orthologs in mammals (Roach et al., 2005), was not clearly observed until 27 dph (Fig. 1A).

We next analyzed the expression of the genes that encode antiviral, i.e. *mx*, *irf1*, *irf9* and *ifi30* (Fig. 1B), as well as antibacterial, i.e. *c3*, *lyz*, *hamp* and *lbplbpl* (Fig. 1C), which are supposed to be important regulatory and effector molecules of larval immunity. The results show that all antiviral and antibacterial factors were expressed at the time of hatching. Of interest was the fact that *prf1* transcript which codes for perforin, a cytolytic protein stored in the granules of cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cells, was also detected early during development (2 dph) (Fig. 1B).

Cytokines and inflammatory prostanoids are key players in the regulation of the immune response. Therefore, we evalu-

ated the expression of two pro-inflammatory cytokine genes, *il1b* and *tnfa*, one anti-inflammatory cytokine gene, *tgfb1*, and the gene coding for the enzyme responsible for the synthesis of prostaglandins, *cox2* (Fig. 1D). *il1b* was already expressed at hatching, as *p2rx7* and *caspl* (Fig. 1D), whose products are responsible for the processing of mammalian *Il1b* to its biologically active form and subsequent release (Solle et al., 2001). Similarly, the *tnfa*, *tgfb1* and *cox2* transcripts were also found from 1 dph (Fig. 1D).

We next examined the development of innate cellular immunity through the expression of *mcsfr*, whose expression is restricted to the macrophage lineage in adult gilthead seabream (Roca et al., 2006) and *nfc4*, which codes for a component of phagocytic NADPH oxidase (Matute et al., 2005) (Fig. 1E). As expected in the light of previous data showing that zebrafish embryos possess early macrophages that differentiate in the yolk sac before other leukocytes arise (Herbomel et al., 1999), *mcsfr* and *nfc4* were both expressed 1 dph.

3.2. Adaptive immune gene expression profiles during development

To study the development of adaptive immunity, we analyzed the expression of *rag1*, *rag2*, *tcr α* , *tcr β* , *igl*, *ighm*, *spau-daa* and *ictp* transcripts (Fig. 1F). Strikingly, *rag1* and *rag2* tran-

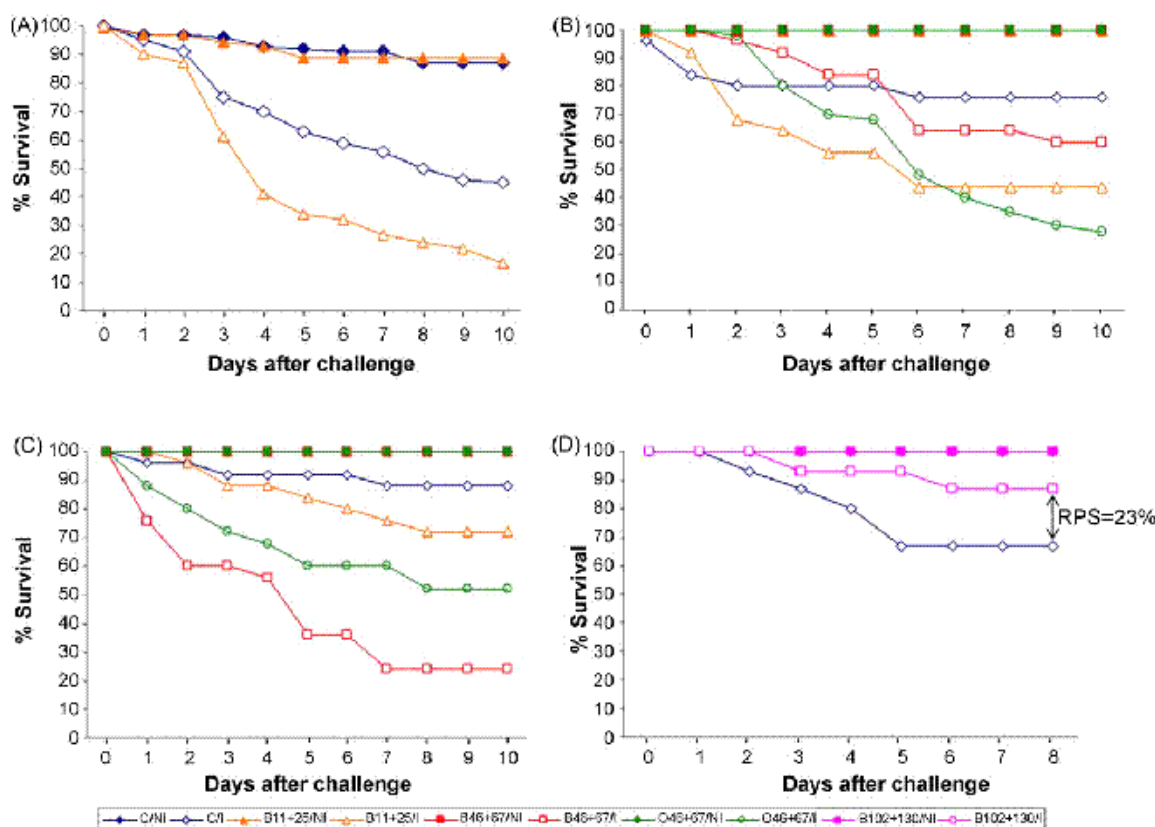


Fig. 2. Effects of vaccination in the resistance of fry to infection. Survival of 70-day-old fry (A), 103-day-old fry (B), 125-day-old fry (C) and 155-day-old fry (D) exposed to 7.2×10^5 cfu/ml (A–C) or 7.2×10^6 cfu/ml (D) Phd strain PC-435.1 for 1 h. The results are representative of independent experiments performed with duplicate tanks of all experimental groups. Ni, non-infected; I, infected; C, control group (non-vaccinated); B11 + 25, bath vaccinated group 11 and 25 dph; B46 + 67, bath vaccinated group 46 and 67 dph; O46 + 67, oral vaccinated group 46 and 67 dph; B102 + 130, bath vaccinated group 102 and 130 dph; RPS, relative percentage of survival.

scripts were detected from 21 dph and soon after (27–34 dph) the transcripts coding for Tcr and Ig chains, coinciding with the microscopic identification of the thymus at 34 dph (Mulero et al., 2007b). However, *spau-daa* was detected as early as 1 dph, while *ictp* was found for the first time at 10 dph (Fig. 1F).

3.3. Vaccination and disease resistance of fry

The expression pattern of adaptive immune genes obtained above suggested that the immunocompetence of seabream young larvae depends on innate immunity and, therefore, vaccination of the larvae might be unsuccessful or even detrimental. To directly test this hypothesis and to determine the earliest stage when seabream larvae might be successfully vaccinated, we exposed fry to a Phd bacterin before (11 and 25 dph), around (46 and 67 dph) and after (102 and 130 dph) the appearance of adaptive immunity markers and the histological detection of the thymus (around 30 dph) and analyzed the protection conferred against an experimental challenge with live Phd. Surprisingly, not only the group of larvae exposed to the bacterin 11 and 25 dph (Fig. 2A–C) but also the group exposed to 46 and 67 dph, whether by immersion or oral delivery using *Artemia* (Fig. 2B and C), showed increased susceptibility to an experimental challenge with 7.2×10^5 cfu/ml Phd. This higher susceptibility to Phd infection of the groups exposed to the bacterin lasted for up to 55 days following vaccination, the longest time analyzed (Fig. 2C). In contrast, the fry exposed to the bacterin at 102 and 130 dph showed a significant increase in protection against an infection with 7.2×10^6 cfu/ml Phd 25 days post-vaccination compared with control fish (RPS = 23%) (Fig. 2D). In addition, when assayed 20 days post-vaccination, the specimens vaccinated in the juvenile stage also showed Phd-specific antibodies (titer 1/50) while non-vaccinated fish did not (data not shown). Unfortunately, we were unable to study whether this protection remained for longer since juveniles developed a natural resistance to Phd infection (Fig. 3). Thus, although a LD₅₀ dose of 7.2×10^5 bacteria/ml was established for 70-day-old larvae, this dose caused a 25% mortality of 103-day-old fry, 15% mortality of 125-day-old fry and no mortality of 140-day-old fry. However, exposing 155-day-old fry to one order of magnitude higher dose of Phd resulted in a mortality higher than 30% in non-vaccinated fish (Fig. 3).

In order to determine the molecular mechanisms involved in the increased susceptibility of vaccinated larvae and the impossibility of collecting blood from larvae and young juveniles, we analyzed by real-time PCR the mRNA levels of *ighm* as well as those of *il1b*, *tnfa* and *tlr5*, which have been shown to be excellent markers of the inflammatory response of the gilthead seabream (Sepulcre et al., 2007), and *tgfb1*, the only anti-inflammatory gene whose sequence is available in this species. The mRNA levels of *ighm* increased throughout development and reached a plateau in juveniles (i.e. by 100 dph) (Fig. 4A). In addition, the group of larvae exposed to the bacterin by immersion 46 and 67 dph showed lower *ighm* mRNA levels than non-vaccinated fish after the first vaccination but showed higher levels 1 day after the second vaccination. In contrast, the *ighm* mRNA levels of juveniles vaccinated 103 and 131 dph

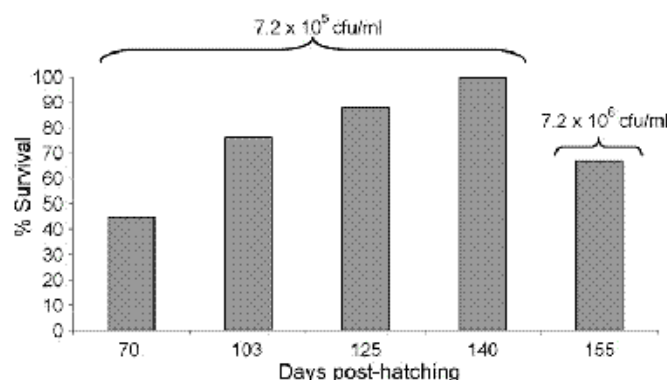


Fig. 3. Natural resistance of fry to Phd. The percentage of survival of non-vaccinated fry of the indicated ages exposed to 7.2×10^5 or 7.2×10^6 cfu/ml Phd strain PC-435.1 for 1 h is shown.

showed higher *ighm* mRNA levels 2 and 1 days after the first and second vaccination, respectively (Fig. 4B). As regards the mRNA levels of *il1b*, they significantly increased in larvae 1 day after the first vaccination but drastically decreased 1 and 2 days after the second vaccination (Fig. 5A). However, we found

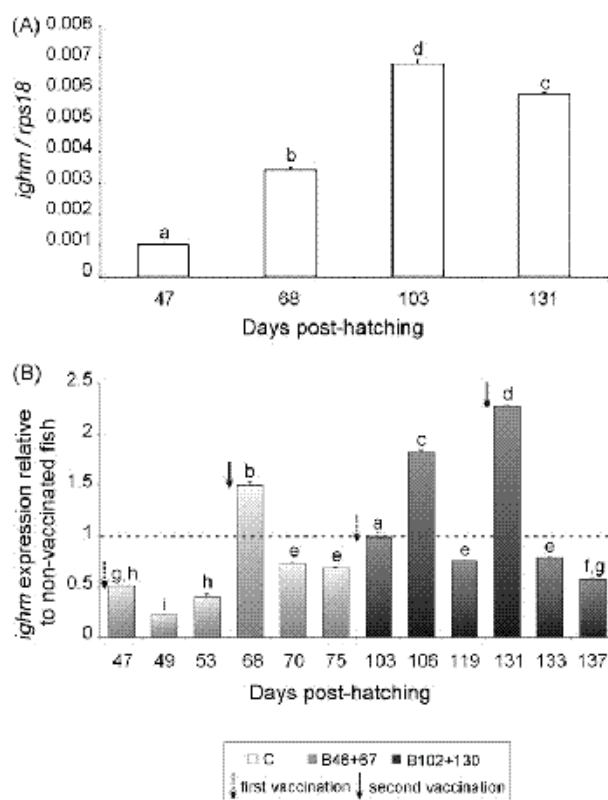


Fig. 4. Effects of vaccination in the expression of *ighm* gene in larvae and juveniles. The mRNA levels of *ighm* were determined by real-time PCR using mRNA extracted from whole fish fry of the indicated ages from the control (non-vaccinated) group (C), the group bath vaccinated 46 and 67 dph (B46 + 67) and the group bath vaccinated 102 and 130 dph (B102 + 130). Gene expression is normalized against *rps18* and shown as relative to the mean of non-vaccinated fish of the same age in (B). Each bar represents the mean $\pm$ S.E. of triplicate samples. Different letters denote statistically significant differences between the groups according to a Tukey test. The groups marked with "a" in (B) did not show statistically significant differences from non-vaccinated fish. The first and second vaccination of each experimental group is indicated with vertical arrows.

