UNIVERSIDAD DE LEÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura

**Memoria presentada por María Camino Fierro Castro
para optar al grado de Doctor.**

León, a 16 de junio de 2009

Universidad de León

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Drs. ALBERTO J. VILLENA CORTÉS Y PILAR LÓPEZ FIERRO como Directores de la Tesis Doctoral titulada “**Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura**” realizada por Dña. MARÍA CAMINO FIERRO CASTRO en el Departamento de Biología Molecular, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005.

León a 16 de junio de 2009

Dr. D. ALBERTO J. VILLENA CORTÉS
Catedrático de Universidad
Dpto. de Biología Molecular
Universidad de León

Dra. Dña. PILAR LÓPEZ FIERRO
Profesora Titular de Universidad
Dpto. de Biología Molecular
Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de BIOLOGÍA MOLECULAR en su reunión celebrada el día 16 de Junio de 2009 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “**Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura**”, dirigida por los Dres. D. ALBERTO J. VILLENA CORTÉS y Dña. PILAR LÓPEZ FIERRO, elaborada por Dña. MARÍA CAMINO FIERRO CASTRO y cuyo título en inglés es el siguiente “Use of fish cell cultures to study the effects of immunostimulants for aquaculture”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005.
León a 16 de Junio de 2009.

El Secretario,

Fdo.: Dr. D. Jesús M. Aparicio

Vº Bº
El Director del Departamento,

Fdo.: Dr. D.. Pedro Calvo Fernández

Los trabajos de investigación de esta Tesis Doctoral han sido cofinanciados por el Ministerio de Educación y Ciencia y el programa FEDER mediante un subvención para el proyecto de Plan Nacional de I+D+i titulado “**Utilización de los cultivos celulares de peces para la selección y estudio de la acción de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura**” (ref. AGL2002-00211). La autora ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador (Ministerio de Ciencia y Tecnología / Educación y Ciencia) durante los años 2003 – 20007.

A todas las mujeres de mi familia

*“La vida cobra sentido cuando se hace de ella
una aspiración a no renunciar a nada”.*

José Ortega y Gasset

Agradecimientos

Debo agradecer a toda esa gente que de una u otra manera han contribuido para que este pequeño sueño llegara a buen término y aunque aquí no nombre a todos y no por ello se me olvidan, si quiero dejar constancia de esa gente que más influyó.

En primer lugar, quiero agradecerle al Dr. Alberto Villena el haberme aceptado en su grupo de investigación y haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y con ello no perder la esperanza de que se puede trabajar en biología. Por todo lo que me ha enseñado en estos años, su dirección y consejos e introducirme en el mundo de la inmunología.

También quiero hacer una mención especial a mi codirectora la Dra. Pilar López Fierro, por todo lo que su experiencia en el mundo de la biología me ha aportado, su apoyo y ayuda, pero especialmente por haberme introducido en el mundo del cultivo celular y haber confiado en mí para trabajar con las células.

A la Dra. Blanca Rázquin, quien no sólo ha compartido conmigo su despacho durante estos años, sino que también ha estado ahí para ayudarme a solucionar cualquier problema y aportar ideas.

A Leticia Barrioluengo, nuestra última integrante del equipo, una buena compañera de equipo que ha sido una gran ayuda en la última recta fina de este trabajo y a la que deseo mucha suerte en su Tesis Doctoral.

A todos los becarios del departamento Seve, Sheila, Sonia, Serafín, Bea, Irene, Sé, Hugo y Taia. Por sus ánimos y colaboración, y porque todos juntos hemos formado un estupendo grupo unido siempre dispuesto a ayudarse y que mas que compañeros de laboratorio ya son amigos. Porque eso nunca cambie y no se pierdan nuestras reuniones gastronómicas.

Al equipo técnico de este laboratorio, Marta y María, que también han aportado su granito de arena de una u otra manera y a Juan que aunque pertenece al laboratorio de genética siempre se ha preocupado por saber como me iba el trabajo.

Finalmente y muy especialmente a mis padres y hermano, co-artífices de que esta Tesis se haya podido realizar y que espero que les haga tan felices como a mi porque esta Tesis también es vuestra.

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Acuicultura	3
2. Trucha arco iris	5
3. Sistema inmunitario de Teleósteos.....	8
3.1. Descripción general.....	8
4. Órganos linfoides.....	10
4.1. Timo	11
4.2. Riñón	11
4.3. Bazo.....	12
4.4. MALT	13
5. Sistema inmunitario innato	13
5.1. Barreras mecánicas.....	14
5.2. Factores humores: Moléculas antimicrobianas.....	14
5.3. Respuesta inflamatoria	18
5.4. Componente Celular.....	20
5.4.1. Granulocitos	20
5.4.2. Monocitos / Macrófagos.....	21
5.4.3. Células granulares eosinófilas (EGCs)	22
5.4.4. Células citotóxicas naturales (NCC).....	23
5.5. Receptores para el reconocimiento de patógenos.....	23
5.6. Mecanismos de respuesta innata	26
5.6.1. Opsonización y función fagocítica	26
5.6.2. Activación de macrófagos	28
5.6.3. Explosión respiratoria.....	28
5.6.4. Enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)	31
5.6.5. Vía de la arginasa.....	32
5.6.6. Enzima ciclo-oxigenasa 2 (COX-2).....	33
6. Sistema inmunitario específico.....	34
6.1. MHC y respuesta inmunitaria específica.....	34
6.2. Linfocitos	35
6.3. Respuesta humoral específica.....	36
6.4. Respuesta celular específica.....	37
7. Citoquinas	39
7.1. Interferón , factor de activación de macrófagos y proteínas Mx	41
7.2. Interleuquina 1 β	43
7.3. Quimioquinas. Interleuquina 8.....	44
7.4. Factor de la necrosis tumoral alfa.....	45
8. Inmunomodulación	46
8.1. Inmunoestimulantes	47
8.1.1. LPS.....	49
8.1.2. Levamisol	51
8.1.3. Poly I:C.....	52
JUSTIFICACIÓN Y PROPÓSITO.....	55
MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. Animales de experimentación.....	63
2. Líneas celulares de trucha arco iris	64
3. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares	65
3.1. Congelación y descongelación de las líneas celulares.....	65
3.2. Medios de cultivo de las líneas celulares.....	65
4. Cultivo primario de macrófagos	67
4.1. Aislamiento de macrófagos de pronefros	67

4.2. Estimación del número de macrófagos	68
5. Inmunoestimulantes	68
6. Ensayos biológicos de inmunoestimulación	69
6.1. Preparación de los cultivos en placas	69
6.2. Ensayo de fagocitosis	69
6.3. Ensayos de explosión respiratoria	70
6.3.1. Método del NBT (detección intracelular de O ₂ ⁻)	71
6.3.2. Método del ferrocitocromo C (detección extracelular de O ₂ ⁻)	71
6.3.3. Producción de sobrenadantes condicionados y ensayos para analizar la liberación de MAF ..	72
6.4. Ensayos de producción de NO	74
6.4.1. Ensayo para la detección de NO intracelular	74
6.4.2. Detección NO extracelular	75
6.5. Tratamiento estadístico de los resultados de los ensayos biológicos	76
7. Ensayos de expresión génica	76
7.1. Extracción de RNA total	77
7.2. Retrotranscripción	79
7.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	80
7.4. Electroforesis en geles de agarosa	83
7.5. Semicuantificación	84
7.6. PCR en tiempo real	84
7.7. Análisis cuantitativo	87
RESULTADOS	89
1. Cultivo de macrófagos	91
2. Ensayo de fagocitosis	92
3. Análisis del estallido respiratorio	93
3.1. Detección intracelular de O ₂ ⁻ . Método del NBT	93
3.2. Detección extracelular de O ₂ ⁻ . Método del ferrocitocromo C	97
3.3. Detección de la respuesta de las líneas celulares a citoquinas	101
3.4. Detección de la producción de óxido nítrico	108
4. Ensayos de expresión génica	114
4.1. Expresión del gen <i>IL-1β1</i>	114
4.2. Expresión del gen <i>IL-8</i>	117
4.3. Expresión del gen <i>TNF-α1</i>	119
4.4. Expresión del gen <i>TNF-α2</i>	122
4.5. Expresión del gen <i>MHC-II</i>	125
4.6. Expresión del gen <i>Mx-1</i>	128
4.7. Expresión del gen para <i>COX-2</i>	131
4.8. Expresión del gen para <i>iNOS</i>	134
4.9. Expresión del gen para <i>Arginasa</i>	135
DISCUSIÓN	139
1. Elección de los inmunoestimulantes para el estudio	141
2. Ensayos biológicos tras la inmunoestimulación <i>in vitro</i>	143
2.1. Actividad fagocítica	143
2.2. Producción de ROS	147
2.3. Producción de óxido nítrico	151
3. Expresión génica de iNOS y de arginasa-2	154
4. Expresión génica de COX-2	157
5. Expresión génica MHC-II	159
6. Comparación de los perfiles de expresión de citoquinas y de la proteína Mx1	160

7. Las líneas celulares con poblaciones celulares heterogéneas como modelos de cribado para la selección de inmunoestimulantes.....	164
CONCLUSIONES	167
ANEXOS	171
BIBLIOGRAFÍA	177

Portada: Microfotografía (x100) de una mitosis en la línea celular TSS de estroma de bazo de trucha arco iris con tinción para la actividad fosfatasa ácida (cedida por la Dra B. Carracedo).

Abreviaturas

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

AGD: amebiasis branquial

APCs: células presentadoras de antígenos

AMPs: péptidos antimicrobianos

ANAE: α -naftil acetato esterasa inespecífica

BCR: receptores de linfocitos B

ConA: concavalina A

COX: ciclooxigenasa

CRP: Proteína C-reactiva

D.O.: densidad óptica

DAF-2 DA: diaminofluoresceína-2 diacetato

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleótidos trifosfatos

DPI: cloruro de difenil-iodonio

dsRNA: RNA de cadena sencilla

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Epo: eritropoyetina

FCS: suero fetal de ternera

Fig.: figura

G-CSF: factor de crecimiento granulotario

HBSS: solución salina tamponada de Hanks

IFN: interferón

IgM: inmunoglobulina M

IL: interleuquina

iNOS: enzima óxido nítrico sintasa inducible

IPNV: virus de la necrosis pancreática infecciosa

IRAKs: quinasas asociadas al receptor de IL

Kb: kilo bases

LBP: proteína de unión a lipopolisacárido

LPS: lipopolisacárido

LRR: repeticiones ricas en leucina

MAFs: factores de activación de macrófagos

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

MS-222: metil sulfonato de tricaina

NBT: azul de nitrotetrazolium

NOS: óxido nítrico sintasa

p/v: relación peso / volumen

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGE₂: prostaglandina E₂

PGE₂: prostaglandina H₂

PKR: proteína quinasa dependiente de RNA

PMA: éster de forbol 12-miristato 13-acetato

Poly I:C: ácido polinosínico - policitidílico

PRRS: receptores de reconocimiento de patrón

RES: sistema retículo endotelial

ROI: metabolitos intermediarios reactivos del oxígeno

ROS: metabolitos reactivos del oxígeno

RNS: metabolitos reactivos del nitrógeno

RT: retrotranscripción

STAT1: Señal de traducción y activación de factores de transcripción 1

SOD: superóxido dismutasa

TAE: tampón Tris, acetato y EDTA

TCMD: medio completo de Mishell y Dulton

TCR: receptores de linfocitos T

TGF: factor de crecimiento transformante

THM: *trout holding medium*

TIR: dominio de señalización citoplasmática

homólogo al de los receptores de interleuquina

TLRs: Receptores tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

v/v: relación volumen / volumen

VEGF: factor de crecimiento vasculo-endotelial

—— Introducción ——

1. Acuicultura

Se entiende por Acuicultura «el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, lo cual implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar producción, en operaciones como la siembra, la alimentación y la protección de depredadores, etc.

Aproximadamente el 40% de todo el pescado consumido directamente por los seres humanos en todo el mundo es actualmente de cría en piscifactorías (FAO 2007). Aunque la mayoría de la producción de la acuicultura hasta la fecha ha sido en especies de agua dulce, la acuicultura marina ha ido creciendo de manera espectacular.

La acuicultura está alcanzando mundialmente un gran desarrollo, constituyendo el sector alimentario de más rápido crecimiento. Esta tendencia tiene que conservarse o subir, para mantener los actuales niveles de consumo de productos pesqueros, pues la demanda de estos productos por la población mundial sigue su aumento geométrico según previsiones de la FAO, cabiendo destacar que en las últimas cuatro décadas la Unión Europea ha registrado un incremento en el consumo de productos pesqueros del 50%. (FAO 2003).

No obstante, la acuicultura no está exenta de problemas y el más importante de ellos y el que más graves complicaciones causa es el desarrollo de enfermedades infecciosas. Fallos en el sistema de cultivo, la manipulación y el transporte y, sobre todo, el confinamiento a altas densidades, generan en los peces situaciones de estrés, provocando una depresión del sistema inmunitario, lo cual facilita en gran medida el desarrollo de patologías (Schreck, 1996). Los peces pueden ser infectados por un amplio rango de parásitos, hongos, bacterias (sobre todo Gram-negativas) y virus (Shao, 2001). Las patologías de los peces se reconocen cada vez más como un problema en la producción y comercialización en acuicultura y afectan tanto al desarrollo económico como al impacto socio-económico de este sector en muchos países (Subasinghe, 2005).

La utilización de antibióticos sigue siendo una práctica común para prevenir y tratar enfermedades infecciosas bacterianas (Smith *et al.*, 1994; Miranda y Zemelman, 2002a),

aunque se pretende reducir su uso debido a la aparición cada vez más frecuente de resistencias, además de los efectos nocivos sobre el medio ambiente (Anderson y Jenny, 1992; Williams *et al.*, 2002) e incluso por dejar residuos peligrosos para los consumidores de estos pescados (Moats, 1999).

La vacunación es una alternativa real y una necesidad ligada al desarrollo de la acuicultura (Evelyn, 1997). Aunque la vacunación es un método muy eficaz de prevención, está limitada a un número reducido de enfermedades, donde los agentes etiológicos han sido aislados y caracterizados, y en las que se ha comprobado su eficacia (Robertsen *et al.*, 1990; Sveinbjørnsson y Seljelid, 1994).

Como alternativas al uso de antibióticos y adicional a la vacunación, se han desarrollado métodos de inmunoprofilaxis que incluyen la modulación del sistema inmunitario mediante el uso de diversas sustancias estimulantes. Un gran número de trabajos demuestran que diversas sustancias, denominadas inmunoestimulantes, son capaces de estimular la respuesta inmunitaria de los peces. Los inmunoestimulantes pueden, por si mismos, activar los mecanismos de defensa no específicos o administrados junto con vacunas activar la defensa inespecífica y elevar la respuesta específica (Anderson, 1992). Estos métodos de control de las patologías permiten conseguir una mayor producción con un menor impacto ambiental y una mayor calidad del pescado de consumo humano (Howgate *et al.*, 1997) y, sobre todo, evitar la aparición de cepas resistentes a antibióticos (Sørum y Lund, 2002; Miranda y Zemelman, 2002b). Además, son un método de elección para las enfermedades virales y bacterianas para las que no existen vacunas efectivas (Austin y Austin, 1999).

Un problema asociado a la experimentación en peces es la elevada variabilidad de las respuestas, en función de la especie y condiciones ambientales en el origen de captura y/o de mantenimiento (Anderson, 1990; Hedrick, 1998). Frente a estos problemas, la experimentación *in vitro* presenta numerosas ventajas, tales como condiciones controladas y repetitivas, y posibilidad de realizar numerosos ensayos repetitivos y en tiempos cortos, con una menor variación individual (Anderson, 1990; Villena, 2003). En consecuencia, se han desarrollado un número considerable de líneas celulares de peces (Fryer y Lannan, 1994); estas líneas celulares han proporcionado una herramienta muy útil para realizar diversos estudios sobre procesos fisiológicos importantes como comunicación celular (Slarter *et al.*, 1983) y sistema endocrino (Bols *et al.*, 1995), pero su uso más frecuente es en el estudio de las patologías infecciosas de peces (Villena, 2003), no obstante muy pocas líneas celulares han sido establecidas y caracterizadas como líneas celulares estables (Tapay *et al.*, 1995; Chen y Wang, 1999; Neumann *et al.*, 2000; Villena, 2003).

En las últimas décadas, se han establecido más de 150 líneas celulares de peces y se han desarrollado numerosos bioensayos con el fin de reemplazar los test de toxicidad aguda en peces por ensayos de citotoxicidad (Castaño *et al.*, 2003; Bols *et al.*, 2005;

Schirmer, 2006), así como en estudios de fisiología celular (Wood *et al.*, 1998), efectos ante infecciones virales y carcinogénesis (Nicholson, 1989) como se ha venido haciendo en mamíferos (revisado por Villena, 2003).

2. Trucha arco iris

La trucha arco iris, inicialmente denominada *Salmo gairdneri* (Richardson) y ahora identificada como *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum, 1792), es una especie originaria de Norteamérica y fue introducida en Europa en 1882. Pertenece a la clase de los Osteictios, orden *Salmoniformes*, familia *Salmonidae*, género *Oncorhynchus*. Esta es la variedad más frecuente en las piscifactorías, aunque existen otras especies, algunas de carácter salvaje.

Presenta un cuerpo alargado y esbelto; una marcada línea lateral, ribeteada de rosa (Fig. 1). El lomo, a ambos costados, y las aletas dorsal y caudal aparecen moteados con puntos oscuros. La zona ventral es, sin embargo, clara. En la época reproductora, sobre todo las hembras, adquieren una coloración muy vistosa. Cabeza pequeña, mandíbulas fuertes, opérculo muy marcado. En los machos la mandíbula inferior se va prolongando con la edad y se curva hacia arriba en forma de gancho. Posee un pliegue sobre la línea medio-dorsal, a modo de aleta, desprovisto de radios llamado aleta adiposa. Tiene escamas pequeñas y aletas sin radios duros.

Fig. 1.- Dibujo representativo de la morfología externa de un individuo de *Oncorhynchus mykiss*. (Tomado de www.dec.ny.gov/animals/52731.html. Copyright © 2009 New York State Department of Environmental Conservation).

Por su buena respuesta al cultivo masivo en cautividad, su alto índice de supervivencia y por la facilidad de adquisición de reproductores de calidad y de huevos obtenidos por sistemas de reproducción artificial, la trucha arco iris es el principal pez cultivado en España (Tabla 1).

Su cultivo ha dado lugar a un sector económicamente estable, de tendencia exportadora, con márgenes estrechos pero innovador y en expansión, aunque en los

últimos años parece haberse frenado la producción de trucha en España, que había alcanzado un máximo en 2001 con 35.384 Tm y que en 2006/07 se vio reducida en casi 10.000 Tm (Tabla 1). La producción de trucha arco iris en España se concentra fundamentalmente en el noroeste (Fig. 2).

En mucha menor escala se ha desarrollado el cultivo de otras especies continentales como son la tenca, en las charcas de Extremadura con una producción en 2006 de 60,88 Tm y, en menor medida, en Castilla y León (34,10 Tm); el esturión (102,00 Tm) en la cuenca del Guadalquivir y el cangrejo de las marismas de Huelva (0,4 Tm) (JACUMAR 2009).

Dado que la producción de especies continentales en general y en particular la de trucha, sigue en aumento, no solo en España, sino en todo el mundo, la preocupación por las enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura, está ligada a la motivación por conocer la epidemiología, ecología, impacto y sobre todo, la profilaxis ante las mismas.

Origen del agua	Grupo de Especies	Especies	Total producción €	Fase 1 puesta (miles de huevos)	Fase 2 Incubación/cría (miles de Indv)	Fase 3 Preengorde (Indv)	Fase 4 engorde a talla comercial Kg
De Zona Continental	Peces	Esturión (ESP)	3.422.000	153.050		25.000	33.000
		Esturión de Siberia	684.022	35.550			60.775
		Salmón Atlántico	262.230,7	355	380,7	1.494.629	
		Trucha común y marina	122.913,2	1.885,1	591,6	5.684.203	158.995,4
		Trucha arco iris	65.480.621,2	526.858,5	27.290	58.783.953	25.486.414,2
		Hucho				2.730	
		Carpa común	67.723,9			332.800	7.690
		Tenca	535.811,1		1.572	449.150	38.287,5
		Pez Rojo	4.000			10.000	
		Rutilos				200	
		Ciprínidos nep				41.200	9,00
		Anguila europea	3.717.944			57.500	461.000
		Espinosos				1.000	
	Samarugo				2.500		
	Crustáceos	Cangrejo del pacífico	5.400				300,00
Cangrejo de pinzas blancas					65.290		
Total continental			74.302.666,3	717.698,6	29.834,3	66.950.155	26.246.471
Total acuicultura			496.508.693,8	717.698,6	85.747,6	1.580.098.123	284.992.167

Tabla 1.- Producción de acuicultura continental en 2007 en España. Subdirección General de Estadística Agroalimentaria del Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino.
www.mapa.es/es/estadistica/pags/pesquera/acuicultura/produccion.htm

Fig. 2.- Producción de trucha arco iris sobre el total nacional en porcentaje
(Fuente: MARM 2007)

3. Sistema inmunitario de Teleósteos

3.1. Descripción general

La función esencial del sistema inmunitario en todos los vertebrados es la defensa contra las infecciones. El sistema inmunitario de los peces teleósteos es, en general, muy similar al de los vertebrados superiores y aún presentando algunas diferencias importantes respecto a estos, se halla notablemente desarrollado (Newman, 1993). Hay muchas similitudes en cuanto a los mecanismos celulares (Warr, 1997; Miller *et al.*, 1998) y en menor medida a las citoquinas e interleuquinas (Secombes *et al.*, 1999a). Así, la respuesta inmunitaria de los peces tiene la propiedad de distinguir lo propio de lo extraño (Ellis, 1982) y puede ser dividida en dos tipos:

- **Inmunidad innata** (inespecífica) que comprende una serie de mecanismos innatos, codificados genéticamente en la línea germinal y que se generan de forma independiente del contacto con los patógenos. Estos mecanismos son filogenéticamente antiguos y pueden eliminar patógenos del organismo y bloquear su entrada. Hoy en día se prefiere usar el término innato, ya que, aunque las respuestas son inespecíficas en cuanto a los mecanismos (fagocitosis, opsonización...), si existe una capacidad de discriminación del tipo de patógeno (virus, bacterias, hongos). En peces, al igual que en otros poiquilothermos, la respuesta innata tiene mayor importancia que la respuesta específica (Siwicki *et al.*, 1994; Magnadottir, 2006).
- **Inmunidad adquirida** (específica) que es una respuesta inducible que requiere de la presencia de células linfoides que reaccionan específicamente contra el antígeno inductor. En esta respuesta interviene un componente humoral constituido por los anticuerpos que inhiben la adherencia e invasión de las células por bacterias, neutralizan las toxinas bacterianas y activan el complemento (Yano, 1996; Ellis, 1999), y un componente celular, principalmente linfocitos T (Bernstein *et al.*, 1998).

Ambas implican respuestas humorales y celulares inducidas por agentes extraños, tales como agentes infecciosos. En el caso de la inmunidad adquirida el agente extraño es reconocido por el/los antígeno/s (Ag) contra el/los que se elabora/n la/s respuesta/s. En el caso de la inmunidad innata, los agentes extraños son identificados por los “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs).

Ambos tipos de respuestas inmunitarias están relacionadas a través de las respuestas inflamatorias, originadas inicialmente por los mecanismos innatos, pero capaces de dirigir y regular las respuestas adquiridas. La respuesta inflamatoria es un proceso complejo que se produce ante una infección o daño del tejido e implica el envío coordinado de componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) al lugar de la infección o

lesión (Ellis, 1986). Tras el daño se produce un aumento de la vascularización y migración de monocitos/macrófagos y granulocitos hacia la zona donde estas células aumentan sus actividades enzimáticas y fagocíticas para eliminar los agentes patógenos.

En los teleósteos el sistema defensivo celular está compuesto por subpoblaciones de leucocitos, que incluyen: a) en la inmunidad adquirida, los linfocitos B y T, y células presentadoras de antígenos; b) en la inmunidad innata, los granulocitos, los trombocitos, los macrófagos y células citotóxicas inespecíficas, además, de otros componentes incluidos en el sistema retículo-endotelial (Dalmo *et al.*, 1997), con capacidad fagocítica, tales como células endoteliales sinusoidales y células reticulares fagocíticas (Press *et al.*, 1994; Dannevig *et al.*, 1994; Sørensen *et al.*, 1998;).

Un rasgo particular del tejido linfo-hematopoyético de los teleósteos es la presencia de macrófagos conteniendo pigmentos de color oscuro, principalmente melanina y que se denominan melanomacrófagos (Meseguer *et al.*, 1994). Estos se agrupan y forman agregados llamados centros melanomacrófágicos (CMM) en la mayoría de los teleósteos (Ferguson, 1989; Press *et al.*, 1994). Su número y tamaño aumenta en peces crónicamente enfermos, cuando el catabolismo ha sido excesivo (Ferguson 1989). Sirven como depósito de los productos finales del metabolismo (ej. los fosfolípidos) y también de antígenos y material particulado (Herráez *et al.*, 1986), su función exacta no se conoce, pero además de lo mencionado, se sabe que la melanina tiene la capacidad de atrapar los radicales oxidativos y eso protegería a los tejidos contra estos productos liberados por células fagocíticas como los neutrófilos. También se encuentran en el riñón e hígado y ocasionalmente en las gónadas y el tiroides (Ferguson, 1989).

En cuanto a los órganos y tejidos del sistema inmunitario, en peces teleósteos se consideran como órganos linfoides primarios el timo y el riñón (Ellis, 1988b) y como secundarios el bazo, el riñón y componentes de los tejidos linfoides asociados a las mucosas y al tegumento (Zapata, 1982). Por otra parte, en los teleósteos no hay tejidos linfoides foliculares, ni centros germinales, y se suele considerar la existencia de tejido linfo-hematopoyético en los órganos linfoides secundarios, consistente en una mezcla de tejidos linfoides y hematopoyético sin delimitación clara entre ellos (Zapata y Cooper, 1990; Press *et al.*, 1994).

A lo largo de la historia evolutiva, los organismos menos desarrollados dependen proporcionalmente más de las respuestas inespecíficas que de las específicas, por lo que en los peces los mecanismos innatos tienen una gran importancia (Anderson, 1997). Las mayores diferencias entre la respuesta inmunitaria de los peces teleósteos y la de los mamíferos estriban en una cinética más lenta de la respuesta antígeno-específica, la presencia predominante de inmunoglobulinas de tipo M (IgM) en los peces que durante la respuesta secundaria se caracteriza por la ausencia de cambio de Ig y un moderado incremento en la afinidad de los anticuerpos, aunque también se ha descrito la presencia de IgD (Kaattari y Piganelli, 1996; Watts *et al.*, 2001), y en menor grado de los genes de

la línea germinal para los receptores de las células T y B en los peces (Kaattari, 1992; Miller *et al.*, 1998). Además, particularmente en salmónidos las respuestas humorales secundarias son muy débiles (Kaattari, 1992).

Al igual que en mamíferos, las respuestas inmunitarias de los peces, especialmente las adquiridas, están influenciadas por distintos factores intrínsecos del individuo, tales como el “background genético”, el ciclo sexual y la edad. No obstante, como otros vertebrados poiquiloterms, los peces son muy sensibles a cambios estacionales – la temperatura ambiente ejerce un gran impacto sobre todos los aspectos de sus respuestas inmunitarias (Zapata *et al.*, 1992; Bly *et al.*, 1997) – y al estrés (Schreck, 1996).

A continuación se hace una presentación más detallada de los principales componentes del sistema inmunitario de peces teleósteos.

4. Órganos linfoides

Los principales órganos linfoides en teleósteos son el timo, el riñón y el bazo (Ellis, 1988b) (Fig. 3). En bazo y riñón se localizan mayoritariamente los macrófagos, que juegan un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa.

La carencia de médula ósea y ganglios linfáticos en los peces teleósteos es una de las principales diferencias con los mamíferos. Mientras que en mamíferos el tejido hematopoyético se localiza en el hígado fetal, el bazo y la médula ósea de los adultos, en los teleósteos el tejido linfoide y el hematopoyético, están estrechamente ligados encontrándose ambos tejidos en riñón y bazo, por lo que algunos autores optan por denominar a los órganos que ejercen estas funciones en los peces, como órganos linfo-hematopoyéticos (Zapata, 1982; Zapata y Cooper, 1990).

Fig. 3.- Esquema de la anatomía interna de un teleósteo.

En el tejido linfo-hematopoyético se encuentran células presentadoras de antígenos (macrófagos y linfocitos B) y células productoras de anticuerpos (células plasmáticas) (Zapata y Cooper, 1990). Las sustancias antigénicas son procesadas y presentadas a las células T iniciando una respuesta específica (Vallejo *et al.*, 1992a; Stensvag *et al.*, 1995). La ausencia en peces de tejido linfoide folicular se ha asociado a la falta de cambio de clase de inmunoglobulinas durante las respuestas inmunitarias secundarias humorales, ya que solo poseen inmunoglobulinas séricas de tipo M (IgM) y a la debilidad de memoria inmunológica en los peces (Kaattari, 1992).

4.1. Timo

Es el único órgano totalmente linfoide en todos los teleósteos y hay muchas pruebas que indican que es un órgano linfoide primario para células T (Razquin *et al.*, 1990; Bernstein *et al.*, 1998).

El timo es un órgano par, bilateral, que aparece en la parte superior interna de las cámaras branquiales por encima del epitelio branquial (Ellis, 1977). Está formado por una red de células retículo-epiteliales entre las que se encuentran células libres, fundamentalmente timocitos (linfocitos en distintos estadios de maduración), así como melanomacrófagos, células granulares eosinófilas y macrófagos propiamente dichos, además de células mioides (Ferguson, 1989; Castillo *et al.*, 1991; Zapata *et al.*, 1996). Su localización superficial así como el epitelio simple que lo separa del agua, ha ocasionado que algunos autores, como Chilmonczyk (1992), hayan descrito que el timo de teleósteos posee una cierta vulnerabilidad a infecciones micóticas y bacterianas debida a la entrada de partículas antigénicas al interior del mismo.

Estudios posteriores como los realizados por Castillo *et al.*, (1998) han demostrado que en la trucha arco iris, el timo está claramente protegido durante el desarrollo de la entrada de sustancias antigénicas del agua y aún cuando está recubierto por una única capa simple de epitelio faríngeo se ha demostrado que es una capa continua sin poros entre las células.

El timo es el primer órgano linfoide que se desarrolla en los peces (Castillo *et al.*, 1991; Willett *et al.*, 1999); es la fuente más importante de linfocitos T y al igual que en mamíferos sufre una regresión con la edad; aunque en muchas especies no parece existir esta involución tímica, al menos permanente hasta una edad muy avanzada (Chilmonkzyc, 1992), si se han descrito periodos de involución estacional seguidos de fases de recuperación (Álvarez, 1986).

4.2. Riñón

Es el principal órgano hematopoyético en peces óseos (Bielek; 1981). Consta de dos partes, una anterior o cefálica (pronefros) con función hematopoyética y sitio principal de

diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos, y una parte posterior (mesonefros) con función excretora en la que el tejido hematopoyético se dispone entre las estructuras del sistema excretor (Ferguson; 1989).

Tanto en el pronefros como en el mesonefros, las células linfoides y hematopoyéticas se encuentran entre una extensa red de fibras reticulares y células reticulares formando cordones celulares, que se disponen entre sinusoides sanguíneos. Estos están revestidos por células endoteliales sinusoidales con capacidad fagocítica (Ellis, 1988b; Zapata y Cooper, 1990; Meseguer *et al.*, 1990; Press *et al.*, 1994). Además de las células hematopoyéticas, se encuentran un gran número de macrófagos, centros melanomacrófagos y células linfoides en todos sus estados de diferenciación, mayoritariamente linfocitos B (Agius y Agbede, 1984; Kaattari e Irwin, 1985; Press *et al.*, 1994). Las células endoteliales sinusoidales suponen el principal sistema de filtrado de la sangre gracias a su capacidad endocítica (Dannevig *et al.*, 1994).

En el riñón anterior o pronefros es en el primer órgano en el que aparecen células portadoras de inmunoglobulinas (Ig+) durante la ontogenia, por lo que se le considera un órgano primario para la diferenciación de células B (Irwin y Kaattari, 1986). Por esta característica, por su capacidad hematopoyética y de producción de células sanguíneas, y por sus características ultraestructurales e histoenzimáticas, es considerado como un órgano homólogo de la médula ósea de los mamíferos, en el que se producen la eritropoyesis, granulopoyesis y linfopoyesis (Razquin *et al.*, 1990).

4.3. Bazo

El bazo es un órgano linfoide que contiene menor número de células hematopoyéticas y linfoides en comparación con el riñón. Está delimitado por una cápsula fibrosa y el parénquima carece de trabéculas vasculares bien desarrolladas, especialmente en salmónidos, y no presenta una clara definición entre pulpa blanca y roja como en mamíferos (Tischenforrf, 1985; Zapata y Cooper, 1990). La pulpa roja formada por un entramado de células reticulares entremezcladas con sinusoides y células hematopoyéticas, incluyendo macrófagos y linfocitos, ocupa la mayor parte y tiene una función eritropoyética y granulopoyética, mientras que la pulpa blanca está pobremente desarrollada y contiene elipsoides y grupos de melanomacrófagos (Press y Evensen, 1999). Las células sanguíneas en diferenciación se localizan en cordones celulares, de estructura semejante a la descrita para el tejido linfo-hematopoyético del riñón, encontrándose también eritropoyesis en la luz de los sinusoides sanguíneos (Álvarez, 1986).

El bazo de peces teleósteos contiene también elipsoides esplénicos, paredes capilares compuestas por una trama de fibras reticulares donde se encuentran macrófagos. Las fibras se especializan en atrapar complejos inmunes y antígenos particulados (Vallejo *et al.*, 1992a), mientras que los macrófagos son altamente fagocíticos (Ellis, 1980)

generalmente de complejos antígeno-anticuerpo o de productos metabólicos, material que puede ser retenido durante largos periodos de tiempo y jugar un papel importante en el fenómeno de memoria inmunológica.

Estudios ontogénicos en salmón Atlántico (*S. salar*), carpa (*Cyprinus carpio*) y trucha arco iris, sugieren que el bazo no es esencial en la maduración inmunológica, ya que linfocitos del timo y del riñón anterior participan en numerosas funciones inmunológicas cuando el bazo es todavía rudimentario (Razquin *et al.*, 1990). Sin embargo, bajo estimulación antigénica aparecen células productoras de anticuerpos, cuya cinética es muy parecida a la observada en el riñón anterior (Kaattari e Irwin, 1985; Razquin *et al.*, 1990).

4.4. MALT

Entre los tejidos linfoides secundarios se encuentra el tejido linfoide asociado a mucosas, conocido como MALT (“mucosal associated lymphoid tissue”). En peces, el MALT incluye, según la mucosa de la que se trate, el GALT (asociado al tracto intestinal) y el SALT (asociado al tegumento).

El MALT no es un órgano linfoide como tal, pero se considera tejido linfoide con importantes funciones defensivas. En teleósteos el GALT está formado por tejido linfoide disperso que coloniza la mucosa del tubo digestivo, conteniendo diversas poblaciones linfocitarias, macrófagos, células presentadoras de antígenos, diversos tipos de granulocitos y células granulares eosinófilas. Estas últimas son especialmente numerosas en salmónidos (Hart *et al.*, 1988). En cuanto a los linfocitos, se encuentran células-B, productoras de inmunoglobulinas M secretoras (Rombout *et al.*, 1993, McMillan y Secombes, 1997, Zapata *et al.*, 2006) que se alojan en la lámina propia y linfocitos intraepiteliales, principalmente células T (Rombout *et al.*, 2005, Bernard *et al.*, 2006).

5. Sistema inmunitario innato

Los vertebrados poiquilothermos dependen proporcionalmente más de las respuestas inmunitarias inespecíficas que de las específicas, y los peces dependen en gran medida del sistema innato, ya que no tienen un sistema específico con un desarrollo amplio como en mamíferos (Anderson, 1997; Robertsen, 1999).

Este tipo de respuesta comprende una serie de mecanismos, en los que están implicados barreras mecánicas y funcionales del tegumento y las mucosas, expuestas al contacto con el medio externo, moléculas con actividades antimicrobianas (microbicidas, citostáticas, antiproteasas, lectinas...) y factores humorales y celulares que median las respuestas inflamatorias.

5.1. Barreras mecánicas

La inmunidad innata comienza por las barreras físicas, tales como los epitelios y el mucus que los recubre, una mezcla principalmente de glicoproteínas, que impide o dificulta la penetración de muchos antígenos y previene la colonización en su superficie de parásitos, bacterias y hongos (Ourh, 1980).

La producción de mucus se ve incrementada ante una infección, es una barrera física y química ya que contiene lisozima y enzimas proteolíticas que inhiben e impiden la invasión bacteriana. También el mucus tapiza las paredes del tracto alimentario, que junto con el pH extremo estomacal y enzimas proteolíticas, sirven de defensa contra potenciales patógenos (Shephard, 1994).

5.2. Factores humorales: Moléculas antimicrobianas

Incluyen una serie de factores solubles que pueden formar parte del sistema inmunitario específico o inespecífico. Son un conjunto de proteínas y glucoproteínas presentes en suero, mucus y huevos, con funciones de defensa (Yano, 1996; Kaattari y Piganelli, 1996). Sus concentraciones aumentan o disminuyen en respuesta a infecciones o daños tisulares interviniendo en diferentes procesos de la denominada respuesta de la fase aguda. En los últimos años se les ha dado una mayor importancia y han surgido algunas revisiones sobre el tema (Yano, 1996; Ellis, 2001).

Los más destacables en la respuesta innata son:

Microbicidas: entre las que se encuentran lisozima, sistema del complemento, proteína C-reactiva, quitinasas, péptidos antimicrobianos y hemolisinas.

Bacteriostáticos: tales como la transferrina, lectinas y α -precipitina.

Antiproteasas: como la α 2-macroglobulina.

Citoquinas: principalmente, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquinas 1 (IL-1 β) y 6 (IL-6) y quimioquinas.

En cuanto a los tres primeros grupos, su naturaleza y funciones en la inmunidad innata de los peces teleósteos han sido objeto de revisión por diversos autores como Yano (1996), Ellis (2001), Magnadottir (2006), Whyte (2007), Gómez y Balcázar (2008) o Alvarez-Pellitero (2008) entre otros.

En esta Introducción nos centraremos en aquellos que tienen relación más directa con los objetivos de esta Tesis, como son las citoquinas que median procesos inflamatorios y que se describen más exhaustivamente en el apartado 7 de esta introducción. Por este motivo, comenzaremos por una breve descripción de algunos de estos factores humorales de la respuesta innata, seguida de una revisión de la respuesta inflamatoria en peces teleósteos.

Lisozima. Se trata de una pequeña proteína catiónica de bajo peso molecular que cataliza la hidrólisis de los enlaces β -1,4-glicosídicos entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina, presente en la pared celular de bacterias Gram-positivas y otros microorganismos, de forma que provoca la rotura de la membrana por estrés osmótico (Alexander, 1985; Ellis, 1990).

La lisozima se ha relacionado generalmente con la resistencia a la infección (Yano, 1996) y es considerada como parte del sistema intrínseco de defensa de muchas especies frente a las infecciones de virus, bacterias y parásitos (Lindsay, 1986; Fast *et al.*, 2002).

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida por el organismo tanto de vertebrados como invertebrados. En peces teleósteos se ha localizado en suero, mucus, huevos, células del sistema inmunitario y en algunos tejidos (Sveinbjørnsson *et al.*, 1996; Takemura, 1996; Fast *et al.*, 2002). En suero de trucha arco iris, Grinde (1989) aisló dos formas de lisozima, al menos una de las cuales era capaz de lisar importantes patógenos Gram-negativos, como *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas hydrophila*.

Su actividad está modulada por el sexo, la edad, el estrés o los cambios estacionales, observándose incrementos durante infecciones o reacciones inflamatorias (Alexander, 1985; Siwicki y Studnicka, 1987).

Sistema del complemento. Complejo de proteínas plasmáticas sintetizadas como precursores inactivos (pro-enzimas) que se activan en cascada generando numerosos mediadores de la inflamación biológicamente activos que desembocan en una actividad viricida y bactericida (Sakai, 1992; Sakai *et al.*, 1994), actividad frente a parásitos (Woo, 1992) y capacidad de opsonización. Su actividad está afectada por la temperatura, el sexo y la estación del año teniendo una mayor efectividad entre 15 y 25°C (Nonaka *et al.*, 1981).

Puede ser activado a través de tres vías (Fig. 4), la clásica o dependiente de anticuerpo, la alternativa o independiente de anticuerpo y actualmente se habla de una tercera vía dependiente de lectina. Se ha descrito la presencia del sistema de complemento en el mucus de la piel, actuando así como primera barrera de defensa, mediante la activación de alguna de las vías (Lambris, 1993; Sakai, 1992; Holland y Lambris, 2002).

La activación de la vía clásica se inicia por la interacción entre el componente C1 y el complejo antígeno-anticuerpo. La activación de la vía alternativa se produce a través del componente C3, que es activado por diferentes sustancias como lipopolisacáridos o polisacáridos de la pared celular de bacterias u hongos entre otros compuestos (Boshra *et al.*, 2006). En peces teleósteos este componente es capaz de lisar eritrocitos de diferentes especies y células alogénicas y se conoce la existencia de múltiples isoformas del factor C3 que aumentan la capacidad de reconocer diferentes patógenos (Sunyer *et al.*, 1997).

La presencia de ambas vías se ha demostrado en distintas especies, como la trucha arco iris, la carpa, la tilapia (*Tilapia nilotica*) y el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Nonaka *et al.*, 1981; Matsuyama *et al.*, 1988; Lobb y Hayman, 1989).

La tercera vía de activación requiere la interacción de lectinas tales como las lectinas de unión a manosa (MBL) y las ficolinas con restos de azúcares que se encuentran en la superficie celular de los microorganismos (Fujita *et al.*, 2004, Boshra *et al.*, 2006).

Fig. 4.- Esquema de las vías de activación del complemento en la respuesta innata. (Modificado de W.B. Saunders Company 2002)

Proteína C-reactiva (C-Reactive Protein, CRP). Es una globulina del plasma que aparece en la fase aguda de muchos procesos infecciosos y a la que se le han atribuido funciones protectoras; su principal función es la de precipitar al lipopolisacárido C presente en las paredes bacterianas. En peces se encuentra de forma persistente en el suero pudiendo representar una línea defensiva permanente contra cualquier patógeno (Roberts, 1989), también se ha encontrado en huevos y esperma.

La concentración de CRP ejerce su efecto protector al aumentar la respuesta inflamatoria frente a toxinas o lipopolisacáridos que son liberados por los agentes infecciosos y a su vez minimiza la acción de mediadores inflamatorios como el TNF, la IL-1, y el factor activador de plaquetas (Platelet Activating Factor, PAF) (Du Clos y Mold, 2001; Gould y Weiser, 2002). Interviene también en la opsonización de patógenos favoreciendo la fagocitosis, en la presentación antigénica y en la activación de la vía clásica del complemento (Mold *et al.*, 1982; Du Clos, 2000).

Entre los teleósteos se ha detectado en el pez gato (Szalai *et al.*, 1994) y en la trucha arco iris, en la que se ha demostrado que favorece la acción del complemento y la fagocitosis, y dificulta el crecimiento bacteriano (Nakanishi *et al.*, 1991). En presencia de iones calcio se une a los polisacáridos de paredes bacterianas, fúngicas y parasitarias, causando aglutinación o precipitación (Alexander, 1985).

Péptidos Antimicrobianos (AMPs). Los AMPs son pequeños polipéptidos que han sido identificados como un componente de la respuesta inmunitaria innata tanto en el reino planta y como en el reino animal (Zasloff, 2002). Son expresados por diversos tipos celulares como monocitos / macrófagos, neutrófilos, células epiteliales y células cebadas.

En teleósteos, además de en órganos linfoides, han sido encontrados en mucus (Cole *et al.*, 1997), hígado (Shike *et al.*, 2002) y branquias (Chang *et al.*, 2005). La mayoría de estos péptidos son de pequeño tamaño (10-46 aminoácidos), de naturaleza catiónica (carga básica a pH fisiológico por poseer un elevado número de residuos de lisina y arginina) y anfipáticos. Se introducen en las membranas biológicas y lisan un amplio espectro de agentes patógenos, como bacterias, virus, hongos y protozoos (Ganz, 2003; Yang *et al.*, 2004). Por otra parte, pueden desempeñar un papel en la inflamación y la modulación de la respuesta inmunitaria (Mookherjee y Hancock, 2007).

En peces se han identificado varios AMPs como: pleurocidinas, piscidinas, defensinas, hepcidina y parasina (Shi y Camus, 2006; Huang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Falcó *et al.*, 2007).

Transferrina. Se han descrito diversas proteínas en peces como transferrina, ceruloplasmina y metalotionina (Alexander e Ingram, 1992; Yano, 1996; Dalmo *et al.*, 1997) con capacidad de quelar iones metálicos, especialmente hierro y otros necesarios para el crecimiento de bacterias, pudiendo tener una función importante como mediadores de la defensa inespecífica.

La transferrina es una glucoproteína transportadora de hierro que aumenta la resistencia a enfermedades y ha sido la más estudiada en cuanto a su poder defensivo. Es un competidor para los microorganismos y limita la cantidad de hierro endógeno necesario para los mismos, y durante la respuesta de la fase aguda se sintetiza en gran cantidad, actuando como un bacteriostático (Alexander y Ingran, 1992; Bayne y Gerwick, 2001) y como activador de los macrófagos de teleósteos (Stafford y Belosevic, 2003).

Antiproteasas. En suero y mucus existen algunas antiproteasas, proteínas que inactivan o destruyen toxinas y se caracterizan por su capacidad para inhibir las proteasas con las que ciertos agentes infecciosos penetran en el organismo, como *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (Ellis, 1987; Zuo y Woo, 1997). En los peces se ha demostrado la existencia de una proteína análoga a la antiproteasa α_1 -antitripsina (Hjelmeland, 1983) y una homóloga a la α_2 -macroglobulina (Starkey *et al.*, 1982).

Una de las mejor estudiadas, es un análogo de la $\alpha 2$ -macroglobulina de los mamíferos, la cual neutraliza la actividad proteolítica de una exotoxina de *Aeromonas salmonicida* en el suero normal de la trucha arco iris y puede estabilizar los lisosomas de macrófagos (Ellis, 1981b). Aunque se ha considerado que la $\alpha 2$ -macroglobulina no es una proteína de fase aguda de trucha (Bayne y Gerwick, 2001), si le adjudican un papel en la defensa inmunitaria frente a bacterias (Freedman, 1991; Bayne *et al.*, 2001).

5.3. Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria es común a todos los vertebrados, incluyendo los peces (Finn y Nielsen, 1971). Ante una lesión o infección se produce el proceso de inflamación, que conlleva un aumento de la vascularización y migración de granulocitos y macrófagos a la zona, donde las células incrementan su actividad enzimática o fagocítica para eliminar los agentes patógenos. La inflamación puede ser aguda o crónica interviniendo en este último caso también los linfocitos. Los leucocitos secretan una serie de factores, aminas vasoactivas como la 5-hidroxitriptamina y citoquinas, que median en el proceso de la inflamación. Tras la eliminación del patógeno se produce la reparación tisular de la zona dañada (Fig. 5).

La inflamación es una respuesta inespecífica que puede ser iniciada por distintos factores incluyendo parásitos, bacterias o virus, otros agentes como la radiación y toxinas químicas o un daño tisular. Se caracteriza por (Afonso *et al.*, 1998b):

- Vasodilatación con un aumento en el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular.
- Migración de leucocitos a los tejidos

Las infecciones microbianas provocan una respuesta inflamatoria aguda, que incluye leucopenia, neutrofilia, aumento del número de macrófagos, liberación de leucocitos inmaduros, vasodilatación en órganos, y movilización de células granulares eosinófilas (EGCs) (Álvarez *et al.*, 1988; Lamas *et al.*, 1994). Esta respuesta ha sido bien caracterizada frente a infecciones bacterianas, en las que la respuesta inflamatoria se desencadena a través de los receptores del sistema inmunitario innato, como los receptores TLRs (toll-like receptors) o los receptores NOD (nucleotide-binding oligomerization-domain protein) (NLRs) (Barton, 2008). Este reconocimiento inicial de la infección es mediado por los macrófagos residentes en los tejidos y las células cebadas, lo que lleva a la producción de una variedad de mediadores de la inflamación, como quimioquinas, citoquinas, aminas vasodilatadoras, eicosanoides y toda una cascada de productos proteolíticos.

Los neutrófilos son las primeras células que migran a los tejidos y se pueden observar con frecuencia en las lesiones inflamatorias (Tizard, 1992) por lo que una

neutrofilia puede ser un signo de las primeras fases de inflamación aguda (Lamas y Ellis, 1994).

El número de monocitos en sangre se eleva y los macrófagos migran a la zona inflamada tras los neutrófilos (Afonso *et al.*, 1998b), donde fagocitan los desechos celulares del tejido dañado y restos de eritrocitos y neutrófilos degenerados. En trucha arco iris se ha especulado que los macrófagos adquieren mieloperoxidasa y glucógeno de los neutrófilos fagocitados, probablemente como medio para aumentar su capacidad bactericida (Afonso *et al.*, 1998a).

La liberación de sustancias vasoactivas, como la 5-hidroxitriptamina, parece estar relacionada con la desgranulación de las EGCs y la presencia de trombocitos. Estas sustancias, junto con la liberación de IL-1 por los macrófagos, producen un efecto quimiotáctico para otros leucocitos, que son atraídos desde la sangre o tejidos cercanos hacia el lugar de la infección microbiana o el daño tisular, formándose un conglomerado de moléculas y células que median en el desarrollo del proceso inflamatorio (Ellis, 1986; Lamas *et al.*, 1994; Dalmo *et al.*, 1997).

Los linfocitos están menos asociados con lesiones inflamatorias excepto que esté involucrada una respuesta inmunitaria mediada por células. Si el proceso inflamatorio no es efectivo para neutralizar la causa del daño o si el daño tisular continúa, puede ocurrir un encapsulamiento o enquistamiento en el área, que se acompaña por depósitos de fibras de colágeno, calcio y pigmentación (Ferguson, 1989).

Fig. 5.- Diagrama del proceso de inducción y desarrollo de la respuesta inflamatoria en fase aguda (modificado de Bayne y Gerwick, 2001).

En mamíferos la respuesta inflamatoria da lugar a una cascada de citoquinas a través de TNF- α , seguido de la producción de IL-1 β y luego de IL-6 (Titus *et al.*, 1991); estudios *in vitro* han demostrado en peces la expresión en macrófagos de TNF y IL-1 tras la estimulación con LPS (Zou *et al.*, 2000; Saeij *et al.*, 2003). Posteriormente a estas citoquinas, son liberados potentes quimioatrayentes que inducen la migración de los neutrófilos y macrófagos al lugar de la infección, de ahí que se les llame quimioquinas. Tras la llegada de los neutrófilos y posteriormente de los monocitos/macrófagos, comienza la actividad fagocítica de los mismos.

Por tanto la inflamación constituye una respuesta primaria del organismo como mecanismo de defensa. La respuesta aguda inflamatoria ocurre a través de reacciones celulares mediadas por factores químicos tales como las citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y otros metabolitos reactivos del oxígeno (ROS), que se producen en respuesta al estímulo pro-inflamatorio (Ajuebor *et al.*, 1999). Tres grupos principales de citoquinas son las que intervienen: las llamadas citoquinas pro-inflamatorias, TNF- α , IL-1 β y IL-6, quimioquinas (CXCL8, CCL2 y CCL3) y citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β) (Dinarello, 1997).

Muchos mediadores inflamatorios, como las proteínas de fase aguda (APP, acute phase proteins) (Bayne y Gerwick, 2001; Gerwick *et al.*, 2002), las quimioquinas (Magnadottir, 2006; Sánchez *et al.*, 2007) y factores del complemento, incluyendo diferentes isoformas de C3/4/5, han sido descritos en peces (Secombes *et al.*, 2001; Magnadottir, 2006; Boshra *et al.*, 2006). En los últimos años también se han aislado y estudiado más detenidamente las citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y IL-1 β (Lindestrøm *et al.*, 2004; Sigh *et al.*, 2004; Bridle *et al.*, 2006).

5.4. Componente Celular

En la respuesta celular inespecífica intervienen células fagocíticas, principalmente del sistema monocito-macrófago, granulocitos heterófilos (neutrófilos) y melanomacrófagos (Wolke, 1992; Secombes, 1996), células con actividad pro-inflamatoria, como trombocitos, granulocitos acidófilos y basófilos (Ainsworth, 1992) EGCs y células productoras de péptidos antimicrobianos (Sveinbjornsson *et al.*, 1996) y células con actividad citotóxica natural (NCCs) (Evans *et al.*, 2001) semejantes a las células NK (Natural Killer) de mamíferos.

A continuación se describen las características de los tres tipos de leucocitos y de las EGCs, cuya participación en las respuestas inflamatorias mejor se han caracterizado.

5.4.1. Granulocitos

La clasificación y nomenclatura de estas células, caracterizadas por la presencia de gránulos en su citoplasma, ha sido muy controvertida por la gran variación existente entre las distintas especies piscícolas y por los continuos intentos de asemejarlos a los

granulocitos de mamíferos, que se dividen en neutrófilos, eosinófilos (acidófilos) y basófilos, según la tinción de sus gránulos (Hine, 1992).

En algunos teleósteos han sido descritos granulocitos acidófilos y basófilos en sangre periférica además de neutrófilos aunque son poco abundantes y han sido poco estudiados, en otras especies sin embargo, solo se han encontrado neutrófilos (Ellis, 1977; Ainsworth, 1992).

Los neutrófilos son los granulocitos defensivos por excelencia en peces (Ainsworth, 1992) y al igual que los macrófagos, los neutrófilos son móviles y fagocíticamente activos, su citoplasma contiene gránulos donde se almacenan moléculas con actividad antimicrobiana como potentes enzimas degradativas tales como proteasas, nucleasas, fosfatasas, esterasas y lipasas entre otras (Lamas y Ellis, 1994; Neumann *et al.*, 2001); por lo tanto su función primaria sería la lisis extracelular por secreción de estas enzimas y otras sustancias antimicrobianas. Además tienen patrones de quimiotaxis y adherencia similares a los de los macrófagos y también poseen capacidad para generar radicales oxidativos produciendo graves daños tisulares por liberación de estos radicales libres del oxígeno (Tizard, 1992).

5.4.2. Monocitos / Macrófagos

Los monocitos son células presentes en la circulación sanguínea que se diferencian a macrófagos cuando se establecen en los tejidos. En sangre de peces su porcentaje es muy bajo con respecto al total de leucocitos, son móviles, fagocíticos y normalmente de mayor tamaño que los leucocitos.

Los macrófagos constituyen la principal célula fagocítica en los peces; poseen la capacidad de fagocitar material extraño, inerte o antigénico, así como restos celulares resultantes de la respuesta inflamatoria u otros procesos degenerativos (MacArthur y Fletcher, 1985; Blazer, 1991; Enane *et al.*, 1993). También tienen funciones basadas en la producción y secreción de moléculas reguladoras incluyendo enzimas, péptidos antimicrobianos y factores quimiotácticos, secreción de citoquinas e interleuquinas así como especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Secombes y Flecher, 1992; Jang *et al.*, 1995; Ganassim y Bols, 1998; Neumann *et al.*, 2000). Durante la fagocitosis, los macrófagos estimulados producen y liberan diferentes radicales libres oxidativos de oxígeno y de nitrógeno (Reactive Nitrogen Species, RNS) con gran capacidad microbicida durante el denominado proceso de explosión respiratoria (Secombes *et al.*, 1988; Secombes y Flecher, 1992; Secombes, 1994; Neumann *et al.*, 1995).

Por otra parte, los macrófagos participan en la respuesta específica como importantes células accesorias en la iniciación y en la regulación de la inmunidad, ya que reconocen y procesan el antígeno y secretan factores solubles que desencadenan la activación de los linfocitos (Vallejo *et al.*, 1992a; Ellsaesser y Clem, 1994). Los antígenos fagocitados, así como el material inerte, son transportados a los centros

melanomacrofágicos, donde se producen las interacciones con las células responsables de la respuesta específica (Vallejo *et al.*, 1992b; Press *et al.*, 1995).

La actividad de los macrófagos puede ser modulada por factores endógenos o exógenos induciendo una activación o inhibición de algunas de sus funciones (Secombes y Flecher, 1992; Secombes, 1994; Sørensen *et al.*, 1997), sustancias exógenas como lipopolisacáridos, glucanos, citoquinas, Levamisol, algunas vitaminas, hormonas y otros inmunopotenciadores (Robertsen *et al.*, 1990; Kajita *et al.*, 1992; Secombes, 1994) pueden afectar a la producción de metabolitos tóxicos, a la fagocitosis y a la producción y secreción de enzimas lisosomales.

Los melanomacrófagos aparecen en todos los grupos de peces; en teleósteos se encuentran fundamentalmente en los órganos linfoides, riñón y bazo, normalmente asociados a los vasos sanguíneos pudiendo estar encapsulados, total o parcialmente (Herráez y Zapata, 1986; Meseguer *et al.*, 1994). Se trata de macrófagos que contiene diversas inclusiones en su citoplasma como lipofucsina, hemosiderina y sobre todo melanina (Agius, 1985) y también gránulos con actividad fosfatasa ácida y alcalina (Herráez y Zapata, 1991; Meseguer *et al.*, 1994). Tienen una función defensiva como centros de limpieza de materiales endógenos y exógenos para su destrucción, detoxificación y reciclaje (Vogelbein *et al.*, 1987) y participan en el catabolismo y procesamiento de antígenos (Agius, 1985) y en el metabolismo del hierro (Herráez y Zapata, 1991; Meseguer *et al.*, 1994). La melanina que acumulan parece tener un papel importante en la absorción de radicales libres y cationes producidos durante los procesos de oxidación-reducción y cierta capacidad bactericida asociada a la peroxidasa.

Pueden agruparse formando los denominados centros melanomacrofágicos, (CMMs) que aparecen en los órganos linfoides de teleósteos a excepción de algunos grupos como los salmónidos (Agius, 1985; Zapata y Cooper, 1990).

5.4.3. Células granulares eosinófilas (EGCs)

Las EGCs se han descrito en intestino, branquias, piel, meninges, alrededor de los principales vasos sanguíneos de salmónidos y en exudado peritoneal (Powel *et al.*, 1990; Lamas *et al.*, 1991). Por sus características funcionales, histoquímicas y de tinción han sido comparadas con células cebadas de mamíferos (Flaño *et al.*, 1997; Reite, 1998). Las EGCs tienen capacidad migratoria, están presentes en reacciones de hipersensibilidad y responden a estímulos nocivos (Lamas *et al.*, 1991; Flaño *et al.*, 1996; Reite, 1997). Estas células contienen numerosos gránulos eosinófilos y su función parece estar relacionada con la defensa frente a daños tisulares, aunque se ha postulado que pueden estar implicadas en los mecanismos de defensa dado que se ha observado una desgranulación de las mismas tras inocular ciertos agentes como *Aeromonas salmonicida* (Ellis, 1985). Su número aumenta tras una infección parasitaria (Sharp *et al.*, 1989) y se localizan frecuentemente alrededor de vasos sanguíneos asociados a la pared del intestino

(Blackstock y Pickering, 1980). Más recientemente se ha demostrado que estas células poseen péptidos antimicrobianos en sus gránulos (Silphaduang y Noga, 2001).

5.4.4. Células citotóxicas naturales (NCC)

En los peces teleósteos se ha encontrado este tipo de células en el pronefros, el bazo, la sangre periférica y el timo. Se cree que estas células son análogas a las células NK de mamíferos (Evans *et al.*, 1984) y que ejercen su misma función de citotoxicidad inespecífica frente a diferentes células diana sin discriminación antigénica.

Son un importante mecanismo de la respuesta inmunitaria inespecífica frente a infecciones por virus, bacterias y parásitos (Nakanishi *et al.*, 1999; Greenlee *et al.*, 1991; Jaso-Friedmann *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2001). Pueden lisar un amplio espectro de células tumorales, células infectadas por virus o por parásitos protozoarios (Evans y Jaso-Friedmann, 1992). Para la citólisis se requiere el contacto célula a célula (Secombes, 1996) y se han descrito en su membrana moléculas asociadas al reconocimiento de células diana (Jaso-Friedmann *et al.*, 1994; Cuesta *et al.*, 1999).

Participan en la inmunidad liberando citoquinas que interaccionan con los productos bacterianos facilitando y aumentando la respuesta inflamatoria en el lugar de la infección (Graves *et al.*, 1985a y b). Las células citotóxicas colaboran con otros efectores de la respuesta inmunitaria inespecífica (fagocitos, etc.) proporcionando resistencia innata durante la respuesta aguda de estrés (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001).

5.5. Receptores para el reconocimiento de patógenos

La inmunidad innata está basada en la detección de productos o moléculas microbianas conservadas en el tiempo. Los macrófagos poseen receptores de diferente tipo que hacen posible este fenómeno de reconocimiento, destacando:

- Receptores Fc (FcRI y FcRIII de alta afinidad) y así pueden ser dirigidos contra células recubiertas de anticuerpos, participando en las reacciones líticas por ADCC.
- Receptores “scavenger” o depuradores.
- Receptores tipo “toll”.
- Receptores inhibidores (ILT y otros).

El reconocimiento de los patógenos por los macrófagos y otras células de la respuesta inmunitaria innata está mediado por un grupo de receptores que están codificados en la línea germinal y a los que se ha denominado receptores de reconocimiento de patrón (Pattern-recognition receptors, PRRs). Estos receptores reconocen estructuras moleculares conservadas presentes en microorganismos patógenos: bacterias, virus, hongos y protozoos, pero no en los tejidos propios, a los que se denomina *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs (Akira y Takeda, 2004).

Estos patrones moleculares, que son esenciales para la supervivencia y patogenicidad del microorganismo, son también capaces de inducir una fuerte respuesta del sistema inmunitario innato.

Los PRRs son expresados estratégicamente en aquellas células que actúan como primera línea de defensa contra los diferentes patógenos durante la infección. Los diferentes PRRs son expresados en la superficie celular, en compartimentos intracelulares o secretados al torrente circulatorio y a los fluidos tisulares. Este mecanismo de reconocimiento permite a las células fagocíticas poner en marcha un sistema rápido de defensa, sin embargo, carecen de memoria inmunológica y no pueden mejorar su respuesta tras un segundo contacto con el mismo patógeno, pero también este estímulo origina el comienzo de la respuesta inmunitaria adaptativa (Aderem y Ulevitch, 2000; Medzhitov, 2001; Janeway y Medzhitov, 2002).

Entre los receptores de membrana que participan en la respuesta inmunitaria innata, implicados en el reconocimiento de patógenos, se pueden distinguir los receptores endocíticos que participan en el proceso de fagocitosis y los receptores activadores que inducen otras respuestas inmunitarias como la secreción de citoquinas y quimioquinas.

La activación de los receptores endocíticos pone en marcha las diferentes fases del proceso de fagocitosis con la consiguiente ingestión y destrucción de las partículas o microorganismos fagocitados. Entre los principales receptores implicados en el proceso de endocitosis destacan los receptores depuradores (scavenger receptors) presentes principalmente en macrófagos y que participan en la eliminación de microorganismos y de lipoproteínas modificadas (oxidadas o acetiladas), los receptores de manosa y los receptores de glucano presentes también en células dendríticas.

Entre los receptores activadores destacan los receptores Tipo Toll (Toll-like Receptors, TLR) y los receptores de LPS, (CD14 y LBP lipopolysaccharide binding protein). La proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) da lugar a complejos LPS-LBP que se unen a los receptores de LPS CD14-Toll like receptor-4 o también llamado TLR4 y a los complejos MD-2 en los fagocitos. Estos complejos son más eficientes en la activación de la fagocitosis que el LPS solo (Jia *et al.*, 2004). Estos factores son necesarios para la activación de los TLRs a bajas concentraciones de LPS (Mathison *et al.*, 1992).

Los TLRs son los receptores PRRs más importantes en el reconocimiento de componentes microbianos y en la inducción de la respuesta inmunológica (Lemaitre *et al.*, 1996; Medzhitov *et al.*, 1997; Akira *et al.*, 2001,2006), y en peces se han descrito hasta diez genes diferentes para ellos.

Los receptores Toll se describieron por primera vez en *Drosophila*, mosca del vinagre, (Anderson y Nusslein-Volhard, 1984) y participan en la respuesta inmunitaria

frente a hongos induciendo la síntesis de péptidos antimicrobianos (Lemaitre *et al.*, 1996). Posteriormente se describieron sus homólogos en mamíferos, denominándose receptores tipo Toll (Toll-like Receptors, TLR). Recientemente ha habido varios estudios que han identificado muchos TLRs de peces ortólogos a los de mamíferos (Jault *et al.*, 2004; Meijer *et al.*, 2004). Los TLRs poseen especificidad para el reconocimiento PAMPs y se ha demostrado que juegan un papel importante en la iniciación de la respuesta inmunitaria.

Los TLRs son glicoproteínas de transmembrana tipo I bien conservadas y caracterizadas por un dominio extracelular que contiene numerosas repeticiones ricas en leucina (LRR) y un dominio de señalización citoplasmática homólogo al de los receptores de interleuquina 1(IL-1R) llamado “Toll/IL-1R” (TIR) (Bowie y O’Neill, 2000; Xu *et al.*, 2000). Este dominio TIR se asocia a proteínas adaptadoras como es la proteína MyD88 (myeloid differentiation factor 88) que fue la primera descrita y está implicada en la señalización en todos los TLRs humanos (O’Neill *et al.*, 2003).

Los TLRs están implicados en el reconocimiento de una gran variedad de PAMPs, la activación del TLR, tras reconocer a su ligando específico, induce una cascada de señales intracelulares; el reconocimiento de los PAMPs por los TLRs que se expresan en macrófagos o en células APC (células presentadoras de antígenos) como las células dendríticas provoca la activación de las células NK e inicia la respuesta adaptativa (Dabbagh y Lewis, 2003; Kaisho y Akira, 2003). Los TLRs activados inducen la expresión de citoquinas tales como IL-12 y TNF- α , quimioquinas, así mismo inducen la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) (Akira y Takaeda, 2004; Akira *et al.*, 2006) y también actúan activando otros eventos asociados con la maduración de las células dendríticas. Las células dendríticas maduras poseen mayor capacidad de actuar como APC y estimulan a los linfocitos-T e inician la respuesta inmunitaria adaptativa. Por tanto, la activación de los TLRs sirve de enlace entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

El tipo de expresión de citoquinas tras la estimulación depende del tipo de agonista, de las células estimuladas y del repertorio de TLRs expresados por esas células (Iwasaki y Medzhitov, 2004). Los principales genes inducidos por los diferentes agonistas de TLR son genes implicados en la inflamación y los genes sensibles a interferón (Fig. 6). En peces se han identificado varias moléculas señalizadoras TLR o genes con dominios TIR (Zhang *et al.*, 2003; Jault *et al.*, 2004; Meijer *et al.*, 2004).

Los TLR se pueden asociar a otras moléculas o co-receptores para el reconocimiento de microorganismos. Así, TLR4, tanto en macrófagos como en linfocitos B, reconoce LPS y requiere la asociación con CD14 y otras proteínas como MD2 en macrófagos o MD1 y RP105 en linfocitos B. Los TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lipoproteínas y peptidoglucanos de bacterias Gram-positivas, el TLR5 reconoce la flagelina de bacterias con flagelo, el TLR3 el RNA de doble cadena generado durante la infección vírica, los

TLR7 y TLR8 ácidos nucleicos y el TLR9 CpG no metilados del genoma de bacterias y virus (Barton y Medzhitov, 2002; Akira *et al.*, 2006).

Fig. 6.- Esquema representativo de las diferentes vías de señalización de los diferentes TLRs Imagen tomada de “Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish” (Purcell *et al.*, 2006).

Más recientemente se han identificado otros receptores PRRs citosólicos, tales como Nod1, Nod2, IPAF y las helicases RIG-I y MDA-5. Los tres primeros están involucrados en la detección de bacterias intracelulares. Se caracterizan por una estructura tripartita, con un dominio C-terminal LRR, un dominio central de unión y oligomerización (NOD o Nacht) y un dominio N-terminal caspasa de reclutamiento (CARD). Las helicasa RIG-I y MDA-5 son sensores intracelulares para virus de RNA de doble cadena y también poseen un dominio CARD (Bourhis y Werts, 2007).

5.6. Mecanismos de respuesta innata

5.6.1. Opsonización y función fagocítica

El proceso de opsonización consiste en el recubrimiento de las partículas a fagocitar por factores séricos: sistema del complemento, anticuerpos específicos y opsinas inespecíficas. Tras la opsonización los fagocitos son atraídos hacia el patógeno con mayor eficacia para su ingestión y destrucción.

La opsonización en peces ha sido descrita en diferentes especies, en carpa (Matsuyama *et al.*, 1992), en pez gato (*I. punctatus*) (Jenkins y Outh, 1993) o en salmónidos (Sakai, 1984; Lammens *et al.*, 2000). Algunos investigadores piensan que los

macrófagos de peces pueden tener receptores específicos para las opsoninas como los mamíferos (Sakai, 1984; Michel *et al.*, 1990; Blazer, 1991).

En la opsonización el sistema del complemento puede ser activado a través de dos vías, la clásica o dependiente de anticuerpo y la alternativa o independiente de anticuerpo. Se ha descrito que el sistema del complemento no requiere anticuerpos para neutralizar virus como el IPNV (Ellis, 2001) y que ante infecciones bacterianas el LPS de la pared bacteriana induce la activación del complemento generando C5a que es un fuerte quimioatrayente de macrófagos y neutrófilos que además presentan receptores para C3b que permanecen unidos a la bacteria aumentando la capacidad fagocítica (Sakai, 1984; Ellis, 1999, 2001).

La opsonización de microorganismos por el sistema del complemento puede desencadenar la activación de los mecanismos de defensa monocito/macrófago incrementando la fagocitosis y la neutralización de patógenos (Whyte, 2007).

La fagocitosis es el proceso por el cual las células fagocíticas, principalmente macrófagos y neutrófilos, eliminan de forma inespecífica el material extraño que invade el organismo. Las células fagocíticas principales en peces son los monocitos/macrófagos y los neutrófilos (Secombes y Fletcher, 1992). Los macrófagos y los neutrófilos juegan un papel importante en la protección y supervivencia de los individuos ante condiciones adversas. Esto viene dado porque este proceso está menos influenciado por la temperatura que provoca una producción de anticuerpos mucho más lenta (Blazer, 1991). Así pues la defensa primaria dependerá casi exclusivamente de la capacidad fagocítica.

El proceso fagocítico puede dividirse en tres fases: el reconocimiento de la partícula por el fagocito y la adherencia a la membrana del mismo, la ingestión y formación del fagosoma y unión a un lisosoma y por último liberación de las enzimas en el recién formado fagolisosoma, o desgranulación en el caso de los neutrófilos, y digestión del material fagocitado, lo que concluye con la destrucción de la partícula (MacArthur y Fletcher, 1985; Blazer, 1991).

La fagocitosis comienza con la unión de la bacteria u otras partículas extrañas a la célula fagocítica mediante interacciones hidrofóbicas o interacciones azúcar/lectina (Secombes, 1996). No obstante el promotor más activo de la fagocitosis es el componente C3 del complemento, que se une a la superficie de la bacteria directamente por la vía alternativa o indirectamente vía lectina o CRP (Ellis, 2001) (Fig. 4).

Aunque no siempre la fagocitosis concluye con la destrucción del antígeno por la capacidad de resistencia del propio microorganismo o por una inhibición de los procesos microbicidas intracelulares debida a factores externos (nutrición, temperatura, etc.) el objetivo final de las células fagocíticas es la destrucción del organismo invasor mediante la activación y desarrollo de la actividad microbicida intracelular (Blazer, 1991).

5.6.2. Activación de macrófagos

La activación es necesaria para que el macrófago ejerza sus funciones. Enane *et al.*, (1993) demostraron que la activación en trucha arco iris ocurre de forma análoga a como ocurre en los fagocitos de mamíferos.

La activación puede producirse por la presencia de un antígeno (Skarmeta *et al.*, 1995) o material extraño (Enane *et al.*, 1993). Sin embargo, existen otros factores que incrementan la actividad fagocítica y bactericida, como el factor de activación de macrófagos (MAF) liberado por linfocitos (Graham y Secombes, 1990a; Hardie *et al.*, 1996), opsonización de la partícula a fagocitar, acción del complemento (Yoshida y Kitao, 1991; Blazer, 1991), y presencia de la hormona adrenocorticotropa, ACTH (Bayne y Levy, 1991).

La activación de los macrófagos se clasifica en dos tipos: la activación clásica y la alternativa (Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004). La activación clásica o tipo I de los macrófagos incluye el proceso denominado explosión respiratoria, durante el cual se producen ROS, así como óxido nítrico, este último mediado por la activación de la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) que convierte la L-arginina en NO y L-citrulina (Fig. 7). En peces este proceso ha sido ampliamente estudiado (Chung y Secombes, 1987; Sharp y Secombes, 1993; Neumann *et al.*, 1995; Hardie *et al.*, 1996; Saeji *et al.*, 2000).

En los últimos años está experimentando un mayor interés la vía alternativa de activación de macrófagos (tipo II), que ha sido más recientemente demostrada en peces (Joerink *et al.*, 2006b). La activación alternativa comprende la activación de la enzima arginasa, que convierte la L-arginina en urea (Fig. 8).

La activación clásica en macrófagos produce la secreción de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β y IL-6, por el contrario la activación alternativa incluye la liberación de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β y de otros factores implicados en la remodelación tisular y reparación de daños (Mantovani *et al.*, 2002, 2004). Además se ha descrito un estado adicional de activación de macrófagos, la activación innata. La activación clásica es inducida por interferón IFN- γ y por compuestos microbianos; mientras que la activación innata es únicamente activada por compuestos microbianos como el LPS (Gordon, 2003). Por tanto la activación clásica y la innata en macrófagos son inducidas por diferentes estímulos pero sus funciones se solapan. La activación innata en macrófagos produce citoquinas pro-inflamatorias, compuestos reactivos de oxígeno, y óxido nítrico (Gordon, 2005).

5.6.3. Explosión respiratoria.

En peces, al igual que en mamíferos, la destrucción de microorganismos puede realizarse mediante procesos dependientes o independientes de oxígeno (Secombes,

1996). La actividad microbicida se produce principalmente por el proceso de *explosión respiratoria*, que se desencadena cuando los fagocitos se exponen a ciertos estímulos, como patógenos, o durante la fagocitosis, incrementando el consumo de oxígeno (Chanock *et al.*, 1994). Los fagocitos pueden ejercer esta actividad intra- o extracelularmente sin que por ello varíe el proceso.

La explosión o estallido respiratorio se caracteriza por la generación de ROS con gran capacidad microbicida, mediada por la reducción del oxígeno a anión superóxido (O_2^-) y catalizada por la enzima NADPH-oxidasas presente en la membrana celular (Babior, 1978; Chanock *et al.*, 1994), como se muestra en la reacción indicada más abajo. Mediante estudios metabólicos se ha demostrado que este proceso es independiente de la respiración mitocondrial (Cross, 1990).

La mayoría del O_2^- se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bien espontáneamente o por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Secombes *et al.*, 1992). Los ROS, como el singlete de oxígeno [$O_2 (^1\Delta g)$], radicales hidroxilo ($OH^\cdot$) y compuestos halogenados ($OCI^\cdot$), junto con otros RNS que se sintetizan de forma secundaria (peroxinitrito $ONOO^-$), son los compuestos microbicidas más importantes de los fagocitos (Chung y Secombes, 1988).

El óxido nítrico es otro tipo de compuesto microbicida; es un radical inestable de vida corta, a partir del cual se generan diversos radicales RNS. La producción de estos radicales de nitrógeno es un conocido mecanismo de defensa antimicrobiana en macrófagos de mamíferos; en peces se ha demostrado su producción en macrófagos estimulados con LPS en carpín (*Carassius auratus*) y en pez gato (*Clarias gariepinus*) (Neumann *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 1997). Las funciones de la moléculas de NO incluyen señalización intercelular, vasodilatación y defensa microbiana (Nathan, 1992).

La producción de NO está catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) a través de la oxidación de la L-arginina, con participación de NADPH y otros cofactores (Hibbs *et al.*, 1987), como se muestra en la reacción indicada a continuación:

La reacción del NO con oxígeno da lugar a radicales libres oxidantes, que incluyen iones $NO^\cdot$, dióxido de nitrógeno (NO_2), nitrosotioles y peroxinitritos ($ONOO^-$) (Hibbs, 1992) (Fig. 7). El NO_2 es también un radical libre, con mayor poder oxidante que el NO, además de ser un agente nitrante. El dióxido de nitrógeno a su vez puede reaccionar con otra molécula de NO para dar trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y este hidrolizarse al producto final estable nitrito (NO_2^-). Alternativamente, el NO_2 puede reaccionar con otra molécula de NO_2 para dar tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4), que a su vez se hidroliza a nitrito y nitrato (NO_3^-) (Fig. 7). Esta oxidación del NO a otros óxidos de nitrógeno lleva a

producir radicales estables como el nitrito y el nitrato, que pueden ser medidos en diferentes tejidos y fluidos biológicos.