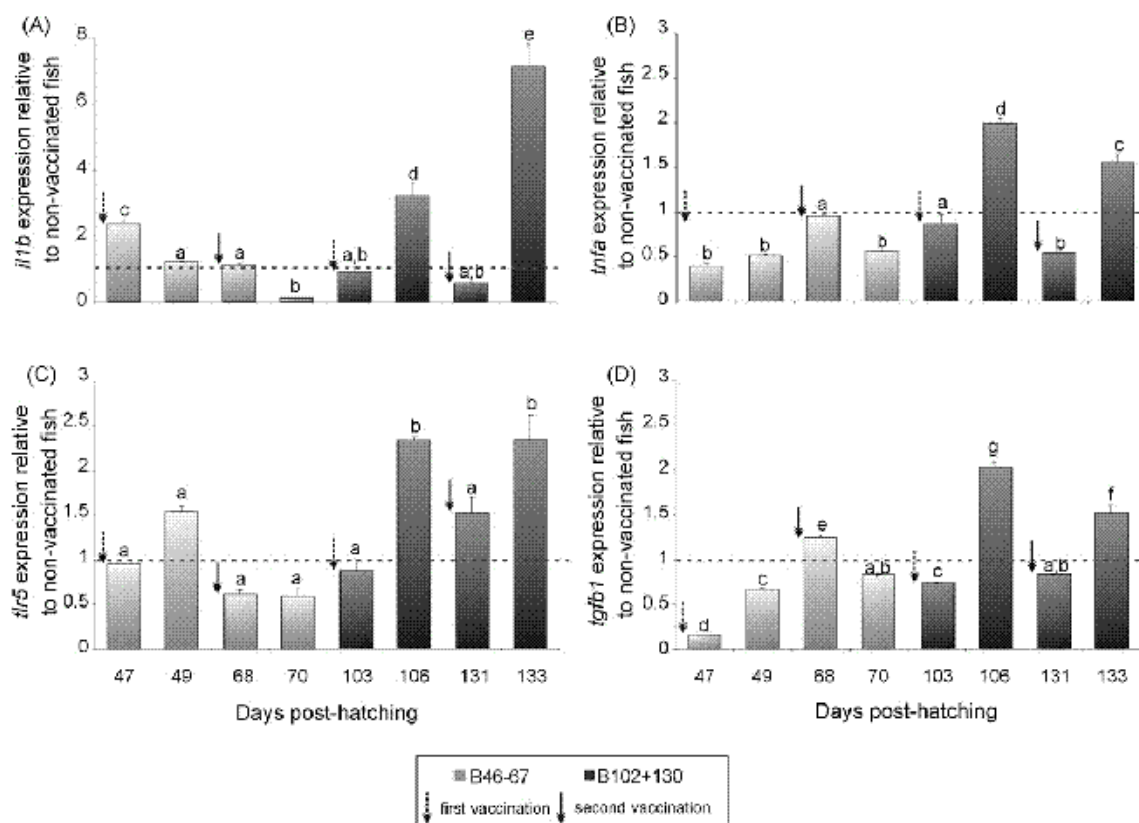


Fig. 5. Effects of vaccination in the expression of *il1b*, *tnfa*, *ilr5* and *tgfb1* genes in larvae and juveniles. The mRNA levels of *il1b* (A), *tnfa* (B), *ilr5* (C) and *tgfb1* (D) were determined by real-time PCR using mRNA extracted from whole fish fry of the indicated ages from the control (non-vaccinated) group (C), the group bath vaccinated 46 and 67 dph (B46 + 67) and the group bath vaccinated 102 and 130 dph (B102 + 130). Gene expression is normalized against *rps18* and shown as relative to the mean of non-vaccinated fish of the same age. Each bar represents the mean $\pm$ S.E. of triplicate samples. Different letters denote statistically significant differences between the groups according to a Tukey test. The groups marked with "a" did not show statistically significant differences from non-vaccinated fish. The first and second vaccination of each experimental group is indicated with vertical arrows.

that the *il1b* mRNA levels in juveniles sharply increased 2 days after the first and second vaccination (Fig. 5A). Similarly, the mRNA levels of *tnfa* (Fig. 5B), *ilr5* (Fig. 5C) and *tgfb1* (Fig. 5D) tended to decrease in vaccinated larvae while they consistently increased in vaccinated juveniles.

4. Discussion

Fish eggs hatch in a very early phase of development, so larvae are exposed to the millions of microorganisms present in the aquatic environment (Bergh et al., 1989; Breitbart et al., 2002). Immunological defence in fishes seems to be limited during the first stages of life, and although some studies suggest that maternal antibodies and complement proteins can be transferred through the yolk sac (Magnadottir et al., 2005) and confer some protection (Hanif et al., 2004), it seems that larvae depend fundamentally on their innate defence mechanisms since adaptive immunity develop late. In addition, earlier studies reported that fish are immunocompetent sometime after the first observation of lymphomyeloid organs (Ellis, 1977; Botham et al., 1980; Tatner and Manning, 1983; Nakanishi, 1986; Lam et al., 2004).

In the present study we have demonstrated that the first lymphocyte markers, i.e. *rag1* and *rag2*, are detected by RT-PCR at 21–27 dph. In addition, the expression of the genes coding for

the two subunits of Rag is followed by the expression of the α and β subunits of Tcr and the light and heavy chains of IgM at 27–48 dph, coinciding with the histological identification of the thymus around 34 dph (Mulero et al., 2007b). Notably, gene coding for the α chain of the major histocompatibility complex II (*spau-daa*) was expressed at hatching while the gene coding for the invariable γ chain (*ictp*) was firstly found at 10 dph. This asynchronous expression of *spau-daa* and *ictp* before the appearance of the lymphocyte markers is unexpected and its biological significance need further investigations.

As regards innate immune genes, most of them are already expressed at hatching, including those coding for innate immune receptors (*tlr5* and *tlr9*), pro-inflammatory (*il1b*, *tnfa* and *cox2*) and anti-inflammatory (*tgfb1*) molecules, antiviral (*mx*, *irf1*, *irf9*, *ifl30* and *pri1*) and antibacterial (*c3*, *lyz*, *hamp* and *lbp/bpi*) molecules, and phagocyte markers (*mcsfr* and *nrf4*). The unexpected expression of the *pri1* gene at 2 dph, more than 40 days before the appearance of functional transcript coding for the α and β chains of the Tcr, suggests that NK-like cells develop early during the ontogeny of the gilthead seabream and might play an important role in the protection of young larvae against infection.

Another interesting observation of this study is that the transcript of *tlr22* was not clearly detected until 27 dph. The Tlr22

belongs to the Tlr11 family, which includes the Tlr11–13 and Tlr21–23 subfamilies (Roach et al., 2005). Little is known about the ligands for this family, but mouse Tlr11 apparently recognizes uropathogenic bacteria (Zhang et al., 2004) and a protozoan profilin-like protein (Yarovinsky et al., 2005). Therefore, it is difficult to anticipate the functional relevance of the observed late expression of Tlr22 in sea bream larvae before the unequivocal identification of its ligand(s).

The immune gene expression data indicate that the immunocompetence of the gilthead sea bream during the early developmental stages depends on innate immunity, as expected from earlier work in the zebrafish and other teleosts (Zapata et al., 2006). In addition, it also suggests that vaccination of young larvae might be unsuccessful. In fact, we found that exposing young larvae not only before (i.e. 11 and 25 dph) but also around (i.e. 46 and 67 dph) the appearance of lymphocyte markers to a Phd bacterin, by either bath immersion or oral delivery, resulted in decreased expression of all the genes analyzed, including *ighm*, *il1b*, *tnfa*, *tlr5* and *tgfb1*, and increased susceptibility to an experimental challenge with Phd that lasted for up to 55 days post-vaccination. In sharp contrast, the bacterin was able to increase the Phd-specific antibody titers and the expression of *ighm*, *il1b*, *tnfa*, *tlr5* and *tgfb1* genes when administered at 102 and 130 dph and this resulted in an efficient protection of young juveniles. We also found that the natural resistance of larvae increased with age so that the oldest fish were strongly resistant to an infection with this pathogen. Unfortunately, we were unable to identify the mechanisms responsible for this resistance or whether it is associated to innate or adaptive immunity. Nonetheless, it is tempting to speculate that the gradual increase of the basal transcription of *ighm* from the larval to the juvenile stage may contribute to this protection. In addition, the expression of others innate or adaptive immune-related genes might gradually increase during development and this would also affect the natural resistance of juveniles and adults to Phd infection. Anyway, our results illustrate the strong dependence of young fish larvae on innate immunity, the ineffectiveness of vaccination to prevent infectious diseases during larval stages and the lack of correlation between the achievement of immunocompetence and the formation of the lymphomyeloid organs and the detection of the adaptive immunity markers.

Acknowledgements

We thank B. Castellana, J.V. Planas, E. Sarropoulou and G. Kotoulas for their collaboration in obtaining some of the seabream sequences used in this study, and Culmarex, S.A. for financial support and technical advice. This work was supported by the Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (grant 08BIO2005-01-6471 to V.M.) and Fundación Séneca-Murcia (fellowship to I.M.).

References

- Bergh, Ø., Børshems, K.Y., Bratbak, G., Haldal, M., 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340, 467–468.
- Botham, J.W., Grace, M.F., Manning, M.J., 1980. Ontogeny of first and second set alloimmune reactivity in fishes. In: Botham, M.J., Manning, M.J. (Eds.), *Phylogeny of Immunological Memory*. Elsevier, Amsterdam, pp. 83–92.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J.M., Segall, A.M., Mead, D., Azam, F., Rohwer, F., 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14250–14255.
- Chaves-Pozo, E., Muñoz, P., López-Muñoz, A., Pelegrín, P., García Ayala, A., Mulero, V., Meseguer, J., 2005. Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res.* 320, 61–68.
- Ellis, A.E., 1977. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leukocyte reactivity. In: Solomon, J.B., Horton, J.D. (Eds.), *Developmental Immunobiology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 225–231.
- Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 397–412.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Dimitriadis, G.J., 2004. Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 411–435.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., Dimitriadis, G.J., 2005. The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 345–361.
- Herbomel, P., Thisse, B., Thisse, C., 1999. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126, 3735–3745.
- Koumans-van Diegen, J.C.E., Taverne-Thiele, J.J., van Rens, B.T.T.M., Rombout, J.H.W.M., 1994. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.): an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 19–28.
- Lam, S.H., Chua, H.L., Gong, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 9–28.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 429–439.
- Matule, J.D., Arias, A.A., Dinuer, M.C., Patiño, P.J., 2005. p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 291–302.
- Mughal, M.S., Farley-Ewens, E.K., Manning, M.J., 1986. Effects of direct immersion in antigen on immunological memory in young carp, *Cyprinus carpio*. *Vel. Immunol. Immunopathol.* 12, 181–192.
- Mulero, I., García-Ayala, A., Meseguer, J., Mulero, V., 2007a. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: a minireview. *Aquaculture* 268, 244–250.
- Mulero, I., Chaves-Pozo, E., García-Alcázar, A., Meseguer, J., Mulero, V., García Ayala, A., 2007b. Distribution of the professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during the ontogeny of lymphomyeloid organs and pathogen entry sites. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1024–1033.
- Nakanishi, T., 1986. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissue of the marine teleost, *Sebastes marmoratus*. *Vel. Immunol. Immunopathol.* 12, 213–221.
- Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., Aderem, A., 2005. The evolution of vertebrate toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9577–9582.
- Roca, F.J., Sepulcre, M.P., López-Castejón, G., Meseguer, J., Mulero, V., 2006. The colony-stimulating factor-1 receptor is a specific marker of macrophages from the bony fish gilthead seabream. *Mol. Immunol.* 43, 1418–1423.
- Romano, N., Picchielli, S., Taverne-Thiele, J.J., Taverne, N., Abelli, L., Mastrolia, L., Verbarg-van Kemenade, B.M.L., Rombout, J.H.W.M., 1998. Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anal. Embryol.* 198, 31–41.
- Romano, N., Taverne-Thiele, A.J., Panelli, M., Baldassini, M.R., Abelli, L., Mastrolia, L., Van Muiswinkel, W.B., Rombout, J.H.W.M., 1999. Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 123–137.
- Sepulcre, M.P., López-Castejón, G., Meseguer, J., Mulero, V., 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs

- underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Mol. Immunol.* 44, 2009–2016.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C.A., 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125–132.
- Tatner, M.F., Manning, M.J., 1983. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 69–75.
- Yarovinsky, E., Zhang, D., Andersen, J.P., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, P.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., Sher, A., 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626–1629.
- Zapata, A., Díez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez de Frías, C., Cortés, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 126–136.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., Ghosh, S., 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522–1526.

OBJETIVOS

El presente trabajo se propone los siguientes objetivos:

1. Caracterizar los macrófagos y las células productoras de interleuquina-1 β de dorada en ejemplares sanos e infectados experimentalmente con la bacteria patógena *Vibrio anguillarum*.
2. Caracterizar morfológica, funcional y evolutivamente los mastocitos de dorada.
3. Determinar la presencia de péptidos antimicrobianos, piscidinas, en células del sistema inmunitario de dorada y de otras especies de teleósteos.
4. Caracterizar el sistema inmunitario de dorada durante el desarrollo larvario.
5. Determinar la resistencia natural de larvas y juveniles de dorada frente al patógeno bacteriano *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y la protección inducida por la vacunación frente a este patógeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Animales

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se utilizaron larvas, juveniles y adultos de dorada (*Sparus aurata* L., Perciformes, Sparidae) y ejemplares adultos de lubina (*Dicentrarchus labrax* L., Perciformes, Moronidae), de lenguado (*Solea senegalensis* K., Pleuronectiformes, Soleidae), de rodaballo (*Psetta maxima* L., Pleuronectiformes, Scophthalmidae), de anguila (*Anguilla anguilla* L., Anguilliformes, Anguillidae), de pez cebra (*Danio rerio* H., Cypriniformes, Cyprinidae), de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss* W., Salmoniformes, Salmonidae), de pez pulmonado sudamericano (*Lepidosiren paradoxa* F., Lepidosireniformes; Lepidosirenidae), de rana común (*Rana perezi* S., Anura, Ranidae) y de tritón vientre de fuego (*Cynops orientalis* D., Caudata, Salamandridae).