Fig. 7.- Metabolismo del óxido nítrico. El NO puede combinarse con aniones superóxido O_2^- para formar iones de peroxinitrito altamente reactivos ($ONOO^-$); o puede también ser metabolizado a nitrito (NO_2^-) o a nitrato (NO_3^-). NOS NO sintasa; MPO mieloperoxidasa; SOD superóxido dismutasa. (Adaptación de Montuschi, 2002).

La familia de enzimas NOS está ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos (Moncada *et al.*, 1991). Existen diferentes isoformas de NOS, pero todas comparten las características siguientes:

1. Presentarse en forma de dímero, con PM de 130 y 150 kDa por monómero.
2. Poseer en su sitio activo flavina y hemo.
3. Poseer en su sitio activo un sitio de unión para el complejo calcio-calmodulina.
4. Muchas de las NOS requieren la presencia de tetrahydrobiopterina como co-factor para su acción.

En mamíferos han sido identificadas y clonadas tres isoformas de NOS (Stuehr, 1992):

1. La variedad neuronal (nNOS o tipo I).
2. La variedad macrofágica o citoquina-inducible (iNOS o tipo II).
3. La variedad endotelial (eNOS o tipo III).

Las eNOS y nNOS son variedades constitutivas de la NOS y su actividad es calcio-calmodulina dependiente.

5.6.4. Enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)

La producción de óxido nítrico por la iNOS es un importante factor de la respuesta inmunitaria. La expresión de la enzima iNOS está regulada por citoquinas como IFN y TNF o por LPS; así en peces se ha demostrado que para que haya una liberación óptima de óxido nítrico por los macrófagos se requiere de factores de activación de los macrófagos y/o LPS (Neumann y Blosevici, 1996).

La enzima iNOS ha sido totalmente secuenciada en trucha (Wang *et al.*, 2001) y en carpa (Saeij *et al.*, 2000). En trucha, la secuencia de cDNA está compuesta por 27 exones y 26 intrones como en mamíferos (Xu *et al.*, 1996). La óxido nítrico sintasa presenta dos dominios, un dominio N-terminal oxigenasa y un dominio C-terminal reductasa, estos dos dominios están conectados por un dominio de unión a calmodulina (Alderton *et al.*, 2001) pudiendo su actividad estar influida por iones calcio (Ca^{2+}). Sin embargo la función de la iNOS es independiente de los niveles fisiológicos de calcio y calmodulina quizás debido a la estrecha unión no covalente de la calmodulina con la iNOS (Cho *et al.*, 1992).

Diversos estudios muestran la expresión de iNOS en diferentes tejidos de trucha arco iris como branquias, riñón anterior o hígado, tras una infección (Campos Pérez *et al.*, 2000; Bridle *et al.*, 2006).

La iNOS es inducida por citoquinas (IFN- γ y TNF), LPS y parásitos a nivel transcripcional (Nathan, 1992) y en células no estimuladas su expresión es muy baja o falta. La presencia de iNOS en teleósteos fue confirmada por Hardie *et al.*, (1994b). En trucha arco iris se ha detectado expresión de iNOS tras ser infectadas con bacterias (Laing *et al.*; 1999).

La producción de NO en macrófagos está regulada por un gran número de sustancias, tanto transcripcionalmente como post-transcripcionalmente (Nathan y Xie, 1994), y juega un papel importante en la defensa celular contra los parásitos y las infecciones virales y bacterianas (Bogdan, 1997). Además, el NO es un mensajero omnipresente en los sistemas biológicos, que participa en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos. Este papel también es ejercido por el NO cuando es liberado por los macrófagos en respuesta a estímulos nocivos (endotoxina, citoquinas proinflamatorias, etc.).

Una parte considerable de NO es liberado por los macrófagos varias horas después de un estímulo inicial. La magnitud de esta respuesta está determinada por la inducción de la transcripción del gen de la enzima iNOS. El NO participa como un factor beneficioso para destruir patógenos y causa vasodilatación y disminución de la trombosis (Nathan y Hibbs, 1991; Nussler y Billiar, 1993; Moncada y Higgs, 2006). Si bien estas acciones son útiles para la defensa contra infecciones locales, el NO es también un factor importante mediador de daño tisular en condiciones tales como sepsis, tumores

abdominales y enfermedades autoinmunes (McCartney-Francis *et al.*, 1993; Vodovotz *et al.*, 1996). En presencia de estas circunstancias patológicas pro-inflamatorias, la producción de NO por los macrófagos podría atenuar la producción de una gran variedad de mediadores de la inflamación asociados a las vías de NO (Aldridge *et al.*, 2008).

5.6.5. Vía de la arginasa.

La activación alternativa de macrófagos se produce a través de la vía de activación de la arginasa, que convierte la L-arginina en urea, según la reacción:

Esta activación alternativa de los macrófagos tiene un papel importante en la respuesta inmunitaria de tipo II o adaptativa, contra patógenos extracelulares incrementando la capacidad fagocítica y la expresión de MHCII (Mantovani *et al.*, 2002; Gordon, 2003; Joerink *et al.*, 2006a), mientras que la activación clásica de macrófagos resulta más importante en la respuesta inmunitaria Tipo I o innata, contra los patógenos intracelulares mediante producción de ROS y RNS (Neumann *et al.*, 1995; Laing *et al.*, 1999; Saij *et al.*, 2000).

Fig. 8.- Diagrama del metabolismo de la L-arginina. Las líneas continuas indican activación, mientras que las líneas discontinuas marcan inhibición. La vía de activación Tipo I está marcada en azul y la vía tipo II en rojo. Abreviaturas: Arg1, arginasa 1; NOHA, *N*-hidroxi-L-arginina; NOS2 = iNOS; ODC, ornitina decarboxilasa; TGF-β, factor de crecimiento transformante β. (Imagen tomada de Bronte *et al.*, 2003).

Al igual que en mamíferos, en peces existen dos isoformas (1 y 2) de la arginasa (Joerink *et al.*, 2006b). La arginasa 1 de mamíferos se localiza en el citosol y se expresa abundantemente en hígado como componente del ciclo de la urea. Por el contrario, la

arginasa-2 se ha encontrado en mitocondrias y se expresa escasamente en la mayoría de los órganos y es casi inapreciable o inexistente en hígado. En macrófagos de roedores se han encontrado las dos isoformas, la arginasa 1 es inducida por citoquinas tales como IL-4, IL-13, TGF- β e IL-10 (Fig. 8), mientras que la arginasa 2 se induce en presencia de bacterias, por LPS y cAMP (Morris *et al.*, 1998; Bogdan, 2001). En carpa se ha descrito la activación alternativa de macrófagos (Joerink *et al.*, 2006b), y se ha encontrado que sólo la isoforma 2 de la arginasa está diferencialmente regulada, aunque en los distintos tejidos se cree que la respuesta está influenciada por los isotipos de la arginasa.

La arginasa presenta una serie de funciones importantes relacionadas con la defensa inmunitaria. Por ejemplo, la actividad de la arginasa puede retirar del medio extracelular L-arginina necesaria para la proliferación y supervivencia de patógenos y de las células huésped y también reducir la L-arginina intracelular de modo que elimina sustrato para la enzima iNOS (Vincendeau *et al.*, 2003). La regulación de la síntesis de NO y la expresión de iNOS mediante la eliminación de L-arginina por la actividad de la arginasa, ha sido demostrada en macrófagos de ratón (Bogdan, 2001; El-Gayar *et al.*, 2003) y esta acción podría tener un papel importante en el control de la respuesta inflamatoria.

En muchas infecciones parasitarias, la primera respuesta está caracterizada por una activación clásica de los macrófagos y la producción de NO antimicrobiano. A menudo una fase más tardía se caracteriza por una activación alternativa de los macrófagos relacionada con la actividad arginasa (Noel *et al.*, 2004).

Por un lado, la inducción de la activación alternativa de macrófagos disminuye la activación clásica inicial de los mismos, caracterizada por una elevada actividad iNOS, y en consecuencia de la producción de NO que acompaña a la inflamación, de modo que minimiza la patología relacionada con la respuesta inmunitaria (Joerink *et al.*, 2006a). Aunque, por otro lado, la inducción de la vía alternativa de activación puede ser beneficiosa para el desarrollo de parásitos (Gobert *et al.*, 2000); la actividad de la arginasa reduce los niveles de L-arginina, sustrato de la iNOS, y a su vez da lugar a L-ornitina que es un precursor de poliaminas implicadas en la síntesis de DNA y tripanotona necesarios para protozoarios tripanosomátidos.

Ambas enzimas, iNOS y arginasa, se pueden co-expresar en macrófagos estimulados con LPS, pero la producción de NO sólo se ve aumentada cuando la expresión de la arginasa está inhibida (Chang *et al.*, 1998). Por tanto la arginasa puede modular la producción de NO mediante la activación clásica de los macrófagos (Nathan, 1995; Yu *et al.*, 2001).

5.6.6. Enzima ciclo-oxigenasa 2 (COX-2)

Las enzimas ciclooxigenasas (COX) median en la conversión del ácido araquidónico, liberado de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A₂, a prostaglandinas H₂ (Harris *et al.*, 2002), según la reacción enzimática:

Existen dos isoformas de esta enzima, una forma constitutiva (COX-1) que se expresa en diversos tipos celulares y una forma inducible (COX-2) expresada en células endoteliales, fibroblastos y macrófagos, tras estimulación por agentes pro-inflamatorios (Salvemini *et al.*, 1993). La enzima inducible es responsable de la producción de prostaglandinas y tromboxanos durante la inflamación, mediadores que afectan a la respuesta inmunitaria (Rowley *et al.*, 1995).

Los macrófagos activados de teleósteos expresan homólogos de la isoforma inducible de la ciclo-oxigenasa (Zou *et al.*, 1999b). En trucha arco iris se ha demostrado la existencia de COX-2 y se ha clonado (Zou *et al.*, 1999b). La expresión de COX-2 en las células de pronefros de trucha es inducible por LPS o por una infección bacteriana, mientras que COX-1 se expresa en las células de forma constitutiva y no se ve afectada por estimulación con LPS.

La enzima COX-2 es el factor limitante en la biosíntesis de prostaglandinas. Las PGH₂ producidas son luego metabolizadas por un número variado de otras enzimas para producir prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Rowley, 1996). La prostaglandina E₂ (PGE₂) es una de las más relevantes en el proceso de la inflamación (Knight y Rowley, 1995; Vane *et al.*, 1998), induciendo vasodilatación e incremento de permeabilidad y una regulación de las funciones de los leucocitos por reducción de la explosión respiratoria, la proliferación de linfocitos y la producción de anticuerpos (Secombes *et al.*, 2001). En la trucha arco iris, PGE₂ reprime la explosión respiratoria de los macrófagos, así como inhibe la proliferación de leucocitos de pronefros (Secombes *et al.*, 1994; Novoa *et al.*, 1996).

6. Sistema inmunitario específico

Al igual que en mamíferos, la respuesta inmunitaria específica requiere de la discriminación de los elementos propios y extraños (antígenos) y se caracteriza por la especificidad hacia el antígeno y el desarrollo de memoria inmunológica. Esta respuesta específica está compuesta por dos elementos principales: la respuesta humoral con producción de anticuerpos mediada por linfocitos B y la respuesta celular, mediada por los linfocitos T. Estas respuestas han sido analizadas en diversas especies de teleósteos, especialmente en pez gato (*I. punctatus*) y en trucha (Miller *et al.*, 1998; Warr, 1998; Watts *et al.*, 2001).

6.1. MHC y respuesta inmunitaria específica

La respuesta inmunitaria de los peces está bajo el control del sistema genético polimórfico formado por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), cuyos genes y organización han sido descritos en especies de peces cultivados, principalmente

ciprínidos, salmónidos y el pez gato *I. punctatus* (Stet y Egberts, 1991; Glamann, 1995; Stet *et al.*, 1998; Nakanishi *et al.*, 1999).

El MHC incluye un conjunto de receptores polimórficos que se encargan de reconocer y presentar péptidos procedentes de agentes infecciosos o de las propias células del organismo a los linfocitos T (Trowsdale, 2001). Estas moléculas, unidas a sus péptidos específicos, se localizan generalmente en la superficie de la mayoría de las células. Al igual que en otros vertebrados, en peces se han descrito dos tipos de MHC: clase I y clase II (Grimholt *et al.*, 1993).

El MHC clase I se expresa en todas las células nucleadas del organismo, está asociado a la respuesta celular y presenta antígenos de origen intracelular a las células Tc CD8 (Bjorkman y Parham, 1990). El MHC de clase II se expresa en células especializadas en la presentación de antígenos, las APCs, y está asociado a una respuesta humoral, presentado antígenos de origen extracelular para ser reconocidos por células T portadoras del correceptor CD4 (Fig. 9).

Múltiples estudios genómicos en peces teleósteos han demostrado la presencia del complejo principal de histocompatibilidad requerido para la presentación de antígenos, tanto vía MHC clase I como clase II (Rodrigues *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 1999).

6.2. Linfocitos

Los linfocitos que portan receptores antigénicos son las células principales de la respuesta inmunitaria específica y los receptores antigénicos que expresan en su membrana permiten el reconocimiento de los antígenos de forma específica. Se trata de células altamente diferenciadas con capacidad de respuesta frente a los estímulos inmunológicos (Ellis, 1977).

Al igual que en mamíferos, en los peces los linfocitos circulan por todo el organismo a través de la sangre y la linfa, y se congregan en los órganos linfoides (Roberts, 1989), aunque también se encuentran en otros tejidos como epidermis y tejidos afectados por procesos inflamatorios (Peleteiro y Richards, 1985; Takashima e Hibiya, 1994). En salmónidos, los linfocitos son los leucocitos mayoritarios en sangre, representado entre un 70 y un 90 % (Ellis, 1977; Takashima e Hibiya, 1994).

En los teleósteos se han descrito poblaciones de linfocitos similares a las células-T y -B de mamífero (Manning y Nakanishi, 1996; Bernstein *et al.*, 1998). Los linfocitos B portan inmunoglobulinas en su superficie y receptores BCR (B cell receptor), mientras que los linfocitos T presentan receptores celulares TCR (T cell receptor) (Miller *et al.*, 1998; Nakanishi *et al.*, 1999). No obstante el análisis de subgrupos de estos linfocitos T y B está comenzándose a analizar en peces (Fischer *et al.*, 2006).

Los linfocitos T se producen principalmente en el timo (Zapata y Cooper, 1990) y se dividen en, células T “helper” (Th) que se caracterizan por presentar el co-receptor CD4 en la superficie de la célula, y en células T citotóxicas (Tc), que expresan CD8.

Los linfocitos B se localizan mayoritariamente en el bazo y en menor cantidad en el pronefros y el GALT (Rombout *et al.* 1993), y más ocasionalmente, en el timo (DeLuca *et al.*, 1983).

Las células Th estimulan la expresión y secreción de citoquinas, facilitan la maduración de células B y la producción de anticuerpos por células B o dan lugar a la activación de los macrófagos; mientras que las células Tc están involucradas en la eliminación de células portadoras del antígeno.

6.3. Respuesta humoral específica

La respuesta humoral se lleva a cabo principalmente a través de un grupo de proteínas denominadas inmunoglobulinas o anticuerpos. Al igual que en otros vertebrados, en los teleósteos la inducción de la respuesta inmunitaria humoral específica contra antígenos de naturaleza peptídica depende de la interacción entre las células presentadoras de antígenos (APCs), generalmente monocitos/macrófagos y células dendríticas, y los linfocitos B, en un proceso de cooperación restringido por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Clem *et al.*, 1985; Vallejo *et al.*, 1992a, b) y con la colaboración de linfocitos Th.

Los anticuerpos producidos frente a los antígenos son proteínas del grupo de las inmunoglobulinas. Los peces poseen un repertorio menor de anticuerpos respecto a los mamíferos y la inmunoglobulina predominante en suero es de la familia de inmunoglobulinas, IgM tetraméricas (Solem y Steenvik, 2006); este tipo de inmunoglobulinas son las más antiguas filogenéticamente, estando presente en todos los vertebrados. Dentro de las IgM se han detectado varios subtipos dependiendo de la heterogeneidad de las cadenas ligera y pesada de las mismas (Palomera *et al.*, 1996). Aunque las IgM resultan predominantes también se ha descrito en peces la presencia de IgD (Kaattari y Piganelli, 1996; Watts *et al.*, 2001).

Las inmunoglobulinas pueden actuar como moléculas solubles efectoras del suero (anticuerpos) y como receptores de superficie de linfocitos B. Los anticuerpos se encargan de neutralizar los antígenos mediante su unión a ellos, de la precipitación y aglutinación de los antígenos, a través de múltiples uniones entre si y con el antígeno, de la opsonización favoreciendo la fagocitosis al marcar la célula invasora para que el fagocito la reconozca, y activando la vía clásica del sistema de complemento (Kaattari y Piganelli, 1996; Wentworth *et al.*, 2000). Como receptores de linfocitos B, las inmunoglobulinas participan en el reconocimiento del antígeno para la producción de anticuerpos específicos (Bernstein *et al.*, 1998).

En general, la respuesta humoral específica en peces es lenta y dependiente de la temperatura ambiente (Bly *et al.*, 1997). Los antígenos son generalmente presentados en la superficie de las células APCs (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B). Las APCs endocitan el antígeno en fagosomas donde comienza su procesamiento en fragmentos más pequeños; posteriormente el fagosoma se fusiona con un lisosoma formando un fago-lisosoma donde los fragmentos antigénicos son procesados a partículas peptídicas que se unirán a moléculas del MHC II para expresarse en la superficie celular de la célula APC, donde pueden ser reconocidas por las células colaboradoras Th CD4+. Tras la unión de la APC a la célula Th mediante receptores específicos, esta célula se activa y proporciona ayuda para el desarrollo de las células B, que consiste en la liberación de factores de crecimiento y diferenciación (citoquinas) y mediante contactos célula-célula que producen señales de maduración.

Por otro lado, algunos antígenos T-independientes, por ejemplo LPS, pueden generar una respuesta humoral mediante la activación de los linfocitos B por unión directa del antígeno a los receptores BCR (Fig. 9).

La generación de memoria inmunológica juega un papel importante en la protección frente a patógenos. Los linfocitos B se diferencian hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos o hacia células de memoria que a su vez pueden convertirse en células plasmáticas tras una segunda exposición. Las células Th también evolucionan hacia células de memoria, que incrementan su número tras la segunda exposición para cooperar con las células B, con lo que en esta segunda exposición el número de anticuerpos es mucho mayor y se produce mucho más rápido (Ellis, 1988a). En general la respuesta secundaria en peces es más débil que en mamíferos, pero los títulos de anticuerpos en esta segunda respuesta alcanzan niveles entre 2 y 8 veces superiores a los de la primera y la cantidad de antígeno necesaria para desencadenarla es mucho menor (Arkoosh y Kaattari, 1991).

6.4. Respuesta celular específica

La inmunidad celular está mediada por los linfocitos T y es independiente de anticuerpos. Es efectiva contra infecciones que escapen al sistema humoral, generalmente producidas por patógenos intracelulares, como virus, o en respuesta a células tumorales, y generalmente implican la destrucción de la célula infectada o alterada. En vertebrados superiores esta función es ejercida por los linfocitos T citotóxicos (Tc). Este tipo de inmunidad específica incluye respuestas de rechazo de alo- y xenoinjertos, muerte de células tumorales o infectadas por virus, fenómenos de hipersensibilidad retardada y formación de granulomas.

Los antígenos que se generan intracelularmente son presentados a los linfocitos Tc unidos a proteínas del MHC I (Fig. 9), presente en la mayoría de las células del

organismo, y las células citotóxicas se encargan de destruir a las células que presentan estos antígenos extraños en su superficie (Bernstein *et al.*, 1998).

Fig. 9.- Esquema de la respuesta celular y humoral del sistema inmunitario, involucrada en el reconocimiento de los antígenos propios y externos. En el esquema se observa cuál es el papel de las moléculas MHC como presentadoras de los antígenos fragmentados. Abreviaturas: APC, células presentadoras de antígeno; MHC-I o MHC-II, complejo principal de histocompatibilidad de clase I o clase II; Linfocitos Tc, linfocitos T citotóxicos; TCR, receptor de células Tc; BCR, receptor de linfocitos B; Th, linfocitos Th (Th0 linfocito precursor, Th1 y Th2 diferentes fenotipos); AC, anticuerpos. Imagen obtenida y modificada de: www.montpellier.com.ar/paginaqm/AvancesEnEndocrinologia/Inmunoendo/SistInmune.html

Fischer *et al.*, (2003) demostraron que la trucha arco iris posee células citotóxicas específicas con similares fenotipo y patrón de expresión génica a las de Tc en mamíferos. En esta misma especie se ha demostrado la actividad de las células Tc *in vitro*, a partir de líneas celulares de células T que portan el receptor celular TCR con actividad antiviral (Estepa *et al.*, 1999). Nuevos estudios están abriendo camino hacia un conocimiento más amplio sobre la respuesta celular específica (Utke *et al.*, 2007).

Otra función de los linfocitos T es la regulación de la respuesta inmunitaria (Fig. 9). En mamíferos, la población CD4⁺ de linfocitos T se subdivide en varios tipos fenotípicos y funcionales distintos, que incluyen actividades “helper” (Th) y reguladoras (Tr) (Zhu y Paul, 2008). A su vez, estos dos tipos incluyen varias subpoblaciones. Respecto a las Th, en mamíferos, se reconoce la existencia de diversos subtipos funcionales, entre los que se encuentran las células Th1, que secretan un perfil de citoquinas (IFN- γ , IL-2 y IL-12) que dirigen la respuesta hacia la inmunidad celular, y las células Th2, cuyas citoquinas (IL-4, IL-5, IL-13), colaboran en la inducción de las respuestas inmuno-humorales (Reinhardt *et al.*, 2006).

Aunque algunas de las citoquinas de los perfiles Th1 y Th2 se han identificado en peces (Li *et al.*, 2007, Randelli *et al.*, 2008), no se ha determinado aún la existencia de estas subpoblaciones en teleósteos.

7. Citoquinas

Las citoquinas son factores solubles, polipéptidos o glicoproteínas, que intervienen en la respuesta inmunitaria (Ellis, 1999; Secombes *et al.*, 1996). Las citoquinas en mamíferos tienen un papel importante como inmunomoduladores en la respuesta inmunitaria y tienen sus homólogos en peces teleósteos (Scapigliati *et al.*, 2004). Destacan la IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN y MAF que intervienen en las respuestas proinflamatorias de los peces. El conocimiento de la estructura y la expresión de los genes de citoquinas en peces es mucho menor de lo que se conoce sobre las citoquinas de mamíferos.

Existen diversas clasificaciones de citoquinas, pero podemos agruparlas según Scapigliati *et al.*, (2004) en:

- Activadores celulares y factores de crecimiento celular.
- Citoquinas proinflamatorias.
- Quimioquinas.
- Citoquinas inmunosupresoras.
- Interferón.

Actualmente, también se consideran los siguientes grupos de citoquinas (Aoki *et al.*, 2008): a) familia de la interleuquina-1, que incluye IL-1 α y - β y IL-18, con efectos proinflamatorios y reguladores de la producción de otras citoquinas; b) citoquinas de clase I, que incluye productos con efectos pleiotróficos y que están implicados en la proliferación, supervivencia y diferenciación de una gran variedad de células, como IL-6, IL-11 y factores de crecimiento hematopoyéticos (Epo, G-CSF); c) citoquinas de clase II, cuya función es minimizar la propagación de agentes patógenos y los daños producidos por lesiones tisulares, principalmente IFNs tipo I (α , β) y tipo II (γ) y IL-10; d) quimioquinas, que regulan la motilidad y la migración celular, como IL-8 y MIP; e) superfamilia del TNE, incluyendo TNF- α y - β y linfotoxinas, que tienen funciones efectoras de las respuestas inflamatorias.

Las citoquinas tienen una función inmunorreguladora y juegan un papel importante en la coordinación de la respuesta inmunitaria, fundamentalmente en la respuesta innata. En los últimos años se ha generado un gran interés en el estudio de las citoquinas y quimioquinas de peces y se han escrito algunas revisiones donde se describe una relación de aquellas que han sido identificadas y/o clonadas en teleósteos (Scapigliati *et al.*, 2000; Whyte, 2007), como TNF- α y TNF- β (Laing *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2003; Savan *et al.*, 2004; 2005), las interleuquinas IL-1 β (Zou *et al.*, 1999c; Corripio-Miyar *et al.*, 2006), IL-

2 (Bird *et al.*, 2004), IL-4 (Li *et al.*, 2007), IL-6 (Bird *et al.*, 2005), e IL-10 (Lutfalla *et al.*, 2003) y algunas otras, el interferón γ (IFN- γ) (Robertsen, 2006; Zou *et al.*, 2004a) y varias quimioquinas como IL-8 (Laing *et al.*, 2002; Sangrador-Vegas *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Corripio-Miyar *et al.*, 2006).

Estos conocimientos, han abierto la puerta al estudio de los mecanismos que regulan en los peces el inicio, la intensidad y la duración de los diversos tipos de respuestas inmunitarias que se inducen frente a distintos tipos de antígenos, así como analizar en detalle los procesos inflamatorios. Aunque en la mayoría de los casos los estudios sobre la expresión génica de dichos factores se han centrado en el análisis de su expresión para caracterizarlos, más recientemente se están aplicando estos métodos para el estudio del perfil de citoquinas y mediadores en las respuestas inmunitarias *in vivo* frente a patógenos (Grayson *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2003; Lindenstrøm *et al.*, 2004; Purcell *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004), o en estudios *in vitro* en los que se analiza la respuesta frente a la estimulación con factores de crecimiento recombinantes o agentes inmunoestimulantes (Brubacher *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2003).

En mamíferos, la respuesta inflamatoria provoca una cascada de citoquinas (Fig. 10), con liberación de TNF seguida de la de IL-1 β y IL-6; a continuación se liberan otras, como la IL-8, que ejercen su función como potentes quimiotácticos y que inducen la migración de neutrófilos y macrófagos al lugar de la infección (Secombes *et al.*, 2001). TNF α , IL-1 β y IL-6 tienen efectos que se solapan en la inducción de síntesis de proteínas durante la fase aguda, activación del endotelio vascular para incrementar la permeabilidad, proliferación de fibroblastos y activación de linfocitos B y T.

Fig. 10.- Esquema representativo de las interacciones entre las moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inflamatoria en mamíferos. (Modificado de Secombes *et al.*, 2001)

A continuación se hace una presentación más detallada de las principales citoquinas estudiadas en esta tesis.

7.1. Interferón, factor de activación de macrófagos y proteínas Mx

El IFN es una potente citoquina implicada en la mediación de la resistencia celular frente a patógenos virales y también en modular el sistema inmunitario innato y adaptativo.

En mamíferos se han descrito tres familias de interferón, tipo I, tipo II y tipo III que se pueden distinguir por su estructura genética o proteica y por sus propiedades funcionales. Dentro del IFN tipo I se incluyen el IFN- α y el IFN- β que son producidos por cualquier tipo celular principalmente por leucocitos y fibroblastos, además desempeñan un papel fundamental en la respuesta a las infecciones virales mediante la inducción de más de un centenar de genes inducidos por IFN. La mejor vía antiviral inducida por IFN implica la producción de proteínas Mx (Goodbourn *et al.*, 2000). El IFN tipo II, representado por el IFN- γ , es producido por los linfocitos T y las células citotóxicas naturales en respuesta a mitógenos, antígenos o interleuquinas IL-12 y IL-18 (Robertsen, 2006). A diferencia del IFN tipo I, el IFN- γ es activador de macrófagos incrementando la actividad microbicida contra bacterias, protozoos y virus. El IFN tipo III de mamíferos está representado por IFN- λ (Chelbi-Alix y Wietzerbin, 2007).

En los peces, se demostró la actividad de moléculas tipo IFN frente a infecciones víricas en el suero de trucha arco iris (De Kinkle *et al.*, 1982) y más recientemente se clonaron los genes para IFN en especies de teleósteos como el pez cebra (Altmann *et al.*, 2003) o en salmón atlántico (Robertsen *et al.*, 2003) entre otros. Evidencias de múltiples aligamientos y análisis filogenéticos sugieren que el IFN tipo I de peces es ortólogo al IFN α/β de mamíferos (Robertsen, 2006).

Las citoquinas que incrementan la función de los macrófagos se han denominado genéricamente como MAFs (Graham y Secombes 1988). Aunque se ha demostrado que diferentes citoquinas tienen esa actividad (Flesh y Kaufmann, 1990; Frendl *et al.*, 1990; Collins y Bancorft, 1992), el IFN- γ es el principal MAF (Schultz, 1991; Farra y Schreiber, 1993). En peces, Graham y Secombes (1990a) demostraron que los sobrenadantes de cultivos de leucocitos de trucha arco iris estimulados con un mitógeno de células-T (fitohemaglutinina o concanavalina A) contienen actividad MAF. Posteriormente observaron que también presentaban actividad IFN antiviral (Graham y Secombes, 1990b), evidenciando la producción de IFN en respuesta a un mitógeno y no sólo a virus. Sin embargo, mediante cromatografía no fue posible aislar dos moléculas diferentes, por lo que estos autores sugieren que ambas acciones pueden ejercerse en peces por la misma molécula, aunque no queda demostrado si son lo mismo, ni si hay otras moléculas MAF sin actividad IFN. La forma de liberación de esta molécula, la sensibilidad al pH y la temperatura, la aparente identidad con el MAF y la actividad antiviral, indicaban para estos investigadores que se trata de una molécula similar al IFN tipo II, o IFN- γ .

Hoy en día, los genes para IFN tipo I (Altman *et al.*, 2003; Robertsen *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2004b, 2007) y para IFN tipo II (Zou *et al.*, 2004a, 2005) han sido clonados y secuenciados en distintas especies de peces incluida la trucha arco iris. Ambos IFN son producidos como proteínas recombinantes en trucha (Zou *et al.*, 2005, 2007) y muestran una actividad biológica característica. De este modo, el IFN tipo I induce la expresión de proteínas Mx como respuesta ante una infección vírica (Zou *et al.*, 2007), mientras que el IFN- γ estimula la expresión de genes como la proteína IFN- γ inducible (γ IP-10), del MHC II y de STAT1 (signal transducers and activators of transcription proteins), así como de un gran número de genes que codifican para proteínas relacionadas con la presentación de antígenos (Martin *et al.*, 2007b). Además, la exposición *in vitro* de macrófagos del pronefros de trucha a IFN- γ recombinante de trucha incrementa la explosión respiratoria en esas células (Zou *et al.*, 2005) y también modifica los niveles de proteínas en la línea celular SHK-1 de salmón atlántico (*Salmo salar*), incluidas las Mx (Martin *et al.*, 2007a).

En referencia a las proteínas Mx, está documentado que en mamíferos la actividad antiviral está mediada por proteínas inducidas por genes estimulados por IFN y entre estas las Mx son una de las familias más estudiadas (Goodbourn *et al.*, 2000). En peces también han sido bien caracterizadas algunas proteínas Mx (Robertsen *et al.*, 1997; Trobridge *et al.*, 1997; Collet y Secombes, 2001).

Las proteínas Mx han permanecido muy conservadas en vertebrados, incluidos los peces. Algunas especies muestran varias isoformas que se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, aunque han sido encontradas preferentemente en el núcleo (Lin *et al.*, 2005; Lee y Vidal, 2002). En trucha arco iris se han clonado y caracterizado tres isoformas (Trobridge *et al.*, 1995, 1997) así como el promotor para Mx1 (Collet y Secombes, 2001).

La expresión de Mx está regulada por el promotor del gen que contiene entre uno y tres elementos inducibles por IFN, en trucha el promotor Mx1 es estimulado por RNA de doble cadena que le confiere una fuerte inducción del gen (Collet y Secombes, 2001). Las proteínas Mx de trucha tienen diferentes propiedades antivirales impidiendo la replicación de virus RNA negativos de cadena sencilla fundamentalmente.

El estudio de la expresión del gen Mx ha sido usado como un indicador de actividad de IFN y es habitualmente empleado por los investigadores en estudios con vertebrados inferiores, como los peces (Collet *et al.*, 2003, Jørgensen *et al.*, 2007) y sólo más recientemente se han comenzado a realizar estudios de expresión de genes que codifican IFNs (Altmann *et al.*, 2003, Robertsen *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2004a, 2007).

7.2. Interleuquina 1 β

La IL-1 es una citoquina pro-inflamatoria conocida por su importante función durante la inflamación y la respuesta inmunitaria (Dinarello, 1997) y es secretada por diferentes tipos celulares como monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos y células epidérmicas y endoteliales (Oppenheim *et al.*, 1986). Pertenecce a una superfamilia de citoquinas, las interleuquinas, de las cuales se conocen tres miembros (IL-1 α , IL-1 β e IL-18) que activan al receptor de IL-1, y un miembro (IL-1ra), que es antagonista.

Su expresión esta inducida por diversos estímulos incluidos mitógenos, citoquinas y productos microbianos (Wang *et al.*, 1997; Tabona *et al.*, 1998) e interviene en la respuesta inflamatoria incrementando los mediadores celulares de la inmunidad. La IL-1 es una de las citoquinas cruciales en la respuesta pro-inflamatoria temprana induciendo una cascada de efectos que regulan los niveles de otras citoquinas y liderando la inflamación (Dinarello, 1997), así por ejemplo produce la inducción de genes que codifican para COX2, fosfolipasa A e iNOS, cuya estimulación provoca una respuesta inflamatoria.

La IL-1 β de mamíferos lleva a cabo un gran número de efectos biológicos, como aumentar la fagocitosis y la explosión respiratoria, e incluso regular la síntesis de otras citoquinas inflamatorias y PGE2, activar la respuesta inmunitaria humoral, y también inducir dolor (Watkins y Maier, 2002), fiebre (Leon, 2002) y activar el eje del estrés (Ferri y Ferguson, 2003). Es importante mencionar, que aunque en los peces teleósteos la IL-1 β también puede estar dotada de actividad pleiotrópica, su expresión, su procesamiento y su secreción son diferentes de los de mamíferos.

La IL-1 se une a dos receptores específicos IL-1R tipo I y tipo II que han sido caracterizados y clonados (Sims y Dower, 1994), estos receptores poseen afinidades diferentes con respecto a los tipos celulares (Scapigliati *et al.*, 1989). IL-1R_I desencadena una vía de señalización intracelular que incluye la fosforilación proteica mediada por quinasas conocidas como IRAKs (quinasas asociadas al receptor de IL), y que es responsable de los efectos biológicos de las citoquinas (Sims *et al.*, 1993) mientras que la unión al receptor IL-1R_{II} no desencadena ninguna señal (Colotta *et al.*, 1993).

La IL-1 y sus receptores tiene sus ortólogos en teleósteos; la IL-1 es particularmente importante porque fue la primera IL-1 descubierta en vertebrados inferiores y clonada en teleósteos y evolutivamente datada en unos 350 millones de años de antigüedad. La IL-1 β ha sido identificada en 13 especies diferentes de teleósteos, trucha arco iris entre ellos, (Zou *et al.*, 1999a,c) y se ha evidenciado que los peces producen IL-1 β durante la respuesta inmunitaria (Secombes *et al.*, 1999b).

En trucha se han descrito dos genes que codifican para las diferentes isoformas para IL-1 β : IL-1 β 1 y IL-1 β 2 (Pleguezuelos *et al.*, 2000), que representan diferente loci antes

que diferentes alelos (Wang *et al.*, 2000). Estudios de expresión mediante RT-PCR de los dos genes han confirmado que ambos son expresados en leucocitos del riñón anterior tras estimulación con LPS (Pleguezuelos *et al.*, 2000). Sin embargo los conocimientos relativos a la función diferencial y de expresión de ambas isoformas durante los procesos infecciosos son actualmente escasos. No obstante, se ha demostrado un aumento en la expresión de IL-1 β 1 en el bazo y pronefros de truchas infectadas con de *I. multifiliis*, seguido por una ligera demora en el aumento de expresión de la IL-1 β 2, (Sigh *et al.*, 2004). Del mismo modo, también se ha visto un rápido descenso de la expresión de IL-1 β 1 en relación con IL-1 β 2 en la piel de trucha infectada por *G. derjavini* (Lindenstrøm *et al.*, 2004).

7.3. Quimioquinas. Interleuquina 8

Las quimioquinas son una superfamilia de las citoquinas, producidas por diferentes tipos celulares y que actúan como factores quimiotáticos, induciendo el reclutamiento, activación y adhesión de células al lugar de la infección o herida. Se dividen en cuatro subfamilias: CXC (α), CC (β), C (γ) y CX₃C (δ) dependiendo de la posición de los dos primeros residuos de cisteína, de los cuatro conservados, que definen la familia en su estructura peptídica (Kunkel *et al.*, 1995). En general, se considera que las quimioquinas CXC, son atrayentes de neutrófilos, pero no de monocitos/macrófagos, mientras que por el contrario, las quimioquinas CC son atrayentes de monocitos/macrófagos pero no de neutrófilos. Las quimioquinas juegan un papel importante en el movimiento de células inmuno-efectoras hacia el lugar de la infección y parecen también actuar en el paso de la respuesta inmunitaria innata hacia una respuesta adaptativa.

En trucha arco iris se han identificado diferentes quimioquinas (Dixon *et al.*, 1998; Laing *et al.*, 2002; Laing y Secombes, 2004). La IL-8 fue la primera quimioquina identificada del grupo de las CXC; atrae a neutrófilos, linfocitos T y granulocitos basófilos pero no a los macrófagos. Muchos tipos celulares, incluidos los macrófagos, producen IL-8 en respuesta a determinados estímulos, como LPS o virus. La atracción de los neutrófilos por IL-8 parece ser debida a la presencia del motivo Glu-Leu-Arg denominado ELR en el extremo N-terminal de las quimioquinas CXC, presumiblemente porque afecta a su unión a receptores específicos (Clark-Lewis *et al.*, 1991). Los efectos de la IL-8 en los neutrófilos incluyen incremento en los niveles de calcio en el citosol, explosión respiratoria, cambios en la forma del neutrófilo y quimiotaxis.

Se ha demostrado la expresión de IL-8 en trucha arco iris, entre otras especies, en respuesta a una vacunación con antígenos bacterianos, así como ante una infección con bacterias, virus y parásitos y en respuesta a la inflamación (Corripio-Miyar *et al.*, 2006; Sigh *et al.*, 2004). Las quimioquinas juegan un papel importante como primera línea de defensa contra patógenos virales y a este respecto se han demostrado incrementos de la expresión de IL-8 en peces infectados con VHSV (Purcell *et al.*, 2004) y IHNV (Tafalla *et al.*, 2005) o en respuesta a vacunas de DNA (Purcell *et al.*, 2004).