Larvas y juveniles de dorada fueron mantenidos en el Centro Oceanográfico de Murcia (IEO) mediante la técnica del agua verde en tanques circulares de 5000 litros con una densidad inicial de aproximadamente 60 huevos/litro. Inicialmente el agua de mar de 38‰ de salinidad fue calentada hasta los $17\pm 1^{\circ}\text{C}$ y filtrada mediante sustratos mecánicos y biológicos. La temperatura aumentó de forma natural y alcanzó los 26°C al final de la fase experimental. La renovación del agua se limitó al 2% diario durante los primeros 20 días y fue suplementada con 70ml/m^3 de una solución concentrada de microalgas (Phytobloom, Necton) que contenía un 80% de *Nannochloropsis oculata*. Posteriormente, se proporcionaron aireación ligera y renovación continua del agua (30%/h) a los tanques. Durante la fase experimental la intensidad lumínica fue de 1000 lux en la superficie del agua y el fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Las larvas se alimentaron de forma sucesiva con rotífero enriquecido (Selco, Inve Animal Health) entre los días 6 y 24 dde, con nauplios de *Artemia* (Inve Animal Health) entre los días 20 y 35 dde, con *Artemia* instar II entre los días 31 y 58 dde y con pienso comercial (Skretting) a partir del día 54 dde. La toma de muestras se inició a finales de enero o principios de febrero (época de la puesta). Las larvas fueron muestradas a los 1, 2, 6, 8, 10, 13, 21, 27, 34, 47, 48, 49, 62, 68, 70 y 76 dde y los juveniles a los 92, 103, 106, 111, 131, 132, 133 y 146 dde.

Ejemplares adultos de dorada con un peso medio de 150 gramos procedentes del IEO fueron mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad en

acuarios provistos de un circuito cerrado de agua que presentaba una velocidad de flujo de 1500l/hora, una temperatura de 23°C y una salinidad de 22‰. El agua tenía un pH de 7'5-8'0, una concentración de amoníaco por debajo de 0'02mg/ml y de nitritos por debajo de 0'1 mg/ml. Los peces fueron alimentados con pienso comercial (Skretting) a una tasa de 15 gramos de pienso/Kg de biomasa de pez por día. Los parámetros anteriores fueron controlados semanalmente y mantenidos constantes.

Los ejemplares de lubina y lenguado fueron obtenidos del Centro Oceanográfico de Murcia (IEO), los de rodaballo fueron cedidos por la Dr. B. Novoa, los de anguila por el Dr. R. Barrera, los de trucha por la Dr. A. Estepa y los de pez pulmonado sudamericano por los Drs. M.L. Ribeiro y R. DaMatta. Los ejemplares de pez cebra del fondo genético TL fueron cedidos por el Centro Internacional de Recursos del Pez cebra (ZIRC) y mantenidos según describe la guía de uso del pez cebra en laboratorio (Westerfield, 2000). Los ejemplares de rana común y tritón vientre de fuego fueron suministrados por un distribuidor local. Todas estas especies fueron utilizadas únicamente para el análisis de la presencia de histamina y/o piscidininas.

El doctorando tiene la homologación de la formación en animales utilizados para la experimentación y fines científicos como personal de la categoría B de acuerdo con la disposición transitoria tercera del Real Decreto 1201/2005. Así mismo, este estudio ha sido realizado de acuerdo con las leyes de experimentación animal de la Unión Europea (86/609/EU).

II. Infecciones experimentales en dorada

II.1. Infección experimental con *V. anguillarum*

Ejemplares adultos fueron inyectados intraperitonealmente con 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) solo o conteniendo una dosis subletal (10^8) de células *V. anguillarum* R82 (serogrupo 01, cedido por la Dr. AE Toranzo) llevadas a crecimiento exponencial (Chaves-Pozo y col., 2004). El riñón cefálico, bazo, timo, hígado, branquia e intestino se obtuvieron tras 4, 24, 48 y 72 horas de infección bacteriana y se procesaron para estudios de microscopía óptica.

II.2. Vacunación de larvas y juveniles frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* e infección experimental

Se llevaron a cabo cuatro ensayos de vacunación diferentes por duplicado. Tres grupos fueron vacunados dos veces con un intervalo de aproximadamente 15 días, por inmersión durante 1 hora, con una vacuna comercial frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* (Icthiovac-PD, Hipra, España) a una dilución de 1:500 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El primer grupo fue vacunado a los 11 y a los 25 dde, el segundo grupo a los 46 y a los 67 dde y el tercer grupo a los 102 y a los 130 dde. Un cuarto grupo fue vacunado oralmente a los 46 y 67 dde mediante suministro de *Artemia* instar II alimentada durante toda la noche con *P. damselae* subsp. *piscicida* (cepa PC-435.1, cedida por la Dr. A.E. Toranzo) inactivada por calor (60°C durante 3 horas).

Se evaluó la protección conferida por la vacuna entre el primer y tercer mes después de la vacunación mediante la exposición de 15, 25 o 100 ejemplares, dependiendo de la edad (70, 103, 125 y 155 dde) de cada grupo experimental y de un grupo no vacunado, a 7.2×10^5 o 7.2×10^6 unidades formadoras de colonias (u.f.c)/ml de la cepa PC-435.1 de *P. damselae* subsp. *piscicida* durante 1 hora (Hanif y col., 2005). La mortalidad fue registrada durante 10 días y se calculó el porcentaje relativo de supervivencia (RPS) como 1-% mortalidad de la larvas inmunizadas/% mortalidad de larvas controles no inmunizadas. Así mismo, varios ejemplares fueron procesados a los 1, 3 y 7 días después de la vacunación para estudios de expresión génica mediante PCR a tiempo real (ver apartado IX) y se obtuvieron muestras de sangre para la determinación del nivel sérico de IgM específica frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* en individuos de 150 dde (ver apartado XI).

III. Análisis realizados

Muestras	Análisis mediante	Métodos y ensayos
Larvas y juveniles	Microscopía óptica	Hematoxilina-Eosina
		Inmunocitoquímica
	RT-PCR	
Riñón cefálico	Microscopía óptica	Hematoxilina-Eosina
		Aislamiento de macrófagos
		Inmunocitoquímica
	Microscopía electrónica	Fagocitosis
		Inmunocitoquímica
	Citometría de flujo	Fagocitosis
		Producción de ROIs
Sangre	ELISA	Determinación de IgM específica frente <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>
Intestino, Branquia	Microscopía óptica	Hematoxilina-Eosina
		Azul de toluidina
		Giemsa
		Inmunocitoquímica
		Ensayos farmacológicos <i>in vitro</i> : contracción intestinal y vascular
	Microscopía electrónica	Inmunocitoquímica
Bazo, Timo, Hígado	Microscopía óptica	Hematoxilina-Eosina
		Inmunocitoquímica
Larvas y juveniles	Mortalidad	Vacunación e infección con <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>
Adultos		Ensayos farmacológicos <i>in vivo</i>

IV. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo primario			Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Técnica	Dilución óptima	Anticuerpos		Dilución óptima	
G7 (Sepulcre y col., 2002)	Inmunocitoquímica indirecta	1:100	Anti-IgG de ratón-HRP (Sigma)		1:100	
			Anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina (Sigma)		1:50	
Anti-MCSFR (Pacific Immunology)	Immunocitoquímica indirecta	1:100	Anti-IgG de conejo biotinilado (Dako)	Complejo avidina-biotina-HRP (Dako)	1:100	1:100
	Inmunofluorescencia	1:100	Anti-IgG de conejo-TRITC (Dako)		1:20	
Anti-IL-1 β (Pacific Immunology)	Immunocitoquímica indirecta	1:100	Anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina (Sigma)		1:50	
			Anti-IgG de conejo biotinilado (Dako)	Complejo avidina-biotina-HRP (Dako)	1:100	1:100
Anti-histamina (Sigma)	Immunocitoquímica indirecta	1:100	Anti-IgG de conejo biotinilado (Dako)	Complejo avidina-biotina-HRP (Dako)	Anti-IgG de conejo conjugado con oro (Sigma)	1:100 1:100 1:25
Anti-serotonina (INC)	Immunocitoquímica indirecta	1:500	Anti-IgG de conejo biotinilado (Dako)	Complejo avidina-biotina-HRP (Dako)	1:100	1:100
Anti-piscidina 1 (cedido por Dr. E. Noga)	Immunocitoquímica indirecta	1:50	Anti-IgG de conejo biotinilado (Dako)	Complejo avidina-biotina-HRP (Dako)	Anti-IgG de conejo conjugado con oro (Sigma)	1:100 1:100 1:25
Anti-piscidina 3 (cedido por Dr. E. Noga)	Immunocitoquímica indirecta	1:200	Anti-IgG de conejo biotinilado (Dako)	Complejo avidina-biotina-HRP (Dako)	1:100	1:100

V. Microscopía

V.1. Microscopía óptica de campo claro

Larvas y juveniles de dorada, así como riñón cefálico, bazo, timo, intestino y branquia, obtenidos mediante disección de ejemplares adultos de dorada, lubina, lenguado, rodaballo, anguila, pez cebra, trucha, pez pulmonado sudamericano, rana común y tritón vientre de fuego a los que previamente se les extrajo la sangre, fueron

fijados en una solución Bouin o en una solución de metanol conteniendo 10% de formalina y 5% de ácido acético, embebidos en Paraplast Plus (Sherwood Medical, Albuta, Canadá) y cortados en secciones de 5 μ m de grosor. Las secciones fijadas con Bouin se tiñeron con hematoxilina-eosina, eosina o Giemsa. Para ello, se desparafinaron en xilol durante 10 minutos (2 lavados de 5 minutos) y se hidrataron en soluciones decrecientes de etanol (100%, 90%, 70%) durante 3 minutos cada una y en agua destilada durante 5 minutos. Las secciones que fueron teñidas con hematoxilina-eosina o eosina, fueron sumergidas en hematoxilina durante 5 minutos y en eosina durante 3 minutos, o en eosina durante 3 minutos, respectivamente, lavando el exceso de los colorantes en agua del grifo durante 10 minutos y en agua destilada durante 5 minutos después de cada colorante. Posteriormente, las secciones fueron deshidratadas en soluciones crecientes de etanol (70%, 90%, 100%) durante 3 minutos cada una, aclaradas en xilol durante 10 minutos (2 lavados de 5 minutos) y montadas en una resina comercial, DPX (Probus). Las secciones teñidas con Giemsa (solución de Azur B, eosina y azul de metileno, Merk) fueron sumergidas en Giemsa diluida 1:10 en agua del grifo durante 1 hora y lavadas en agua del grifo hasta la total diferenciación de los colorantes, lo que fue comprobado mediante la observación de las secciones al microscopio óptico. Posteriormente fueron lavadas en agua destilada, dejadas secar varias horas al aire y montadas en DPX. Para la detección de metacromasia, las secciones fueron teñidas con 0'5% de azul de toluidina en HCl 0'5 N durante 10 minutos a 60°C (pH 0'5) o bien con 0'2% de azul de toluidina en tampón acetato 0'2 M (pH 4'2). Posteriormente, las secciones fueron deshidratadas, aclaradas en xilol y montadas como se ha descrito anteriormente.

V.2. Inmunocitoquímica

Esta metodología (Stenberger, 1986) se llevó a cabo sobre secciones de tejido fijadas en Bouin. Los sueros utilizados fueron un anticuerpo monoclonal específico de granulocitos acidófilos de dorada (G7) y varios anticuerpos policlonales: (i) frente al receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos de dorada (anti-M-CSF-R), (ii) frente a la IL-1 β de dorada (anti-IL-1 β), (iii) frente a los miembros 1 y 3 de la familia de péptidos antimicrobianos piscidinas (anti-piscidina 1 y anti-piscidina 3), (iv) frente a histamina (anti-histamina) y (v) frente a serotonina (anti-serotonina).

V.2.1. Marcaje con G7

Larvas y juveniles y secciones tisulares de riñón cefálico, bazo, timo, intestino y branquia de dorada, una vez desparafinadas e hidratadas (apartado V.1), fueron incubadas en una solución inhibidora de la peroxidasa endógena (peróxido de hidrógeno en metanol, 1:9) durante 40 minutos. Posteriormente fueron lavadas en PBS (pH 7'2-7'4) y en tampón PBS con albúmina de suero bovino (BSA) al 0'01% y Triton X-100 al 0'2% (PBT) durante 5 minutos cada lavado e incubadas en PBS con un 5% BSA, como agente de bloqueo, durante 30 minutos. Después de ser lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal G7 (1:100) diluido en PBS con un 1% BSA. A continuación fueron lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez, incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo contra IgG de ratón producido en cabra y conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido 1:100 en PBS con 1% BSA y lavadas dos veces en PBT y una en tampón Tris-HCl 0'05M (pH 7'4-7'6) durante 5 minutos cada vez.