7.4. Factor de la necrosis tumoral alfa

El TNF es una citoquina que interviene en la inflamación y en la respuesta inmunitaria (Secombes *et al.*, 2001) y es producido por diferentes tipos celulares como macrófagos, linfocitos, astrocitos y células tumorales en mamíferos (Vassalli, 1992).

El TNF- α es un miembro de la superfamilia TNF a la que pertenecen: linfotóxina- α (TNF- α), linfotóxina- β (TNF- β), ligando Fas, ligando CD27, ligando CD30, ligando CD40 y ligando OX40 (Hirono *et al.*, 2000). TNF- α y TNF- β están presentes en mamíferos y comparten un 30% de homología en la secuencia proteica y se unen a los mismos receptores (Vilcek y Lee, 1991). En teleósteos, como en trucha arco iris, se han descrito y clonado genes tipo TNF (Laing *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002). Los análisis comparativos de la estructura filogenética de la secuencia de aminoácidos, parecen indicar que los TNFs de teleósteos están más próximos al TNF- α que al TNF- β de mamíferos, lo cual ha llevado a sugerir la no existencia en peces del gen tipo linfotóxina TNF- β (Goetz *et al.*, 2004).

Existen múltiples isoformas del gen TNF- α debido a duplicaciones en el genoma, como ocurre en trucha arco iris (Zou *et al.*, 2002) o en carpa (Saeij *et al.*, 2003; Savan y Sakai, 2004). En todas las secuencias TNF- α de teleósteos, existe una región de transmembrana conservada con residuos de cisteína que están involucrados en la formación de enlaces disulfuro.

En general para la expresión de TNF, estudios en carpa y trucha han revelado algunas diferencias en la expresión *in vitro* de las dos isoformas del gen TNF- α (TNF- α 1 TNF- α 2). Así en trucha estas diferencias en el patrón de expresión han sido atribuidas a diferencias en la región del promotor, donde se han identificado variaciones en los elementos de regulación transcripcional y a la existencia de numerosos polimorfismos en la región UTR 3' (Zou *et al.*, 2002). No obstante la importancia biológica de estos dos genes en carpa (Saeij *et al.*, 2003) y trucha arco iris (Zou *et al.*, 2002) no se conoce bien.

Sin embargo, aparte de la caracterización de este gen, existen pocos datos funcionales para el TNF- α de teleósteos. En la trucha arco iris, se ha comprobado que el TNF- α recombinante (rTNF α) incrementa la migración de leucocitos y la actividad fagocítica, e induce la expresión génica de numerosas citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-8, TNF- α 1, TNF- α 2 y COX2 en leucocitos, macrófagos y la línea celular RTS11 (Zou *et al.*, 2003); estos estudios indican que el TNF- α en teleósteos es un importante factor de activación de los macrófagos.

8. Inmunomodulación

Cuando hablamos de inmunomodulación nos referimos a la capacidad de modulación del sistema inmunitario por diferentes factores. Podemos distinguir entre factores ambientales externos, como temperatura, respuestas fisiológicas, como el estrés, y sustancias que afectan de diversas formas al sistema defensivo. Los agentes o sustancias capaces de modular el sistema inmunitario se clasifican como inmunoestimulantes o inmunosupresores.

En cuanto a la inmunomodulación ambiental, se ha descrito que la temperatura el fotoperíodo y los cambios estacionales afectan al sistema inmunitario y a la respuesta inflamatoria de peces (Anderson y Roberts, 1975; Zapata *et al.*, 1992, Bowden *et al.*, 2007, Morgan *et al.*, 2008).

En peces, la inmunidad adaptativa muestra ciclos estacionales, que se presentan fundamentalmente en cambios en el título de anticuerpos y en la respuesta antigénica (Nakanishi, 1986). También se han demostrado que estos cambios estacionales afectan al sistema inmunitario (Álvarez *et al.*, 1998) y al número de linfocitos circulantes (Slater y Schreck, 1998). Otro factor es el fotoperíodo (Zeeman, 1986), que junto con la temperatura parecen actuar sobre el sistema inmunitario a través de la regulación y modulación del ciclo reproductor y del aletargamiento invernal (Zapata *et al.*, 1992)

Se ha descrito que en los peces existe un rango de temperaturas permisivo, dentro del cual se pueden producir respuestas inmunitarias humores y por debajo del cual están suprimidas (Bly y Clem, 1992). Además, las bajas temperaturas están asociadas a la reducción de las reacciones inflamatorias, mientras que las altas temperaturas tienden a acelerarlas (Anderson y Roberts, 1975; Bly y Clem, 1992). Bly y Clem (1992) propusieron que el efecto de las bajas temperaturas es debido a la inducción de cambios químicos y estructurales en los lípidos de las membranas celulares, a través de la regulación de la formación de cadenas acilo y su orientación, así como en las reacciones enzimáticas en las células. En la trucha arco iris se ha demostrado, a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, que a bajas temperaturas la producción de MAF (Hardie *et al.*, 1994a) y de IL-1 β (Zou *et al.*, 2000) se ven significativamente reducidos, aunque la migración de neutrófilos y macrófagos no está afectada (Anderson y Roberts, 1975). En dorada (*Sparus aurata* L.) se ha comprobado que a bajas temperaturas existe una marcada inmunosupresión, incluyendo un descenso significativo de la actividad del complemento en suero y de la actividad de la lisozima en plasma, y reducción de los linfocitos circulantes (Tort *et al.*, 1998).

En general, se asume que la respuesta inmune innata, no muestra ciclos estacionales, y se mantiene constante durante todo el año, proporcionando siempre una defensa contra patógenos invasores (Ellis, 2001).

El estrés es otra condición que produce inmunomodulación en peces. En las piscifactorías constituye uno de los principales problemas que afectan a la salud de los peces. Numerosos factores extrínsecos producen respuestas de estrés lo cual implica reacciones fisiológicas y de comportamiento que ayudan a adaptarse a una nueva situación. En teleósteos, las principales respuestas de estrés que se han relacionado con alteraciones del sistema inmunitario incluyen la adaptación a los cambios en el medio (Bly *et al.*, 1997), los relacionados con el ciclo sexual y los derivados del manejo de los peces y las interacciones sociales en condiciones de alta densidad de población (Caruzco y Lazard, 1999). En algunos casos, cuando el estrés se prolonga o se hace más agudo, puede exceder su capacidad de ajuste fisiológico, produciéndose un colapso del sistema inmunitario y también de otros sistemas (Ellis, 1981a). Se ha descrito que el efecto supresor del estrés está mediado por hormonas esteroideas, principalmente cortisol (Jeney *et al.*, 1992).

Muchas sustancias han sido descritas como inmunomoduladores, incluyendo productos microbianos, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Neumann *et al.*, 1995) y β -glucanos de la pared de hongos (Jørgensen *et al.*, 1993), ciertas vitaminas, como A, E y C (Blazer, 1992; Thompson *et al.*, 1993), lípidos y hormonas (Kajita *et al.*, 1992), algunas citoquinas, como IFN y TNF- α entre otras (Sakai, 1999), y otras sustancias no biológicas como el Levamisol (Kajita *et al.*, 1990; Anderson, 1992).

El desarrollo y estudio de los inmunomoduladores, principalmente inmunoestimulantes, va ligado al desarrollo de la acuicultura y su aplicación industrial (Sakai, 1999). En las piscifactorías vienen aplicándose diversas sustancias para incrementar los mecanismos de respuesta innata, paliar los efectos de los inmunodepresores ante situaciones de estrés y reducir el impacto de las infecciones bacterianas, víricas y protozoarias que causan importantes pérdidas económicas en los cultivos intensivos de peces.

La inducción y regulación de muchas respuestas inmunitarias innatas y adquiridas dependen de la actividad de una variedad de citoquinas y de interleuquinas, muchas de cuyas actividades han sido demostradas en teleósteos (Secombes *et al.*, 1996, 1999a). Durante la respuesta inflamatoria, debida a una herida o infección, tanto las células residentes en la zona afectada, como las que emigran hasta allí, están sujetas a la acción de diversos estímulos que producen cambios dramáticos en el perfil de expresión génica (Ehrt *et al.*, 2001). Estos estímulos pueden venir dados por la acción de los inmunomoduladores, que influyen en los niveles de expresión de los genes que intervienen en la respuesta inflamatoria y la regulan.

8.1. Inmunoestimulantes

Algunos estudios, han mostrado su interés en los beneficios potenciales del control positivo de los mecanismos de defensa no específicos con inmunoestimulantes, como

método para incrementar la resistencia de los peces cultivados contra un amplio espectro de enfermedades incluyendo aquellas para las que no existen vacunas efectivas (Anderson, 1992).

Cada vez son más numerosos los trabajos disponibles sobre el sistema inmunitario de peces con interés para la acuicultura, así como sobre su inmunomodulación mediante el empleo de diversas sustancias. Se conocen muchas sustancias, naturales o sintéticas, capaces de estimular el sistema inmunitario de vertebrados, y algunas de esas sustancias han sido probadas en peces, presentando la capacidad de incrementar su protección frente a infecciones, lo que las hace útiles en la prevención de enfermedades en acuicultura (Anderson, 1997; Robertsen, 1999).

En mamíferos, algunos inmunoestimulantes, tales como Levamisol, β -glucanos y LPS, activan las respuestas inmunocelulares, mientras que otros, como RNAs bicatenarios y los polinucleótidos tipo poli(I) - poli(C), inducen la producción de interferón, que es una de las principales citoquinas implicadas en la defensa anti-viral (Biron, 2001). La existencia de respuestas semejantes frente a inmunoestimulantes también ha sido puesta de manifiesto en peces, en los que se ha demostrado la expresión de actividad de distintas citoquinas, como MAF, interferón y TNF (Secombes *et al.*, 2001; Jørgensen *et al.*, 2001). También estos productos activan la producción de metabolitos oxidativos, como el óxido nítrico (Laing *et al.*, 1999), que parecen tener una función importante en el control de patógenos intracelulares como *R. salmoninarum* (Hardie *et al.*, 1996; Campos Pérez, 1998). De los estudios de inmunoestimulación realizados en peces se puede concluir que sus efectos sobre el sistema de defensa afectan principalmente a la función de las células fagocíticas (Dalmo *et al.*, 1997).

Las técnicas de inmunoprofilaxis, como la vacunación y la inmunoestimulación, tienen grandes perspectivas en acuicultura y están desplazando a los métodos tradicionales basados en la quimioterapia (Sakai, 1999). Existen todavía algunas enfermedades contra las que no se dispone de vacunas efectivas, como son las producidas por virus y otros patógenos intracelulares; contra las que los inmunoestimulantes pueden tener una función importante, incrementando las respuestas inmunológicas específicas e inespecíficas, pero especialmente las celulares implicadas en las respuestas defensivas (Anderson, 1997).

Los inmunoestimulantes se definen como, sustancias químicas, fármacos, agentes estresantes o cualquier acción que eleve los mecanismos de defensa inespecíficos o la respuesta específica (Anderson, 1992). Como indicó este autor, los inmunoestimulantes pueden ser utilizados solos para activar la respuesta inespecífica, o pueden ser administrados junto a una vacuna para activar los mecanismos de defensa inespecíficos a la vez que se aumenta la respuesta específica. En peces, se pueden administrar por vía oral, por inyección intraperitoneal o por inmersión, y su eficacia se mide no sólo por su

acción sobre diversos componentes del sistema inmunitario sino también por el grado de protección que proporcionan ante una exposición a un determinado patógeno.

Son numerosas las respuestas del sistema inmunitario que han sido estudiadas tras la administración *in vivo* o *in vitro* de inmunoestimulantes en varias especies de peces, siendo de todas ellas la actividad fagocítica la más estudiada (Sakai, 1999). El efecto biológico de los inmunoestimulantes depende principalmente de los receptores de las células diana que los reconocen como moléculas nocivas que desencadenan las vías de defensa. Un mayor conocimiento respecto a los receptores específicos y los procesos inflamatorios que los diferentes receptores inducen, nos proporcionará un mayor entendimiento de las vías de actuación de los inmunoestimulantes.

Las dosis y el tiempo de aplicación de los mismos, son factores importantes a tener en cuenta en los ensayos de inmunoestimulación. Algunos estimulantes pueden tener efectos adversos generalmente por sobredosisificación. Por ejemplo, en trucha arco iris está demostrado que la exposición de cultivos de células de bazo a dosis de 5 µg/ml de Levamisol incrementa la capacidad fagocítica, la explosión respiratoria y el número de células formadoras de placas (Siwicki *et al.*, 1990), mientras que dosis más altas (25 o 50 µg/ml) suprimen algunas respuestas inmunológicas.

Según Sakai (1999) los inmunoestimulantes se pueden dividir en varios grupos dependiendo de su naturaleza: bacterias y productos bacterianos, polisacáridos complejos, derivados de plantas o animales, factores nutricionales, hormonas, citoquinas y otros.

A continuación, se detallan las características y efectos de los inmunoestimulantes que se han utilizado en este estudio.

8.1.1. LPS.

El lipopolisacárido es un componente esencial de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Los lipopolisacáridos son heteropolímeros formados por polisacáridos unidos covalentemente a un fosfolípido nitrogenado, denominado lípido A, que forma parte de la pared bacteriana. Se distinguen tres regiones: polisacárido-O o antígeno-O formado por residuos de oligosacáridos, una región “core” o región R formada por una cadena corta de azúcares y una región lipídica, denominada lípido A, formada por un disacárido, fosfato de *diglucosamina*, esterificado con cinco o seis cadenas de ácidos grasos (Fig.11). El polisacárido-O es el principal responsable de la especificidad serológica, mientras que el lípido A determina las funciones biológicas, especialmente la respuesta endotóxica (Erridge *et al.*, 2002).

Fig. 11.- Estructura simplificada de una molécula de LPS. Monosacáridos, Fosfatos, Cadena de ácido graso.

La actividad del LPS como inmunoestimulante está ampliamente reconocida en los peces (Dalmo *et al.*, 1998; Robertsen, 1999). El tratamiento con LPS incrementa algunas de las funciones de los macrófagos y linfocitos en diferentes especies de peces (Clem *et al.*, 1985; Neumann *et al.*, 1995) e *in vitro* estimula la fagocitosis y la producción de radicales superóxido (Solem *et al.*, 1995), así como la expresión de citoquinas como IL-1 y TNF- α en la trucha arco iris (Zou, *et al.*, 2002).

Hoy en día, se conoce el modo de acción del LPS en mamíferos. Esta molécula es reconocida por receptores TLR4 de células CD14 que desencadena una cascada de reacciones. El LPS es reconocido por la proteína LBP (proteína de unión a lipopolisacárido) a la que se une para posteriormente ser conducido hasta un receptor TLR4 de células CD14, formando un complejo que activa toda una cascada que induce la expresión de los genes proinflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IFN, etc.

En peces, la respuesta es similar (Fig. 12) (Toshchakov *et al.*, 2003; Iliev *et al.*, 2005b; Swain *et al.*, 2008). Estos factores, LBP y CD14, confieren sensibilidad al LPS y son requeridos para la activación de los receptores TLR a bajas concentraciones de LPS (Mathison *et al.*, 1992). Diferentes estudios en diversas especies de peces han mostrado que el LPS es un potente inductor de la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias y proteínas de la fase aguda de la respuesta inmunitaria (Brubacher *et al.*, 2000; Mackenzie *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2003).

Fig. 12.- Representación esquemática del modo de acción del LPS-TLR4 en mamíferos y sus diferencias respecto al modo de acción en peces. (Modificado de Iliev *et al.*, 2005b).

Iliev *et al.*, (2005a) han demostrado que los monocitos / macrófagos de trucha arco iris son alrededor de 1000 veces menos sensibles al LPS de *E.coli* que los macrófagos de mamíferos, fenómeno que no parece limitarse a la trucha arco iris, ya que otros investigadores han utilizado altas dosis de LPS (5-500 $\mu\text{g/ml}$) para estimular de forma óptima diferentes tipos de células de diversas especies de peces (Hirono *et al.*, 2000; MacKenzie *et al.*, 2003; Pelegrin *et al.*, 2001; Stafford *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2003). Además, Iliev *et al.*, (2005a) sugieren que la respuesta de los monocitos/ macrófagos de trucha arco iris a bajas concentraciones de LPS no dependen de la presencia de suero, lo cual apunta a que podría haber diferencias fundamentales entre los mecanismos de reconocimiento del LPS en peces y mamíferos, y como estos datos estarían de acuerdo con una hipótesis anteriormente publicada que sugiere que los peces pueden carecer de LBP funcional (Inagawa *et al.*, 2002; Stenvik *et al.*, 2004), lo cual explica su baja sensibilidad al LPS. Además, recientemente, Sepulcre *et al.*, (2009) han demostrado que el receptor TLR4 de pez cebra no participan en el reconocimiento de LPS.

8.1.2. Levamisol

El Levamisol, un levoisomero de tetramisol, es un compuesto sintético ampliamente usado como antihelmíntico en veterinaria (Findlay y Munday, 2000). Diversos estudios han mostrado que el Levamisol produce un incremento de la resistencia contra diferentes infecciones (Mulero *et al.*, 1998; Cuesta *et al.*, 2002; Ispir y Dörücü, 2005).

Se ha demostrado en varias especies acuáticas que el Levamisol es un potente inmunoestimulante que incrementa la actividad citotóxica de leucocitos (Cuesta *et al.*, 2002), la fagocitosis (Mulero *et al.*, 1998 y Findlay y Munday, 2000), la explosión respiratoria, la proliferación de linfocitos (Siwicki, 1989; Mulero *et al.*, 1998), la respuesta de anticuerpos (Jeney y Anderson, 1993; Cuesta *et al.*, 2004) y de los factores

de activación de macrófagos (Mulero *et al.*, 1998). También se ha mostrado que el Levamisol es capaz de aumentar la resistencia a bacterias patógenas como *Vibrio anguillarum* (Kajita *et al.*, 1990) *A. hydrophila* (Baba *et al.*, 1993), *Paramoeba sp.* (Findlay *et al.*, 2000; Munday y Zilberg, 2003) y nematodos, tales como *Anguillicola craso* (Geets *et al.*, 1992).

Este medicamento no tiene efectos directos sobre las bacterias, virus y hongos (Renoux, 1980), por lo que sirve principalmente para inmunoterapia y la posibilidad de que las bacterias patógenas desarrollen resistencia es mínima.

Aunque algunas investigaciones han demostrado que la administración de Levamisol a través de la inmersión o inyección intraperitoneal en peces puede modular la inmunidad adaptativa y la producción de anticuerpos (Jeney y Anderson, 1993; Midtlyng *et al.*, 1996), también puede ser administrado a través de suplementos dietéticos, lo que haría mucho más factible su uso en la industria, en comparación con la inyección y la inmersión.

8.1.3. Poly I:C

El ácido polinosínico-policitidílico (Poly I:C) es un análogo sintético de RNAs de doble cadena (dsRNA) (Alexopoulou *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2004). El Poly I:C estimula la actividad inmunitaria antiviral (Masysheva *et al.*, 1995) y es un potente inductor de IFN de tipo I, lo cual ha sido documentado tanto en mamíferos (Heitmeier *et al.*, 1998; Auch *et al.*, 2004; Kulka *et al.*, 2004) como en peces (Eaton, 1990; Nygaard *et al.*, 2000; Jensen y Robertsen, 2002; Robertsen *et al.*, 2006) y en invertebrados de interés en acuicultura, como en el camarón *Litopenaeus vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

Los dsRNA sintéticos son reconocidos por el receptor TLR3 (Rodríguez *et al.*, 2005), así como por las proteínas citoplasmáticas RIG-I y MDA5 que intervienen en este reconocimiento, provocando la inducción de la respuesta antiviral (Yoneyama *et al.*, 2004).

Tras la unión del ligando a su receptor TLRs se activa una vía de señalización intracelular común mediante el reclutamiento de la proteína adaptadora de señalización intracelular MyD88. Posteriormente se activa una cascada de quinasas que provocan la activación de la vía del factor nuclear (NFκB), lo que se traduce en la generación de una respuesta inflamatoria (Akira y Takeda, 2004). Estudios utilizando ratones deficientes en MyD88 han demostrado que el TLR3 y TLR4 puede también activar una vía de señalización independientemente de MyD88 (Alexopoulou *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002). Esta vía de señalización independiente de MyD88 se produce a través de otra proteína adaptadora, TRIF, que si bien puede activar la vía del NFκB, también provoca la fosforilación de IRF-3, lo que genera una respuesta antiviral con producción de IFN-I y con la activación de genes inducibles por interferón (Takeuchi *et al.*, 2004).

Los dsRNA también inducen respuestas antivirales intracelulares por activación directa de la proteína quinasa dependiente de RNA (PKR), lo que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares y virales a través de la fosforilación del factor eucariótico de iniciación de traducción 2 α (eIF2 α) (Meurs *et al.*, 1990).

La función de PRRS como TLR3 y TLR9 es estimular la inmunidad protectora contra patógenos intracelulares, la administración de sus ligandos representa una estrategia profiláctica para eliminar este tipo de infecciones. De hecho, los estudios en mamíferos y peces han demostrado que los ligandos sintéticos para estos TLRs pueden proteger contra una amplia gama de bacterias y virus patógenos (Klinman *et al.*, 1999; Krieg, 2006). Cuando se inyecta Poly I:C en el salmón Atlántico se produce la inducción de la expresión del gen de la proteína Mx, que confiere resistencia contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) (Jørgensen *et al.*, 2003) y también se ha visto un incremento de la resistencia contra la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (Jensen *et al.*, 2002).

——Justificación y Propósito ——

Debido a su creciente impacto económico y social, existe un gran interés en el desarrollo de la acuicultura, lo que ha producido un gran avance en los estudios sobre la biología de las especies cultivadas o que están en proceso de adaptación a su producción. Dentro de estos estudios, muchos se han dirigido al conocimiento de las respuestas inmunitarias de los peces, que son clave en la defensa contra los patógenos, lo que es de vital importancia para poder intensificar los cultivos. Es necesario comprender cómo se desarrollan las respuestas inmunitarias en los peces y así poder utilizar sus propios mecanismos de defensa, activados y potenciados mediante vacunación o inmunoestimulación, para controlar las enfermedades infecciosas (Sakai, 1999; Ellis, 2001).

La inmunoestimulación es un método de inmunoprofilaxis muy conveniente en la acuicultura, ya que es efectiva contra un amplio rango de enfermedades infecciosas y actúa estimulando la respuesta inmunitaria innata, que es el mecanismo de defensa más importante en los peces (Anderson, 1997). Los inmunoestimulantes pueden tener una función importante en la protección contra una gran variedad de patologías, especialmente contra las que no hay vacunas efectivas, pero además pueden potenciar las respuestas inmunológicas adquiridas tras la vacunación o la exposición natural al patógeno (Sakai, 1999; Bricknell y Dalmo, 2005).

Ya se encuentran disponibles para su uso comercial en acuicultura algunos inmunoestimulantes, como los que incluyen β -glucanos, pero muchos otros productos, de los que existen pruebas de ser inmunoestimulantes, no han sido aún ensayados *in vivo*. Esto es debido, al menos en parte, a que seleccionar y ensayar nuevos inmunoestimulantes es un trabajo costoso, principalmente cuando los experimentos deben realizarse *in vivo*, porque los peces son muy sensibles al estrés y a las condiciones experimentales, como la temperatura, el fotoperiodo o la calidad del agua entre otros, lo cual influye en las respuestas observadas (Bowden *et al.*, 2007; Bowden, 2008).

En general, este es un problema asociado a la experimentación en peces, a la que se suma la elevada variabilidad intra- e interespecífica, en función de la especie, condiciones ambientales en el origen de captura y/o de mantenimiento (Anderson, 1990; Hedrick, 1998). Frente a estos problemas, la experimentación *in vitro* presenta numerosas ventajas, tales como condiciones controladas y repetitivas, y la posibilidad de realizar

numerosos ensayos en un plazo de tiempo corto y con una menor variación individual (Villena, 2003).

Por eso, el uso de ensayos inmunológicos *in vitro*, especialmente los que utilizan cultivos celulares, son una alternativa útil a los estudios *in vivo* y su desarrollo se considera un requisito indispensable para el futuro avance de la experimentación clínica y farmacéutica, tanto en medicina humana como animal. Además, el desarrollo y validación de métodos de ensayos *in vitro* son parte fundamental de la política de las 3Rs (reducción, refinamiento y reemplazamiento) para optimizar o reemplazar el uso de animales, según establece la legislación española (Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre) y comunitaria (Directiva 2003/65/CE) para la protección y uso de animales para la experimentación. Esta aproximación experimental está siendo fuertemente impulsada por numerosos organismos internacionales de investigación, incluyendo los Programas Marco de la Comisión Europea.

Sin embargo, existe una gran dificultad para transponer los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* a la situación real *in vivo*. Esto es especialmente cierto cuando se usan líneas celulares estables, formadas por un solo tipo celular y, generalmente, en cultivos en monocapa (bidimensionales), en los que no se replican las complejas interacciones celulares que se dan en los tejidos y en los órganos. Por ello, hoy en día se considera que cultivos de tipo histotípicos u organotípicos, frecuentemente en forma de cultivos tridimensionales, reproducen de manera más fiel el escenario fisiológico real y son mejores para predecir resultados *in vivo* (Griffith y Swartz, 2006; Yamada y Cukierman, 2007). No obstante, el establecimiento de estos tipos de cultivos es complicado y, en mamíferos, requiere generalmente obtener varias poblaciones celulares a partir de los tejidos o de cultivos primarios, lo que mantiene el requisito de utilizar constantemente animales.

El proyecto de investigación en el que se incluye esta Tesis Doctoral engarza con las dos situaciones expuestas, búsqueda de nuevos inmunoestimulantes para la acuicultura y uso de métodos alternativos a la experimentación animal, continuando una de las líneas de trabajo del grupo de investigación en el que se ha realizado, que persigue desarrollar cultivos celulares de salmónidos como modelos para estudios de inmunología y de patogenicia *in vitro*.

De esta forma, el propósito de la Tesis Doctoral es:

Analizar el potencial de técnicas fundamentadas en el empleo de métodos de cultivo celular y de ensayos *in vitro* para el estudio y selección de sustancias candidatas a ser inmunoestimulantes para la acuicultura.

Para ello, hemos estudiado las respuestas proinflamatorias inducidas por diversos inmunoestimulantes (LPS, Levamisol y Poly I:C), cuyos efectos ya han sido demostrados

in vitro e *in vivo* en peces, en las líneas celulares de trucha arco iris TPS-2 y TSS, provenientes de estroma de pronefros y de bazo respectivamente, que desarrollamos en nuestro laboratorio (Carracedo, 2003).

En comparación con otros sistemas más comúnmente usados para ese fin, que utilizan cultivos primarios de leucocitos (principalmente macrófagos) u otras líneas establecidas de peces (Brubacher *et al.*, 2000; Villena, 2003; Iliev *et al.*, 2005a), el empleo de las líneas TPS-2 y TSS como modelos de estudio tiene como ventaja fundamental el hecho de que ambas están formadas por poblaciones celulares heterogéneas del estroma hematopoyético, que intervienen en diversos procesos asociados a las respuestas defensivas, como fagocitosis, aclaramiento de antígenos y producción de citoquinas. Además, estas líneas celulares forman, de manera espontánea, cultivos tridimensionales, que con el tiempo dan lugar a cultivos histotípicos, capaces de soportar hematopoyesis. Estas características de las líneas TPS-2 y TSS se han mantenido estables durante los más de 160 pases que se han realizado en el momento de escribir este trabajo.

El trabajo de investigación de esta Tesis Doctoral incluye los siguientes objetivos:

- 1) Investigar en las líneas celulares TPS-2 y TSS de *O. mykiss* respuestas inducidas por la exposición a inmunoestimulantes conocidos (lipopolisacárido bacteriano, Levamisol y Poly I:C), mediante ensayos biológicos *in vitro* relevantes para determinar los efectos potenciadores de las respuestas inmunitarias innatas.
- 2) Analizar en las dos líneas celulares indicadas, tras la exposición a los inmunoestimulantes, la expresión de genes inmunorreguladores, al nivel de transcritos, implicados en respuestas proinflamatorias.
- 3) Comparar los resultados obtenidos en las líneas TPS-2 y TSS con los observados en cultivos primarios de macrófagos aislados del pronefros de *O. mykiss*, para determinar los efectos diferenciales derivados del uso de cultivos celulares complejos, con potencial histotípico.

———— **Material y Métodos** ————

1. Animales de experimentación

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado ejemplares adultos de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, con un peso de 150-300 g, procedentes de la piscifactoría comercial “Los Leoneses” situada en Castrillo del Porma (León).

Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Animalario de la Universidad de León, dispuestos en tanques de polietileno de 300 l de capacidad y con una densidad máxima de 15 animales por tanque (Fig. 13), a los que se suministraba agua no clorada, a una temperatura de $14\pm 2^{\circ}\text{C}$, proveniente de un pozo artesiano situado en el Campus de Vegazana (León). Se utilizó un fotoperiodo de luz natural y las truchas fueron alimentadas cada 48 h con pienso comercial granulado Trouw T-6 classic 3P (Trouw España S.A.) con la siguiente composición: 40% de proteína, 21% de grasa, 16% de carbohidratos, 8% de cenizas, y 1,5% de fibras.

Todos los animales pasaron un periodo de aclimatación y fueron examinados diariamente durante la realización de los ensayos, para eliminación de cualquier pez con signos de enfermedad.

Para el manejo de los animales, la obtención de muestras o sacrificio, estos fueron previamente anestesiados por inmersión en una solución de metil sulfonato de tricafna (Sigma), producto también conocido como MS-222 (marca comercial de Sandoz), a dosis de 60 mg/l para anestésiar o de 200 mg/l para el sacrificio.

Fig. 13.- Instalaciones del animalario utilizadas para el mantenimiento de las truchas, mostrando los tanques utilizados (izquierda) y la densidad de animales típicamente utilizada.

2. Líneas celulares de trucha arco iris

Se han usado 2 líneas celulares obtenidas de estroma de órganos linfoides de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* R.), obtenidas en nuestro laboratorio.

Línea TPS-2 de pronefros; línea celular de estroma de pronefros de *O. mykiss* (Carracedo 2003) formada por células epitelioides, células fibroblásticas (Fig. 14) y gigantes. La línea TPS-2 contiene diversas poblaciones celulares del estroma hematopoyético del pronefros, principal órgano hematopoyético de los peces, equivalente a la médula ósea de los mamíferos (Razquin *et al.*, 1990) con predominancia de células del sistema retículoendotelial (RES). Esta línea celular se asemeja a la línea TPS obtenida y descrita por Diago *et al.*, (1995), pero se distingue de ella por contener un menor número de células gigantes.

Fig. 14.- Microfotografías de cultivos de la línea celular TPS-2 de pronefros de trucha arco iris: a) Imagen de contraste de fases del pase 28 a los 3 días de cultivo, x100; b) Imagen de contraste interferencial del pase 35 a los 2 días de cultivo; c) Imagen de contraste interferencial del pase 35 a los 2 días de cultivo x200.

Línea TSS de bazo; línea celular de estroma de bazo de *O. mykiss* (Carracedo 2003), formada por una población heterogénea de células, entre las que predominan las células epitelioides. Se caracteriza por su alta capacidad endocítica, mostrando actividades enzimáticas α -naftil acetato esterasa inespecífica (ANAE) y fosfatasa ácida (Fig. 15), así como marcaje positivo para la lectina de *Ulex europaeus* (UEAI), por lo que se asemeja a líneas de células endoteliales de tipo sinusoidal.

Fig. 15.- Microfotografías de cultivos de la línea celular TSS de bazo de trucha arco iris: a) Imagen de contraste de fases del pase 137 a los 4 días de cultivo, x100; b) Imagen de un cultivo de pase 54 a los 4 días de cultivo teñido para la demostración histoquímica de la actividad ANAE, x200. c) Imagen de un cultivo de pase 126 a los 4 días de cultivo teñido para la demostración histoquímica de la actividad fosfatasa ácida, x100.

3. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

3.1. Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para los ensayos, se usaron siempre pases jóvenes (20-30 pases) de ambas líneas celulares, procedentes de “master seeds” conservados congelados en nitrógeno líquido, por lo que previamente a cada ensayo se procedió a descongelar y aclimatar las células. Las células, se descongelaron en un baño a 37°C durante un minuto y seguidamente se resuspendieron en medio de cultivo adecuado para su crecimiento (ver más abajo) a una concentración aproximada de 2×10^4 células/cm² y se sembraron en frascos de 25 cm² (Costar).

Antes de ser usadas para los experimentos, tras la descongelación, las células se subcultivaron varias veces (entre 3 y 5 pases hasta que las células se aclimatan y adquieren un buen aspecto) mediante tripsinización (ver más abajo), manteniéndolas a 18°C en atmósfera de aire y humedad a saturación en un incubador termostatzado MPR 161D (Sanyo).

Para la obtención de subcultivos, los cultivos se tripsinizaron (hasta disgregación de la monocapa) a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ usando una solución de tripsina/ EDTA (Invitrogen) al 0,05-0,02% en tampón fosfato salino (PBS) 0,16M, libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Pasado este tiempo se añadió medio de cultivo completo (20% FCS) para inactivar la tripsina y las células fueron lavadas por centrifugación a 300 g durante 10 minutos a 4°C y resuspendidas en el medio de cultivo. Se determinó la viabilidad mediante el método de exclusión con azul tripán al 0,1% y se sembraron 5×10^5 células viables en frascos de cultivo de 25 cm² con 5 ml del medio correspondiente.

Tras el primer o segundo pase, se procedió a volver a congelar las células de varios frascos para su preservación como stock de “master seeds” en nitrógeno líquido. Para ello, se tripsinizaron (como se ha indicado en el párrafo anterior) cultivos con las células en fase logarítmica de crecimiento, se determinó el número de células viables con azul tripán y se resuspendieron en un medio de congelación consistente en suero fetal (FCS) con un 10% de DMSO (dimetil sulfóxido) (Sigma) a una concentración de 10^6 - 10^7 células/ml. Finalmente, se hicieron alícuotas de 1 ml en viales de congelación de 1,5 ml (Costar), que se congelaron primero envueltos en gasas y en una caja de Porexpan a -80°C durante 24-48 horas, para posteriormente pasarlos a nitrógeno líquido.

3.2. Medios de cultivo de las líneas celulares

Los medios de cultivo empleados para las líneas celulares TSS y TPS-2 fueron:

- a) Medio de cultivo rutinario (TCMD) según Diago *et al.*, (1993, 1995), semejante al descrito por Mishell y Dutton (1967), pero modificado por Carracedo (2003) para eliminar el suero de trucha, cuya composición se muestra en la Tabla 2.

- b) Medio de estimulación de los cultivos (THM: *trout holding medium*), que se usó para los bioensayos de estimulación y de análisis de expresión génica, cuya composición se muestra en la Tabla 3. Este medio se caracteriza por la ausencia de rojo fenol y contener un porcentaje del 2% de suero fetal (FCS), a fin de que el medio no interfiriera en la toma de lecturas en el espectrofotómetro, ni que el FCS produjese una estimulación inespecífica en los cultivos.

Tabla 2. Formulación del medio de cultivo rutinario (TCMD) usado para las líneas celulares.		
Solución stock	Concentración final	Volumen para 100 ml
Suero fetal bovino (FCS) (Cultek)	20% v/v	20 ml
L-glutamina 200 mM (Biochrom)	2 mM	1 ml
Piruvato sódico 100 mM (Merck)	2,5 mM	2,5 ml
2-Mercaptoetanol 50 mM (Merck)	50 μ M	0,1 ml
Mezcla de nucleósidos (Sigma)	0,1% p/v	2,5 ml
Adenosina	9,4 x10 ⁻² mM	2,5 ml
Citosina	22,5 x10 ⁻² mM	
Guanosina	8,8 x10 ⁻² mM	
Uridina	10,2 x10 ⁻² mM	
Gentamicina 10 mg/ml (Gibco)	50 μ g/ml	500 μ l
Anfotericina 250 μ g/ml (Gibco)	2 μ g/ml	880 μ l
RPMI -1640, con HEPES 25 mM y L-glutamina 2 μ M (Gibco)		Hasta 100 ml
El pH se ajustó a 7,2-7,4 y el medio se esterilizó mediante filtración (filtros con poros de 0,22 micras) y se conservó a 4°C.		

Tabla 3. Formulación del medio de estimulación de los cultivo (THM) de las líneas celulares y de macrófagos usado para bioensayos y estudios de expresión génica.		
Solución stock	Concentración final	Volumen para 100 ml
Suero fetal bovino (FCS)	2% v/v	2 ml
Gentamicina 10 mg/ml (Gibco)	50 μ g/ml	500 μ l
Anfotericina 250 μ g/ml (Gibco)	2 μ g/ml	880 μ l
RPMI -1640 sin rojo fenol, con HEPES 25 mM y L-glutamina 2 μ M (Gibco)		Hasta 100 ml
El pH se ajustó 7,2-7,4 y el medio se esterilizó mediante filtración (filtros con poros de 0,22 micras) y se conservó a 4°C.		

4. Cultivo primario de macrófagos

Se han usado también en los estudios cultivos primarios de macrófagos, extraídos de pronefros de trucha arco iris, con el fin de comparar sus respuestas biológicas y de expresión génica con los de las líneas celulares TSS y TPS-2. El procedimiento de obtención y cultivo de los macrófagos de pronefros se describe a continuación.

4.1. Aislamiento de macrófagos de pronefros

Los macrófagos fueron aislados siguiendo el método descrito por Secombes (1990), mediante centrifugación en gradiente de densidad y enriquecimiento en macrófagos por adherencia a plástico. En primer lugar, para la obtención del pronefros (riñón anterior), las truchas fueron previamente sacrificadas por sobreanestesia y exanguinadas mediante punción en el seno caudal, empleando tubos de extracción sanguínea (Venoject, Terumo Europe N.V.) provistos de una aguja de calibre 23G. El pronefros fue extraído por disección en condiciones asépticas, trabajando en cabina de flujo laminar vertical, y el órgano se homogeneizó mediante pases sucesivos a través de una jeringuilla de 1 ml usando medio de mantenimiento (Tabla 4), suplementado con 20 U.I/ml de heparina (Sigma). Posteriormente, la suspensión celular se tamizó a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 100 μm (Falcon) para eliminar restos tisulares no disociados.

Tabla 4. Formulación del medio de mantenimiento (“holding medium”) usado para el aislamiento de macrófagos de pronefros.

Solución stock	Concentración final	Volumen para 100 ml
Suero fetal bovino (FCS)	2% v/v	2 ml
Gentamicina 10 mg/ml (Gibco)	50 $\mu\text{g/ml}$	500 μl
Anfotericina 250 $\mu\text{g/ml}$ (Gibco)	2 $\mu\text{g/ml}$	880 μl
RPMI -1640 sin rojo fenol, con HEPES 25 mM y L-glutamina 2 μM (Gibco)		Hasta 100 ml
El pH se ajustó a 7,2-7,4 y el medio se esterilizó mediante filtración (filtros con poros de 0,22 micras) y se conservó a 4°C.		

A continuación, la suspensión de células se dispuso sobre un gradiente discontinuo de Percoll (Amersham, Pharmacia) de densidades 34% y 51% y se centrifugó 30 min a 400 g y 4 °C. Tras la centrifugación, se recogió la banda de células de la interfase entre 34% - 51%, rica en macrófagos, y las células se lavaron dos veces con RPMI-1640 por centrifugación a 400g durante 5 min y 4°C. Tras el último lavado, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de mantenimiento. Se usó una alícuota para contar la concentración de células viables con azul tripán al 0,1% y se ajustó la concentración a

2×10^7 cél./ml en medio de cultivo de macrófagos (Tabla 3), pero con solamente 0,1% de FCS.

Para el enriquecimiento de la población de macrófagos por adherencia, esa suspensión de macrófagos se añadió a frascos de polipropileno de 25 cm² (Costar) (4×10^7 cél./ frasco) o a placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano (Costar) (2×10^6 cél./ pocillo), que se dejaron incubar durante toda la noche a 18°C. Tras ello, se hicieron varios lavados con RPMI-1640 para eliminar las células no adheridas y finalmente se añadió medio de cultivo THM (Tabla 3) para los ensayos biológicos y estudios de expresión génica.

4.2. Estimación del número de macrófagos

Para estimar el número de macrófagos obtenidos en los frascos o en los pocillos de las placas, tras el enriquecimiento por adherencia, se utilizó el recuento de núcleos después de producir la lisis de las células por tratamiento con un tampón de lisis que contenía ácido cítrico (Sigma) 0,1M, 1% de Tween 20 (Sigma) y 0,05% de cristal violeta (Sigma). El número de núcleos liberados se contó en un hemocitómetro, tomando como criterio su tamaño y forma para discriminar los de los macrófagos. Para los ensayos biológicos y estudios de expresión génica se usaron cultivos en los que el porcentaje de macrófagos era al menos de un $\pm 80\%$.

5. Inmunoestimulantes

Para los distintos bioensayos se escogieron tres inmunoestimulantes, cuya actividad *in vivo* e *in vitro* ha sido bien demostrada en peces:

Levamisol: compuesto sintético, clorhidrato de L-tetramisol (Sigma), del cual se preparó una solución stock en agua estéril (Gibco) a una concentración de 50 mg/ml, que se almacenó a 4°C. Para la estimulación *in vitro*, se usó a las concentraciones de 5 y 25 µg/ml en medio de estimulación THM.

LPS: lipopolisacárido extraído de *Salmonella typhimurium* (Sigma), del cual se preparó una solución stock en agua estéril (Gibco) a una concentración de 5 mg/ml, que se almacenó a -20 °C. Las concentraciones utilizadas para los ensayos fueron de 5 y 50 µg/ml en medio de estimulación THM.

Poly I:C: sal sódica del ácido polinosínico - policitidílico (Sigma), del cual se preparó una solución stock en agua estéril (Gibco) a una concentración de 5 mg/ml, que se almacenó a -20 °C. Este producto se utilizó en los bioensayos a concentraciones de 1, 50 y 100 µg/ml en medio de estimulación THM.

6. Ensayos biológicos de inmunoestimulación

Se realizaron ensayos biológicos* para analizar diversas respuestas de las líneas celulares TPS-2 y TSS y de macrófagos relacionadas con la inmunidad innata, incluyendo la capacidad fagocítica, de producción de radicales oxidativos y de respuesta a citoquinas, tras la estimulación *in vitro*, como se describe a continuación.

6.1. Preparación de los cultivos en placas

A partir de los frascos de cultivos de las líneas celulares (los macrófagos se sembraron directamente en placas como se ha indicado anteriormente) se obtuvieron suspensiones celulares por tripsinización. Las células se recogieron en un tubo estéril de 15 ml (Costar), se centrifugaron a 4°C y 300 g durante 10 minutos y se resuspendieron en 1 ml de medio TCMD para determinar el número de células viables con azul tripán.

Las células fueron resembradas en placas de 96 pocillos con fondo plano (Costar), o en placas de paredes oscuras y fondo transparente (Costar) para ensayos con fluorescencia, a una densidad de 2×10^4 cél./pocillo en medio TCMD. Las placas se incubaron a 18 °C hasta obtener una capa subconfluente y 24 horas antes del ensayo tanto los cultivos de macrófagos como los de las líneas celulares se lavaron con RPMI-1640 para eliminar células no adheridas y se les añadió medio THM.

6.2. Ensayo de fagocitosis

Con el fin de comprobar la actividad fagocítica de nuestras líneas celulares así como de los cultivos de macrófagos de pronefros de trucha arco iris, se realizó un ensayo previo con un kit comercial de la casa Invitrogen (pHrodo™ BioParticles® Conjugates for Phagocytosis). Este preparado comercial, específico para cuantificar la actividad fagocítica, usa partículas de *E. coli* conjugadas con pHrodo, un fluorocromo sensible al pH.

La fagocitosis se mide como fluorescencia emitida, que se produce como consecuencia de la acidificación de las partículas cuando son ingeridas en fagosomas, aumentando intensamente la fluorescencia del pHrodo a medida que el pH disminuye. Para determinar la especificidad de la fagocitosis, y como blanco del ensayo, se utilizó la diferencia entre la señal precedente de muestras con células, que han ingerido esas partículas, y muestras sin células conteniendo el mismo medio de incubación.

Para este ensayo se preparó una placa de 96 pocillos para fluorescencia (Costar) donde se sembraron los macrófagos (2×10^6 cél./pocillo) y las líneas celulares (2×10^4 cél./pocillo) por triplicado para cada condición: pocillos estimulados con LPS (5 y 50

---

* En este trabajo usamos “ensayo biológico” para designar ensayos funcionales demostrativos de una actividad celular dada, como por ejemplo la fagocitosis.

$\mu\text{g/ml}$), con Levamisol (5 y 25 $\mu\text{g/ml}$), y con Poly I:C (1, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Se prepararon también pocillos control, donde no se añadió ningún inmunoestimulante y pocillos sin células usados como blancos donde añadió simplemente medio. Las células permanecieron con los inmunoestimulantes durante una hora, a partir de ese momento se procedió a medir la actividad fagocítica como indica el protocolo del kit.

Se preparó una solución de RPMI sin rojo fenol con 20mM de Hepes y a pH 7,4 con NaOH para resuspender el vial de partículas liofilizadas del kit. Se añadieron 2 ml de esta solución por vial de partículas y se procedió a su sonicación hasta su completa dispersión.

El protocolo seguido fue el siguiente:

- Retirar el medio de la placa de células
- Añadir 100 μl /pocillo de la suspensión de partículas previamente preparada incluidos los pocillos sin células y los pocillos control de células sin inmunoestimular.
- Cubrir e incubar la placa durante 3 horas en oscuridad y a 18 °C.
- Leer la placa en un fluorímetro (Synergy HT) con un filtro de excitación de 550 nm y un filtro de emisión de 600 nm.

6.3. Ensayos de explosión respiratoria

Se han utilizado dos métodos para medir la producción de O_2^- como indicador de la explosión respiratoria: a) el método de la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT), que detecta la presencia intracelular de O_2^- (Rook *et al.*, 1985), y b) la reducción del ferrocitocromo C, que detecta el O_2^- liberado al medio de cultivo. La especificidad de ambos métodos se demostró utilizando como control el enzima SOD (superóxido dismutasa) exógena, que dismuta el O_2^- generado a H_2O_2 . La Fig. 16 muestra el esquema experimental para estos estudios, para los que se utilizaron placas de 96 pocillos sembradas con las líneas celulares o con macrófagos.

Fig. 16.- Esquema representativo del proceso de experimentación para los ensayos de explosión respiratoria.

6.3.1. Método del NBT (detección intracelular de O_2^-)

La producción de O_2^- intracelular por el método del NBT se fundamenta en la reducción por el O_2^- del compuesto soluble y amarillo del NBT a una forma insoluble, formazán, que se acumula en depósitos de color azul.

Se realizaron dos tipos de experimentos, por el método del NBT, de estimulación de las líneas celulares y de los macrófagos. En el primero se determinó la capacidad estimuladora de los inmunoestimulantes utilizados (LPS, Poly I:C y Levamisol), mientras que en el segundo se pretendía analizar la duración de la estimulación y el efecto sensibilizador de los mismos.

Para el primer tipo de ensayo se procedió de la siguiente manera: Previo lavado con solución salina Hanks (HBSS 10X) de la placa, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de RPMI-1640 sin rojo fenol que contenían 1 mg/ml de NBT y el correspondiente inmunoestimulante: LPS (5 o 50 μ g/ml), Poly I:C (1, 50 o 100 μ g/ml) y Levamisol (5 o 25 μ g/ml), utilizando 8 pocillos (una columna) de la placa para cada concentración de estimulante. Como blanco para las medidas espectrofotométricas se dispuso una columna más con los pocillos sin células a los que se añadió medio sin estimulante. Como testigo se usó otra columna de pocillos con células (TSS, TPS-2 o macrófagos) a los que se añadió medio sin estimulantes.

Las células se incubaron durante una hora (tiempo estimado para la obtención de los mejores resultados) a 18°C en atmósfera de aire y a continuación se retiró la solución de todos los pocillos, las células se fijaron durante 15 minutos con metanol (Merck), se realizó un segundo lavado con metanol al 70% y las placas se dejaron secar al aire. Los depósitos de formazán reducido en las células se disolvieron añadiendo 120 μ l de KOH (Panreac) 2 M y 140 μ l de DMSO (Sigma) a cada pocillo. Finalmente, se determinó la densidad óptica de cada pocillo en un espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-Tek) a 620 nm de longitud de onda frente al blanco con KOH/DMSO.

En el segundo tipo de experimento las células se preincubaron durante una hora con las diferentes dosis de inmunoestimulantes y transcurrido ese tiempo se eliminó el medio y se añadieron a todos los pocillos 100 μ l de una solución de RPMI-1640 con NBT (1mg/ml) y se incubaron nuevamente durante una hora a 18 °C. A continuación se retiró el medio, y se procedió como en el caso anterior para fijar las células, disolver el formazán y leer la D.O. a 620 nm.

6.3.2. Método del ferrocitocromo C (detección extracelular de O_2^-)

La presencia de anión superóxido extracelular se detectó mediante el método del ferrocitocromo C (Secombes, 1990), que se fundamenta en la reducción del cromóforo por el O_2^- presente en el medio extracelular.

Tras varios lavados con HBSS, se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución Hanks con el inmunoestimulante correspondiente, en las mismas dosis indicadas en el caso anterior, junto con 2 mg/ml de ferrocitocromo C (Sigma). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. En los pocillos blanco (sin células) y en los controles se añadieron 100 µl/pocillo de solución Hanks con ferrocitocromo C (2mg/ml) sin inmunoestimulantes, y también se usaron pocillos como control negativo donde se añadieron 300 µg/ml de SOD para comprobar la especificidad de la reacción. Las células se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, realizándose medidas de densidad óptica a 550nm en el espectrofotómetro Synergy HT cada 5 minutos.

Tanto para los ensayos de detección de O₂⁻ tanto intracelular como extracelular, los resultados se expresaron como “índice de estimulación” frente a los controles, calculados según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de estimulación} = \frac{\overline{X} \text{ muestra} - \overline{X} \text{ blanco}}{\overline{X} \text{ control} - \overline{X} \text{ blanco}} - 1$$

6.3.3. Producción de sobrenadantes condicionados y ensayos para analizar la liberación de MAF

Diversas citoquinas secretadas por leucocitos que estimulan a los macrófagos se agrupan bajo la denominación genérica de factores de activación de los macrófagos (MAFs, macrophage-activating factors). Aunque no están caracterizados, el IFN-γ en mamíferos (Schultz, 1991) y IFN-I y TNF-α en peces (Jang *et al.*, 1995) son factores presentes en MAF. Para poner de manifiesto esta actividad biológica tras la estimulación de las líneas celulares y de macrófagos, se usó un ensayo de inmunoestimulación indirecta utilizando medios condicionados obtenidos de cultivos de macrófagos estimulados con Poly I:C o Levamisol.

Un esquema del planteamiento experimental, semejante al descrito por Graham y Secombes (1988), se muestra en la Fig. 17. Se utilizaron macrófagos sembrados en placas de cultivo de 6 pocillos (Costar). Tras lavar los pocillos para retirar las células no adheridas se procedió a estimular a los macrófagos añadiendo medio THM (3 ml / pocillo) que contenía los inmunoestimulantes en las siguientes concentraciones: 1 µg/ml o 100 µg/ml de Poly I:C; 5 µg/ml o 25 µg/ml de Levamisol. Tras 24 horas de estimulación, se retiró el medio y los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 3 ml de medio THM fresco sin inmunoestimulantes. Nuevamente se incubaron los macrófagos durante otras 24 horas, tras las cuales se recogieron los sobrenadantes en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

La actividad MAFs en esos sobrenadantes condicionados se demostró usando ensayos biológicos para la producción de ROS en cultivos primarios de macrófagos, de trucha arco iris, en placas de 96 pocillos y sobre cultivo celulares de TSS y TPS-2, usando los métodos indicados anteriormente. Se realizaron estudios de dosis/respuesta analizando la actividad de los sobrenadantes condicionados sin diluir (netos) y de sus diluciones 1:10 y 1:2 ($V_{\text{sobrenadante}}:V_{\text{final}}$) en THM.

Para el ensayo de producción de O_2^- intracelular (método del NBT), se agregó 1mg/ml de NBT a los sobrenadantes condicionados, que se añadieron a razón de 100 μ l/pocillo. A los pocillos control (pocillos con células a los que se añadió sobrenadante de cultivos de macrófagos sin estimular) y blancos (sin células, sólo medio THM), se añadió 1mg/ml de NBT. Además, se usaron como controles positivos células estimuladas con 50 μ g/ml de LPS en medio THM, con 1mg/ml de NBT. Las placas se incubaron durante una hora y el ensayo continuó tal y como se describe en el método del NBT.

Para el ensayo de producción de O_2^- extracelular (método del ferrocitocromo), se usaron las mismas diluciones de los sobrenadantes, que se añadieron a las placas, previamente lavadas con solución de Hanks, junto con los 2 mg/ml de ferrocitocromo C a razón de 100 μ l/pocillo. Se usaron también pocillos blanco (sin células) y control, con sobrenadantes de cultivos de macrófagos no estimulados, controles positivos estimulados con 5 y 50 μ g/ml de LPS y controles negativos donde se añadieron 300 μ g/ml de SOD. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, realizándose medidas de densidad óptica a 550 nm cada 5 minutos.

Fig. 17.- Esquema representativo del proceso de obtención de sobrenadantes condicionados para analizar la liberación de citoquinas (MAFs) para los ensayos de explosión respiratoria.

6.4. Ensayos de producción de NO

Al igual que para los ensayos de explosión respiratoria, la detección de NO se llevo a cabo tanto intracelular como extracelularmente. Existen varios métodos para detección de NO: métodos indirectos, por medición de productos de derivados de la actividad oxidativa del NO, tales como nitritos (NO_2) o nitratos (NO_3) – usados para la detección de NO extracelular – o de compuestos nitrogenados como nitrotirosina (en proteínas intracelulares o extracelulares), o mediante métodos directos de detección de NO. En nuestro estudio, para la detección de NO intracelular se eligió un método fluorimétrico de detección directa de NO, mientras que para la de NO extracelular se utilizó una variante del método de Griess (Green *et al.*, 1982), que detecta la formación de nitritos.

6.4.1. Ensayo para la detección de NO intracelular

Para los ensayos de detección de NO intracelular hemos escogido un método suficientemente sensible basado en una detección fluorimétrica de NO, mediante un kit comercial (Fluorometric cell-associated nitric oxide synthase (NOS) detection system, Sigma) que utiliza un fluoróforo permeable a través de la membrana celular llamado Diaminofluorescein-2 Diacetate (DAF-2 DA) para visualizar la producción interna del NO. El fluoróforo DAF-2 DA reacciona con el NO, formando un producto fluorescente, triazolofluoresceína, que ya no es capaz de atravesar la membrana celular (Fig. 18) y que puede cuantificarse mediante un fluorímetro.

Fig. 18.- Esquema del proceso experimental de detección de NO mediante el fluoróforo DAF-2,DA. La L-arginina es usada para producir NO por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), con ayuda del NADPH como cofactor enzimático, transformándose en L-citrulina.

Para llevar a cabo estos ensayos, se prepararon placas de 96 pocillos para fluorescencia (Costar) donde se sembraron los macrófagos (2×10^6 cél./pocillo) y las líneas celulares (2×10^4 cél./pocillo). Por cuadruplicado, se estimularon las células añadiendo a los pocillos los distintos inmunoestimulantes LPS (5-50 µg/ml), Levamisol (5-25 µg/ml), Poly I:C (1-100 µg/ml) en medio THM. Además se usó 1 µg/ml de éster de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en medio THM como control positivo. También se prepararon pocillos como controles negativos, que contenían únicamente medio THM. Para determinar la especificidad enzimática, se usaron pocillos con células estimuladas con LPS 5 µg/ml o PMA 1 µg/ml a los que se añadió cloruro de difenil-iodonio (DPI), un inhibidor específico de iNOS a la concentración final de 8 µM. La producción intracelular de NO se estudió a 1, 8 y 24 horas post-estimulación, incubándose las placas a 18 °C en atmósfera de aire.

Tras el tiempo de estimulación, se eliminó el medio de las placas y los pocillos se lavaron dos veces con medio Hanks. Después del último lavado, se añadieron inmediatamente a cada pocillo 100 µl del tampón de reacción del kit. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de la mezcla de reacción 2, conteniendo esta mezcla el doble de la concentración adecuada de NADPH, solución de arginina y DAF-2 DA. Para determinar la concentración óptima de NADPH a añadir se realizaron ensayos previos en los que se determinó que era de 4 µM (por tanto, la mezcla de reacción contenía una concentración 8 µM de este reactivo).

Los pocillos control, pocillos sin células y pocillos con células no estimuladas, siguieron el mismo protocolo, exceptuando un grupo de pocillos que se usó como control de fluorescencia en los que la mezcla de reacción 2 carecía de DAF-2 DA. A los pocillos usados como control negativo, se les añadieron 50 µl del tampón de reacción, 100 µl de la mezcla de reacción 2 y 50 µl de la dilución del inhibidor (32 µM de DPI en tampón de reacción).

Las placas se incubaron protegidas de la luz a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras este tiempo se leyó la fluorescencia en un fluorímetro (Synergy HT) con un filtro de excitación de 492 nm y un filtro de emisión de 515 nm.

6.4.2. Detección NO extracelular

La detección extracelular de producción de NO fue ensayada mediante el método indirecto descrito por Neuman (Neuman *et al.*, 1995), una variante de la reacción de Griess (Green *et al.*, 1982) que cuantifica el contenido en nitrito en los sobrenadantes.

Se utilizaron los sobrenadantes procedentes de las placas sembradas para el ensayo de detección fluorimétrica de NO. Tras los tiempos de estimulación (4, 8 o 24 horas), se recogieron 75 µl de los sobrenadantes, que se transfirieron individualmente a nuevos pocillos de una nueva placa de 96 pocillos (Costar). Se añadieron a cada pocillo 100 µl

de sulfanilamida (Sigma) al 1% en 2,5% de ácido fosfórico (Merck) y 100 µl de 0,1% de N-naftil-etilendiamina (Sigma) en 2,5% de ácido fosfórico. Las muestras se incubaron 10 minutos en oscuridad y la densidad óptica se determinó usando un espectrofotómetro (Synergy Ht) a una longitud de onda de 550nm.

La concentración molar de nitritos de los sobrenadantes fue determinada mediante una curva estándar de concentración generada usando concentraciones conocidas de nitrito de sodio, que se ensayaron en las mismas placas que los sobrenadantes.

Los resultados de los ensayos de detección de NO, tanto intracelular como extracelular, se expresaron como “índices de estimulación” frente a los controles, aplicando la fórmula indicada anteriormente para la detección de ROS.

6.5. Tratamiento estadístico de los resultados de los ensayos biológicos

Los resultados obtenidos se expresaron como medias y desviación estándar y se analizaron mediante un análisis de varianza mediante las pruebas de Tukey. El nivel de significación utilizado fue para $p < 0,01$ y $p < 0,005$.

7. Ensayos de expresión génica

La detección de la expresión de algunos genes implicados en la respuesta inmunitaria, indicados en la Tabla 5, se ha llevado a cabo mediante la técnica de retrotranscripción (RT) seguida de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se muestra esquemáticamente en la Fig. 19. Inicialmente y para la puesta a punto de la técnica, los resultados se analizaron semicuantitativamente por densitometría de las bandas de DNA amplificado (amplicones) en geles de agarosa. Posteriormente, el nivel de expresión génica se cuantificó y validó por PCR cuantitativa (en tiempo real, q-PCR).

Los genes a estudiar, implicados en la respuesta inmunitaria, han sido los siguientes: los de las citoquinas IL-1 β 1, IL-8 y TNF- α 1 y TNF- α 2; los de las enzimas COX-2 e iNOS; el de la proteína inducible por interferón Mx-1 y el que codifica la cadena beta del MHC-II, todos ellos de *O. mykiss*. Además, como control para comparar el nivel de expresión de estos genes entre distintas muestras se estudió la expresión del gen de la β -actina, que se expresa constitutivamente y con pocas variaciones entre diversos tipos celulares.

La expresión de esos genes ha sido estudiada en las líneas celulares TSS y TPS-2 y en cultivos de macrófagos de truchas arco iris sanas; estos cultivos se estimularon con los inmunoestimulantes: LPS (5 y 50 µg/ml), Levamisol (5 y 25 µg/ml) y Poly I:C (1, 50 y 100 µg/ml), disueltos en medio THM, frente a cultivos control, no estimulados. Los ensayos de inmunoestimulación se realizaron de forma semejante a lo descrito para los

bioensayos de producción de ROS, tanto en lo referido a las líneas celulares como a la obtención de cultivos primarios de macrófagos, pero usando frascos de 25 cm², en los que se sembraron 5x10⁵ cél./frasco de las líneas TPS-2 y TSS, y 4x10⁷ macrófagos/frasco. A cada frasco se añadieron 5 ml del medio THM con los inmunoestimulantes o sin ellos (controles). Los cultivos se incubaron a 18°C y se recogieron muestras a 4, 8, 12 y 24 horas, tras las cuales se procedió a la extracción del RNA, como se indica a continuación.

Fig. 19.- Proceso esquemático de la amplificación de transcritos génicos mediante la técnica de RT-PCR

7.1. Extracción de RNA total

El RNA es un ácido nucleico de tamaño variable y de cadena sencilla. Presenta dos grupos hidroxilo descubiertos más que el DNA, lo que lo hace un material mucho más reactivo a la hidrólisis enzimática, y por tanto es mucho más inestable. El RNA mayoritario en una célula, entre un 80-85%, es RNA ribosómico, principalmente 28S y 18S, mientras que el 10-15% está compuesto por RNAs de bajo peso molecular como el nucleolar y de transferencia. El RNA mensajero se encuentra entre un 1-5% y es heterogéneo en tamaño.

Para evitar problemas de contaminación y evitar la degradación del RNA de las muestras, se tomaron las precauciones indicadas en los manuales de biología molecular (Sambroock *et al.*, 1989), incluyendo el uso de guantes durante todo el proceso de extracción, realizar los trabajos en zonas limpias y de uso exclusivo para la técnica, uso de material específico, esterilizado por autoclavado dos veces y libre de RNAsas, y de agua ultrapura certificada libre de ribonucleasas (Sigma).

Para la extracción del RNA total se utilizaron columnas de purificación RNeasy™ (Quiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) En primer lugar, los cultivos se tripsinizaron y las células se recogieron por centrifugación (300 g /10 min/4°C) en tubos de 15 ml (Costar), descartando el sobrenadante.
- 2) Para lisar las células se añadieron a los tubos 350 µl de tampón RLT*, suplementado con un 1% de β-mercaptoetanol justo antes de su uso. Para homogeneizar el lisado, este se pasó a través de una jeringuilla de 1ml con una aguja hipodérmica de 25 G al menos 5 veces. A continuación, se añadieron a cada muestra 350 µl de etanol al 70%, para terminar de homogenizar el lisado pipeteando suavemente.
- 3) Cada muestra se colocó en una columna RNeasy™ mini spin y estas se centrifugaron durante 1 minuto a 10.000 rpm (microcentrífuga Eppendorff, 5415R).
- 4) Seguidamente se añadieron 700 µl del tampón RW1 a cada columna y se centrifugaron nuevamente 1 minuto a 10.000 rpm, realizándose a continuación dos lavados sucesivos con 500 µl de tampón RPE por centrifugación (1 minuto a 10.000 rpm).
- 5) Finalmente se eliminó todo el líquido de las columnas y estas se centrifugaron durante 2 minutos a 14.000 rpm para eliminar los restos de etanol. Se transfirió cada columna a un tubo Eppendorf y se añadieron 30 µl de agua libre de RNasa (del kit) para eluir el RNA.

El RNA así obtenido se conservó a -80 °C hasta su uso.

Antes de realizar la retrotranscripción, se determinó la concentración y pureza del RNA midiendo en un espectrofotómetro GeneQuant *pro* (Amersham Pharmacia Biotech) a 260 nm y 280 nm. La relación entre las absorbancias a 260/280 nm nos permite estimar la pureza del RNA. Se usaron aquellas muestras que presentaban una relación entre 1,8 y 2, valores que indican ausencia o baja contaminación de DNA o proteínas (Sambroock *et al.*, 1989).

Por otra parte, también se determinó la integridad de los RNAs obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio. En la Fig. 20 se muestra un

---

* Los tampones RLT, RW1 y RPE son soluciones del kit, de composición desconocida. RLT y RW1 son soluciones acuosas que contiene isotiocianato de guanidina. RPE se suministra como concentrado al que deben añadirse 4 volúmenes de etanol en el momento de su uso.

ejemplo representativo de uno de estos estudios, donde se puede apreciar la calidad del RNA extraído, indicada por la no degradación del RNA ribosómico 28S y 18S. El RNAm aparece como un conjunto de bandas, con tamaños variables que se extienden desde 5 kilopares de bases a 600 pares de bases.

Fig. 20.- Electroforesis en gel de agarosa de muestras de RNA obtenidas de cultivos de la línea celular TSS control e inmunoestimuladas. En cada carril se cargaron 1,5 µg de RNA. El carril de la izquierda contiene marcadores de peso molecular (517-1016-1636). Las dos bandas superiores corresponden a RNA ribosómico 28S y 18S.

7.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción (RT) es una técnica que permite generar una copia de DNA a partir del RNA usando la enzima transcriptasa inversa y proporcionando un cebador. Después de la retrotranscripción se obtiene un híbrido RNA-DNA, que por degradación del RNA queda como DNA monocatenario y complementario (cDNA) del RNA original.

En nuestro estudio se utilizaron como cebadores oligos-dT para la retrotranscripción de los RNA mensajeros. Los oligos-dT, formados por una secuencia de 10 a 15 timidinas, se aparean con la cola de poli-Adenina que presentan la mayoría de los RNA mensajeros en su extremo 3'. Para llevar a cabo la retrotranscripción se usaron los siguientes reactivos:

- RNA molde, procedente de las muestras: 4 µg de RNA total por reacción.
- Cebador Oligo-dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen), a concentración de 0,5 µg/µl (stock).
- Retrotranscriptasa del virus Moloney de la leucemia murina (M-MLV) (Invitrogen).
- Inhibidor de la actividad RNAasa (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen).
- Mezcla de 2'-deoxinucleótidos 5'- trifosfato (dNTP Mix, Invitrogen), que contiene dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, cada uno de ellos a una concentración de 10 mM.

- Agua libre de RNAsas (Sigma).

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en tubos de PCR (Costar), y el proceso seguido fue:

1. Se mezclaron en el tubo de PCR el RNA molde, 1 μ l del stock de oligos-dT₁₂₋₁₈ (concentración final 0,5 μ g/ μ l), 1 μ l de dNTPs (concentración final de cada uno de ellos 0,5 mM) y se ajustó el volumen final de la reacción con agua a 12 μ l.
2. Se incubó la mezcla de reacción a 70°C durante 10 minutos para desnaturalizar el RNA y a continuación se enfrió el tubo en hielo inmediatamente, donde se mantuvo 1 minuto, para evitar que el RNA se repliegue.
3. A continuación, se añadieron a cada tubo 4 μ l del tampón 5X de reacción de la retrotranscriptasa (suministrado junto el enzima, contiene Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 μ l del stock (100 mM) de dithiothreitol (DTT, Invitrogen) y 1 μ l (40 U) de RNaseOUT™ (inhibidor de la actividad RNAsa).
4. Los tubos se incubaron a 37°C durante 2 minutos, a continuación se añadió a cada tubo 1 μ l (200 unidades) de la retrotranscriptasa y se incubó a 37 °C durante una hora para realizar la síntesis del cDNA, y después a 70°C durante 15 minutos para parar la reacción.

Finalmente, las muestras de cDNA se diluyeron añadiendo 30 μ l de agua estéril (volumen final de 50 μ l) y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

7.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el cDNA, para la puesta a punto de la técnica y análisis semicuantitativos se procedió a la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores para la amplificación por PCR del cDNA de los genes estudiados se muestran en la Tabla 5, junto con el tamaño de los productos amplificados. Para comprobar que la cantidad de cDNA es la misma en todas las muestras se han realizado PCRs utilizando cebadores específicos para el gen de la β -actina de expresión constitutiva.

De forma general, las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) empleando un kit con Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Inicialmente, se utilizó un protocolo general de PCR que comprendía la mezcla de reacción indicada en la Tabla 6, con un volumen final de 50 μ l, en tubos Eppendorf de 0,2 ml (Thermowell™ Tubes Costar), que se mantenían en hielo hasta iniciar la reacción, y el programa de ciclos indicado en la Tabla 7.

El protocolo general de amplificación que se ha descrito fue modificado atendiendo a la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos y del tamaño del producto esperado. Así, se modificaron temperaturas y tiempos de extensión, ajustando las condiciones finales empíricamente. Para los análisis semi-cuantitativos de la PCR, el número de ciclos para la amplificación necesarios, depende del número de copias de la muestra de DNA presente al comienzo de la reacción y de la eficiencia de la PCR, por lo que se mantuvo en el menor número posible para estar en el rango lineal de la PCR y obtener bandas de una intensidad que permitieran el análisis densitométrico de los geles. Las condiciones finales usadas se indican en la Tabla 8.

En todos los casos se utilizaron un control negativo al que no se añadía cDNA, para comprobar que no se formaban dímeros de cebadores o que sucedían otras anomalías, y un control del origen del DNA molde consistente en muestras de RNA procesadas para RT-PCR en paralelo con las otras muestras, pero a las que no se había añadido la retrotranscriptasa (controles RT-), para observar si había contaminación por DNA genómico.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño amplicón	Referencias
β -actina	Actina-F	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC	543 pb	Bridle <i>et al.</i> (2006)
	Actina-R	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC		
IL-1 β	IL1 F10	GGATTCACAAGAACTAAGGAC	399 pb	Brubacher <i>et al.</i> (2000).
	IL1 R5	ACTGTGATGTACTGCTGAAC		
IL-8	IL-8 F3	GAATGTCAGCCAGCCTTGTC	226 pb	Laing KJ <i>et al.</i> (2002).
	IL-8 R3	TCCAGACAAATCTCCTGACCG		
TNF- α 1	TNF-1 F5	CAAGAGTTTGAACCTTGTTCAA	181 pb	Zou <i>et al.</i> (2002).
	TNF-1 R5	GCTGCTGCCGCACATAGAC		
TNF- α 2	TNF-2 F4	CAAGAGTTTGAACCTCATTGAG	208 pb	Zou <i>et al.</i> (2002).
	TNF-2 R4	GCTGCTGCCGCACATAAAG		
Mx-1	Mx-1 F	ATGAATAATACGCTCAACCAACA TTA	1852 pb	Fierro y Estepa (2004) GeneBank U30253
	Mx-1 R	CTAGAACTCAACTAGGTAGC		
COX-2	COX2-F6	ATCCTTACTCACTACAAAGG	386 pb	Zou <i>et al.</i> (1999b).
	COX2-R3	GCTGGTCCTTTCATGAAGTCTG		
iNOS	iNOS F4	CATACGCCCCCAACAAACCAGTG C	746 pb	Lindestrøm <i>et al.</i> (2004).
	iNOS R5	CCTCGCCTTCTCATCTCCAGTGTC		
MHC- II β	ONMY-F	ATGTCGATGCCAATTGCCTTCTA	336 pb	Glamann (1995).
	ONMY-R	TGTCTTGTCAGTATGGCGCT		

Tabla 5.- Secuencia de oligonucleótidos utilizados como cebadores para la detección por RT-PCR de la expresión de genes. Estas secuencias fueron diseñadas o tomadas a partir de las secuencias y datos indicados en las referencias bibliográficas que se muestran y sintetizados por Invitrogen.

	Concentración stock	Volumen añadido
Tampón 10x Taq polimerasa		5 µl
Cebador 5'	10 µM	2,5 µl
Cebador 3'	10 µM	2,5 µl
Mezcla dNTPS	10mM	1,2 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/ µl	0,3 µl
MgCL ₂	50 mM	2 µl
cDNA		2 µl
Agua estéril		Hasta 50 µl

Tabla 6.- Formulación general de la mezcla de reacción para las PCR

Ciclo		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial:		5 min	94 °C
Amplificación (nº de ciclos variable)	Desnaturalización:	45 seg	94 °C
	Anillamiento:	45 seg	50 °C
	Extensión:	1 min	72 °C
Extensión final:		10 min	72 °C

Tabla 7.- Protocolo general de ciclos usados para la amplificación por PCR.

Gen	Tª de anillamiento	Nº de ciclos
β-actina	55 °C	28
IL-1β1	55 °C	30
IL-8	58 °C	30
TNF- α1	55 °C	35
TNF- α2	58 °C	30
Mx-1	50 °C	30
COX-2	57 °C	30
iNOS	60 °C	35
MHC-IIβ	55 °C	30

Tabla 8.- Condiciones finales de PCR usadas para la amplificación de cada cDNA con cada gen.

7.4. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos obtenidos de las PCRs se visualizaron en geles de agarosa de baja electroendosmosis (Agarose D-1 low EEO Pronadisa) al 1,5% en tampón TAE pH 8,0 (cuya composición se muestra en la Tabla 9) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Fluka).

En los geles se cargaron las muestras de los amplicones obtenidos de cada gen a estudiar en las diversas condiciones experimentales (por ejemplo, de células estimuladas con los diversos inmunoestimulantes y del control), junto con los amplicones del gen de la β -actina correspondientes, a fin de evitar variaciones inter-geles en la semicuantificación por densitometría. Un ejemplo genérico de la disposición y muestras incluidas en cada gel se muestra en la Fig. 21.

Fig. 21.- Ejemplo de las muestras incluidas en un gel de electroforesis usado para la visualización de los resultados de la PCR. Se indica la disposición de las muestras en los carriles (arriba), que incluyen: marcadores de tamaño (carriles 1 y 12), muestras de cDNA a estudiar (carriles 2 a 9), control negativo sin cDNA (C-) y control del origen del cDNA (RT-). Las bandas que se observan corresponden a las obtenidas para muestras del gen COX-2 y de β -Actina de células TPS-2.

Los geles se cargaron con 8 µl de la muestra de PCR junto con 8 µl de la amplificación de β -actina. A las muestras a cargar en el gel se les añadió tampón de carga, 2 µl por pocillo del gel, para dar densidad a las muestras y visualizarlas en el mismo. En cada gel se incluyeron marcadores de tamaño (1 Kb Plus DNA ladder, Invitrogen) en el rango de 100 pb a 12 Kb.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE mediante la aplicación de un diferencial de potencial de entre 1 y 5 V/cm y se detuvo cuando el frente de avance, marcado por el azul de bromofenol, se aproximó a final del gel.

Tampón	Composición
Tampón TAE 50X	57 ml de ácido acético glacial, 100ml de EDTA 0,5 M pH 8, 242 g de Tris base y agua destilada hasta 1 litro.
Tampón de carga	12,5 mg de azul de bromofenol (0,025%), 25 ml de glicerol y agua destilada hasta 50 ml.

Tabla 9.- Composición de los tampones utilizados para las electroforesis en geles de agarosa.

7.5. Semicuantificación

Para el análisis densitométrico, los geles se fotografiaron usando el sistema Uvitec (Witel LTD), que consta de un transiluminador con luz UV, cámara fotográfica digital y analizador de imagen, que permite guardar la imagen para posterior análisis. La intensidad de las bandas fue analizada usando el programa Quantity One (BioRad). La estimación de los niveles de expresión de los genes de interés fue expresada como la expresión relativa respecto a la del gen de la β -actina usando la siguiente fórmula (Sigh J. *et al* 2004):

$$\text{Expresión relativa} = (\text{densidad del gen muestra} - \text{densidad del fondo}) / (\text{densidad de la muestra de } \beta\text{-actina} - \text{densidad del fondo})$$

7.6. PCR en tiempo real

La cuantificación de la expresión génica, a partir del cDNA obtenido de los transcritos de los genes a estudiar, se ha analizado mediante q-PCR, usando como marcador fluorescente SYBR Green, un fluoróforo que aumenta su intensidad de fluorescencia al unirse a DNA bicatenario (Wittwer, 1997). Un esquema del proceso en el que se fundamenta esta metodología se muestra en la Fig. 22. Para este estudio se utilizó el termociclador de tiempo real ABI 7000 (Applied Biosystems) del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León.

Para el análisis del producto, se analiza la curva de amplificación, la cual está constituida por al menos tres fases distintas: fase de latencia donde la acumulación del producto no se puede detectar, fase exponencial y fase de saturación.

El número de copias de la diana al inicio de la reacción se puede cuantificar con gran precisión a través de ciclo umbral (Ct). El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento significativo de la fluorescencia con respecto a la señal base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de las moléculas molde. De esta manera, utilizando muestras patrón que contienen diluciones seriadas de concentraciones conocidas de la diana, se construye una recta de calibración que relaciona los Ct con el logaritmo de la cantidad inicial de molde.

Fig. 22.- Representación esquemática del proceso de amplificación con SYBR Green para la detección de la amplificación por PCR a tiempo real. Durante el anillamiento las moléculas de SYBR Green se unen a la cadena doble de DNA emitiendo fluorescencia.

La eficiencia de la reacción también se puede calcular a partir de los Ct de los patrones. Para analizar cambios relativos en la cantidad del transcrito se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión en los tratamientos a analizar, en este caso β -actina. Comparando los Ct del gen de referencia con el gen a estudiar en nuestras muestras tratadas y sin tratar, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema.