La actividad peroxidasa fue revelada incubando las secciones en 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0'05% en tampón Tris-HCl 0'05M (pH 7'4-7'6) con H₂O₂ al 0'05% durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida lavando las secciones en tampón Tris-HCl 0'05M (pH 7'4-7'6) y en agua destilada durante 5 minutos. A continuación, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina durante 1 minuto y lavadas en agua del grifo durante 10 minutos y en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente fueron deshidratadas, aclaradas y montadas en DPX (apartado IV.1).

La especificidad de las reacciones fue determinada mediante la omisión del primer anticuerpo.

V.2.2. Marcaje con anti-IL-1 β , anti-histamina, anti-serotonina, anti-piscidina 1 y anti-piscidina 3.

Secciones tisulares de riñón cefálico y bazo de dorada, branquia e intestino de dorada, lubina, rodaballo, lenguado, anguila, pez cebra, trucha y pez pulmonado

sudamericano e intestino de rana común y tritón vientre de fuego, una vez desparafinadas e hidratadas, respectivamente (apartado V.1), fueron incubadas en solución inhibidora de la peroxidasa endógena (apartado V.2.1). Posteriormente, las muestras fueron lavadas en PBS y en PBT durante 5 minutos cada vez, incubadas en PBS con un 5% BSA, como agente de bloqueo, durante 30 minutos y lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez. Posteriormente fueron incubadas con anti-IL-1 β (1:100), anti-histamina (1:100), anti-serotonina (1:500), anti-piscidina 1 (1:50) y anti-piscidina 3 (1:200) diluidos en PBS con un 1% BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (1:100) producido en cerdo (Dako) y diluido en PBS con un 1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas dos veces con PBT durante 5 minutos cada vez e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un complejo avidina-biotina conjugado con peroxidasa (Dako). La actividad peroxidasa fue revelada como se ha descrito en el apartado V.2.1 y las muestras contrastadas con hematoxilina. La especificidad de la reacción fue determinada mediante la omisión del primer anticuerpo y mediante la preadsorción del anticuerpo con un exceso 10 molar del péptido o amina correspondiente.

V.2.3. Marcaje con anti-M-CSF-R

Secciones tisulares de riñón cefálico y bazo de dorada, lubina y lenguado y de timo, intestino, hígado y branquia de dorada, una vez desparafinadas e hidratadas (apartado V.1), fueron incubadas en ácido etilendiaminotetracético (EDTA, 1mM, pH 8'0) a 95 °C durante 20 minutos para desenmascarar el antígeno. Después de dejar enfriar las secciones, se procedió como en el apartado V.2.2. Sólo algunas de las secciones se contrastaron con hematoxilina.

V.2.4. Método doble inmunocitoquímica

V.2.4.1. Marcaje con G7/anti-histamina o G7/anti-piscidina 3

Secciones tisulares de branquia e intestino de dorada, una vez desparafinadas e hidratadas (apartado V.1) fueron sometidas a una doble inmunocitoquímica usando el anticuerpo monoclonal G7 junto con el suero anti-histamina o anti-piscidina 3. Las

secciones fueron incubadas en solución inhibidora de la peroxidasa endógena (apartado V.2.1). Posteriormente, las muestras fueron lavadas en PBS y en PBT durante 5 minutos cada vez, incubadas en PBS con un 5% BSA, como agente de bloqueo, durante 30 minutos y lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez. Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal G7 (1:100) diluido en PBS con un 1% BSA. A continuación fueron lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez, incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo contra IgG de ratón producido en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1:50 en PBS con un 1% de BSA y lavadas dos veces en PBT y una en tampón Tris-HCl 0'05M (pH 7'4-7'6) durante 5 minutos cada vez.

La actividad fosfatasa alcalina fue revelada incubando las secciones en Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida lavando las secciones en tampón Tris-HCl 0'05M (pH 7'4-7'6) y en agua destilada durante 5 minutos. A continuación, las secciones fueron montadas en glicerina, examinadas y fotografiadas. Después de la identificación de los granulocitos acidófilos, se realizó una segunda inmunotinción sobre las mismas secciones con el suero anti-histamina o anti-piscidina 3 como se ha descrito anteriormente (apartado V.2.2). Las secciones fueron montadas de nuevo en glicerina y fotografiadas. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina durante 1 minuto y lavadas en agua del grifo durante 10 minutos y en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente fueron deshidratadas (la tinción roja de la fosfatasa alcalina se pierde tras la deshidratación), aclaradas y montadas en DPX (apartado V.1).

V.2.4.2. Marcaje con anti-IL-1 β /G7

Secciones tisulares de riñón cefálico y bazo de dorada, una vez desparafinadas e hidratadas (apartado V.1), fueron sometidas a una doble inmunocitoquímica usando el suero anti-IL-1 β junto con el anticuerpo monoclonal G7.

Las secciones fueron incubadas con el anti-IL-1 β (1:100) diluido en PBS con un 1% BSA como se ha descrito anteriormente (apartado V.2.2). A continuación, fueron lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez, incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo contra IgG de conejo producido en cabra y

conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1:50 en PBS con un 1% de BSA y lavadas dos veces en PBT y una en tampón Tris-HCl 0'05M (pH 7'4-7'6) durante 5 minutos cada vez.

La actividad fosfatasa alcalina, fue revelada incubando como se ha descrito en la sección anterior (apartado V.2.4.1). A continuación, las secciones fueron montadas en glicerina, examinadas y fotografiadas. Después de la identificación de las células IL-1 β positivas, se realizó una segunda inmunotinción sobre las mismas secciones con el anticuerpo monoclonal G7, como se ha descrito anteriormente (apartado V.2.1). Las secciones fueron montadas de nuevo en glicerina y fotografiadas. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina durante 1 minuto y lavadas en agua del grifo durante 10 minutos y en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente fueron deshidratadas (la tinción roja de la fosfatasa alcalina se pierde tras la deshidratación), aclaradas y montadas en DPX (apartado V.1).

V.3. Microscopía de fluorescencia

Secciones tisulares de riñón cefálico de dorada, una vez desparafinadas e hidratadas (apartado V.1) y desenmascarado el antígeno (apartado V.2.2.2), fueron incubadas durante 30 minutos en PBS con un 5% de BSA, como agente de bloqueo, durante 30 minutos. Después de ser lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-M-CSF-R (1:100) diluido en PBS con un 1% BSA. Después de lavarlas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez, fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con un suero anti-IgG de conejo conjugado con tetrametilisotiocianato de rodamina (TRICT, Dako) diluido 1:20 en PBS con BSA al 1%. A continuación fueron lavadas dos veces en PBT durante 5 minutos cada vez y montadas en glicerina. La especificidad de la reacción fue determinada mediante la omisión del primer anticuerpo.

Todas las secciones de microscopía óptica convencional, las de las técnicas inmunocitoquímicas y las de fluorescencia fueron estudiadas en un microscopio óptico Axiolab (Zeiss) y las fotografías realizadas en una cámara digital CoolSNAP (RS Photometrics) usando un ordenador Pentium III con un software CoolSNAP (RS Photometrics).

V.4. Microscopía electrónica de transmisión

Fragmentos de aproximadamente 1 mm³ de intestino de dorada fueron fijados en glutaraldehído al 2'5 % en tampón cacodilato 0'1M (pH 7'2) durante 3 horas a 4°C. A continuación fueron introducidos en una solución lavadora de sacarosa al 0'85% en tampón cacodilato 0'1M (pH 7'2) durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, algunas de las muestras fueron post-fijadas durante 1 hora a 4°C en tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0'1M (pH 7'2) en oscuridad, lavadas durante 15 minutos en la solución lavadora y contrastadas durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución de acetato de uranilo al 4'8% en tampón veronal (pH 7'2-7'4). Seguidamente fueron deshidratadas en soluciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 96%), manteniéndolas 15 minutos en cada una de ellas, y lavadas dos veces en etanol con sulfato de cobre a saturación durante 15 minutos cada vez. Posteriormente fueron sumergidas en óxido de propileno (2 baños de 30 minutos) y en soluciones de óxido de propileno y una mezcla de resinas Epoxi (éter glicídico 100, DDSA, MNA) (Serva) en proporciones 2:1, 1:1, 1:2 (v:v) y mantenidas durante una noche a temperatura ambiente en dicha mezcla de resinas Epoxi con los tubos destapados para que se evaporase el óxido de propileno residual.

Suspensiones celulares de riñón cefálico de dorada (ver apartado VI) fueron fijadas en glutaraldehído al 2'5% en tampón cacodilato 0'1M (pH 7'2) durante 2 horas a 4°C y procesadas como anteriormente se ha descrito, exceptuando la post-fijación en tetraóxido de osmio.

Los bloques fueron realizados utilizando como moldes cápsulas de gelatina del número 2 previamente deshidratadas durante 24 horas a 50°C. La polimerización y endurecimiento de la resina fue conseguida añadiendo 2,4,6,-tris-dimetil amino metil fenol (DMP-30) a la mezcla de resinas Epoxi anteriormente utilizada, y manteniendo los bloques a 70°C durante 72 horas. Las secciones semifinas (0'5 a 1 µm de espesor) fueron obtenidas con un ultramicrotomo REICHERT-JUNG, usando cuchillas de vidrio de un ángulo de 45° obtenidas con un aparato "knifemaker" LKB, teñidas con azul de toluidina al 0'5% en una solución de borato sódico al 1%, deshidratadas con calor y montadas en DPX. Secciones ultrafinas (50-200 nm de espesor) obtenidas con un

ultramicrotomo REICHERT-JUNG, usando cuchillas de diamante fueron recogidas sobre rejillas de cobre y contrastadas con acetato de uranilo al 4% en alcohol metílico y citrato de plomo.

El examen de los cortes ultrafinos fue realizado en un microscopio electrónico Zeiss EM 10C y las imágenes obtenidas sobre placas fotográficas Kodak Electron Image Film.

V.4.1. Inmunocitoquímica

Secciones ultrafinas de intestino o de suspensiones celulares de riñón cefálico de dorada fueron recogidas sobre rejillas de níquel, tratadas con metaperiodato sódico para eliminar la resina, lavadas con agua destilada y posteriormente con PBS-glicina (50mM) durante 10 minutos. A continuación, las rejillas se lavaron tres veces con PBS conteniendo 0'2% de gelatina y 0'5% de BSA (PBG) y se incubaron con los sueros anti-histamina (1:10) o anti-piscidina 3 (1:100) durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron seis veces con PBG y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con oro de 10 nm y producido en cabra (1:25) (Sigma) diluido en PBG durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las rejillas fueron lavadas seis veces con PBG, tres veces con PBS-glicina y por último con agua destilada. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

VI. Obtención de suspensiones celulares de riñón cefálico de dorada

Se utilizó el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) con la osmolaridad ajustada a la del suero de dorada (353'33 mosmol) con NaCl al 0'35% y suplementado con penicilina/streptomicina. Las suspensiones celulares de riñón cefálico fueron obtenidas al forzar el órgano a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 100 μ m, lavadas varias veces mediante centrifugación a 500xg, contadas en una cámara de Neubauer (Absher, 1993) y ajustadas a una concentración final de 1×10^7 células/ml para su posterior utilización.

VI.1. Suspensiones enriquecidas en granulocitos acidófilos

Las suspensiones celulares enriquecidas en granulocitos acidófilos se obtuvieron mediante separación celular activada magnéticamente (MACS). Para ello, las suspensiones celulares de riñón cefálico, obtenidas como anteriormente se ha descrito (apartado VI), fueron lavadas en tampón [PBS, EDTA 2mM, suero bovino fetal al 2% sonificado previa utilización (SBF)] (TF) mediante centrifugación a 500-800xg durante 10 minutos a 4°C e incubadas con el G7 a una dilución óptima 1:10 en TF, y en un volumen final de 100 µl por cada 10⁸ células, durante 20 minutos en hielo. Una vez lavadas, las células fueron incubadas con un anticuerpo contra IgG de ratón conjugado con micro-bolas magnéticas (Miltenyi Biotec) a una concentración 1:9 en TF y en un volumen final de 100 µl por cada 10⁸ células durante 30 minutos a 4°C. Tras ser lavadas, las células fueron separadas utilizando una unidad de separación MACS (Miltenyi Biotec) compuesta de una columna y de un imán de rendimiento adecuado al número de células totales de la suspensión tal y como indica el fabricante. Las suspensiones fueron introducidas en las unidades de separación MACS y lavadas con abundante TF con el fin de recoger las fracciones carentes de granulocitos acidófilos (G7⁻). Posteriormente, las columnas fueron separadas del imán con el fin de permitir la elución de las fracciones enriquecidas en granulocitos acidófilos (G7⁺).

VI.2. Aislamiento de macrófagos

Las suspensiones celulares de riñón cefálico fueron incubadas durante toda la noche en medio RPMI-1640 en placas de cultivo de 6 pocillos. Posteriormente se lavaron repetidamente con PBS para eliminar las células no adherentes y las monocapas de macrófagos resultantes se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS, durante 30 minutos, y se sometieron a inmunocitoquímica indirecta por el método avidina-biotina con el anticuerpo anti-M-CSF-R (ver apartados V.2.2 y V.2.3).

VII. Extracción del ADN genómico de *V. anguillarum*

La bacteria *V. anguillarum* fue crecida durante una noche a temperatura ambiente en 25 ml de caldo de triptona de soja (TSB) al 3% en agua conteniendo NaCl

al 1%. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 10.000xg durante 10 minutos y resuspendidas en 400 µl de tampón Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, (pH 7'5). A continuación, las células fueron tratadas durante 1 hora a 37°C con 8 µl de una solución de 25 g/l de proteinasa K (Invitrogen) y 80 µl de tampón Tris-HCl 0'5M, EDTA 125mM, dodecilsulfato sódico al 5% (pH 9'4). Posteriormente, las células fueron lisadas al hacerlas pasar por una jeringuilla de insulina con una aguja 19 XG.

Una vez lisadas las bacterias, se procedió a la extracción del ADN. Para ello se añadió un volumen de fenol y se centrifugó a 10.000xg durante 2 minutos obteniéndose dos fases. La fase superior donde se encuentra el ADN, fue tratada con un volumen de fenol y un volumen de cloroformo:isoamiloalcohol (24:1) y centrifugada a 10.000xg durante 2 minutos obteniéndose dos fases. El ADN contenido en la fase superior fue precipitado con acetato sódico, 0'3M, al 15% (pH 5'5) y 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente, lavado con etanol frío al 70%, secado a temperatura ambiente y resuspendido en 100 µl de PBS. La cantidad y pureza del ADN se evaluó en un espectrofotómetro (Beckman DU 640) midiendo la absorbancia (Abs) a una longitud de onda de 260 nm y de 280 nm en una cubeta de cuarzo. La concentración de ADN se calculó sabiendo que una unidad de Abs a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN. El índice de contaminación con proteínas (Abs 260/Abs 280) se mantuvo siempre por debajo de 2.

VIII. Análisis funcionales

VIII.1. Análisis de la actividad fagocítica

La actividad fagocítica de las células del riñón cefálico fue estudiada mediante citometría de flujo siguiendo la metodología de Esteban y col. (1998). Para estos ensayos se utilizó la bacteria *V. anguillarum*, cepa R-82, marcada con fluoresceína (FITC) y *Escherichia coli* conjugada con Texas Red (cepa K-12, Bioparticles, Invitrogen), como partículas susceptibles de ser fagocitadas.

VIII.1.1. Marcaje de la bacteria *V. anguillarum*

La bacteria *V. anguillarum* fue cultivada en TSB que contenía 50 µg/ml de FITC

a 25°C, durante una noche, para permitir que se le uniera de una forma homogénea el FITC. A continuación, las bacterias fueron lavadas 3 veces en PBS mediante centrifugación (10.000xg, 15 minutos) e inactivadas por calor a 60°C, durante 15 minutos. La densidad óptica de las suspensiones bacterianas fue medida a 600 nm y el número de u.f.c./ml fue ajustado a 10^9 con una curva patrón de crecimiento. Finalmente, la bacteria fue almacenada a -80°C hasta su uso. La uniformidad del marcado se comprobó mediante citometría de flujo.

VIII.1.2. Ensayo de fagocitosis

Para la realización de los ensayos de fagocitosis se utilizaron alícuotas de 5×10^7 células de las suspensiones celulares de riñón cefálico. Posteriormente se mezclaron con 10^9 partículas de *V. anguillarum* marcadas con FITC o 2.5×10^8 partículas de *E. coli* conjugadas con Texas Red, se centrifugaron a 300xg, se resuspendieron y se incubaron durante 60 minutos a 25°C en oscuridad. Después de la incubación, la actividad fagocítica fue bloqueada añadiendo PBS a 4°C y la fluorescencia de las bacterias no ingeridas o adheridas a la membrana de los fagocitos pero no interiorizadas, fue bloqueada por adición de azul tripano al 0.4% en PBS. El número de células fluorescentes (células que habían fagocitado) se analizó mediante citometría de flujo. Tras la realización del ensayo, algunas alícuotas fueron procesadas para su estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (apartado V.4).

VIII.1.3. Citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo (Becton Dickinson) para el análisis de la actividad fagocítica (VIII.1.2). El citómetro de flujo utilizado estaba provisto de un láser de argón y de un equipo estándar para la medición de tamaño celular (FSC), granularidad celular (SSC), fluorescencia verde (FITC) y fluorescencia roja (ioduro de propidio o ficoeritrina). De cada muestra se analizaron 5.000 células a una velocidad de 400 células/s. Los datos obtenidos corresponden a las medias del número de células que emitían fluorescencia de tres muestras independientes.

VIII.2. Producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs)

La producción de ROIs fue medida como la quimioluminiscencia de las células siguiendo la metodología de Bayne y Levy (1991). Para ello se prepararon disoluciones madre de forbol 12-miristato 13-acetato 1 mg/ml (PMA, Sigma) en etanol y de luminol 10^{-4} M (Sigma) en dimetil sulfóxido que fueron almacenadas a -20°C y 4°C , respectivamente. Alícuotas de 5×10^5 suspensiones celulares de riñón cefálico o fracciones G7^{+} de riñón cefálico fueron estimuladas con ADN genómico de *V. anguillarum* (ATCC19264) durante 16 horas en presencia o en ausencia de concentraciones de entre 10^{-5} hasta 10^{-2} M de histamina, piridiletilamina (agonista del receptor H_1) o dimaprit (agonista del receptor H_2) (Tocris Bioscience). Posteriormente se les añadió 100 μl de una solución conjunta de luminol y PMA a unas concentraciones finales de 100 μM de luminol y 1 $\mu\text{g/ml}$ de PMA en tampón Hank's. La quimioluminiscencia fue registrada cada 117 segundos durante 1 hora en un lector de placa FLUOstart (BGM LabTechnologies). Los datos fueron obtenidos como la media de ocho medidas y expresados como la pendiente de la curva de la reacción desde 585 a 1170 segundos a la cual se le restó la emisión inespecífica de fondo. Al mismo tiempo se analizó la viabilidad celular mediante análisis por citometría de flujo de células teñidas con 40 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio.

IX. Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

IX.1. Aislamiento de ARN

El ARN total de larvas de 1, 2, 6, 8, 10, 13, 21, 27, 34, 47, 48, 49, 62, 68, 70 y 76 dde y de juveniles de 103, 106, 131 y 133 dde fue aislado utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente en 1 ml de TRIzol frío con la ayuda de un homogeneizador (Sigma). A continuación fueron incubadas con 100 μl de cloroformo (Sigma) durante 15 minutos en hielo y centrifugadas a 10.000xg durante 15 minutos a 4°C . De esta forma se obtuvo una fase superior acuosa que contiene el ARN, una interfase de color blanco y una fase inferior roja de fenol-cloroformo (orgánica), estas dos últimas contienen las proteínas y el ADN genómico.

El ARN fue recogido en la fase acuosa y transferido a un tubo de centrífuga de

1'5 ml libre de ARNasa. El ARN fue precipitado mediante incubación con 0'5 ml de isopropanol frío durante 15 minutos en hielo y centrifugación a 10.000xg durante 15 minutos a 4°C. A continuación, el sobrenadante fue retirado y el ARN lavado con etanol frío al 75%. Una vez lavado fue dejado secar durante 3-5 minutos a 37°C y resuspendido finalmente en 30 µl de agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) (Sigma). Con el fin de garantizar su completa resuspensión, el ARN aislado fue calentado durante 5 minutos a 50°C.

La concentración de ARN obtenido fue cuantificada espectrofotométricamente teniendo en cuenta que una unidad de Abs a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. El índice de contaminación con proteínas (Abs 260/Abs 280) se mantuvo siempre por debajo de 2.

IX.2. Obtención de ADN copia

Siempre se trabajó en cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones. Para eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico, las muestras fueron tratadas con 1 unidad de desoxirribonucleasa I (ADNasa I) (Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente siendo la enzima posteriormente desnaturalizada al aumentar la temperatura a 65°C durante 10 minutos en presencia de 25 mM de EDTA. El ARN fue precipitado (apartado IX.1) y resuspendido en agua tratada con DEPC. La reacción de retrotranscripción fue realizada con 1 µg de ARN total al que se le añadió 1 µl de una solución 50 µM de Oligo-dT (Invitrogen) ajustándose el volumen a 11 µl finales con agua tratada con DEPC. Esta mezcla fue incubada durante 10 minutos a 70°C para relajar las estructuras secundarias del ARN y enfriada inmediatamente en hielo para evitar la renaturalización del mismo. A continuación, se añadió el resto de componentes de la reacción (Tabla 4): 4 µl de tampón de reacción 5x, 1 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (10 mM) (Invitrogen), 2 µl de ditiotretol (0'1 M), 200 unidades (1 µl) de retrotranscriptasa (SUPERScript™ II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase, Invitrogen) y 40 unidades (1 µl) de inhibidor de ribonucleasas (ARNasas) (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen). La reacción fue incubada inicialmente a temperatura ambiente durante 10 minutos para facilitar la unión

del Oligo-dT, a 42°C durante 50 minutos para permitir la retrotranscripción y a 95°C durante 5 minutos para inactivar el enzima. El ADN copia así obtenido fue llevado hasta un volumen final de 100 µl con agua tratada con DEPC y guardado a -20°C.

RT	Concentración
Tampón de reacción	1x
Oligo-dT	0'5 µg
dNTPs	0'5 mM
DTT	0'01 M
Retrotranscriptasa	200 unidades
Inhibidor de ARNasas	40 unidades
ARN	1 µg
Volumen total final	20 µl

Tabla 4. Concentraciones finales utilizadas en la RT.

IX.3. PCR

Una vez realizada la retrotranscripción, se pasó a amplificar los genes en estudio: receptor similar a Toll 9 (*tlr9*), *tlr5*, *tlr22*, receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (*mcsfr*), subunidad p40^{phox} de la NADPH oxidasa (gen *ncf4*), lisozima (*lyz*), hepcidina (*hamp*), componente C3 del complemento (*c3*), proteína de incremento de permeabilidad/proteína de unión a lipopolisacárido (*lbp/bpi*), gen de resistencia a myxovirus (influenza) (*mx*), factor regulador de interferón 1 (*irf1*), *irf9*, proteína 30 inducible por interferón γ (*ifi30*), perforina (*prf1*), genes activadores de recombinación (*rag1* y *2*), cadenas α y β del receptor de células T (*tcra* y *tcrb*), cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina M (*igl* e *igmh*), cadenas α y γ del complejo mayor de histocompatibilidad II (*spau-daa* e *ictp*), ciclooxigenasa 2 (*cox2*), factor de necrosis tumoral α (*tnfa*), factor de crecimiento transformante β1 (*tgfb1*), interleuquina-1β (*ilb1*), receptor purinérgico P2X₇ (*p2rx7*), caspasa-1 (*caspl*), β-actina (*actb*) y la proteína ribosomal S18 (*rps18*) por PCR en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Para llevar a cabo las reacciones se utilizó 2 µl de ADN molde por reacción, a excepción de los controles negativos en los que no se puso ADN molde, junto con 2 µl de tampón 10x, 0'4 µl dNTPs (2'5 mM), 0'4 µl MgCl₂ (50 mM), 0'8 µl de cada uno de

los oligonucleótidos sintéticos (Invitrogen) a una concentración de 10 μM y 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Ecogen) (Tabla 5). Las condiciones de amplificación fueron: una temperatura específica de hibridación de los cebadores, y un tiempo de polimerización de 45 segundos y 35 ciclos de amplificación (Tablas 6 y 7). Los productos amplificados fueron separados mediante una electroforesis en un gel de agarosa (Pronadisa) al 1% conteniendo 0'5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio (Sigma) y visualizados con luz UV. Su identidad se determinó mediante análisis de restricción y/o secuenciación.

PCR	Concentración
Tampón de reacción	1x
MgCl ₂	1 mM
dNTPs	0'05 mM
Cebadores	0'4 μM
Taq ADN polimerasa	1 unidades
ADNc	2 μl
Volumen total final	20 μL

Tabla 5. Concentraciones finales utilizadas en la PCR.

Paso 1	94°C	2 min.	1x
Paso 2	94°C	45 s.	35x
	X°C	45 s.	
	72°C	45 s.	
Paso 3	72 °C	10 min.	1x
Paso 4	4 °C	Indefinido	

Tabla 6. Programa utilizado en las reacciones de PCR. X°C depende de los cebadores utilizados en cada caso.

Además, la expresión de los genes *ighm*, *tlr5*, *illb*, *tnfa* y *tgfb1* se analizaron

mediante PCR a tiempo real, para la que se utilizó un instrumento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosintesis). Las condiciones de amplificación fueron: incubación durante 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, y finalmente 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C. Para cada ARN, la expresión de genes se corrigió con el contenido de la proteína ribosómica S18 de cada muestra.