No obstante el Sybr Green no es específico en el reconocimiento del DNA, por lo que cuantifica todas las moléculas de DNA bicatenario presentes en la PCR, incluidos los productos de PCR no específicos y los dímeros de los cebadores. Para solventar este problema se analiza la curva de disociación o de fusión (melting) que se obtiene tras la reacción de amplificación, representa la dependencia de la fluorescencia de la temperatura. Al aumentar la temperatura las dos cadenas de DNA se separan y disminuye la fluorescencia. La derivada de la curva de fusión nos muestra un pico máximo en la curva donde la fluorescencia desciende bruscamente que se corresponde con la T_m o temperatura de fusión o melting del producto. La curva de disociación nos permite confirmar si tenemos un solo producto de amplificación o varios en el caso de detectar varios picos con T_m diferentes, dado que cada DNA bicatenario tiene una temperatura de fusión específica.

En este trabajo se utilizó el kit Brilliant® Sybr® Green QPCR Master Mix (Stratagene) para q-PCR, que se preparó para cada muestra como se indica en la Tabla 10.

	Concentración stock	Volumen añadido
2X Master Mix Syber Green	2X	12,5 µl
Cebador 5'	10 µM	0,5 µl
Cebador 3'	10 µM	0,5 µl
Colorante de referencia	(1:50)	0,375 µl
cDNA	(1:10)	2 µl
Agua estéril		Hasta 25 µl

Tabla 10.- Formulación general de la mezcla de reacción para las PCRs

Los cebadores usados fueron los mismos que los empleados para la RT-PCR exceptuando los de los genes β -actina, Mx-1, TNF- α 1, iNOS y MHC-II β que se diseñaron de nuevo o se cambiaron por otros y el de Arginasa que se incluyó para los análisis de PCR a tiempo real, para generar un producto de menor tamaño y aumentar la eficiencia en la q-PCR. Las secuencias de los oligonucleótidos y los tamaños de los amplicones se muestran en la Tabla 11.

El protocolo general seguido de amplificación de la q-PCR a tiempo real fue el indicado en la Tabla 12. Al final de cada PCR, se realizó un ciclo para determinar la curva de disociación ("melting") que permite determinar si se ha producido la amplificación de un único amplicón o de varios, o si se han formado dímeros de los cebadores, es decir, confirmar la especificidad de la PCR.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño del amplicón	Referencia
β -actina	Bact - F	ATGGAAGGTGAAATCGCC	260 pb	Lindenstrøm <i>et al.</i> (2004)
	Bact - R	TGCCAGATCTTCTCCATG		
TNF- α 1	TNF-1a F	AGCATGGAAGACCGTCAACGAT	131 pb	Purcell <i>et al.</i> (2004)
	TNF-1a R	ACCCTCTAAATGGATGGCTGCTT		
Mx-1	Mx-1 F	GGTTGTGCCATGCAACGTT	102 pb	Purcell <i>et al.</i> (2004)
	Mx-1 R	GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT		
iNOS	iNOS-F	CCAACCATGCACATCAAAAGTT	98 pb	Fierro. C. (2007)
	iNOS-R	CCTGAGGTAGGATTCAAGAGTA GAAA		
Arginasa 2	Arginase F	TGGGAGCCGGACACACTAC	68 pb	Fierro. C. (2007)
	Arginase R	GCCTTCCACTGAACCAATGG		
MHC-II β	ONMY-F	GTCGATGCCAATTGCCTTCTA	84 pb	Fierro. C. (2006)
	ONMY-R	ACCGATGTTCAAAATATCCATCT GT		

Tabla 11.- Oligonucleótidos usados como cebadores para q-PCR.

Ciclos	Duración ciclos	Temperatura
1	10 min	95 °C
35	0,15 seg	95 °C
	0,30 seg	55 °C
	0,30 seg	72 °C
Curva de disociación		

Tabla 12.- Condiciones generales utilizadas para los estudios de q-PCR.

7.7. Análisis cuantitativo

Para cada ensayo experimental, las q-PCRs se llevaron a cabo por triplicado. Para determinar los niveles de expresión relativa de los genes candidatos se ha empleado el método de Pfaffl (2001) para obtener la expresión relativa de los genes candidatos en comparación con la expresión del gen de la β -actina. Para ello, se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{muestra}}^{\Delta Ct_{\text{muestra}} (\text{control- muestra})}}{E_{\beta\text{-actina}}^{\Delta Ct_{\beta\text{-actina}} (\text{control- muestra})}}$$

Donde Ct es el número de “ciclo umbral” necesario para que se produzca un aumento significativo de la fluorescencia con respecto a la señal base. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de las moléculas molde. ΔCt es igual al valor de Ct obtenido en la muestra control menos el valor de Ct para la muestra tratada con el inmunoestimulante a analizar.

La eficiencia de amplificación fue determinada para cada cebador usando diluciones seriadas (1, 10, 100 y 1000) de una mezcla de alícuotas de todos los cDNAs obtenidos de las muestras control y de las experimentales expuestas a los inmunoestimulantes a 4 y 24 horas. La eficiencia fue calculada como $E = 10^{(-1/m)}$ donde la pendiente (m) se genera a partir de las diluciones seriadas cuando representamos el logaritmo de las concentraciones de los cDNA diluidos frente a los Ct obtenidos para los mismos (un ejemplo de este cálculo se muestra en la Fig. 23). En el Anexo I se muestran la gráficas correspondientes al cálculo de las eficiencias de todos los cebadores usados en este trabajo.

Fig. 23.- Eficiencia de la reacción de q-PCR para la β -actina en la línea TPS-2. A la derecha se muestran las curvas de amplificación con las diluciones seriadas de cDNA, mientras que el panel izquierdo presenta la representación lineal del logaritmo de las diluciones frente al valor de Ct.

Las diferencias significativas en la expresión de los genes entre los diferentes tratamientos con los inmunoestimulantes y los controles fueron analizadas mediante un test de ANOVA considerándose significativas para $p < 0,01$.

Resultados

1. Cultivo de macrófagos

Con el fin de optimizar los ensayos con cultivos primarios de macrófagos de pronefros, se determinó el número de células adherentes al plástico tras 24 horas (día 1) y a 2, 3, 4 y 5 días de cultivo, tras eliminar la población celular no adherente con cada cambio de medio. El número de macrófagos se estimó mediante la técnica de lisis seguida de tinción de núcleos (ver Material y Métodos, apartado 4.2).

La Fig. 24 muestra los resultados de un ensayo típico de aislamiento y cultivo primario de macrófagos de pronefros. A las 24 horas de incubación se observó una media de 5×10^5 células adherentes por pocillo, lo que representa aproximadamente un 25% del total de la población sembrada inicialmente (2×10^6 cél./pocillo). El número de células adherentes decreció de forma estadísticamente significativa, en comparación con el día 1, a partir del día tres de cultivo (Fig. 24). Por tanto, para estandarizar los diferentes ensayos subsiguientes, se utilizaron únicamente cultivos primarios de macrófagos incubados como máximo durante dos días.

Fig. 24.- Gráfica representativa del número de células adherentes por pocillo en un ensayo de aislamiento y cultivo primario de macrófagos de pronefros, a diferentes días de cultivo. Cada punto representa la media aritmética de cuatro pocillos y las barras la desviación estándar. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al valor obtenido el día 1.

2. Ensayo de fagocitosis

Se estudió el efecto de los distintos inmunoestimulantes sobre la actividad fagocítica de las líneas celulares y de macrófagos de pronefros, usando un ensayo de fagocitosis de partículas fluorescentes (Material y Métodos, apartado 6.2).

Los resultados demostraron que en términos absolutos la capacidad fagocítica de los macrófagos, determinada por la intensidad de la fluorescencia, era mucho mayor que la de las líneas celulares TSS y TPS-2, en cualquier condición experimental (Fig. 25a).

Fig. 25.- Representación gráfica de los resultados obtenidos en un experimento representativo del ensayo para analizar la actividad fagocítica de las líneas celulares TSS y TPS-2 y de macrófagos. **a)** Capacidad fagocítica absoluta de células control o expuestas a las diferentes dosis de los inmunoestimulantes. **b)** Índices de fagocitosis obtenidos respecto al control tras la exposición a los inmunoestimulantes. Cada columna representa la media aritmética de 3 pocillos más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

No obstante, en términos de activación tras la exposición a los inmunoestimulantes, determinada como el índice de fagocitosis frente a los respectivos controles, estas últimas mostraban una respuesta más elevada que los macrófagos (Fig. 25b). Ambas líneas celulares mostraron valores mayores de estimulación, con diferencias estadísticamente significativas, tras la exposición a las dosis más altas de Poly I:C, seguidos de los obtenidos para la dosis de 50 µg/ml de LPS. La línea celular TSS también mostró una fuerte activación de la fagocitosis tras la exposición a 5 µg/ml de Levamisol.

Como ya se ha indicado, los macrófagos presentaron valores de estimulación de la fagocitosis mucho menores que las líneas celulares (Fig. 25b) y se observaron diferencias significativas para incrementos en la estimulación tras la exposición a las dosis mayores de Poly I:C y de LPS.

La tabla 13 muestra un resumen cualitativo de las respuestas de fagocitosis de las líneas celulares y de los macrófagos a los inmunoestimulantes.

Activación de la fagocitosis							
TSS	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 25 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml
TPS-2	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml
Mac	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml

Tabla 13.- Efecto de los inmunoestimulantes sobre la fagocitosis ordenado por grado de acción.

3. Análisis del estallido respiratorio

3.1. Detección intracelular de O_2^- . Método del NBT

Se realizaron dos tipos de ensayos:

- Estimulación-detección simultánea (que se denominarán ensayos “simultáneos”): se realizó una incubación durante una hora de los inmunoestimulantes junto con el reactivo de detección de la producción de O_2^- (NBT).
- Estimulación seguida de detección (que se denominarán ensayos “preincubados”): las células se incubaron previamente con los inmunoestimulantes durante una hora, tras lo cual se retiraron los inmunoestimulantes y se incubó con la solución de NBT durante otra hora.

Los resultados obtenidos se describen a continuación.

A- Ensayos simultáneos

Tras una hora de incubación con cualquiera de los inmunoestimulantes todos los tipos celulares mostraron incrementos del índice de estimulación del estallido respiratorio (Figs. 26a, b y c).

En las líneas celulares TSS y TPS-2 se observó un patrón de respuesta semejante. Las dosis más bajas de LPS y Levamisol inducían índices de estimulación mayores, con diferencias estadísticamente significativas, que las dosis más altas (Figs. 26 a y b). Tras la estimulación con Poly I:C se observó una clara relación dosis/respuesta creciente y el índice de estimulación más elevado se obtuvo en ambas líneas tras la exposición a la dosis más alta de Poly I:C (Figs. 26 a y b).

En la línea TPS-2 los índices de estimulación mostraron diferencias estadísticamente significativas mayores que para la línea TSS y los macrófagos frente a todos los inmunoestimulantes. Además, la línea TPS-2 fue la única que tras ser estimulada con 25 µg/ml de Levamisol produjo una respuesta significativa.

El patrón de respuesta de los macrófagos frente a los inmunoestimulantes fue similar al descrito para las líneas celulares, pero los valores máximos de índices de estimulación fueron sensiblemente menores (Fig. 26c). En términos absolutos, no obstante, los macrófagos, tanto control como estimulados, mostraron valores mucho mayores de reducción de NBT (hasta 4 veces más) que las líneas celulares (datos no mostrados), aunque el aumento de estos valores tras la inmunoestimulación fue menor.

La tabla 14 muestra un resumen cualitativo de las respuestas de las líneas celulares y de los macrófagos a los inmunoestimulantes.

<u>Detección intracelular O_2^- Simultáneo</u>							
TSS	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 25 µg/ml
TPS-2	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml
Mac	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml

Tabla 14.- Efecto de los inmunoestimulantes sobre la reducción del NBT ordenado por grado de acción, en los ensayos simultáneos.

B- Ensayos preincubados

En general, para las líneas celulares los índices de estimulación del estallido respiratorio fueron menores en estos ensayos que en los ensayos simultáneos, sobre todo para la línea TSS (Fig. 26a). En esta línea celular sólo las respuestas frente a las dosis de 25 µg/ml de Levamisol y de 50 µg/ml de Poly I:C mostraron diferencias estadísticamente significativas frente a los controles (Fig. 26a).

Por su parte, la línea TPS-2 mostró índices de estimulación con diferencias estadísticamente significativas frente a los controles para las diferentes dosis de los inmunoestimulantes, excepto frente a 5 µg/ml de LPS, pero siempre menores que en los ensayos simultáneos (Fig. 26b).

En los cultivos de macrófagos, los índices de estimulación fueron mayores en estos ensayos tras una hora de preincubación que en los simultáneos frente a LPS y a Levamisol, mientras que para las dosis de Poly I:C fueron menores (Fig. 26c). La inmunoestimulación con Poly I:C en los ensayos preincubados produjo un patrón de respuesta con pocas diferencias entre las diferentes dosis, no siendo evidente el efecto dosis/respuesta que se observaba en los ensayos simultáneos (Fig. 26 a,b y c).

La tabla 15 muestra un resumen cualitativo de las respuestas de las líneas celulares y de los macrófagos a los inmunoestimulantes.

Detección intracelular O ₂ ⁻ Preincubado							
TSS	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 5 µg/ml
TPS-2	Poly I:C 50µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Levan 25 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 5 µg/ml
Mac	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml

Tabla 15.- Efecto de los inmunoestimulantes sobre la reducción del NBT ordenado por grado de acción.

Fig. 26.- Representación del efecto de las diferentes dosis de los inmunoestimulantes para los ensayos de reducción de NBT en: la línea celular TSS (a) en la línea celular TPS-2 (b) y en cultivo de macrófagos (c). Mostrado en la gráfica como índices de estimulación obtenidos para los ensayos simultáneos y preincubados. Cada columna representa la media aritmética de 8 pocillos más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. La existencia de diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las distintas dosis de un mismo inmunoestimulante se indican mediante las letras: a y b para LPS; c y d para Levamisol; e, f y g para Poly I:C. Para cada tratamiento, las columnas que comparten letras no presentan diferencias significativas.

3.2. Detección extracelular de O_2^- . Método del ferrocitocromo C

Como control de la especificidad del ensayo se utilizó SOD cuya presencia en el medio de incubación provocó una inhibición del 100% en la reducción del ferrocitocromo C en todos los casos.

Tras la exposición a las diferentes dosis de todos los inmunoestimulantes, se observó reducción del ferrocitocromo C para cualquiera de los tipos celulares ensayados, aunque la cinética de la producción de O_2^- era diferente según el tipo celular (Figs. 27, 28 y 29). Así, para cualquiera de los inmunoestimulantes, aunque con diferencias entre ellos, los valores máximos de índices de estimulación se alcanzaban más tardíamente para las líneas celulares (entre los 10 y 30 minutos para TPS-2 y los 30-35 minutos para TSS) que para los macrófagos (entre 10 y 15 minutos) y la respuesta era más sostenida.

Para facilitar las comparaciones, en la Fig. 30 se muestran los máximos valores de índices de estimulación alcanzados por las líneas celulares y los macrófagos en respuesta a los inmunoestimulantes, independientemente de los tiempos a los que se observaron.

En la línea TSS los valores máximos de índices de estimulación se alcanzaron entre los 30-35 minutos, independientemente de la dosis (Fig. 27a), siendo el más alto el observado para el Poly I:C 100 (Fig. 30a). La estimulación con Levamisol indujo valores de índices de estimulación moderados, con valores máximos para Levamisol 5 (Fig. 30a), aunque sin diferencias entre las dos dosis en cuanto al momento (30 min) en el que se alcanzaban (Fig. 27b). Para las dosis de Poly I:C se observó efecto dosis/respuesta (Fig. 30a) donde los picos de respuesta para las dosis más bajas se detectaron entre los 25 y 30 minutos (Fig. 27c) y entre los 30 - 35 min para la dosis más alta (Fig. 27c).

Para la línea TPS-2 las magnitudes de los índices de estimulación fueron semejantes a los encontrados para la línea TSS. El valor más alto se encontró en respuesta a la estimulación con el LPS 50 (Fig. 30b), con un pico a los 30 minutos, mientras que para la dosis inferior (5 μ g/ml) se alcanzaba a los 20 minutos (Fig. 28a). Tras la estimulación con Levamisol, el valor más alto se encontró para Leva 25, a los 10 minutos, momento que se retrasaba a los 20 minutos para el Leva 5 (Fig. 28b). En cuanto a las repuestas a la estimulación con Poly I:C, las dosis más altas indujeron respuestas más altas y rápidas, con picos a los 10 minutos, que la dosis de 1 μ g/ml (Figs. 28c y 30b).

Como en los ensayos de detección de O_2^- intracelular (con NBT), la respuesta de los macrófagos medida como valores de densidad óptica era del orden de medio punto superior que la observada en las líneas celulares (datos no mostrados), pero en términos de índices de estimulación los macrófagos presentaron valores inferiores que las líneas celulares (Fig. 30c). Además, los cultivos control de macrófagos presentaron valores iniciales de reducción del cromóforo más elevados que los de las líneas celulares.

En los macrófagos las dosis de LPS produjeron índices de estimulación con valores máximos muy semejantes, ligeramente mayor para la dosis más alta (Fig. 30c) entre los 5 y 10 minutos (Fig. 29a). La estimulación con las diferentes dosis de Levamisol también indujo valores semejantes para ambas dosis (Fig. 30c), alcanzándose antes (10 minutos) el pico para la dosis más alta (Fig. 29b). En las respuestas a Poly I:C se observaron valores máximos entre los 5 y 10 minutos para todas las dosis (Fig. 29c), con valores ligeramente más altos para la dosis de 100 µg / ml (Fig. 30c).

La tabla 16 muestra un resumen cualitativo de las respuestas de reducción de citocromo C de las líneas celulares y de los macrófagos a los inmunoestimulantes.

<u>Reducción</u> <u>Ferrocitocromo C</u>							
TSS	Poly I:C 100µg/ml	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	Leva 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml
TPS-2	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 25 µg/ml	Leva 5 µg/ml
Mac	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 50µg/ml	Leva 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml

Tabla 16.- Efecto de los inmunoestimulantes sobre la reducción del ferrocitocromo C ordenado por grado de acción.

Fig.27.- Cinética de la reducción del Ferrocitocromo C observada para la línea celular TSS, representada como índices de estimulación obtenidos para las diferentes dosis de los inmunostimulantes cada cinco minutos hasta una hora tras la exposición. Cada punto representa la media aritmética de 4 pocillos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * P < 0,05, ** P < 0,01.

Fig.28.- Cinética de la reducción del Ferrocitocromo C observada para la línea celular TPS-2, representada como índices de estimulación obtenidos para las diferentes dosis de los inmunostimulantes cada cinco minutos hasta una hora tras la exposición. Cada punto representa la media aritmética de 4 pocillos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * P < 0,05, ** P < 0,01.

Fig.29.- Cinética de la reducción del ferrocitocromo C observada para los cultivos de macrófagos, representada como índices de estimulación obtenidos para las diferentes dosis de los inmunostimulantes cada cinco minutos hasta una hora tras la exposición. Cada punto representa la media aritmética de 4 pocillos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * P < 0,05, ** P < 0,01.

Fig. 30.- Reducción del ferrocitocromo C representado como valores máximos de los índices de estimulación obtenidos tras la exposición de las líneas celulares TSS (a) y TPS-2 (b) y macrófagos (c) a las diferentes dosis de los inmunostimulantes durante una hora. Cada columna representa la media aritmética de 4 pocillos más la desviación estándar. La existencia de diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las distintas dosis de un mismo inmunostimulante se indican mediante las letras: a y b para LPS; c y d Levamisol; e, f y g para Poly I:C. Para cada tratamiento, las columnas que comparten letras no presentan diferencias significativas.

3.3. Detección de la respuesta de las líneas celulares a citoquinas

Estos ensayos se realizaron para demostrar la capacidad de las líneas celulares TSS y TPS-2 de responder a citoquinas liberadas por macrófagos.

Para ello, como se ha descrito en Material y Métodos, células de dichas líneas se expusieron a sobrenadantes condicionados (S.C.), o a las diluciones 1:2 o 1:10 de ellos, obtenidos de cultivos de macrófagos estimulados con diferentes dosis de Levamisol (5 y 25 $\mu\text{g/ml}$: “S.C._{Leva5}” y “S.C._{Leva25}”) o de Poly I:C (1 y 100 $\mu\text{g/ml}$: abreviadamente “S.C._{Poly1}” y “S.C._{Poly100}”), como se ha descrito anteriormente. Además de las líneas celulares, como testigos de la presencia de citoquinas en los sobrenadantes se usaron cultivos primarios de macrófagos que fueron expuestos a los mismos sobrenadantes condicionados.

Las respuestas a la exposición a los sobrenadantes se analizaron como activación del estallido respiratorio mediante los métodos de NBT (producción de ROS intracelular) y ferrocitocromo C (producción de ROS extracelular), usando la exposición directa a LPS (50 $\mu\text{g/ml}$) como referencia y control positivo del ensayo.

A- Método del NBT

Tras una hora de incubación de las células con cualquiera de las diluciones de los sobrenadantes condicionados, junto con el NBT, se observó un incremento del estallido respiratorio en los macrófagos y en las líneas celulares (Fig. 31).

En los cultivos de macrófagos, usados como testigos de la presencia de citoquinas en los sobrenadantes, se observaron índices de estimulación que tendían a ajustarse a un modelo dosis/respuesta, positivos para los sobrenadantes condicionados por Levamisol (Fig. 31a) y negativos para los condicionados por Poly I:C (Fig. 31b). La exposición a los S.C. por Levamisol indujo respuestas que estaban en el rango de las observadas para el LPS, más altas en el caso del S.C._{Leva5} sin diluir (Fig. 31a). Por el contrario, todas las diluciones de los S.C. por Poly I:C indujeron índices de estimulación menores que la exposición a LPS (Fig. 31b).

Para ambas líneas celulares, la exposición a los S.C. por Levamisol indujo índices de estimulación que tendían a ajustarse a un modelo dosis/respuesta positivo (Figs. 31c-e). Las mejores respuestas, aunque con diferentes magnitudes, se encontraron en las células expuestas a S.C._{Leva5} sin diluir (Figs. 31c-e). Tras la exposición a los S.C. por Poly I:C se observaron marcadas diferencias en las respuestas de ambas líneas celulares. En el caso de la línea TSS se mantuvo la relación dosis/respuesta positiva, con valores máximos, correspondientes a los sobrenadantes sin diluir, que superaban a los inducidos por LPS (Fig. 31d). Por el contrario, en las células TPS-2 los sobrenadantes sin diluir, tanto S.C._{Poly1} como S.C._{Poly100}, produjeron una inhibición de la respuesta en comparación con la observada para la estimulación con LPS (Fig. 31f).

Fig. 31.- Ensayo del estallido respiratorio, medido por la reducción de NBT, de cultivos primarios de macrófagos y de las líneas celulares TSS y TPS-2 en respuesta a la exposición a medios condicionados procedentes de macrófagos estimulados con Levamisol (S.C.-Leva5 y S.C.-Leva25, figs. a, c y e) o con Poly I:C (S.C.-Poly1 y S.C.-Poly100, figs. b, d y f). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

B- Método del ferrocitocromo

La exposición a las diferentes diluciones de los sobrenadantes condicionados por Levamisol o por Poly I:C indujo la activación del estallido respiratorio, con liberación de ROS extracelular demostrado por la reducción del ferrocitocromo C, tanto para las líneas celulares TSS y TPS-2, como para los cultivos de macrófagos. Las cinéticas de las respuestas de los macrófagos, usados como testigos de la presencia de citoquinas, y de las líneas celulares se muestran en la Fig. 32. La especificidad de la reacción se demostró usando SOD, que provocó en todos los ensayos la inhibición total de la reducción del ferrocitocromo C.

Para facilitar las comparaciones, la Fig. 33 muestra los máximos valores de índices de estimulación observados para los macrófagos y las líneas celulares en respuesta a los sobrenadantes condicionados, independientemente de los tiempos a los que se observaron.

Fig. 32.- Cinéticas de la reducción del ferrocitocromo C, representadas como índices de estimulación obtenidos tras la exposición de cultivos de macrófagos y de las líneas celulares TSS y TPS-2 a los diferentes sobrenadantes condicionados, medidos cada cinco minutos hasta una hora. Cada punto representa la media aritmética de 4 pocillos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * P < 0,05, ** P < 0,01. (Las gráficas continúan en la página siguiente).

Fig. 32.- Cont.

En general, en el estudio cinético se observó que el índice de estimulación aumentaba con el tiempo, encontrándose los valores máximos entre los 45 y 60 minutos en la mayoría de las condiciones, excepto para las respuestas de macrófagos a la dilución 1:10 de S.C._{Poly1} y de S.C._{Poly100} (Fig. 32c), y de la línea TSS a S.C._{Poly1} sin diluir (Fig. 32g), en las que los picos de las respuestas se produjeron a tiempos más cortos (5-10 minutos).

En los cultivos de macrófagos expuestos a S.C. por Levamisol se observó que solamente la exposición a las diluciones 1:2 de S.C._{Leva5} y de S.C._{Leva25} inducían índices de estimulación más altos que los observados para la exposición a LPS (Fig. 33a). Los sobrenadantes condicionados sin diluir produjeron una inhibición estadísticamente significativa de la respuesta respecto de los valores más altos, inducidos por la dilución 1:2 (Fig. 33a), pero con cinéticas de respuesta semejantes (Figs. 32 a, b).

En los ensayos de exposición de macrófagos a S.C. por Poly I:C los valores de índices de estimulación fueron similares a los observados para la respuesta a LPS. Los valores más altos se encontraron para las diluciones 1:2 y 1:10 de S.C._{Poly1} (Fig. 33b). No se observaron diferencias en las respuestas a las distintas diluciones de S.C._{Poly100} (Fig. 33b). En cuanto a las cinéticas de las respuestas, las diluciones 1:10 de S.C._{Poly1} y de S.C._{Poly100} indujeron picos de respuesta a tiempos cortos, mientras que para ambos tipos de S.C. sin diluir la respuesta era inicialmente inhibitoria y sólo a partir de los 40 minutos se apreciaba estimulación (Figs. 32c, d).

Para la línea TSS la respuesta a S.C. por Levamisol mostró un perfil tipo dosis/respuesta positivo, con un valor máximo para la exposición a S.C._{Leva 25} sin diluir (Fig. 33c), que se alcanzó a los 60 minutos (Fig. 32f). Para las diluciones 1:2 y 1:10 de los S.C._{Leva5} y de S.C._{Leva25} los picos se alcanzaban más tempranamente, observándose a continuación un agotamiento de las respuestas (Figs. 32e, f). Sólo se obtuvieron índices de estimulación más altos que los observados para la exposición a LPS en el caso de los S.C. sin diluir.

Para las respuestas de la línea TSS a la exposición a S.C. por Poly I:C también se observó un efecto dosis/respuesta positivo, con valores máximos para los sobrenadantes sin diluir, que superaban a los obtenidos por la exposición a LPS (Fig. 33d). El pico de respuesta a la exposición a S.C._{Poly1} no diluido se encontró a los 5 -10 minutos, mientras que para todos los demás casos de exposición a S.C. por Poly I:C se produjeron más tardíamente (Figs. 32g, h)

En cuanto a valores de índices de estimulación, las respuestas de la línea TPS-2 a los S.C. por Levamisol (Fig. 33e) se asemejaron a las descritas para la TSS, con un claro efecto dosis/respuesta positivo. Igualmente, los valores máximos de índices de estimulación, que correspondían a los S.C. sin diluir, superaban a los obtenidos para la exposición a LPS. En cuanto a la cinética de las respuestas, los valores se incrementaban

continuamente a lo largo del tiempo, con un notable retraso en alcanzar valores positivos de estimulación en el caso de las diluciones 1:10, tanto de S.C._{Leva5} como de S.C._{Leva25}. (Figs. 32i, j)

Respecto a las respuestas de la línea TPS-2 a la exposición a S.C. con Poly I:C no se apreció un efecto dosis/respuesta, puesto que los índices de estimulación máximos obtenidos para los S.C._{Poly1} y S.C._{Poly100} no diluidos fueron inferiores a los observados con las diluciones 1:2 y 1:10 de ambos tipos de S.C. Además, los S.C. sin diluir produjeron respuestas más pequeñas que las obtenidas frente a LPS (Fig. 33g) y el estudio de sus cinéticas demostró que eran inicialmente inhibitorias, de forma que sólo a partir de los 35-45 minutos se apreciaba estimulación (Figs. 32 k, l). Por el contrario, las diluciones 1:2 y 1:10 de S.C._{Poly1} y S.C._{Poly100} indujeron índices de estimulación más elevados que los obtenidos para el LPS (Fig. 33g), que se elevaron continuamente a lo largo del tiempo (Figs. 32 k, l).

Reducción del Ferrocitocromo C

Fig. 33.- Reducción del ferrocitocromo C representado como valores máximos de los índices de estimulación obtenidos con los diferentes sobrenadantes condicionados en cultivo de macrófagos y en el cultivo de la líneas celulares TSS y TPS-2 durante una hora. Cada columna representa la media aritmética de 4 pocillos más la desviación estándar. La existencia de diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las respuestas a las distintas diluciones de los S.C. se indican mediante letras de forma que las columnas que comparten letras no presentan diferencias significativas entre si.

3.4. Detección de la producción de óxido nítrico

A- Detección intracelular

Se llevó a cabo mediante la detección fluorimétrica de NO intracelular usando un kit comercial que contiene un fluoróforo que reacciona con el NO formando un producto fluorescente que permanece intracelular (ver Material y Métodos). El ensayo fue realizado a 1, 8 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes.

Como controles positivos de los ensayos se utilizaron células estimuladas con forbol 12 miristato 13 acetato (PMA). También, se utilizaron dos tipos de controles negativos: uno para el kit en el que se omitía el fluoróforo, y otro para la especificidad de la respuesta usando DPI, un inhibidor específico del enzima óxido nítrico sintasa.

La estimulación con PMA indujo en ambas líneas celulares (Fig. 34a y b) y en los macrófagos (Fig. 34c) índices de estimulación muy bajos. La especificidad del kit para detectar la producción de NO quedó de manifiesto por la inhibición de las respuestas en los cultivos a los que se añadió inhibidor específico DPI (Fig. 34).

En cuanto a la cinética de las respuestas tras la exposición a los inmunoestimulantes, se observó un patrón similar para las líneas celulares TSS y TPS-2, de forma que los máximos índices de estimulación se detectaron a tiempos tempranos, mientras que tras 24 horas la detección fue mucho menor y no significativa (Figs. 34a, b). Por el contrario para los macrófagos los índice de estimulación más elevados se producían a tiempos más tardíos (Fig. 34c).

Respecto al efecto de las diferentes dosis de los inmunoestimulantes, en las líneas TSS y TPS-2 la estimulación con 50 µg/ml de LPS, 25 µg/ml de Levamisol y 100 µg/ml de Poly I:C indujeron los índices de estimulación con valores más elevados (Fig. 34a, b). En macrófagos se observó que las dosis de 25 µg/ml de Levamisol y de 1 µg/ml de Poly I:C producían respuestas crecientes en el tiempo (Fig. 34c) y el mayor índice de estimulación se obtuvo tras la exposición a 50 µg/ml de LPS, a las 8 y 24 horas (Fig. 34c).

Las tablas 17a-c muestran un resumen cualitativo de las respuestas de producción intracelular de NO de las líneas celulares y de los macrófagos tras la exposición a los inmunoestimulantes.

B- Detección extracelular por el método de Griess

La detección extracelular de producción de NO fue medida por el método indirecto de Griess (ver Material y Métodos), que cuantifica la concentración de nitritos en los sobrenadantes. Como controles positivos de los ensayos se utilizaron células estimuladas con PMA. Los controles negativos consistieron en células tratadas con DPI.

Tanto la exposición a PMA, como a algunas de las dosis de los diferentes inmunoestimulantes, indujo índices de estimulación positivos en ambas líneas celulares y en los macrófagos (Fig. 35), aunque las concentraciones de nitritos (datos no mostrados) fueron siempre muy bajas, con valores máximos de 9 μ M para las líneas celulares y de 5 μ M para los macrófagos. Como el estudio anterior, la especificidad de la respuesta se puso de manifiesto por su inhibición en los testigos negativos (no mostrado en las gráficas).

La cinética de las respuestas fue variable, dependiendo del tipo celular y del inmunoestimulante, aunque, en general, los picos de respuesta aparecían a las 8 y 24 horas tras la estimulación, tanto en las líneas celulares como en los macrófagos (Fig. 35).

En ambas líneas celulares los índices de estimulación más elevados, con diferencias estadísticamente significativas frente a los controles, se produjeron tras la exposición durante 24 horas a la dosis de 100 μ g/ml de Poly I:C (Figs. 35a, b). En los macrófagos esta mayor respuesta, estadísticamente significativa, se produjo tras 8 horas de estimulación con 5 μ g/ml de Levamisol (Fig. 35c).

Las tablas 18a-c muestran un resumen cualitativo de las respuestas de producción extracelular de NO de las líneas celulares y de los macrófagos tras la exposición a los inmunoestimulantes.

Fig. 34.- Detección fluorométrica de NO intracelular tras 1, 8 y 24 horas de estimulación. Se representan los índices de estimulación obtenidos tras la exposición de las líneas celulares TSS (a) TPS-2 (b) y macrófagos (c) a los diferentes inmunoestimulantes. Como controles positivos de los ensayos se utilizaron células estimuladas con PMA. Se usaron dos tipos de controles negativos: uno para el propio ensayo, en el que se omitía el fluoróforo, y otro para la especificidad de la respuesta celular, usando el inhibidor DPI. Cada columna representa la media aritmética de 4 pocillos más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

a

<u>Detección Fluorométrica NO</u>							
TSS 1h	Poly I:C 100µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 25 µg/ml	PMA 1 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml
TSS 8h	Leva 25 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	PMA 1 µg/ml
TSS 24h	Poly I:C 100µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	PMA 1 µg/ml

b

<u>Detección Fluorométrica NO</u>							
TPS-2 1h	LPS 50 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	PMA 1 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml
TPS-2 8h	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 25 µg/ml	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	PMA 1 µg/ml	Leva 5 µg/ml
TPS-2 24h	Poly I:C 100µg/ml	Leva 25 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	PMA 1 µg/ml

c

<u>Detección Fluorométrica NO</u>							
Mac 1h	LPS 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 5 µg/ml	PMA 1 µg/ml
Mac 8h	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Leva 25 µg/ml	PMA 1 µg/ml
Mac 24h	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml	PMA 1 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml

Tabla 17.- Efecto de los inmunoestimulantes sobre la producción intracelular de NO ordenado por grado de acción, en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en cultivos de macrófagos (c).

Fig. 35.- Detección de nitritos extracelulares mediante el método de Griess. Se representan los índices de estimulación obtenidos tras la estimulación durante 1, 8 y 24 horas de las líneas celulares TSS (a) TPS-2 (b) y macrófagos (c) con los diferentes inmunoestimulantes. Como controles positivos de los ensayos se utilizaron células estimuladas con PMA. Cada columna representa la media aritmética de 4 pocillos más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

a	Detección de Nitritos (Griess)							
	TSS 1h	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 25 µg/ml	Leva 5 µg/ml	PMA 1 µg/ml
	TSS 8h	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	LPS 5 µg/ml	PMA 1 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml
	TSS 24h	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 25 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 50 µg/ml	LPS 5 µg/ml	PMA 1 µg/ml
b	Detección de Nitritos (Griess)							
	TPS-2 1h	LPS 5 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	PMA 1 µg/ml
	TPS-2 8h	Leva 5 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	PMA 1 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 25 µg/ml
	TPS-2 24h	Poly I:C 100µg/ml	PMA 1 µg/ml	Leva 25 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	LPS 50 µg/ml
c	Detección de Nitritos (Griess)							
	Mac 1h	LPS 50 µg/ml	Leva 25 µg/ml	Leva 5 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	PMA 1 µg/ml	LPS 5 µg/ml
	Mac 8h	Leva 5 µg/ml	PMA 1 µg/ml	LPS 50 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Leva 25 µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	LPS 5 µg/ml
	Mac 24h	PMA 1 µg/ml	Poly I:C 100µg/ml	Poly I:C 1µg/ml	Leva 25 µg/ml	LPS 5 µg/ml	Leva 5 µg/ml	LPS 5 µg/ml

Tabla 18.- Efecto de los inmunoestimulantes sobre la producción extracelular de NO ordenado por grado de acción, en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en cultivos de macrófagos (c).

4. Ensayos de expresión génica

Para el análisis de la expresión génica se emplearon dos métodos. Primero se realizó un análisis cinético de las respuestas (a 4, 8, 12 y 24 horas) mediante RT-PCR convencional y semicuantificación de las bandas de amplicones en geles de agarosa. Además, este estudio permitió optimizar los cebadores y poner a punto las condiciones de reacción. Posteriormente, se procedió a un análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), de las muestras recogidas a 4 y 24 h, para determinar con más precisión los cambios en los niveles de expresión entre los distintos tratamientos.

Los genes que se analizaron y los cebadores usados están indicados en las Tablas 5 y 11 de Material y Métodos. Los cambios en la expresión génica se determinaron como variaciones en relación a la expresión del gen para β -actina, que es constitutiva.

En estudio semicuantitativo los resultados se expresan como índices de expresión, que indican las variaciones observadas en la expresión génica en las células expuestas a los inmunoestimulantes respecto a la expresión en los controles (células no tratadas). En el estudio cuantitativo mediante qPCR los resultados se expresan como los cambios de las ratios de expresión del gen a estudiar / expresión del gen β -actina en las muestras experimentales frente a las muestras control, aplicando la fórmula indicada en Material y Métodos. Utilizando esta fórmula, dicha ratio en las muestras control (no tratadas) es uno (1).

4.1. Expresión del gen *IL-1 β*

Con los cebadores y condiciones de PCR usadas se obtuvieron amplificaciones específicas para los transcritos de este gen y se observó expresión basal del gen *IL-1 β* en los controles de todos los tipos celulares. A manera de ejemplo, la Fig. 36a muestra una imagen de las bandas de amplificación para transcritos de este gen y del de β -actina en un gel de agarosa, correspondiente a un ensayo para la línea TPS-2.

En el análisis semicuantitativo para la línea TSS (Fig. 36b) se observó que los mayores índices de expresión para el gen *IL-1 β* se producían tras la exposición a Poly I:C, alcanzando los valores máximos a las 8 horas y para la concentración más elevada de este inmunoestimulante. Para el resto de condiciones, los índices de expresión fueron bajos, situándose en el entorno de los observados para la estimulación con LPS, excepto tras la exposición a Poly I:C durante 4h, que eran algo más altos.