Gen	Número de acceso	Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Temperatura de hibridación (°C)	Amplicon (bp)
<i>tlr9</i>	AY751797	F	GGAGGAGAGGGACTGGAT	59	130
		R	GATCACACCGTCACTGTCTC		
<i>tlr5</i>	AM296028	F	CCTGTCTGCAACTGTCAGGA	60	216
		R	TGTGGATCTGGTTCAAGCTG		
<i>tlr22</i>	AM920660	F	GCGAATCTGATTTCCCTCAA	60	135
		R	GGGTGCCACTGATTTGATTT		
<i>mx</i>	AF491302	F	ATGAACACTCTGAACCAGCAG	54	248
		R	TCCCTCCTTCTTTCTCTTCAT		
<i>irf1</i>	AY962254	F	CATGAAGAGACATGATGAAGTGC	55	408
		R	CAAACACACAAACAAAACAATCTG		
<i>irf9</i>	AM920661	F	AAACGCAACCGAGTTTTTGT	60	161
		R	ATGCGGAACATGGTTTTAGC		
<i>ifl30</i>	AM920662	F	TCGAGGTGGCGCTCTACTAT	60	197
		R	GTTGCCCAGACATTCTTGTT		
<i>c3</i>	CB177126	F	CTACTGTCCGAAAAAGGC	53	241
		R	GCAGTTCTCTTCAGCACATG		
<i>lyz</i>	AM749959	F	CCAGGGCTGGAAATCAACTA	60	280
		R	CCAACATCAACACCTGCAAC		
<i>hamp</i>	AM749960	F	CCGTCGTGCTCACCTTTATT	60	130
		R	CAGGAGTCCTCTGGCATCTC		
<i>lbp/bpi</i>	AM920663	F	CGGCACTCCAAGAGAAACTC	60	137
		R	CACTGACGATGTTGGCAATC		
<i>mcsfr</i>	AM050293	F3	CTGCCCTACAATGACAAG	55	200
		R4	TCAGACATCAGAGCTTCC		
<i>ncf4</i>	AM749961	F	GCGGAGTTGAACCTGAAGAG	60	155
		R	TCACCTTCTGTGTCGCTGTC		
<i>tcra</i>	AY751745	F	GGAAGTGGAACCAGACTGAACG	56	300
		R	CATCACTCTGAGGCACAGGACG		
<i>tcrb</i>	AM261209	F	GCTTCTTCAATGGGACAGGA	60	160
		R	CCGTAGACACAGCCCTTGAT		
<i>igl</i>	AY619988	F	TTACTACTGTGAGAGTTTC	55	198
		R	ACTCCAGTGTGAGGGGAAGC		
<i>ighm</i>	AM493677	F	CAGCCTCGAGAAGTGGAAC	60	137

		R	GAGGTTGACCAGGTTGGTGT		
<i>spau-daa</i>	AY292462	F	AGCTGTTTCAGTGTCCCATCC	60	118
		R	GACCCACAGTCAGACCCAGT		
<i>iclp</i>	AM920665	F	ACCAGAGACCCAAACTCCT	60	183
		R	GAGACTGGATGTCGCTCCTC		
<i>il1b</i>	AJ277166	F3	ATGCCCGAGGGGCTGGGC	55	600
		R2	CAGTTGCTGAAGGGAACAGAC		
<i>caspl</i>	AM490060	ORF1-F	GAAATGGCAGCTAAGGAGCTT	54	750
		R3	TTGAAAATTTCGTTGATCGGG		
<i>p2rx7</i>	AJ887997	F5	CACAGTCCTCATCAAAAAC	55	916
		R11	CGAACAAAGGAGATGAGGTGA		
<i>tgfb1</i>	AF424703	F	AGAGACGGGCAGTAAAGAA	55	227
		R	GCCTGAGGAGACTCTGTTGG		
<i>tnfa</i>	AJ413189	FE2	TATGGGGGCATACACAACA	55	762
		RE5	TTAAAGTGTCAAAACACACAAA		
<i>cox2</i>	AM296029	F	GAGTACTGGAAGCCGAGCAC	60	192
		R	GATATCACTGCCGCTTGAGT		
<i>rag1</i>	EF095657	F	TTAATGGGCTCTCTGGATGG	60	120
		R	TGATGTCCTCCTCCAGATCC		
<i>rag2</i>	EF562633	F	AGCGATGGAGAACTGGACAC	60	119
		R	TAGTACGGCTCCAGGTGTT		
<i>actb</i>	X89920	F	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC	55	550
		R	CTCCTTAATGTACACGACGATTTT		
<i>rps18</i>	AM490061	F	AGGGTGTGGCAGACGTTAC	60	164
		R	CTTCTGCCTGTTGAGGAACC		

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR, F=directo, R=reverso.

X. Ensayos farmacológicos

X.1. Ensayos *in vivo*

Ejemplares de dorada y rana fueron inyectados intraperitonealmente con PBS solo o conteniendo histamina (5, 50 y 500 mg/Kg) o piridiletamina (agonista del receptor H_1) o dimaprit (agonista del H_2) o imetridina (agonista del H_3) (50 y 500 mg/kg) o 2'5 y 15 mg/Kg del compuesto 48/80 (Sigma) y se registró la mortalidad durante 1 hora. En otros ensayos, los ejemplares fueron inyectados con 1-10 mg/Kg de diferentes antagonistas de los receptores de histamina, clorferinamina (antagonista del H_1), ranitidina (antagonista del H_2) y clobenpropit (antagonista del H_3) (Sigma) solos o en combinación con 500 mg/Kg de histamina.

X.2. Ensayos de contracción del músculo liso intestinal y vascular

El intestino y la branquia de seis ejemplares de dorada y el intestino de dos ejemplares de rana fueron colocados en medio de cultivo RPMI-1640 con la osmolaridad ajustada a la del suero de dorada (353'33 mosmol) con NaCl al 0'35% o en medio de cultivo RPMI, respectivamente. Fragmentos de intestino y branquia de 1 cm de longitud fueron incubados con 1 ml de PBS solo o conteniendo 5 mg/ml de histamina, 10 mg/ml de dimaprit, 10 mg/ml de piridiltetilamina o 7'5 mg/ml de compuesto 48/80. La contracción del músculo liso intestinal y vascular fue observada visualmente y se realizaron fotografías cada 4 segundos en el caso del intestino y cada 20 segundos en el caso de la branquia con un estereomicroscopio Stemi 2000-C (Zeiss). En algunos ensayos, los fragmentos de intestino fueron preincubados durante 10 minutos con ranitidina a una concentración de 100 mg/ml en PBS antes de la adición de 5 mg/ml o 100 mg/ml de histamina en PBS.

XI. Determinación del título de IgM específica frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* mediante enzoinmunoensayo (ELISA) en dorada

El nivel de IgM específica frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* fue cuantificado mediante enzoinmunoensayo (ELISA) en muestras de sangre obtenidas de juveniles vacunados y no vacunados de 150 dde (apartado II.2), la edad mínima a la cual se pueden obtener cantidades suficientes de suero para este ensayo. Se utilizó un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa frente a la Igm de dorada (Aquatic Diagnostics Ltd). En primer lugar se añadieron 50µl/pocillo de poly-L-Lisina al 0'05% en tampón 50mM carbonato-bicarbonato (pH 9'6) durante 1 hora. Posteriormente, los pocillos se lavaron 2 veces con tampón de lavado de baja concentración salina [Tris-HCl 2mM, NaCl 38mM, Tween 20 al 0,5 %, pH 7'3] (TBC) y se añadieron 100 µl por pocillo de *P. damselae* subsp. *piscicida* (cepa PC-435.1) inactivada por calor (60°C durante 3 horas) a una concentración de 1×10^8 bacterias/ml y se incubó la placa de ELISA durante toda la noche a 4°C. A continuación se fijó la bacteria mediante la adición de glutaraldehído al 0'05% en PBS durante 20 minutos. Después de lavar 3 veces con TBC se añadieron 200 µl por pocillo de TBC con 1% BSA como agente de bloqueo de las uniones inespecíficas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después

se lavaron de nuevo los pocillos 3 veces con TBC y se adicionó el suero a testar a diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 (por triplicado), incubándose durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo los pocillos se lavaron 5 veces con tampón de lavado de alta concentración salina [Tris-HCl 2mM, NaCl 50mM, Tween 20 al 1 %, pH 7.7] (TAC) y se incubaron con anti-IgM (1:50) diluido en PBS con 1% BSA durante 1 hora. A continuación se lavaron 5 veces con TAC y se reveló la actividad peroxidasa en oscuridad mediante la adición de 100 µl/pocillo de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina en agua destilada con H₂O₂ al 0.01% durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida añadiendo 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2M. La lectura se realizó a 450 nm utilizando un lector de placas automático BioKinetics EL-340i (Bio-Tek Instruments) usando un programa Delta Soft3 software para Macintosh (BioMetallics). Las muestras de suero fueron analizadas por triplicado. La especificidad de la reacción fue determinada mediante la adición de PBS a los pocillos en lugar del suero a testar. El título de IgM específica frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* se expresó como la mayor dilución del suero en la que se observaron diferencias significativas en los valores de absorbancia con respecto a los controles no vacunados.

XII. Análisis estadístico

Se utilizaron 3-6 ejemplares para las técnicas de microscopía, para los ensayos funcionales y para los ensayos farmacológicos. Para los estudios de expresión génica en larvas y juveniles mediante RT-PCR se utilizaron mezclas de entre 4-30 ejemplares y en las infecciones experimentales con *P. damselae* subsp. *piscicida*, 15, 25 o 100 individuos dependiendo, en ambos casos, de la edad de los ejemplares. Para el ensayo de vacunación se utilizaron tanques de 5000 litros con una densidad inicial de 60 huevos/litro. Los ensayos *in vitro* fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados mediante análisis univariable de la varianza (ANOVA), y en caso necesario, mediante el test de rango múltiple de Waller-Duncan ($P \leq 0.05$) o de Duncan ($P \leq 0.1$) para determinar diferencias significativas entre los grupos. Los resultados obtenidos mediante RT-PCR se analizaron semi-cuantitativamente mediante densitometría utilizando una cámara digital (Kodak gel logic 100 imaging system; Kodak) y un programa informático (1D image analysis 3.6 software; Kodak).

RESULTADOS

I. Caracterización de los macrófagos y las células productoras de IL-1 β de dorada en ejemplares sanos e infectados experimentalmente con la bacteria patógena *V. anguillarum*

I.1. Macrófagos

La distribución y localización de los macrófagos en varias especies de teleósteos han sido estudiados hasta ahora solo mediante microscopía óptica y electrónica debido, en parte, a la ausencia de marcadores específicos para estas células por lo que no se ha podido profundizar en su estudio. La producción de anticuerpos específicos frente a macrófagos de peces ha sido hasta la fecha una tarea ardua y sólo se han generado anticuerpos frente a los macrófagos de carpa (Nakayasu y col., 1998; Romano y col., 1998). Sin embargo, estos anticuerpos también reconocen otras células del sistema inmunitario como granulocitos (Nakayasu y col., 1998) y trombocitos (Romano y col., 1998). Nosotros hemos encontrado las mismas dificultades para producir un anticuerpo específico frente a macrófagos de dorada mediante la inmunización de ratones con suspensiones celulares de exudado peritoneal o de riñón cefálico o con macrófagos purificados. Por tanto, hemos usado un anticuerpo policlonal frente a un péptido sintético, deducido a partir del gen que determina el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (*mcsfr*) de la dorada, cuya expresión se halla restringida a macrófagos (Roca y col., 2006).

El estudio inmunocitoquímico realizado demuestra la existencia de células M-CSF-R positivas en riñón cefálico, bazo, timo, branquia e hígado. En riñón cefálico aparecen principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y son células pequeñas con prolongaciones citoplasmáticas largas y delgadas mientras que en bazo se encuentran formando una red celular en la pulpa blanca y alrededor de los elipsoides, estructuras que han sido descritas, mediante microscopía óptica y electrónica, como terminaciones de las arteriolas que presentan una luz estrecha rodeada por una vaina de fibras reticulares, células reticulares y macrófagos (Press y Evensen, 1999).

En timo, branquia e hígado, las células M-CSF-R positivas son menos numerosas que en riñón y no se observan en intestino. Este resultado contrasta con estudios previos realizados en carpa que muestran la presencia de macrófagos en la

lámina propia del intestino de larvas y adultos mediante inmunocitoquímica (Rombout y col., 1993; Huttenhuis y col., 2006). Por tanto, nuestros datos sugieren que los macrófagos residentes en este tejido no expresan el M-CSF-R.

A continuación estudiamos si la distribución y localización de las células M-CSF-R positivas cambiaba tras una infección experimental con la bacteria *V. anguillarum*. Sorprendentemente, la localización y distribución de estas células no cambia después de la infección. Estos datos contrastan con los resultados de estudios anteriores que muestran que los granulocitos acidófilos se movilizan rápidamente desde el riñón cefálico hasta el foco inflamatorio y el bazo después de la infección con *V. anguillarum* (Chaves-Pozo y col., 2004, 2005).

I.2. Células productoras de IL-1 β

En estudios previos se ha demostrado que la expresión del gen que determina la IL-1 β aumenta drásticamente en macrófagos y granulocitos acidófilos, después de la activación con varios PAMPs (Sepulcre y col., 2007). Además se ha demostrado que los granulocitos acidófilos circulantes de animales infectados acumulan IL-1 β (Chaves-Pozo y col., 2004). Por tanto hemos estudiado si las células M-CSF-R positivas producen IL-1 β en dorada.

No se observan células IL-1 β positivas en riñón cefálico y bazo de animales control no infectados mientras que aparecen algunas células IL-1 β positivas cerca y dentro de los vasos sanguíneos en riñón cefálico y bazo de ejemplares infectados con *V. anguillarum* a las 4, 24, 48 y 72 horas después de la infección. Estas células IL-1 β positivas presentan una forma redondeada que difiere de la forma estrellada de las células M-CSF-R positivas que, además, no se tiñen con el suero anti-IL-1 β . Esta observación es sorprendente, ya que recientemente se ha demostrado que la expresión del gen *il1b* aumenta a los mismos niveles, en granulocitos acidófilos y en macrófagos, después de ser activados *in vitro* con varios PAMPs (Sepulcre y col., 2007). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que las células M-CSF-R positivas produzcan IL-1 β que puede ser rápidamente liberada después de una infección *in vivo*. Esto puede explicar el motivo por el que no detectamos IL-1 β en macrófagos mediante

inmunocitoquímica. Sin embargo, se observa que algunos granulocitos acidófilos del riñón cefálico y de bazo de ejemplares infectados se tiñen con el suero anti- IL-1 β .

Todos estos resultados junto al patrón diferencial de expresión observado en granulocitos acidófilos y macrófagos después de ser estimulados (López-Castejón y col., 2007; Sepulcre y col., 2007) sugieren diferentes funciones en el reconocimiento y en la eliminación de patógenos y en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa de los fagocitos profesionales en peces.

II. Caracterización de los mastocitos de dorada

II.1. Distribución tisular y propiedades tintoriales de los mastocitos

Mediante inmunocitoquímica y utilizando el anticuerpo monoclonal G7 frente a granulocitos acidófilos de dorada se distinguen dos tipos diferentes de células eosinófilas en el tejido conectivo de intestino y branquia: granulocitos acidófilos (células G7 positivas) y un tipo celular G7 negativo. Estas células eosinófilas G7 negativas comparten numerosas características morfológicas con los mastocitos de peces, entre las que destaca la presencia de numerosos gránulos citoplasmáticos teñidos de rojo con eosina. Sin embargo, no muestran la tinción metacrómica típica de los mastocitos de mamíferos cuando se tiñen con azul de toluidina a bajo pH. Los mastocitos de dorada se localizan principalmente en la submucosa intestinal y en el tejido conectivo de los filamentos y los arcos branquiales.

II.2. Mediadores inflamatorios de los mastocitos: histamina y serotonina

Todos los estudios realizados hasta ahora sobre mastocitos de vertebrados inferiores señalan que los mastocitos de teleósteos y anfibios carecen de histamina (Reite, 1965; Takaya y col., 1967), aunque su presencia en la mucosa gástrica, como regulador de la secreción de ácido gástrico, está generalizada en todos los vertebrados (Reite, 1969). Además numerosos estudios farmacológicos y fisiológicos, que muestran que peces y anfibios son incapaces de responder a una inyección intravascular de histamina, apoyan estas observaciones. Sin embargo, en ninguno de los estudios farmacológicos ni en la mayoría de los estudios morfológicos realizados sobre la

histamina se han incluido especies del orden Perciformes (Reite, 1972). En este estudio demostramos la presencia de histamina y la ausencia de serotonina en los mastocitos de peces teleósteos pertenecientes al orden Perciformes que es el grupo más extenso y evolucionado de teleósteos y así mismo, la ausencia de serotonina. Por el contrario, los granulocitos acidófilos no poseen ninguna de estas dos aminas en sus gránulos.

II.3. Efectos farmacológicos de la histamina

La presencia de histamina en los mastocitos de dorada sugiere que podría actuar como mediador inflamatorio en esta especie. Por tanto, para demostrar si la histamina presenta algún efecto farmacológico, diversas dosis de histamina, del compuesto 48/80 que es un potente liberador de histamina de los mastocitos de mamíferos (Lagunoff y col., 1983), y de agonistas y antagonistas de los receptores H_1 , H_2 y H_3 fueron inyectados intraperitonealmente a ejemplares de dorada. Los ejemplares mueren rápidamente tras la inyección de 500 mg de histamina/Kg de peso y tras la inyección de 2,5 y 15 mg/Kg del compuesto 48/80, dosis de las que se conoce que promueven la liberación de histamina. Igualmente, este mismo efecto se presenta cuando los peces son inyectados con dimaprit, agonista del receptor H_2 . Así mismo, todos estos compuestos producen una fuerte contracción del músculo liso intestinal y el compuesto 48/80 induce la degranulación de mastocitos de branquia e intestino.

Todas las acciones de la histamina en los mastocitos de dorada parecen estar mediadas por la activación de los receptores H_2 , ya que sólo el agonista del H_2 dimaprit, es capaz de inducir la muerte de los ejemplares y la contracción del músculo liso. Aunque los receptores de histamina en peces están poco estudiados, se han identificado homólogos para los receptores H_1 , H_2 y H_3 , con una secuencia de aminoácidos que presenta un 60% de similitud con la de mamíferos, que se expresan en cerebro y otros tejidos y que regulan el comportamiento natatorio de larvas jóvenes (Peitsaro y col., 2007). Además se ha demostrado que algunos antagonistas de los receptores de histamina humanos puede inhibir de forma efectiva los receptores de histamina de la mosca de la fruta *in vivo* y *ex vivo* (Gisselman y col., 2002). Todos estos datos apoyan nuestros ensayos farmacológicos y, por tanto, sugieren un papel importante para la histamina en peces.

Por último, se observó que la histamina, el agonista del receptor H_1 , piridiletilamina, y el agonista del receptor H_2 , dimaprit, son también capaces de regular la explosión respiratoria de los leucocitos de dorada. Por tanto, estos resultados sugieren que la liberación de histamina de los mastocitos después de su activación puede regular las funciones de los fagocitos de peces. Un aspecto interesante, que aún debe esclarecerse, es el mecanismo de activación de los mastocitos de peces ya que los peces carecen de IgE por lo que los mastocitos no pueden activarse por la vía “clásica”. Sin embargo, todas las vías “alternativas” pueden producir la activación de los mastocitos de peces, dado que los receptores para IgM (Stafford y col., 2006), las anafilotoxinas (Boshra y col., 2005) y los mediadores solubles derivados de agentes patógenos (Sepulcre y col., 2007) son funcionales.

II.4. Filogenia del almacenamiento de histamina en los mastocitos de vertebrados y su utilización como mediador inflamatorio

Se analizó también la presencia de histamina en los principales grupos filogenéticos de peces teleósteos, en peces pulmonados y en anfibios. Los mastocitos de lubina, que pertenece al mismo orden que la dorada (orden Perciformes) pero a una familia diferente (familia Moronidae), son eosinófilos, contienen histamina, pero carecen de serotonina. Sin embargo, los mastocitos de trucha (orden Salmoniformes), rodaballo y lenguado (orden Pleuronectiformes), anguila (orden Anguilliformes), pez cebra (orden Cypriniformes) y peces pulmonados (orden Dipnoi) carecen de histamina y serotonina. Así mismo, los mastocitos de los principales grupos de anfibios, ranas y tritones, son metacromáticos y carecen de histamina y serotonina. Además, las inyecciones de 500 mg de histamina/Kg de peso o de 15mg/Kg de compuesto 48/80 no tienen efecto alguno sobre los ejemplares de rana y son incapaces de inducir la contracción intestinal del músculo liso intestinal en esta especie. Por tanto, estos datos sugieren que aunque el almacenamiento de histamina en mastocitos y su utilización como mediador inflamatorio se establecieron en los reptiles primitivos (Lepidosauria) hace unos 276 millones de años (Kumar y Hedges, 1998), este mismo acontecimiento pudo ocurrir de forma independiente en los peces del orden Perciformes a principios del Eoceno, hace entre 55 y 45 millones de años. Durante estos millones de años

aparecieron la mayoría de las familias de la serie Percomorpha (Johnson y Patterson, 1993).

III. Análisis de piscidinas en células del sistema inmunitario de dorada y de otras especies de teleósteos

Los AMPs actúan como primera línea de defensa frente a muchos patógenos. Los genes que determinan estos péptidos se expresan en numerosos tejidos y tipos celulares de diferentes especies incluyendo mamíferos, anfibios, insectos y peces (Hancock y Chapple, 1999). La mayoría de los AMPs muestran un amplio espectro de acción microbicida, propiedades catiónicas y estructura secundaria anfipática (Lauth y col., 2002). Las piscidinas son una familia de AMPs constituida por cuatro péptidos diferentes denominados piscidina 1, piscidina 2, piscidina 3 y piscidina 4.

En peces se ha demostrado la presencia de piscidinas y pleurocidinas en células epiteliales de la piel (Cole y col., 1997, 2000; Silphaduang y col., 2006), en intestino (Cole y col., 2000; Silphaduang y col., 2006) y en branquia (Murray y col., 2003). Nosotros hemos observado la presencia de piscidina 1 y piscidina 3 en los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos de intestino y branquia de dorada lo que sugiere: (i) una función protectora frente a la invasión microbiana de estos órganos que han sido considerados como vías importantes de entrada de patógenos (Ellis, 2001) y (ii) que este péptido es utilizado como parte del repertorio antimicrobiano de células inflamatorias específicas en esta especie.

Así mismo hemos observado que diferentes péptidos de la familia piscidina son sintetizados por diferentes poblaciones del mismo tipo celular. La piscidina 1 está presente sólo en mastocitos de branquia, pero la piscidina 3 aparece en mastocitos de branquia e intestino. Estos datos sugieren una heterogeneidad intraespecífica caracterizada por la existencia de varias y diferentes poblaciones de mastocitos en dorada que contienen, a su vez, diferentes tipos de piscidinas.

A continuación comprobamos que estos AMPs estaban también presentes en los granulocitos acidófilos. Este tipo celular contiene piscidina tipo 3 en sus gránulos, pero carece de piscidina 1. Mediante microscopía electrónica de transmisión, se han

caracterizado los tres tipos de gránulos citoplasmáticos de este tipo celular siendo los gránulos tipo II los que parecen corresponderse con los gránulos específicos de los acidófilos de mamíferos (Bloom y Fawcett, 1986; Meseguer y col., 1994). Además, también se ha demostrado que granulocitos acidófilos residentes en el riñón cefálico no activados pueden ingerir partículas de *V. anguillarum* rápidamente *in vitro* (Esteban y col., 1998). Las fases del proceso y la fusión de la membrana de los gránulos a la de las vesículas endocíticas se conocen bien. Nuestros resultados demuestran que los gránulos tipo II contienen grandes cantidades de piscidina tipo 3. Así mismo, después de incubar suspensiones celulares de riñón cefálico con *V. anguillarum* o *E. coli*, se observan numerosos granulocitos acidófilos que presentan abundantes partículas bacterianas en su interior muy próximas a gránulos de tipo II. La inmunotinción con el suero anti-piscidina 3 revela la existencia de este péptido en el fagosoma que a su vez contiene las partículas bacterianas. Estas observaciones sugieren que los péptidos antimicrobianos participan en la muerte y destrucción de los patógenos que han sido fagocitados.

Por último se analizó la presencia de estos péptidos antimicrobianos en rodaballo, lenguado, trucha, anguila, pez cebra y pez pulmonado sudamericano. Sólo los mastocitos de lubina muestran inmunotinción para las piscidinas 1 y 3. Por tanto, las piscidinas muestran una historia evolutiva similar al almacenamiento de histamina en mastocitos, ya que sólo los mastocitos de peces del orden Perciformes contienen estos AMPs. Aunque se ha observado la presencia de pleurocidinas en especies del orden Pleuronectiformes (Murray y col., 2003), nosotros no hemos encontrado piscidina 1 ni 3 en los mastocitos de rodaballo y lenguado, especies que pertenecen al mismo orden. Así mismo, tampoco los mastocitos de trucha, anguila y pez cebra contienen ninguno de los dos tipos de piscidina. Colectivamente, todos estos resultados sugieren una enorme heterogeneidad en los mediadores producidos por los mastocitos de diferentes especies y apoyan la existencia de una gran complejidad en la historia evolutiva de estas células inmunitarias.

IV. Caracterización del sistema inmunitario de dorada durante el desarrollo larvario

IV.1. Distribución de los fagocitos profesionales

Hemos estudiado la localización de los granulocitos acidófilos durante el desarrollo de los principales órganos linfomieloides, riñón cefálico, bazo y timo, y de las dos vías más importantes de entrada de patógenos, branquia e intestino, utilizando un anticuerpo monoclonal específico frente a granulocitos acidófilos de dorada (G7). La secuencia de aparición de los órganos linfomieloides del sistema inmunitario de dorada es: riñón cefálico (6 dde), bazo (8 dde) y timo (34 dde). Esta secuencia es similar a la encontrada para otras especies de teleósteos marinos (Chantanachookhin y col., 1991; Jósefsson y Tatner, 1993; Padrós y Crespo, 1996; Schroder y col., 1998; Liu y col., 2004) aunque varía la fecha de aparición de cada uno de ellos y difiere con la encontrada en especies de agua dulce como el salmón atlántico (Ellis, 1977), trucha arcoiris (Grace y Manning, 1980) y carpa (Botham y Manning, 1981). En estas especies, aunque el riñón es el primer órgano linfomieloide que se desarrolla, el timo aparece antes que el bazo.