El estudio cuantitativo mediante qPCR en la línea TSS (Fig. 37a) demostró que los mayores incrementos de las ratios de expresión *IL-1 β* / β -actina frente a los controles se producían a las 4 horas tras la exposición a las dosis más elevadas de Poly I:C. Estos incrementos descendían notablemente a las 24 horas. Para el resto de los

inmunoestimulantes la técnica de qPCR no demostró cambios significativos en las ratios de expresión $IL-1\beta / \beta\text{-actina}$ respecto a los controles.

Fig. 36.- Estudio de la expresión semicuantitativa del gen $IL-1\beta$. **a.** Fotografía de un gel de agarosa mostrando las bandas de amplificación para los genes $IL-1\beta$ y $\beta\text{-actina}$ en la línea TPS-2, tras 4 horas de exposición a los inmunoestimulantes (C: control; L: LPS dosis 5 y 50 $\mu\text{g/ml}$; V: Levamisol 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$; P: Poly I:C 1, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$). **b-d.** Índices de estimulación de la expresión génica en las líneas TSS (b), TPS-2 (c) y macrófagos (d) tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes durante 4, 8, 12 y 24 horas, relativa a $\beta\text{-actina}$.
 ■ LPS 5 ■ LPS 50 ■ Leva 5 ■ Leva 25 ■ Poly 1 ■ Poly 50 ■ Poly 100

Para la línea TPS-2 (Fig. 36c) el estudio semicuantitativo indicó que los índices de expresión más elevados se producían tras la estimulación con LPS a las 12 h, seguidos por los correspondientes a Levamisol y Poly I:C, también a las 12 h. Al igual que en la línea TSS, se observó una respuesta más alta al Poly I:C que a LPS a las 4 h. En el resto de las condiciones, los índices de expresión fueron bajos.

El estudio mediante qPCR en las líneas TPS-2 (Fig. 37b) confirmó este patrón de respuesta, de forma que a las 4 horas se observó una respuesta moderada a ambas dosis de LPS y también a Levamisol (5 $\mu\text{g/ml}$). La respuesta a Poly I:C fue semejante a la descrita para la línea TSS y, como en ese caso, disminuía notablemente a las 24 horas para todas las condiciones experimentales.

El estudio semicuantitativo en los macrófagos (Fig. 36d) no reveló picos notables en los índices de expresión para ninguno de los inmunoestimulantes y los valores fueron en general más bajos que para las líneas celulares. Los valores más elevados se observaron a las 4, 12 y 24 horas tras la exposición a LPS y Poly I:C.

En los estudios de qPCR en los macrófagos destacó el mantenimiento de las respuestas a las 24 horas (Fig. 37c). En estas células los valores de las ratios de expresión $IL-1\beta / \beta\text{-actina}$ alcanzadas tras la exposición a LPS fueron mucho más elevadas que las observadas en las líneas celulares, mientras que las respuestas frente a las diversas concentraciones de Poly I:C fueron semejantes.

Fig. 37.- Cambios en las ratios de expresión IL1- β / β -actina frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunostimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * P < 0,05 ** P < 0,01.

4.2. Expresión del gen *IL-8*

Las condiciones de amplificación por PCR utilizadas permitieron la amplificación específica de los transcritos del gen *IL-8* y se observó expresión basal de dicho gen en los controles de las líneas celulares y de los cultivos de macrófagos, como se muestra en la Fig. 38a, correspondiente a un gel de agarosa procedente de un ensayo en cultivos de macrófagos tras 4 horas de exposición a los inmunoestimulantes.

En el análisis semicuantitativo para la expresión del gen *IL-8* en la línea TSS se observó que los índices de expresión más elevados se producían a las 12 horas para todos los inmunoestimulantes (Fig. 38b). El Poly I:C, sin diferencias significativas entre las diferentes dosis, indujo los mayores índices de expresión, seguidos de los observados tras la exposición a las dosis más altas de LPS y de Levamisol.

El estudio cuantitativo mediante qPCR en la línea TSS mostró que las ratios de expresión *IL-8* / β -actina más altas respecto a los controles se producían a las 4 horas tras la exposición a las dosis de 50 y 100 μ g/ml de Poly I:C (Fig. 39a). Para los otros inmunoestimulantes, sólo la dosis de 25 μ g/ml de Levamisol indujo un incremento significativo de la respuesta a las 24 horas.

Para la línea TPS-2, el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del gen *IL-8* no reveló cambios significativos respecto a los controles, independientemente del tipo de inmunoestimulante y del tiempo (Fig. 38c). Por el contrario, el análisis cuantitativo mediante qPCR en la línea TPS-2 demostró una marcada elevación de las ratios de expresión *IL-8* / β -actina tras 4 horas de estimulación con Poly I:C, que decaía

las 24 horas (Fig. 39b). No se observaron cambios significativos para ninguna de las dosis de los otros inmunoestimulantes.

Fig. 39.- Cambios en las ratios de expresión *IL8* / β -actina frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * P < 0,05 ** P < 0,01.

Los estudios semicuantitativos de expresión génica en los macrófagos demostraron una respuesta similar a la descrita para el gen IL-1 β , con picos de respuesta a las 4 y 12 tras la estimulación con las dosis más altas de Poly I:C y en menor grado, pero más elevada que en las líneas celulares, con LPS (Fig. 38d).

Los ensayos cuantitativos mediante qPCR demostraron un patrón de respuesta semejante al descrito en los estudios semicuantitativos, pero con cambios en las ratios de expresión *IL-8* / β -actina más evidentes (Fig. 39c). Así, los valores más elevados se produjeron tras 4 horas de exposición a las dosis más altas de Poly I:C, seguidas por los inducidos por la dosis de 50 μ g/ml de LPS. Todas las respuestas decayeron a las 24 horas.

4.3. Expresión del gen *TNF- α 1*

En los ensayos de expresión del gen *TNF- α 1* se observó expresión basal de dicho gen en todas las muestras procedentes de las líneas celulares y cultivos de macrófagos no tratados con los inmunoestimulantes. Como ejemplo, la Fig. 40a muestra la imagen de un gel de agarosa tras la electroforesis de los productos de amplificación por PCR para transcritos de este gen y del de β -actina, correspondiente a un ensayo en la línea celular TPS-2 tras 24 horas de estimulación, en el que se observa la especificidad de la amplificación usando los cebadores y condiciones descritas en Material y Métodos (Tabla 5).

Para aumentar la eficiencia de la reacción, el estudio de la expresión de este gen mediante PCR cuantitativa se realizó utilizando oligonucleótidos diferentes de los usados para el estudio semicuantitativo. Esos cebadores, indicados en la Tabla 11 de material y métodos, amplifican un fragmento de 131 pb y la especificidad de la reacción se determinó analizando las curvas de disociación de los productos obtenidos tras la PCR (Anexo I).

El análisis semicuantitativo para la expresión del gen *TNF- α 1* en la línea celular TSS (Fig. 40b) indicó que solamente la exposición a Poly I:C producía incrementos evidentes de su expresión respecto a los controles, con pocas diferencias entre las diversas dosis, y con picos a las 4 y 12 horas de estimulación. La estimulación con LPS (50 μ g/ml) o con Levamisol (sin diferencias apreciables entre las dosis) indujo una pequeña elevación de la expresión a 24 horas.

El estudio cuantitativo mediante qPCR confirmó que sólo la exposición a Poly I:C incrementaba la expresión de este gen en la línea TSS de forma significativa, con un aumento de las ratios de expresión *TNF- α 1* / β -actina tras 4 horas de estimulación, que descendía a las 24 horas, y con un perfil de respuesta tipo dosis-efecto para este inmunoestimulante (Fig. 41a).

Fig. 40.- Estudio de la expresión semicuantitativa del gen *TNF-α1*. **a.** Fotografía de un gel de agarosa mostrando las bandas de amplificación para los genes *TNF-α1* y *β-actina* en la línea TPS-2, tras 24 horas de exposición a los inmunoestimulantes (C: control; L: LPS dosis 5 y 50 µg/ml; V: Levamisol 5 y 25 µg/ml; P: Poly I:C 1, 50 y 100 µg/ml). **b-d.** Índices de estimulación de la expresión génica en las líneas TSS (b), TPS-2 (c) y macrófagos (d) tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes durante 4, 8, 12 y 24 horas, relativa a *β-actina*.

Para la línea TPS-2, los ensayos semicuantitativos (Fig. 40c) mostraron un pico de expresión del gen *TNF-α1* a las 4 horas tras la estimulación con Poly I:C, sin diferencias entre las diversas dosis, que decaía posteriormente. La exposición a las diferentes dosis de LPS y de Levamisol produjeron ligeros incrementos de los índices de expresión del gen a las 4 horas, que se mantenía hasta las 12 horas para el LPS y hasta la 8 horas para el Levamisol, disminuyendo en todos los casos a las 24 horas.

Este patrón de expresión del gen *TNF-α1* en la línea TPS-2 quedó claramente reflejado en los análisis cuantitativos mediante qPCR, donde las ratios de expresión *TNF-α1* / *β-actina* se elevaron significativamente a las 4 horas de exposición a Poly I:C (Fig. 41b). Las respuestas a LPS y Levamisol fueron menores y todas declinaron a las 24 horas.

En el caso de los cultivos de macrófagos, el análisis semicuantitativo mostró un claro pico de expresión del gen *TNF-α1* tras 4 horas de estimulación para todos los inmunoestimulantes, que era muy notable para las dosis más altas de Poly I:C (Fig. 40d). La expresión disminuyó claramente a tiempos más largos, con una ligera recuperación del índice de expresión para la dosis más alta de Poly I:C a las 24 horas.

El estudio mediante qPCR en los cultivos de macrófagos (Fig. 41c) confirmó el patrón de expresión del gen *TNF-α1* percibido en el análisis semicuantitativo, de forma que se observaron incrementos muy significativos de las ratios de expresión *TNF-α1* / *β-actina* a 4 horas tras la estimulación con Poly I:C. Las ratios de expresión también se elevaron, pero de forma mucho menor, tras 4 horas de exposición a LPS o Levamisol.

Tras 24 horas de exposición a los inmunoestimulantes únicamente se observó expresión significativa para la dosis de 100 µg/ml de Poly I:C.

Fig. 41.- Cambios en las ratios de expresión *TNF-α1* / *β-actina* frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * P < 0,05 ** P < 0,01.

4.4. Expresión del gen *TNF- α 2*

En las condiciones de ensayo utilizadas se observó expresión basal del gen *TNF- α 2* en las muestras control, no tratadas con los inmunoestimulantes, de las líneas celulares y de los cultivos de macrófagos (Fig. 42a). Esta figura muestra la imagen de las bandas de amplificación para transcritos de este gen y del de β -actina en un gel de agarosa, correspondiente a un ensayo en la línea celular TPS-2 tras 4 horas de estimulación.

Fig. 42.- Estudio de la expresión semicuantitativa del gen *TNF- α 2* **a.** Fotografía de un gel de agarosa mostrando las bandas de amplificación para los genes *TNF- α 2* y β -actina en la línea TSS, tras 12 horas de exposición a los inmunoestimulantes (C: control; L: LPS dosis 5 y 50 μ g/ml; V: Levamisol 5 y 25 μ g/ml; P: Poly I:C 1, 50 y 100 μ g/ml). **b-d.** Índices de estimulación de la expresión génica en las líneas TSS (b), TPS-2 (c) y macrófagos (d) tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes durante 4, 8, 12 y 24 horas, relativa a β -actina. ■ LPS 5 ■ LPS 50 ■ LPS 100 ■ Lev 5 ■ Lev 25 ■ Poly 1 ■ Poly 50 ■ Poly 100

Los perfiles de expresión de la isoforma α 2 del gen *TNF* fueron semejantes a los descritos anteriormente para la expresión del gen *TNF- α 1*. Así, el análisis semicuantitativo para la línea celular TSS (Fig. 42b) mostró un notable incremento de los índices de expresión del gen *TNF- α 2* tras la exposición a Poly I:C, con picos a las 8 y las 12 horas. Las respuestas tras la estimulación con LPS o Levamisol fueron mucho menores, destacando únicamente ligeros incrementos de los índices de expresión a las 12 horas para el Levamisol y a las 24 horas para el LPS.

El estudio cuantitativo mediante qPCR para la línea TSS (Fig. 43a) confirmó que los mayores incrementos de las ratios de expresión *TNF- α 2* / β -actina sucedían a las 4 horas de estimulación con las dosis altas (50 y 100 μ g/ml) de Poly I:C. También, la ratio de expresión *TNF- α 2* / β -actina se incrementó significativamente tras 24 horas de estimulación con LPS o con Levamisol.

En el caso de la línea TPS-2, el análisis semicuantitativo demostró que la expresión de *TNF- α 2* se veía poco afectada por la exposición a los inmunoestimulantes, con incrementos de los índices de expresión inferiores a cuatro (Fig. 42c). Dentro de ese rango, las mayores respuestas se producían entre las 4 y las 8 horas (Fig. 42c),

disminuyendo posteriormente en todos los casos. La exposición a las dosis altas de Poly I:C durante 8 horas indujeron los índices de expresión más elevados, mientras que la mejor respuesta a LPS se observó a las 4 horas.

El análisis cuantitativo confirmó la débil respuesta de la línea TPS-2 para la expresión de *TNF- α 2* tras la exposición a los inmunoestimulantes (Fig. 43b). Aún así, se observaron cambios estadísticamente significativos de las ratios de expresión *TNF- α 2* / *β -actina* a las 4 horas de estimulación con las dosis más altas de LPS y de Poly I:C (Fig. 43b).

El análisis semicuantitativo de la expresión de *TNF- α 2* en macrófagos mostró que las respuestas se producían principalmente a las 4 horas de exposición, decayendo a tiempos posteriores, con un ligero repunte para el LPS a las 24 horas (Fig. 42d). Las respuestas más elevadas, con incrementos notables de los índices de expresión, que mostraban un perfil tipo dosis-respuesta, se produjeron frente al Poly I:C, a las 4 horas. Para el resto de los inmunoestimulantes y tiempos de análisis, los índices de expresión fueron bajos.

Esos resultados se confirmaron en los análisis cuantitativos mediante qPCR, en los que se observaron ratios de expresión *TNF- α 2* / *β -Actina* muy elevadas a las 4 horas de exposición a Poly I:C (Fig. 43c). A las 24 horas, solamente se observaron valores de estimulación estadísticamente significativos para las ratios de expresión *TNF- α 2* / *β -actina* tras la exposición a las dosis altas de LPS y Poly I:C.

Fig. 43.- Cambios en las ratios de expresión TNF- α 2 / β -*actina* frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

4.5. Expresión del gen *MHC-II*

En todas las condiciones del ensayo, las líneas TSS y TPS-2, y los macrófagos en cultivo, expresaron el gen de la cadena β del complejo principal de histocompatibilidad II (*MHC-II*), como se observa en la Fig. 44a correspondiente a la imagen de un gel de agarosa en la que se aprecian las bandas de amplificación para transcritos de este gen y del de β -actina, correspondiente a un ensayo en la línea celular TPS-2 tras 24 horas de estimulación.

Fig.44.- Estudio de la expresión semicuantitativa del gen *MHC-II*. a) Fotografía de un gel de agarosa mostrando las bandas de amplificación para los genes *MHC-II* y β -actina en la línea TPS-2, tras 24 horas de exposición a los inmunoestimulantes (C: control; L: LPS dosis 5 y 50 μ g/ml; V: Levamisol 5 y 25 μ g/ml; P: Poly I:C 1, 50 y 100 μ g/ml). b-d) Índices de estimulación de la expresión génica en las líneas TSS (b), TPS-2 (c) y macrófagos (d) tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes durante 4, 8, 12 y 24 horas, relativa a β -actina.

Para el estudio de la expresión semicuantitativa de *MHC-II* se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 336 pb del gen (Tabla 5, Material y métodos), mientras que para el análisis cuantitativo a tiempo real, y con el fin de aumentar la eficiencia, se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 11, que amplifican para un fragmento de 84 pb. La especificidad de la reacción se determinó analizando las curvas de disociación de los productos obtenidos tras la qPCR (Anexo I).

El análisis semicuantitativo de la expresión del gen *MHC-II* en la línea celular TSS mostró que la exposición a los diferentes inmunoestimulantes producían pequeños incrementos de los índices de expresión, algo más notables a las 4 y 12 horas (Fig. 44b). Los mayores índices de expresión se observaron tras la estimulación con LPS a las 4 horas y con la dosis de 5 μ g/ml de Levamisol a las 12 horas (Fig. 44b).

El estudio cuantitativo mediante qPCR en la línea TSS únicamente demostró incrementos estadísticamente significativos de las ratios de expresión *MHC-II* / β -actina tras las 4 horas de estimulación con LPS (Fig. 45a).

Para la línea TPS-2, el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del gen *MHC-II* reveló un claro incremento de la expresión a las 8 horas para todos los inmunoestimulantes, que era más notable para las dosis más altas de Poly I:C (Fig. 44c). Esta respuesta disminuyó marcadamente a las 12 y 24 horas, con repuntes a este último tiempo para el Poly I:C.

En el análisis cuantitativo mediante qPCR de las ratios de expresión *MHC-II* / β -actina en la línea TPS-2 se observaron incrementos moderados, pero estadísticamente significativos, tras la estimulación con 50 μ g/ml de LPS a 4 horas, y con las dosis más altas de Poly I:C a las 24 horas (Fig. 45b).

Para los cultivos de macrófagos, el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del gen *MHC-II* no reveló cambios aparentes respecto a los controles, con índices de expresión inferiores a 2, independientemente del tipo de inmunoestimulante y del tiempo (Fig. 44d).

La aparente falta de inducción de la expresión de este gen en los macrófagos, tras la exposición a los inmunoestimulantes, se confirmó en los ensayos cuantitativos mediante qPCR (Fig. 45c). En este estudio solamente se observaron aumentos estadísticamente significativos de las ratios de expresión *MHC-II* / β -actina a las 4 horas de estimulación con 50 μ g/ml de LPS y, con valores muy inferiores, a las 24 horas para la dosis más baja de Poly I:C.

Fig.45.- Cambios en las ratios de expresión *MHC-II* / β -*actina* frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

4.6. Expresión del gen *Mx-1*

El estudio semicuantitativo de la expresión del gen de la proteína *Mx-1*, mediante densitometría en geles de agarosa, tuvo que realizarse de forma separada para las muestras procedentes de la estimulación con Poly I:C, ya que esta condición producía incrementos tan elevados de la expresión de este gen que, en las condiciones rutinarias de la PCR, se producía la saturación de las bandas correspondientes a sus amplicones, como se muestra en la Fig. 46a.

Se observó expresión basal del gen *Mx-1* en los cultivos control de las líneas celulares y de los macrófagos, con mayores niveles de expresión en TPS-2 y en macrófagos. La Fig. 46a muestra la imagen de un gel de agarosa tras la electroforesis de los productos amplificados de los genes *Mx-1* y β -actina de la línea TPS-2 tras 24 horas de exposición a los inmunoestimulantes.

Para los estudios de expresión de este gen mediante PCR cuantitativa a tiempo real se utilizaron oligonucleótidos específicos (indicados en Material y métodos, Tabla 11), para obtener una mayor eficiencia, que amplifican un fragmento de 102 pb. La especificidad de la qPCR se determinó analizando las curvas de disociación de los productos obtenidos (Anexo I).

Fig. 46.- Estudio de la expresión semicuantitativa del gen *Mx-1*. **a** Fotografía de un gel de agarosa mostrando las bandas de amplificación para los genes *Mx-1* y β -actina en la línea TPS-2, tras 24 horas de exposición a los inmunoestimulantes (C: control; L: LPS dosis 5 y 50 μ g/ml; V: Levamisol 5 y 25 μ g/ml; P: Poly I:C 1, 50 y 100 μ g/ml). **b-d**. Índices de estimulación de la expresión génica en las líneas TSS (b), TPS-2 (c) y macrófagos (d) tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes durante 4, 8, 12 y 24 horas, relativa a β -actina.

■ LPS 5 ■ LPS 50 ■ Leva 5 ■ Leva 25 ■ Poly 1 ■ Poly 50 ■ Poly 100

El análisis semicuantitativo para la línea celular TSS (Fig. 46b) mostró un notable incremento de los índices de expresión tras la exposición a Poly I:C, con picos a las 8, 12

y 24 horas muy evidentes. Las respuestas tras la estimulación con LPS o Levamisol fueron mucho menores, destacando únicamente un ligero incremento de los índices de expresión a las 4 horas para 5 µg/ml de Levamisol.

El estudio cuantitativo mediante qPCR para la línea TSS (Fig. 47a) confirmó que los mayores incrementos de las ratios de expresión *Mx-1* / *β-actina* se producían a las 24 horas de estimulación para todas las dosis de Poly I:C, con valores muy elevados, y a 4 horas sólo para las dosis altas (50 y 100 µg/ml) de Poly I:C. Para el resto de inmunoestimulantes no se obtuvieron incrementos significativos de la ratio de expresión *Mx-1* / *β-actina*.

Para la línea TPS-2, el análisis semicuantitativo reveló un incremento progresivo de los índices de expresión, que se iniciaba a las 12 horas y alcanzaba los máximos valores a las 24 horas, en las muestras estimuladas con Poly I:C (Fig. 46c). Para el resto de los inmunoestimulantes los índices de expresión fueron muy bajos a todos los tiempos estudiados.

En el estudio cuantitativo para la línea TPS-2 (Fig. 47b) se confirmó el patrón de respuesta observado para los cambios en la expresión del gen *Mx-1* en el estudio semicuantitativo, de forma que los incrementos mayores de las ratios de expresión *Mx-1* / *β-actina* se observaron a 24 horas de estimulación con todas las dosis de Poly I:C. Para el resto de las condiciones, sólo se observó un aumento estadísticamente significativo de la ratio de expresión para las muestras estimuladas con 5 µg/ml de Levamisol, aunque con valores muy inferiores.

En el análisis semicuantitativo, el patrón de expresión del gen *Mx-1* en los cultivos de macrófagos (Fig. 46d) se asemejó al descrito para la línea TPS-2, de forma que sólo se observaron incrementos de los índices de expresión tras la estimulación con Poly I:C, que eran bajos a las 4 horas y mucho más elevados a las 24 horas de estimulación.

El estudio mediante qPCR en los cultivos de macrófagos confirmó esos resultados y únicamente se encontraron incrementos estadísticamente significativos de las ratios de expresión *Mx-1* / *β-actina* tras la estimulación con Poly I:C (Fig. 47c). A cuatro horas solamente las dos dosis más altas de este estimulante produjeron esos cambios, mientras que a 24 horas todas las dosis indujeron incrementos mayores.

Fig. 47.- Cambios en las ratios de expresión *Mx-1* / β -actina frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunostimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * P < 0,05 ** P < 0,01.

4.7. Expresión del gen para *COX-2*

En el estudio semicuantitativo (Fig. 48), se observó expresión basal de este gen en los cultivos control, tanto de las líneas celulares TSS y TPS-2, como de los cultivos de macrófagos, que se incrementaba notablemente tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes. Como ejemplo, la Fig. 48a muestra un gel de agarosa en el que se observan los amplificadores obtenidos para los genes *COX-2* y β -actina de cultivos de macrófagos tras 24 horas de exposición a los inmunoestimulantes.

Fig. 48.- Estudio de la expresión semicuantitativa del gen *COX-2* **a**. Fotografía de un gel de agarosa mostrando las bandas de amplificación para los genes *COX2* y β -actina en cultivo de macrófagos, tras 24 horas de exposición a los inmunoestimulantes (C: control; L: LPS dosis 5 y 50 μ g/ml; V: Levamisol 5 y 25 μ g/ml; P: Poly I:C 1, 50 y 100 μ g/ml). **b-d**. Índices de estimulación de la expresión génica en las líneas TSS (**b**), TPS-2 (**c**) y macrófagos (**d**) tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes durante 4, 8, 12 y 24 horas, relativa a β -actina.

■ LPS 5 ■ LPS 50 ■ Lev 5 ■ Lev 25 ■ Poly 1 ■ Poly 50 ■ Poly 100

El análisis semicuantitativo en la línea celular TSS indicó que, en respuesta a la estimulación con LPS o Poly I:C, la expresión del gen *COX-2* se inducía a tiempos cortos, alcanzándose los mayores índices de expresión a las 8 horas para el Poly I:C, y decayendo posteriormente (Fig. 48b). Para este inmunoestimulante se apreciaba un claro efecto dosis-respuesta a 4 y 8 horas. Los índices de expresión tras la exposición a LPS fueron moderados, mostrando un pico a las 8 horas. Las respuestas frente al Levamisol fueron siempre débiles.

El estudio cuantitativo mediante qPCR confirmó el patrón observado en el estudio semicuantitativo, con altas ratios de expresión *COX-2* / β -actina a las 4 horas de estimulación con Poly I:C y moderadas para el LPS, que descendían a las 24 horas (Fig. 49a).

En el estudio semicuantitativo, la línea TPS-2 mostró un patrón de expresión del gen *COX-2* similar al obtenido para la línea TSS, con picos de expresión entre las 4 y 8 horas, aunque en este último tiempo también se apreciaba una clara respuesta para el Levamisol

(Fig. 48c). Los mayores índices de expresión se obtuvieron en las muestras estimuladas con las dosis más altas de Poly I:C a las 8 horas.

Esos resultados se confirmaron mediante el estudio cuantitativo por qPCR para TPS-2, de forma que las ratios de expresión *COX-2* / β -actina más altas se hallaron a las 4 horas de estimulación con Poly I:C, seguidas de las correspondientes al LPS (Fig. 49b). Tras 24 horas de estimulación la expresión decayó considerablemente en todos los casos, pero aún se mantenían valores estadísticamente significativos para las dosis altas de Poly I:C.

Para los cultivos de macrófagos, el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del gen *COX-2* reveló que los mayores índices de expresión se encontraban a tiempos cortos (Fig. 48d). Para el estímulo con Poly I:C el pico de respuestas se producía a las 4 horas de exposición, mientras que para el LPS sucedió a las 8 horas. A las 24 horas aún se mantenían respuestas apreciables para estos dos inmunoestimulantes. No se observó respuesta para el Levamisol a ninguno de los tiempos estudiados.

El estudio mediante qPCR en los cultivos de macrófagos confirmó los resultados del análisis semicuantitativo; solamente tras la estimulación con las dosis más altas de Poly I:C y LPS se indujeron incrementos de las ratios de expresión *COX-2* / β -Actina estadísticamente significativos, más altos a las 4 horas de estimulación (Fig. 49c). La estimulación con Levamisol no indujo cambios significativos de las ratios de expresión *COX-2* / β -actina.

Fig. 49.- Cambios en las ratios de expresión *COX-2* / β -*actina* frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

4.8. Expresión del gen para *iNOS*

Para el estudio de la expresión semicuantitativa del gen de la enzima *iNOS* se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 746 pb del gen (Tabla 5, Material y métodos), mientras que para el análisis cuantitativo a tiempo real, y con el fin de aumentar la eficiencia, se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 11, que amplifican para un fragmento de 98 pb. La especificidad de la reacción se determinó analizando las curvas de disociación de los productos obtenidos tras la qPCR (Anexo I).

El estudio semicuantitativo indicó que existía expresión basal del gen *iNOS* en las líneas celulares y en los macrófagos, mayor en los cultivos control de TSS y TPS-2 que en los de macrófagos. La Fig. 50a muestra, a manera de ejemplo, la imagen de un gel de agarosa tras la electroforesis de los productos amplificados correspondientes a los genes *iNOS* y β -actina de la línea TSS-2 tras 4 horas de exposición a los inmunoestimulantes.

Fig. 50.- Estudio de la expresión semicuantitativa del gen *iNOS* **a.** Fotografía de un gel de agarosa mostrando las bandas de amplificación para los genes *iNOS* y β -actina en la línea TSS, tras 4 horas de exposición a los inmunoestimulantes (C: control; L: LPS dosis 5 y 50 μ g/ml; V: Levamisol 5 y 25 μ g/ml; P: Poly I:C 1, 50 y 100 μ g/ml). **b-d.** Índices de estimulación de la expresión génica en las líneas TSS (b), TPS-2 (c) y macrófagos (d) tras la exposición a los diferentes inmunoestimulantes durante 4, 8, 12 y 24 horas, relativa a β -actina.

■ LPS 5 ■ LPS 50 ■ Leva 5 ■ Leva 25 ■ Poly 1 ■ Poly 50 ■ Poly 100

Mediante el análisis semicuantitativo no se observaron cambios en los índices de expresión del gen *iNOS* en la línea TSS, frente a ninguno de los inmunoestimulantes, con índices de expresión siempre inferiores a 2 (Fig. 50b).

Por el contrario, el análisis mediante qPCR en la línea celular TSS si reveló incrementos bajos, pero estadísticamente significativos, en las ratios de expresión *iNOS* / β -actina tras 4 horas de estimulación con LPS y Levamisol y a 24 horas para las dosis más altas de Poly I:C (Fig. 51a).

En el caso de la línea TPS-2 el análisis semicuantitativo reveló incrementos notables de los índices de expresión del gen *iNOS* a las 8 horas de exposición a cualquiera de los inmunoestimulantes, respuestas que se iniciaban a las 4 horas y decaían totalmente a partir de las 12 horas (Fig. 50c).

Para la línea TPS-2, el estudio por qPCR (Fig. 51b) no reveló cambios estadísticamente significativos del gen *iNOS* para ninguna de las condiciones y tiempos estudiados.

En el caso de los cultivos de macrófagos, el análisis semicuantitativo mostró que se solamente se producían incrementos moderados (entre 2 y 4) de los índices de expresión del gen *iNOS* a las cuatro horas, con valores muy semejantes para todos los tratamientos (Fig. 50d).

El análisis mediante qPCR demostró que tras cuatro horas de exposición a cualquiera de las dosis de los diversos inmunoestimulantes se inducían incrementos de las ratios de expresión *iNOS* / β -actina significativas (Fig. 51c). Tras 24 horas de estimulación se observaron incrementos estadísticamente significativos, pero mucho más bajos, solamente para el LPS y el Levamisol.

4.9. Expresión del gen para *Arginasa*

Con el fin de comprobar la existencia de una segunda vía de metabolismo de la L-arginina en el proceso del estallido respiratorio, prácticamente al final de la realización de esta Tesis se decidió incluir el estudio de la expresión del gen para el enzima Arginasa. Por este motivo, sólo se realizaron los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real.

En la línea TSS, la expresión de este gen se inducía de forma significativa tras la estimulación durante 4 horas con LPS (50 μ g/ml) y las dosis altas de Poly I:C, y se elevó a las 24 horas para el Poly I:C (Fig. 52a).

En la línea TPS-2 sólo se observaron incrementos estadísticamente significativos de las ratios *Arginasa* / β -actina a las 24 horas, para LPS (5 μ g/ml), Levamisol (25 μ g/ml) y todas las dosis de Poly I:C (Fig. 52b).

En los cultivos de macrófagos se observaron incrementos estadísticamente significativos de las ratios *Arginasa* / β -actina tras 4 horas de exposición a cualquiera de las dosis de los diferentes inmunoestimulantes (Fig. 52c). Este hecho sólo se mantenía a las 24 horas para la dosis más alta de Poly I:C.

Fig. 51.- Cambios en las ratios de expresión *iNOS* / β -actina frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Fig. 52.- Cambios en las ratios de expresión *Arginasa* / β -actina frente a los controles (=1) en las líneas TSS (a), TPS-2 (b) y en macrófagos (c) a 4 y 24 horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. Las columnas representan la media de tres muestras más la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Discusión

---

1. Elección de los inmunoestimulantes para el estudio

Comenzamos la discusión exponiendo las razones que nos llevaron a elegir los inmunoestimulantes utilizados en este estudio. Otros factores importantes a la hora de utilizar inmunoestimulantes son las dosis y el tiempo de exposición, para lo cual se tuvieron en cuenta resultados previos descritos por otros autores.

En cuanto a los productos utilizados como inmunoestimulantes, se seleccionaron tres que habían sido previamente bien caracterizados, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, en peces y mamíferos: LPS, Levamisol y Poly I:C. Estos tres inmunoestimulantes son sustancias capaces de estimular los mecanismos de defensa inespecíficos y, secundariamente, las respuestas inmunitarias específicas en peces (Anderson, 1992). De ellos, el LPS y el Poly I:C son moléculas que pertenecen a familias distintas de PAMPs, productos asociados a patógenos que son reconocidos por las células eucariotas mediante distintas familias de receptores de superficie o intracelulares (PRRs), como se ha indicado en la Introducción. Los efectos biológicos de estos dos tipos de inmunoestimulantes dependen principalmente de los receptores a los que se unen y de las vías de señalización intracelular que esa unión desencadena que, en general, inducen respuestas fisiológicas celulares (fagocitosis y degradación, producción de radicales oxidativos, secreción de citoquinas...) adaptadas a la defensa contra el tipo de patógeno del que deriva el correspondiente PAMP.

El Levamisol no pertenece a ninguna de las familias de las PAMPs y su mecanismo de acción celular no ha sido descrito (Mulero *et al.*, 1998), aunque en peces es capaz de estimular la producción de ROS y de fagocitosis de leucocitos *in vitro* (Siwicki *et al.*, 1990) e *in vivo* la resistencia a infecciones como la amebiasis branquial (AGD) en salmón atlántico (Findlay *et al.*, 2000). Mulero *et al.*, (1998) indicaron que, probablemente, las células diana del Levamisol no sean directamente los fagocitos (macrófagos y neutrófilos), sino los linfocitos, en los cuales el Levamisol induciría la producción de citoquinas tipo MAF, que activarían a los anteriores.

Respecto las dos dosis utilizadas (5 y 50 µg/ml) de LPS en este estudio, estas se encuentran en el rango de las descritas como activadoras de la explosión respiratoria en

macrófagos de *O. mykiss* (Jang *et al.*, 1995) y *Limanda limanda* (Tahir y Secombes, 1996). En estas mismas especies, las concentraciones superiores (del orden de 100 µg/ml) producían una menor estimulación de la explosión respiratoria. Además, la exposición de macrófagos de *O. mykiss* a dosis de 50 µg/ml de LPS era efectiva para la producción del MAF liberado a los sobrenadantes (Jang *et al.*, 1995) y de inducir la expresión génica de TNF-α en cultivos de macrófagos de *Salmo trutta* (MacKenzie *et al.*, 2003). Para los tiempos de exposición, se tuvieron en cuenta los ensayos que analizaron la fagocitosis y la explosión respiratoria de macrófagos expuestos a LPS (Jang *et al.*, 1995; Tahir y Secombes, 1996), en los que no se apreciaron diferencias apreciables entre incubar 24 o 48 horas, por lo que se utilizaron tiempos de incubación no superiores a las 24 horas.

Para el Levamisol se eligieron las dosis de 5 y 25 µg/ml, ya que se había demostrado que en ese rango de concentraciones el Levamisol inducía incrementos de la capacidad fagocítica y la explosión respiratoria en cultivos de células de bazo de trucha arco iris (Siwicki *et al.*, 1990), mientras que dosis de 25 µg/ml inducían incrementos más débiles en la respuesta inmunitaria no específica y supresión de la respuesta inmunitaria específica. En ese estudio, la dosis de 50 µg/ml suprimía completamente ambas respuestas. En cuanto a los tiempos de exposición al Levamisol, se tuvieron en cuenta estudios realizados por Mulero *et al.* (1998), en los que se ensayaron combinaciones de diferentes dosis de Levamisol y periodos de exposición en cultivos *in vitro* de macrófagos de dorada *S. aurata*. Aunque en la dorada las concentraciones superiores a 10 µg/ml de Levamisol inducen la muerte de leucocitos *in vitro*, en ese estudio, utilizando concentraciones inferiores a esa, no se apreciaban cambios significativos en la explosión respiratoria usando tiempos entre las 3 y 24 horas de exposición, mientras a las 48 se observa inhibición de esa actividad y de otras actividades de los macrófagos (migración, fagocitosis y actividad microbicida).

En el caso del Poly I:C se utilizaron tres dosis (1, 50 y 100 µg/ml) debido a que en salmónidos se han descrito respuestas de producción de interferón en respuesta a este rango tan amplio de concentraciones. Nygaard *et al.* (2000) demostraron que la exposición a 1 µg/ml de este inmunoestimulante era muy efectiva para la producción de interferón en macrófagos aislados de salmón atlántico, descendiendo dicha estimulación cuando se usaban concentraciones inferiores. Además, en ese estudio la máxima producción se alcanzaba tras 24h de estimulación, independientemente de la concentración usada. Otros ensayos mostraban que dosis de 100 µg/ml Poly I:C inducían la expresión de la proteína Mx1 en cultivos de células RTG-2 (Collet y Secombes, 2001). Además, se ha descrito que la exposición de macrófagos de trucha arco iris a concentraciones entre 5 y 50 µg/ml de Poly I:C durante 12 horas induce la expresión de transcritos para proteínas del complejo NADHP-oxidasa, que podrían facilitar la activación de iNOS (Boltaña *et al.*, 2009).

2. Ensayos biológicos tras la inmunoestimulación *in vitro*

El objetivo principal del presente trabajo era verificar la tesis de que es posible utilizar cultivos celulares, principalmente algunas líneas celulares continuas, de peces para evaluar la actividad de inmunoestimulantes para su uso en acuicultura. Por ello, nuestro estudio comprendió, en primer lugar, el análisis *in vitro* del efecto de los inmunoestimulantes sobre respuestas fisiológicas celulares relacionadas con las respuestas proinflamatorias. Dentro de esas respuestas, seleccionamos aquellas que han sido descritas como tales (como se ha indicado en la Introducción), y para las cuales se dispone de ensayos *in vitro* en peces: la fagocitosis, la estimulación de la explosión respiratoria y la inducción de la liberación de MAF.

Las líneas celulares que se han utilizado (TPS-2 y TSS) están formadas por poblaciones celulares heterogéneas, principalmente células sinusoidales (endoteliales fagocíticas) y fibroblásticas / reticulares, procedentes del estroma del pronefros y del bazo, respectivamente, de trucha arco iris (Carracedo, 2003). Las consideramos apropiadas para este estudio dado que se había descrito que ambas líneas presentaban actividad fagocítica (Carracedo, 2003) y capacidades de producción y respuesta a citoquinas / factores de crecimiento (Riaño, 2004). Además, tanto las células sinusoidales como las reticulares, que forman parte de los microambientes hematopoyéticos (Zapata, 1979; Razquin, 1990), han sido involucradas en la iniciación y regulación de respuestas proinflamatorias (Press *et al.*, 1994). Por otra parte, las células sinusoidales están implicadas en la captura de patógenos y en *O. mykiss* se han descrito como una diana inicial de patógenos intracelulares (Estepa y Coll, 1991; Estepa *et al.*, 1991; Flaño, 1995; Flaño *et al.*, 1996).

Como referencia más próxima a la situación *in vivo*, y para comparar con lo observado en las líneas celulares elegidas, utilizamos cultivos primarios de macrófagos de trucha. Los macrófagos tienen un papel fundamental en la inducción y regulación de la respuesta inmunitaria, tanto en peces (Secombes y Fletcher, 1992; Dalmo *et al.*, 1997), como el resto de los vertebrados (Roitt *et al.*, 2001).