El riñón cefálico y el bazo muestran la morfología del adulto tras finalizar el desarrollo larvario (111-146 dde) por lo que puede que el sistema inmunitario larvario sea menos efectivo hasta que estas estructuras se desarrollen, aunque, no obstante, la relevancia funcional de estas observaciones necesita nuevos estudios. Sin embargo, el timo alcanza su máximo desarrollo en los juveniles y queda reducido a agrupaciones de timocitos entre los filamentos de la pseudobranquia en los adultos. A partir de los 62 dde, además de los timocitos, hay unas células de aspecto estrellado y núcleo grande con nucleolo patente y excéntrico, morfología similar a la descrita para las células epiteliales de la corteza tímica (Chilmonezyck, 1983; Gorgollón, 1983; Castillo y col., 1990, 1991). Teniendo en cuenta que las células epiteliales tímicas tienen un papel importante en la maduración y diferenciación de los linfocitos T puede que el timo no sea funcional hasta que estas células aparecen.

Los granulocitos acidófilos se observan a partir de los 21 dde en el intestino posterior y en los vasos sanguíneos adyacentes al riñón, a los 27 dde en el riñón

cefálico, a los 34 dde en la branquia y a los 62 dde en el bazo y en el timo. Sorprendentemente, el primer lugar en el que se detectan los granulocitos acidófilos no es el riñón cefálico, sino los vasos sanguíneos adyacentes al riñón. Por tanto, en la dorada puede que la hematopoyesis, en etapas tempranas del desarrollo, ocurra en un lugar diferente al del adulto tal y como se ha descrito en el pez cebra (Brownlie y Zon, 1999; Davidson y Zon, 2004).

Durante el desarrollo larvario, los granulocitos acidófilos se observan a una edad avanzada en el bazo y en el timo (62 dde) y además, los elipsoides y los centros de melanomacrófagos no aparecen hasta los 76 y 92 dde, respectivamente. Por tanto puede que las larvas estén menos protegidas frente a infecciones bacterianas ya que los elipsoides y centros de melanomacrófagos están implicados en la eliminación de inmunocomplejos en diversas especies de peces (Espenes y col., 1995a, 1995b, 1997; Arnesen y col., 2002) y en el reclutamiento de granulocitos acidófilos que han fagocitado partículas de *V. anguillarum* desde los focos inflamatorios al bazo (Chaves-Pozo y col., 2005).

La branquia y el intestino han sido considerados como vías importantes de entrada de patógenos (Ellis, 2001). En la branquia de dorada, los granulocitos acidófilos se observan por primera vez a los 34 dde y aparecen en pequeño número principalmente en los vasos sanguíneos de los filamentos y en las laminillas branquiales. En las branquias, los granulocitos acidófilos serían la segunda línea de defensa tras el mucus. En el tracto digestivo de dorada, los granulocitos acidófilos aparecen principalmente en el intestino posterior cerca del ano y dispersos en la lámina propia de la mucosa mientras que en el adulto aparecen principalmente en el tejido conjuntivo de la submucosa. Esta localización de los granulocitos acidófilos en larvas sugiere que el ano puede ser una entrada de microorganismos patógenos y que estas células pueden ser importantes en la defensa del intestino de acuerdo con los recientes descubrimientos de Piccchiatti y col. (2007) sobre el aumento de linfocitos B y granulocitos acidófilos en doradas alimentadas con pienso suplementado con bacterias probióticas.

IV.2. Patrón de expresión de genes marcadores de la inmunidad

Así mismo hemos estudiado la expresión tanto de genes marcadores de la inmunidad innata como adaptativa con el fin de correlacionar el desarrollo de los órganos linfomieloides y la aparición de las diferentes células del sistema inmunitario. Las dos subunidades del gen activador de la recombinación (*rag1* y *rag2*) se detectan por RT-PCR entre los 21 y 27 dde. Además, los transcritos de los genes que determinan las subunidades α y β del receptor de linfocitos T y las cadenas pesada y ligera de la Ig M (*ighm* e *igl*) se detectan entre los 27 y 48 dde.

Sin embargo, la mayoría de los genes de la inmunidad innata se expresan desde el momento de la eclosión, incluyendo los genes de los receptores similares a Toll (*tlr5* y *tlr9*), los de las moléculas pro- (*il1b* y *tnfa*) y antiinflamatorias (*tgb1*), los de factores antivirales (*mx*, *irf1*, *irf9*, *prf1* y *ifi30*) y antibacterianos (*c3*, *lyz*, *hamp* y *lbp/bpi*) y los de los marcadores de los fagocitos (*mcsfr* y *ncf4*). La expresión del gen *prf1*, que determina la proteína perforina, a los 2 dde, más de 40 días antes de la aparición de los transcritos de las cadenas α y β del receptor de células T (TCR), sugiere que las células similares a las NK se desarrollan en etapas tempranas durante la ontogenia de la dorada y que pueden desempeñar un papel importante en la protección de larvas frente a infecciones.

Una observación interesante es que el transcrito del *tlr22* no se detecta claramente hasta el 27 dde. El TLR22 pertenece a la familia del TLR11 y aunque se conoce muy poco sobre los ligandos de esta familia parece que el TLR11 reconoce bacterias uropatógenicas (Zhang y col., 2004) y proteínas protozoarias similares a profilina (Yarovinsky y col., 2005). Por tanto, es difícil anticipar la relevancia funcional de la expresión tardía del TLR 22 en dorada antes de la identificación de sus ligandos.

La expresión de genes marcadores de la inmunidad indica que la inmunocompetencia de la dorada durante las primeras fases del desarrollo depende de la inmunidad innata, tal y como se ha demostrado en el pez cebra y en otros teleósteos (Zapata y col., 2006).

V. Análisis de la resistencia natural de larvas y juveniles de dorada frente al patógeno bacteriano *P. damselae* subsp. *piscicida* y la protección inducida por la vacunación frente a este patógeno

El patrón de expresión génica obtenido sugiere que la inmunocompetencia de las larvas de dorada depende de la inmunidad innata y por tanto, la vacunación de las larvas podría no ser efectiva. Para demostrar esta hipótesis y determinar la edad más temprana a la que las larvas de dorada pueden ser vacunadas con éxito, se vacunaron larvas y juveniles antes (11 y 25 dde), alrededor (46 y 67 dde) y después (102 y 130 dde) de la aparición de los marcadores de inmunidad adaptativa y de la detección histológica del timo (alrededor de los 30 dde) y se analizó la protección conferida frente a una inyección experimental con *P. damselae* subsp. *piscicida* viva. Sorprendentemente, el grupo de larvas vacunado a los 11 y 25 dde y también el vacunado los 46 y 67 dde (vacunado por inmersión u oralmente usando *Artemia*) muestran un aumento de susceptibilidad a una infección con *P. damselae* subsp. *piscicida*. Sin embargo, los juveniles vacunados a los 102 y 130 dde e infectados 25 días después de la vacunación muestran un aumento significativo en la protección frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* cuando se comparan con los peces control y un aumento del título de anticuerpos específicos frente a esta bacteria. Desafortunadamente, no ha sido posible estudiar si esta protección se mantiene durante más tiempo dado que los juveniles desarrollan una resistencia natural frente a una infección con *P. damselae* subsp. *piscicida*.

Así mismo, el nivel de expresión de *ighm*, analizado mediante PCR a tiempo real, aumenta durante el desarrollo y se estabiliza en juveniles de aproximadamente 100 dde. Estos datos sugieren que el incremento gradual de la transcripción basal de *ighm* desde larvas a juveniles puede contribuir a esta protección. De cualquier forma, estos resultados muestran que: (i) las larvas de dorada presentan una fuerte dependencia de la inmunidad innata en sus primeras etapas del desarrollo, (ii) la ineffectividad de la vacunación para prevenir enfermedades infecciosas durante el desarrollo larvario y (iii) la falta de correlación entre la adquisición de la inmunocompetencia y la formación de los órganos linfomieloides y la detección de los marcadores de la inmunidad adaptativa.

CONCLUSIONES

1. En una infección experimental con *Vibrio anguillarum*, los macrófagos de dorada no se movilizan al foco inflamatorio y los granulocitos acidófilos son los principales productores de interleuquina 1 β .
2. Los mastocitos de dorada se localizan en intestino y branquia y son células acidófilas, no metacromáticas y contienen histamina y carecen de serotonina. Además, la histamina es biológicamente activa en dorada y regula la activación de los fagocitos y la respuesta inflamatoria mediante la activación de los receptores H₁ y H₂.
3. La histamina sólo está presente en los mastocitos de peces del orden Perciformes y está ausente en anfibios y peces pulmonados, lo que indica una evolución convergente del almacenamiento de histamina en los mastocitos de vertebrados y su utilización como mediador inflamatorio.
4. Las piscidinas se localizan en mastocitos y granulocitos acidófilos de dorada y participan en la muerte y destrucción de los patógenos que han sido fagocitados. La piscidina 1 está presente sólo en mastocitos de branquia y la piscidina 3 en mastocitos de branquia e intestino y en granulocitos acidófilos.
5. Las piscidinas sólo están presentes en los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos de peces del orden Perciformes y están ausentes en los órdenes Pleuronectiformes, Anguilliformes, Salmoniformes y Cypriniformes.
6. La secuencia de aparición de los órganos linfomieloides del sistema inmunitario de dorada es: riñón cefálico (6 dde), bazo (8 dde) y timo (34 dde). El riñón cefálico y el bazo muestran la morfología del adulto tras finalizar el desarrollo larvario. Sin embargo, el timo alcanza su máximo desarrollo en los juveniles y queda reducido a agrupaciones de timocitos entre los filamentos de la pseudobranquia en los adultos.
7. Los granulocitos acidófilos se observan a partir de los 21 dde en el intestino, a los 27 dde en el riñón cefálico, a los 34 dde en la branquia y a los 62 dde en el bazo y en el timo. En adultos, son numerosos en riñón cefálico, bazo y branquia y escasos en intestino y timo.

8. La mayoría de los transcritos de los genes de la inmunidad innata se detectan a partir de 1 dde. Sin embargo, los transcritos de los genes que determinan la perforina (*prf1*) y el receptor similar a Toll 22 (*tlr22*) se detectan a partir de 2 y 27 dde, respectivamente.
9. La mayoría de los transcritos de los genes de la inmunidad adaptativa se detectan a partir de 21 dde. Sin embargo, los transcritos de los genes que determinan las subunidades α y γ del complejo mayor de histocompatibilidad (*spau-daa* e *iclp*) se detectan a partir de 1 y 10 dde, respectivamente.
10. La vacunación frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* durante el desarrollo larvario de dorada es ineficaz y, de hecho, aumenta la susceptibilidad de las larvas a una infección. Además, no existe correlación alguna entre la formación de los órganos linfomieloides, la detección de los marcadores de la inmunidad adaptativa y la adquisición de la inmunocompetencia.

**PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA
TESIS**

Iván Mulero, Alfonsa García Ayala, José Meseguer, Victoriano Mulero (2007) Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture* 268: 244-250.

Gloria López Castejón, M. Pilar Sepulcre, **Iván Mulero**, Pablo Pelegrín, José Meseguer, Victoriano Mulero (2008) Molecular and functional characterization of gilthead seabream *Sparus aurata* caspase-1: the first identification of an inflammatory caspase in fish. *Mol Immunol* 45: 49-57.

**COMUNICACIONES Y PARTICIPACIONES A
CONGRESOS**

Nacionales

Iván Mulero, Elena Chaves Pozo, Alicia García Alcázar, José Meseguer, Victoriano Mulero, Alfonsa García-Ayala. Ontogenia del sistema inmunitario de la dorada (*Sparus aurata* L.). XI Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Cádiz, 2005.

Comunicación oral.

Elena Chaves Pozo, Iván Mulero, Emilia Abellán-Martínez, José Meseguer, Victoriano Mulero, Alfonsa García Ayala. Actividad metaloproteasa en el testículo de dorada. XI Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Cádiz, 2005.

Comunicación oral.

Iván Mulero, M. Pilar Sepulcre, José Meseguer, Alfonsa García- Ayala, Victoriano Mulero. Los mastocitos de los peces evolutivamente más avanzados contienen histamina. XII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Pamplona, 2007.

Comunicación oral.

Inma Fuentes, Iván Mulero, Irene Cano, José Meseguer, Victoriano Mulero. El virus de la necrosis nerviosa (NNV) induce una inflamación crónica en el cerebro de la dorada (*Sparus aurata* L., Teleostei). XII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Pamplona, 2007.

Póster.

Internacionales

Victoriano Mulero, Iván Mulero, Alfonsa García Ayala, José Meseguer. Immunity of fish larvae. 4th Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Gent (Belgica), 2005.

Ponencia invitada.

Iván Mulero, Elena Chaves Pozo, Victoriano Mulero, Alfonsa García Ayala, José Meseguer. Identification and location of the eosinophilic granule cells in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). 10th International Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. Charleston, South Carolina (USA), 2006.

Póster.

Iván Mulero, Elena Chaves Pozo, Alicia García Alcázar, Luis Abelli, José Meseguer, Alfonsa García Ayala, Victoriano Mulero. Ontogeny of the immune system of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). 10th International Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. Charleston, South Carolina (USA), 2006.

Comunicación oral.

Elena Chaves Pozo, Iván Mulero, Emilia Abellán Martínez, José Meseguer, Victoriano Mulero, Alfonsa García Ayala. Matrix metallo-protease activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) testis. 10th International Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. Charleston, South Carolina (USA), 2006.

Póster.