2.1. Actividad fagocítica

La activación de la fagocitosis en macrófagos y granulocitos neutrófilos (heterófilos) es uno de los marcadores más claros de la inducción de los mecanismos defensivos (Secombes, 1994; Dalmo *et al.*, 1997) y su estudio *in vitro* se ha utilizado clásicamente para determinar mecanismos de acción de inmunoestimulantes en peces (Sakai, 1999).

En primer lugar, para estandarizar el ensayo de fagocitosis, determinamos el intervalo de tiempo durante el cual el número de macrófagos en cultivo primario permanecía constante, tras el proceso de aislamiento por adherencia a plástico. Según nuestros resultados, a partir del día tres de cultivo se producía un descenso significativo

en el número de macrófagos por pocillo (Fig. 24), por lo que todos los ensayos se realizaron con cultivos de macrófagos tras no más de dos días de incubación.

Utilizando el ensayo de fagocitosis de partículas fluorescentes, nuestros resultados indicaron que (Fig. 25): a) ambas líneas celulares presentan capacidad fagocítica, sin diferencias entre si, que en términos absolutos es mucho menor que la de los macrófagos; y b) que, por el contrario, tras la exposición a los inmunoestimulantes los índices de estimulación observados eran mayores en las líneas que en los macrófagos. La acción de los inmunoestimulantes sobre la fagocitosis en las líneas celulares y en los macrófagos se resume en la Tabla 13.

En cuanto a la actividad fagocítica de las líneas TSS y TPS-2, estos resultados confirman que presentan actividad fagocítica, que ya había sido demostrada mediante microscopía y en condiciones basales (sin estimulación) frente a células de *Candida lipolytica* inactivadas por calor (Carracedo, 2003). La capacidad fagocítica de ambas líneas puede atribuirse a la presencia de monocito-macrófagos y células con características similares a las sinusoidales, definidas como endoteliales fagocíticas (Zapata y Cooper, 1990; Dannevig *et al.*, 1994). Las células sinusoidales de pronefros y de bazo, así como las endoteliales cardíacas y de los sinusoides hepáticos (Smedsrød *et al.*, 1995; Koren *et al.*, 1997), forman parte del sistema retículo-endotelial de teleósteos y participan activamente en el aclaramiento de antígenos solubles y particulados y de materiales inertes (por ejemplo, carbón coloidal y colorantes vitales), y se consideran elementos fundamentales del sistema de defensa inmunológico innato.

No obstante, la capacidad fagocítica de la líneas es muy baja (del orden de 6 veces menor) en comparación con los macrófagos cultivados, en todas las condiciones experimentales (Fig. 25a). El hecho de que los índices de estimulación de la fagocitosis observados en las líneas celulares tras la exposición a los inmunoestimulantes sean más elevados que los de los macrófagos es debido a que éstos ya muestran una elevada capacidad fagocítica en los cultivos control, mientras que las variaciones tras la inmunoestimulación son pequeñas en relación a ese valor de partida.

Respecto al efecto de los inmunoestimulantes sobre la fagocitosis, ambas líneas responden mejor que los macrófagos a dosis altas de Poly I:C, la línea TSS mejor a Levamisol que la TPS-2 y los macrófagos, y todas ellas responden bien y de forma semejante a LPS 50 µg/ml. Las diferencias observadas podrían explicarse teniendo en cuenta:

a) Las diferentes proporciones que las células fagocíticas (macrófagos o células sinusoidales) representan respecto al total de cada tipo de cultivo: en los primarios de macrófagos aproximadamente el 100%, mientras que en las líneas esta proporción es más baja, ya que las líneas celulares contienen también células reticulares fibroblásticas.

b) La presencia de receptores para esos inmunoestimulantes en las células en cultivo y de su unión al ligando, que son necesarios para la activación celular.

c) La acción diferencial de redes de citoquinas, con acciones supresoras o activadoras sobre las células fagocíticas, que puedan ser liberadas por otras poblaciones celulares de las líneas en respuesta a los inmunoestimulantes.

El reconocimiento de sustancias inmunoestimulantes del tipo del LPS y el Poly I:C por células del sistema inmunitario innato, así como la respuestas a ellas, está mediada por la familia de receptores PRRs implicados en el reconocimiento de componentes microbianos, entre los que se encuentran los receptores tipo TLR, Nod y helicasas RIG-I y MDA-5 (Bourhis y Werts, 2007). Todos estos receptores transducen señales a diferentes moléculas adaptadoras intracelulares, que confluyen en muchos casos en la fosforilación del factor de transcripción NF κ B, el cual induce la activación de la expresión de genes proinflamatorios. Así, en mamíferos, el LPS es reconocido por el receptor TLR4, junto con un complejo de moléculas accesorias, lo que induce la expresión de genes como TNF- α , IL-1 β , IFNs, (Toshchakov *et al.*, 2003; Iliev *et al.*, 2005a, 2005b; Swain *et al.*, 2008), que incrementan la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos, modulando la expresión de los receptores Fc CR3 y receptores de lectina (Collins y Bancroft, 1992; Marodi y Johnston, 1993; Kawakami *et al.*, 1995; Garner *et al.*, 1996).

En el caso de los peces, es un hecho bien descrito que los cultivos de leucocitos (incluyendo los de macrófagos) responden de diversas formas a la exposición *in vitro* a LPS, tales como incrementando la fagocitosis (MacKenzie *et al.*, 2003) y disparando la explosión respiratoria (Purcell *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha descrito que, *in vitro*, este inmunoestimulante no incrementa la actividad endocítica de células endoteliales sinusoidales aisladas de *S. salar* (Martin-Armas *et al.*, 2008). Dado que nosotros si hemos observado respuestas de incremento de la actividad fagocítica en las líneas celulares TSS y TPS-2 tras la exposición a LPS, esta respuesta puede atribuirse a la población de macrófagos que forman parte de ellas.

No obstante, en los peces las respuestas a LPS *in vivo* son muy débiles (Nayak *et al.*, 2008) y este hecho se ha asociado tanto a la falta de LBP funcionalmente análoga a la de mamíferos (Inagawa *et al.*, 2002; Stenvik *et al.*, 2004; Iliev *et al.*, 2005a), como a la falta de la expresión de algunas moléculas adaptadoras (CD14 y LY96), que facilitan el reconocimiento del lípido A (con actividad endotóxica) del LPS por TLR4, y a la ausencia de TICAM2, que en mamíferos forma parte de la vía de señalización intracelular de este receptor (Iliev *et al.* 2005b). Esto explicaría que, a pesar de que suceda el reconocimiento del LPS bacteriano, no se observe una respuesta tipo shock endotóxico cuando se inyectan dosis elevadas de LPS. En cualquier caso, en peces deben existir vías alternativas de activación celular en respuesta a la presencia de LPS, quizá

alternativas a las vías descritas en mamíferos, como es a través de la acción de redes de citoquinas.

Por su parte, tanto en peces como en mamíferos, el Poly I:C se une al receptor TLR3 y puede activar a la proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) y es un potente inductor de IFN (Jensen y Robertsen, 2002; Robertsen *et al.*, 2006), con activación de la expresión del gen de proteínas Mx que confieren resistencia contra infecciones virales (Jørgensen *et al.*, 2003). Además, el IFN tipo II es un potente activador de macrófagos, que incrementa su actividad microbicida y los mecanismos relacionados con la presentación antigénica, incluyendo la endocitosis (Martin *et al.*, 2007a). Sin embargo, Martin-Armas *et al.* (2008) demostraron que la exposición a Poly I:C y otros polinucleótidos CpG inhibían la endocitosis de albúmina sérica formalinizada, mediada por receptores, pero no la mediada por receptores para manosa, en cultivos de células endoteliales sinusoidales de salmón Atlántico. Además, la exposición a Poly I:C inducía la degradación de RNA mensajeros en esas células, lo que resultaba en una disminución de la expresión de IL-1, lo que se atribuyó a la producción de IFNs, que ejercen un efecto antiviral degradando RNAs. Nuestros resultados no confirman estos datos, ya que en ambas líneas celulares se observó que el Poly I:C inducía la expresión de IL-1, al mismo tiempo que la de la proteína Mx inducible por IFN.

No hemos encontrado datos de vías intracelulares que medien la acción del Levamisol, pero en dorada (Mulero *et al.*, 1998) se ha descrito que el Levamisol no actúa directamente sobre las células fagocíticas, sino sobre linfocitos incrementando la producción de linfoquinas que podrían afectar directamente a la fagocitosis. También el Levamisol podría incrementar la producción de MAF por los linfocitos del bazo y posteriormente este MAF podría activar la fagocitosis

Como se ha indicado anteriormente, es posible que una vía de activación de las líneas celulares TPS-2 y TSS tras la exposición a los inmunoestimulantes suceda indirectamente, no por reconocimiento directo de ellos por la mayoría de las células, sino en respuesta a citoquinas liberadas por una parte de la población celular capaz de reconocer esos inmunoestimulantes. Nuestros resultados demuestran que, en la mayoría de los casos, el LPS y, particularmente, el Poly I:C inducían de forma clara la expresión de IL-1 y de TNF- α (especialmente TNF- α 2) en los cultivos, con efectos semejantes en macrófagos y en la línea TPS-2. El Levamisol ejerció efectos mucho menores en la expresión de estas citoquinas.

A ese respecto, la expresión de IL-1 y TNF- α aumenta tras la estimulación *in vitro* de macrófagos de peces con LPS (Zou *et al.*, 2000; Saeij *et al.*, 2003; MacKenzie *et al.*, 2003). Igualmente, la exposición a LPS actúa como un potente inductor de la transcripción de IL-1 en las células RTS11 de tipo macrófago (Zou *et al.*, 1999a). Esas citoquinas son los primeros mediadores de la inflamación y promueven la acción fagocítica de macrófagos y neutrófilos (Neumann *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2004; Bridle

et al., 2006; Swain *et al.*, 2008). En trucha los estudios *in vitro* con TNF- α 1 y TNF- α 2 recombinantes han demostrado que ambas isoformas son funcionales y que pueden aumentar la fagocitosis y la migración de leucocitos de riñón anterior (Zou *et al.*, 2003). Estos estudios han sido confirmados recientemente por Roca *et al.* (2008), quienes además han indicado que, *in vivo*, la actividad de TNF- α de peces está mediada por su acción sobre células endoteliales, en las cuales esta citoquina incrementa la expresión de E-selectina, diferentes CC, CXC quimioquinas y MCH-II y CD38, lo cual facilitaría el reclutamiento y la activación de macrófagos.

2.2. Producción de ROS

Una de las actividades características de los inmunoestimulantes es la inducción de la explosión respiratoria en células fagocíticas. Este proceso de producción de ROS es un mecanismo microbicida del sistema de defensa innato y se ha considerado responsable, en parte, de los efectos protectores de los inmunoestimulantes frente a la infección en peces (Siwicki *et al.*, 1994; Sakai, 1999). La explosión respiratoria se ha demostrado en macrófagos y neutrófilos de diversas especies de peces (Chung y Secombes, 1988; Secombes, 1990; Sharp y Secombes, 1993; Sarmiento *et al.*, 2004) y recientemente se ha estudiado la expresión génica de proteínas del complejo NADPH-oxidasa en macrófagos de trucha arco iris tras la estimulación con diversos LPS, Poly I:C y Zymosan (Boltaña *et al.*, 2009).

Para analizar la explosión respiratoria en nuestro estudio utilizamos dos tipos de técnicas, destinadas a poner de manifiesto la producción de radicales oxidativos intracelulares (ensayo de NBT) y extracelulares (ferrocitocromo C) respectivamente, y para el ensayo de NBT empleamos dos diseños experimentales: i) ensayos simultáneos, en los que se incubaron al mismo tiempo el reactivo y el inmunoestimulante; y ii) ensayos con preincubación durante una hora con el inmunoestimulante, antes de añadir el NBT.

Respecto al tipo de ensayo (NBT o ferrocitocromo C), aunque en muchos estudios únicamente se usa uno de ellos (Secombes, 1990), hay que considerar que son complementarios. El método de detección intracelular es a “punto final”, puesto que requiere la muerte de las células y, además, no mide la cantidad de ROS efectivamente liberado al exterior, ya que una parte del producido se degrada con rapidez intracelularmente y parte del liberado se pierde en el proceso de lavado de las placas. Por otra parte, el método del ferrocitocromo C permite estudiar la cinética de la liberación de radicales oxidativos y detectar los picos de producción tras la estimulación.

Los ensayos simultáneos de producción de ROS con cultivos de macrófagos, usando cualquiera de las técnicas de detección, nos permitieron detectar claramente respuestas tipo explosión respiratoria, con producción / liberación rápida de ROS, tras la exposición a los inmunoestimulantes. Así, la cantidad y cinética de las mismas coinciden con las

descritas anteriormente como explosión respiratoria en poblaciones de macrófagos aislados y expuestos a diversos agentes como sobrenadantes con actividad MAF, PMA o Glucanos, y a productos microbianos como el LPS (Chung y Secombes, 1988; Secombes, 1994; Solem *et al.*, 1995; Neumann y Belosevic, 1996).

En cuanto a los ensayos de preincubación con el inmunoestimulante, según de Castro (2003), estos permiten analizar la duración de la estimulación y el efecto sensibilizador de los inmunoestimulantes. Además, permiten distinguir las poblaciones celulares productoras de ROS en función de la capacidad y velocidad para regenerar sus sistemas enzimáticos de producción de ROS, dado que tras la explosión respiratoria los macrófagos y otras poblaciones celulares pueden ser capaces de sintetizar *de novo* los enzimas necesarios y los sustratos (Decoursey y Ligeti, 2005; Boltaña *et al.*, 2009). Así, un tiempo prolongado de exposición puede producir, dependiendo del inmunoestimulante, modulaciones de la respuesta que resulten en inhibición de la misma, bien por agotamiento enzimático o de algún sustrato o bien por el efecto de factores reguladores (Castro *et al.*, 1999; Castro, 2003; Cook *et al.*, 2001). A este respecto, se ha indicado que puede producirse un efecto inhibitorio en la producción de ROS debido a una baja disponibilidad de la enzima NADPH-oxidasa, que cataliza la reducción del oxígeno a anión superóxido (Chanock *et al.*, 1994).

Nuestros resultados demuestran que las líneas celulares TPS-2 y TSS son capaces de producir radicales oxidativos al ser estimuladas con los diferentes inmunoestimulantes, detectándose tanto intracelular como extracelularmente, tanto en los ensayos simultáneos como en los preincubados. Sin embargo, sus respuestas se diferencian claramente de las de los macrófagos, tanto en cuanto a la capacidad de producción como en la cinética. En términos absolutos, la producción de radicales oxidativos es más alta en los macrófagos, aunque esto no se aprecia en términos de índices de estimulación, que son mayores en las líneas celulares (ver Fig. 26). De forma semejante a lo discutido para la fagocitosis esta aparente contradicción se explica porque los controles, no estimulados, de macrófagos presentaban valores iniciales de reducción de NBT y del ferrocitocromo C más elevados que las líneas, sugiriendo que, de alguna manera, los cultivos control de macrófagos se encuentran estimulados inespecíficamente.

Es interesante notar que existen diferencias en cuanto a la capacidad de producción de ROS (y también de NO) en las diversas líneas celulares de tipo monocito/ macrófago o semejantes a células dendríticas de peces. Así, en las líneas RTS11 (tipo monocito/macrófago) de trucha arco iris (Ganassin y Bols, 1998) y TO (tipo dendrítico) de salmón Atlántico (Pettersen *et al.*, 2008) no se ha podido demostrar la producción de ROS, mientras que las líneas macrofágicas CLC de carpa (Weyts *et al.*, 1997) y GMLC de carpín dorado (Wang *et al.*, 1995) sí presentan explosión respiratoria.

Atendiendo a la cinética de producción de ROS extracelular en ensayos simultáneos, las respuestas de las líneas celulares TSS y TPS-2 (Figs. 27 y 28) no son realmente tan

“explosivas” como las observadas en macrófagos, aunque si son más sostenidas en el tiempo, de forma que, en algunos casos, se alcanzan los picos de producción muy tardíamente (más de 30 minutos para ambas líneas tras la estimulación con LPS o Poli I:C). La línea TPS-2 es la que presenta perfiles de respuesta más semejantes a los de los macrófagos, lo que sugiere que contiene una subpoblación importante de macrófagos. Por el contrario, la línea TSS presentó las respuestas más tardías y, probablemente, en esta línea la producción de ROS suceda en células de linaje no fagocítico, como pueden ser células endoteliales, en las cuales este mediador tiene funciones de señalización celular antes que microbicidas (Ray y Shah 2005; Dworakowski *et al.*, 2008). Esta idea se ve apoyada por los resultados de los ensayos con preincubación. En efecto, la preincubación con cualquiera de los inmunoestimulantes, e independientemente de la dosis, induce un agotamiento de la producción de ROS en las líneas celulares, mientras que en los macrófagos se observan valores semejantes a los de los ensayos simultáneos, e incluso más elevados para la estimulación con LPS.

En cuanto al grado de actividad de los inmunoestimulantes, en los ensayos simultáneos, tanto para los cultivos de macrófagos como para las líneas TPS-2 y TSS, la producción de ROS intracelular y extracelular se vio favorecida a medida que aumentaba la concentración de Poly I:C, mientras que para las dosis de LPS y Levamisol este efecto fue más variable. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que no existe una relación lineal entre la dosis de un inmunoestimulante y su efecto sobre la actividad de los fagocitos (Robertsen *et al.*, 1990; Siwicki *et al.*, 1990; Anderson y Jeney, 1992), sino que en general muestran una respuesta máxima en un intervalo de concentraciones y el efecto desaparece o llega a ser inhibitorio con concentraciones elevadas. Por ejemplo, Tahira y Secombes (1996) observaron que la estimulación *in vitro* de macrófagos de *O. mykiss* y *L. limanda* con una concentración de 100 µg/ml de LPS inhibe la explosión respiratoria en comparación con la exposición a concentraciones de 10 y 50 µg/ml.

También hay que tener en cuenta la posible toxicidad para las células de las altas concentraciones del anión superóxido y de los metabolitos de oxígeno reactivos producidos de forma aguda; aunque existe un equilibrio entre la producción de O_2^- y su dismutación (Secombes *et al.*, 1992; McCord, 1995), las altas concentraciones de ROS inducen muerte celular por apoptosis o necrosis (Trachootham *et al.*, 2008).

Al igual que se ha discutido para la fagocitosis, la activación de la explosión respiratoria en fagocitos, así como de producción de ROS en otros tipos celulares – como células endoteliales – pueden estar mediadas por el reconocimiento de los inmunoestimulantes vía receptores PRRs expresados por estas poblaciones celulares (Bourhis y Werts, 2007) o, indirectamente, en respuesta a citoquinas. En cuanto a los macrófagos, se ha demostrado en peces que las citoquinas activadoras de macrófagos, fundamentalmente IL-1, y las de tipo Th1, como IFN- γ y TNF- α , son inductoras de la explosión respiratoria (Jang *et al.*, 1995; Novoa *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 2005; Grayfer *et al.*, 2008; Roca *et al.*, 2008). Nuestros resultados ponen de manifiesto que existe una

clara relación entre la producción de ROS y la capacidad de los inmunoestimulantes para inducir incrementos significativos de la expresión génica para IL-1 y TNF- α .

Las células endoteliales de mamífero responden a citoquinas proinflamatorias, como TNF- α y mediadores liberados durante el shock endotóxico, probablemente IL-1, incrementando la producción de H₂O₂ y NO (Dworakowski *et al.*, 2008). No obstante, en estas células la producción de ROS tiene una función principalmente de señalización celular (Ray y Shah 2005; Dworakowski *et al.*, 2008) y está mediada fundamentalmente por factores angiogénicos (VEGF, angiopoyetina-1), producidas en respuesta a numerosos factores fisiológicos que regulan la angiogénesis (Ushio-Fukai *et al.*, 2006).

Sin embargo, la situación en peces parece ser distinta. En la dorada (*S. aurata*) y en pez cebra se ha demostrado que el TNF- α ejerce sus efectos proinflamatorios actuando sobre células endoteliales, en las que induce la expresión de E-selectinas y de diferentes quimioquinas CC y CX, mientras que activa débilmente a los macrófagos (Roca *et al.*, 2008).

Dado que no disponíamos de citoquinas recombinantes de trucha, utilizamos sobrenadantes condicionados de macrófagos estimulados con Levamisol o Poly I:C, que contienen actividad MAF, para estudiar si las líneas celulares TPS-2 y TSS, que contienen células endoteliales, son capaces de responder a esas citoquinas. La actividad MAF de peces estimula la explosión respiratoria y la actividad antibacteriana (Secombes, 1987; Graham y Secombes, 1988, 1990a; Mulero y Messenger, 1998) de macrófagos y se ha demostrado que contiene fundamentalmente IFN- γ y TNF- α (Jang *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 2005). Como control del ensayo y para comparar los resultados incluimos en los ensayos cultivos estimulados directamente con LPS.

Los resultados de la exposición de cultivos de macrófagos a los diversos sobrenadantes demuestran claramente que estos contienen actividad MAF, dado que inducen la producción de ROS intra- y extracelular (Figs. 31 y 33). No obstante, estos resultados también indican que los sobrenadantes condicionados inducidos por Levamisol o por Poly I:C contienen actividades MAF distintas, de forma que en el caso de MAF inducido por Poly I:C las respuestas estaban inhibidas en comparación con la estimulación directa con LPS. Este efecto inhibitorio de los sobrenadantes condicionados por Poly I:C también se ha descrito en otros casos en los que se usaron otros productos estimulantes (PMA, ConA) (Graham y Secombes, 1990a, b) y podría ser debido a la liberación por los macrófagos de factores anti-inflamatorios tipo IL-10, que inhibe la explosión respiratoria en peces (Savan *et al.*, 2003), en respuesta a la fuerte estimulación causada por el Poly I:C (ver Fig. 26).

La línea celular TPS-2 respondió a la exposición a los sobrenadantes, tanto condicionados por Poly I:C como por Levamisol, de forma semejante a los cultivos de

macrófagos, sugiriendo una vez más que esta línea contiene un alto porcentaje de macrófagos.

Por el contrario, la línea TSS se distingue de la TPS-2 y de los macrófagos por la respuesta frente a los sobrenadantes condicionados por Poly I:C, dado que esta era de tipo dosis-respuesta positiva (Fig. 33). Es decir, las células TSS, o al menos una parte importante de su población, no presentan inhibición de la producción de ROS en respuesta a los posibles factores inhibidores – tipo IL-10 – presentes en esos sobrenadantes condicionados. Aunque no tenemos datos en peces, esta respuesta podría explicarse por el hecho de que la IL-10 induce la producción de óxido nítrico en células endoteliales de mamífero, aunque también disminuye la producción de superóxidos (Zemse *et al.*, 2008). Dado que los ensayos con NBT o ferrocitocromo no distinguen entre ambos tipos de ROS, es posible que lo que la línea TSS, rica en células endoteliales, produzca en respuesta a esos sobrenadantes sea NO.

2.3. Producción de óxido nítrico

Otro de los mecanismos de defensa antimicrobiana es la producción por los macrófagos de óxido nítrico. En este trabajo hemos estudiado, tras la exposición a los inmunoestimulantes, la capacidad de producción de NO en las líneas celulares y los macrófagos mediante detección tanto intracelular de NO como extracelular de nitratos, así como la inducción de la expresión génica del enzima iNOS.

Dado que la disponibilidad de L-arginina, el metabolito inicial para la producción de NO por iNOS, está controlada también por la ruta de las arginasas, y que al menos en macrófagos la activación de una u otra ruta tiene importantes consecuencias funcionales, analizamos la expresión génica de la arginasa-2 en respuesta a la exposición a los inmunoestimulantes. Esta vía enzimática resulta en la producción de urea y L-ornitina, así como productos derivados de esta última (putrescina, espermina y espermidina), y modula la producción de NO resultante de la actividad iNOS.

Como se ha expuesto en la Introducción, la activación de los macrófagos puede llevarse a cabo a través de la vía clásica o la alternativa. La activación clásica está mediada por la enzima iNOS y da lugar a producción de ROS y NO (Nathan, 1992; Afonso *et al.*, 1998b). Esta vía depende de la expresión inducida de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la consiguiente producción de NO. En trucha arco iris se ha demostrado que la expresión génica de iNOS puede ser inducida *in vivo* por las infecciones bacterianas (Campos-Pérez *et al.*, 2000; Laing *et al.*, 1999) e *in vitro* por la exposición de los macrófagos a LPS (Laing *et al.*, 1999).

Tanto en mamíferos como en peces, la activación alternativa de macrófagos, dependiente de la actividad arginasa, desempeña un papel importante en la inducción de respuestas inmunitarias de tipo II, dirigidas contra patógenos extracelulares,

incrementando la actividad fagocítica y la expresión de los genes de MHC de clase II en los macrófagos (Gordon, 2003; Joerink *et al.*, 2006a,b; Popovic *et al.*, 2007), así como de producción de factores anti-inflamatorios y de reparación tisular (Mantovani *et al.*, 2002, 2004). En peces, se ha demostrado que la activación alternativa de los macrófagos está mediada por la isoforma arginasa-2 (Joerink *et al.*, 2006a,b).

Por otra parte, otras poblaciones celulares distintas de los macrófagos producen NO como molécula de señalización intercelular (Ray y Shah 2005; Dworakowski *et al.*, 2008). En la mayoría de los vertebrados la producción de NO en esos tipos celulares está mediada por sistemas enzimáticos distintos de iNOS, como nNOS en neuronas y eNOS en células endoteliales (Alderton *et al.*, 2001). Sin embargo, en peces no se ha podido demostrar mediante técnicas de biología molecular la existencia de un gen eNOS ortólogo del de otros vertebrados (Pelster, 2007), aunque si existen numerosas pruebas fisiológicas y de inmunolocalización de actividad NOS en células endoteliales de numerosas especies de peces (Agnisola y Pellegrino, 2007; Martin-Armas *et al.*, 2008).

Comenzando con el estudio de la producción de NO, se ha descrito en la bibliografía que los macrófagos de algunas especies de peces, como la trucha arco iris y la lubina presentan una baja capacidad de producción de este producto (Stafford *et al.*, 2001; Sarmiento *et al.*, 2004). Por este motivo, usamos dos métodos de ensayo para la detección de NO en los cultivos: el ensayo de Griess de cuantificación de nitritos, que mide indirectamente la liberación de NO al medio extracelular, y la detección directa de NO intracelular usando un método fluorimétrico de alta sensibilidad.

Los resultados de ambos tipos de ensayos no son directamente comparables, puesto que difieren en el producto que miden (nitritos / NO) y en el hecho de que el método de Griess detecta nitritos, un producto estable que se acumula en el medio extracelular. Por el contrario, el NO es una molécula de vida media muy corta, capaz de difundir a través de las membranas, pero que se transforma en peroxinitritos (ONOO^-) que reacciona rápidamente con moléculas intracelulares (proteínas, lípidos, azúcares y ácidos nucleicos) produciendo compuestos nitrados (Beckman *et al.*, 1990; Radi *et al.*, 1991), que no se detectan con ninguno de los dos métodos empleados. Probablemente debido a esto, los valores de los índices de estimulación que se obtuvieron con los dos métodos difieren notablemente, siendo más elevados los correspondientes al método de Griess, como puede observarse al comparar las Figs. 34 y 35. No obstante, los perfiles de respuestas que se observaron con ambos métodos fueron, en general, semejantes, tanto atendiendo a los tipos celulares y a la cinética, como a la actividad de los inmunoestimulantes (ver Tablas 17-18).

Nuestros resultados demuestran que las líneas TPS-2 y TSS contienen poblaciones celulares capaces de producir NO en respuesta a la exposición a los inmunoestimulantes, de forma semejante a como lo hacen los cultivos de macrófagos. Además, en todos los casos, tanto para macrófagos como para ambas líneas celulares de trucha arco iris, se

observó una escasa capacidad de producción de NO, como se pone de manifiesto por la bajas concentraciones de nitrito obtenidas (siempre inferiores a 9 μM), estando estos valores en el rango de las descritas por otros autores en cultivos de macrófagos de esta especie y de carpín dorado (Stafford *et al.*, 2001), y siendo un poco más altos que los descritos en la línea celular macrofágica TO de salmón Atlántico tras la estimulación con LPS (Pettersen *et al.*, 2008). En comparación, las concentraciones de nitritos alcanzadas en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos, principalmente macrófagos, de otras especies con mayor capacidad de producción de NO, como la dorada (Acosta *et al.*, 2005) y el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Tafalla y Novoa, 2000), llegan a valores superiores a 30 μM .

En cuanto al efecto de los diversos inmunoestimulantes en la producción de NO intra- y extracelular, las líneas celulares respondieron mejor a Poly I:C y a LPS, mientras que los macrófagos lo hicieron a LPS y, tras 8 horas de exposición, a Levamisol. En cuanto al efecto del Poly I:C sobre la producción de NO en las líneas celulares, se ha demostrado que cultivos de células endoteliales fagocíticas de salmón Atlántico, que tapizan los sinusoides del pronefros y el endocardio, responden a la estimulación con dosis altas (40 $\mu\text{g/ml}$) de Poly I:C incrementando significativamente la producción de NO, mientras que no respondían a la exposición a LPS (Martin-Armas *et al.*, 2008). Esto indica que la mejor respuesta de las líneas TSS y TPS-2 al Poly I:C se deba, principalmente, a la población endotelial de las mismas.

Por otra parte, es de resaltar que el Levamisol inhibía la producción de NO extracelular a las 24 horas en macrófagos y en la línea TPS-2, pero se producía el efecto contrario en cuanto a la detección de NO intracelular. No hemos encontrado una explicación para este hecho, salvo que el Levamisol interfiera de alguna forma con la liberación de NO al medio extracelular, quizá favoreciendo la reactividad del NO producido hacia peroxinitritos / nitratos. Aunque es conocido que el Levamisol es un inhibidor de la actividad fosfatasa alcalina de diversos tipos celulares de origen mesenquimático, incluidos los leucocitos (Jalanka y Lindberg, 1975), no hemos encontrado descripciones de que el Levamisol o que la inhibición de la actividad fosfatasa alcalina interfieran con la producción de radicales oxidativos (NO y O^-), como además demuestran nuestros resultados, puesto que se mantiene la producción de NO intracelular en presencia de Levamisol.

En general, la producción de NO extracelular aumentó con el tiempo de exposición a los inmunoestimulantes, excepto para la línea TPS-2, en la que se observó una clara disminución a las 24 horas. Por el contrario, la detección de NO intracelular indicó que los macrófagos presentaban una mayor capacidad de producción a las 24 horas, mientras que los valores más elevados en las líneas celulares se alcanzaban a una (particularmente para TSS) y ocho horas tras la exposición a los inmunoestimulantes. En ese sentido, se ha demostrado que la capacidad de cultivos de macrófagos de *C. aurata* (Neumann *et al.*, 2000) y de trucha (Stafford *et al.*, 2001 para producir óxido nítrico aumenta con el

tiempo en cultivo, lo que se correlaciona con la maduración de monocitos a macrófagos. En mamíferos, estos últimos producen mayores cantidades de NO que los monocitos (Bose y Farnia, 1995). De esta forma, nuestros resultados se pueden correlacionar con los discutidos anteriormente para la producción de ROS y la presencia de diferentes proporciones de poblaciones de macrófagos y células endoteliales en las líneas celulares. De esta forma, la línea TPS-2, con mayor porcentaje de células macrofágicas, tiende a presentar respuestas intermedias entre las de los cultivos de macrófagos y las de la línea TSS, la cual parece contener una mayor proporción de células endoteliales.

3. Expresión génica de iNOS y de arginasa-2

Con respecto a la expresión génica de iNOS, nuestros resultados demuestran que la expresión génica de este enzima se induce fuertemente en los macrófagos a las 4 horas, independientemente del tipo de inmunoestimulante, mientras que en ambas líneas celulares los valores de expresión relativa a ese tiempo eran mucho más bajos y dependientes del inmunoestimulante, siendo el Levamisol el mejor estimulador, seguido del LPS. A las 24 horas la expresión génica de iNOS descendió notablemente en prácticamente todos los casos, desviándose de esta situación únicamente las líneas celulares expuestas a las dosis altas de Poly I:C (ver Fig. 51).

Por el contrario, la inducción de la expresión génica de la enzima arginasa-2 mostró perfiles casi inversos a los de iNOS, de forma que los valores de expresión relativa eran semejantes en macrófagos y en las líneas celulares, y fuertemente dependientes del inmunoestimulante y del tiempo de estudio (ver Fig. 52). Así, en los macrófagos la expresión génica de este enzima era mayor a 4 horas, mientras que en las líneas lo era a las 24 horas, y el Poly I:C era el mejor inductor de la expresión de arginasa.

La rápida y fuerte estimulación de la expresión génica de iNOS en los cultivos de macrófagos expuestos a los inmunoestimulantes coincide con lo descrito tanto en macrófagos de mamíferos (Nathan y Xie 1994) como de peces (Neumann *et al.*, 1995, 1996; Joerink *et al.*, 2006a). La expresión génica de iNOS en macrófagos y líneas celulares de tipo macrófago de mamíferos está regulada por citoquinas y es también activada por el reconocimiento directo de algunos PAMPs por receptores PRRs y señalización intracelular vía el factor de transcripción NF κ B. Así, se ha descrito que el IFN- γ es un potente inductor de la expresión génica de iNOS (Nathan y Xie 1994; Weisz *et al.*, 1994). Otras citoquinas, como IL-1, TNF- α y los IFNs (α o β), tienen también un efecto inductor de la expresión génica de iNOS, probablemente actuando sinérgicamente con otras citoquinas y factores (Weisz *et al.*, 1994; MacMicking *et al.*, 1997). TGF- β reprime la expresión de iNOS (Chesrown *et al.*, 1994), mientras que IL-6 y IL-10 no tienen efecto sobre la inducción de la expresión génica de iNOS en macrófagos y líneas macrofágicas (Chesrown *et al.*, 1994; Weisz *et al.*, 1994). En cuanto a PAMPs, el LPS es un potente inductor de la expresión de iNOS en macrófagos (Chesrown *et al.*, 1994) y,

además, tiene un efecto sinérgico con todos los interferones (MacMicking *et al.*, 1997), de forma que la exposición a ambos productos, además de inducir la expresión génica del enzima, prolonga notablemente la vida media del RNAm para este enzima (Weisz *et al.*, 1994).

En nuestros resultados, la regulación de la expresión génica de iNOS en macrófagos es difícil de correlacionar con los perfiles de expresión génica de las diversas citoquinas que hemos estudiado, probablemente porque la inducción máxima del enzima se alcanza tras alcanzarse un cierto umbral de concentración de la citoquinas, por lo que pasado ese umbral no se observa un mayor índice de expresión relativa. Los que más se correlacionan son los de IL- β 1 y de TNF- α (1 y 2), ambos inductores de la expresión génica de iNOS. Este efecto es claramente visible al comparar los valores de las ratios de expresión relativa de iNOS y de esas citoquinas en respuesta a LPS y Poly I:C, buenos inductores de la expresión de ambas citoquinas, tanto en nuestros resultados como en los de otros autores (Engelsma *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 1999a; 2002; Saeij *et al.*, 2003), con la respuesta a Levamisol, que produce una menor inducción de ellas (ver Figs. 37, 43 y 41).

En cuanto a la acción de los interferones, nuestro estudio solamente ha analizado la expresión del gen de la proteína Mx-1 inducible por IFN α/β , como una medida indirecta de la producción de estas citoquinas (Collet y Secombes 2002, Jørgensen *et al.*, 2007). En nuestro resultado, la expresión génica de Mx-1 en macrófagos fue máxima tras la exposición a Poly I:C, hecho también demostrado en otros trabajos (Trobridge *et al.*, 1997, Jensen y Robertesen, 2000; Jensen *et al.*, 2002; Lockhart *et al.*, 2004), pero las ratios de expresión de iNOS tras la exposición a este inmunoestimulante fue más baja que la observada para LPS o Levamisol.

Las respuestas observadas en las líneas celulares en cuanto a la expresión génica de iNOS sugieren que hay una cierta inducción de la expresión, pero esta sucede solamente en una parte de la población celular y que, posiblemente está regulada por factores distintos de los que se encuentran en los cultivos de macrófagos. La expresión de iNOS en las líneas celulares puede suceder tanto en macrófagos como en células endoteliales, ya que ambos tipos, así como otros, expresan este enzima (Kanno *et al.*, 1994; Campos-Perez *et al.*, 2000), pero la regulación transcripcional de iNOS en estos cultivos, formados por diferentes tipos celulares, se diferencia claramente de la observada en los cultivos de macrófagos y parece estar sometida a las interacciones entre múltiples factores secretados o paracinos.

Así, los perfiles de las ratios de expresión de iNOS son semejantes en ambas líneas (ver Fig. 51), pero estos no se pueden correlacionar con los de las citoquinas IL- β 1 y TNF- α (1 y 2), ni tampoco con los de Mx-1. Por ejemplo, tras la estimulación con Poly I:C, tanto para TPS-2 como para TSS se alcanzan valores altos de expresión de esas citoquinas, pero la expresión de iNOS es baja e incluso aparece inhibida en TSS.

Probablemente esto refleja las interacciones entre múltiples factores, incluidos los efectos reguladores de citoquinas liberadas por la población no macrofágica, por ejemplo TGF- β , tanto en respuesta a los inmunoestimulantes como a la propia activación de los macrófagos y la producción de NO (Bogdan *et al.*, 2000). El TGF- β liberado, tanto por las células endoteliales como por los macrófagos, podría a su vez inhibir la expresión de iNOS en los macrófagos (Chesrown *et al.*, 1994), aunque en un estudio *in vivo* usando el modelo trucha arco iris – infección con VHSV no se encontró relación entre niveles elevados de expresión de TGF- β y la expresión de iNOS (Tafalla *et al.*, 2005).

En cuanto al efecto de los inmunoestimulantes, ya se ha indicado anteriormente que algunos PAMPs, como el LPS, son inductores de la expresión de iNOS. Este mismo hecho podría explicar la respuesta al Poly I:C, ya que se ha demostrado que la exposición al virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), un rabdovirus con genoma formado por RNA, induce la expresión de iNOS en diversos tejidos de trucha arco iris *in vivo* (Tafalla *et al.*, 2005), así como en cultivos celulares de la línea celular RTG-2 (Wang *et al.*, 2001). Paradójicamente, el Levamisol fue el estimulador más potente de la expresión de iNOS, pero no hemos encontrado datos previos sobre el efecto de este producto en la expresión génica de este enzima.

Respecto a la expresión génica de la arginasa-2, es interesante resaltar las diferencias de expresión observadas, tanto en el tiempo de máxima expresión como en las respuestas a los inmunoestimulantes, entre los cultivos de macrófagos y las líneas celulares. Por un lado, en las líneas su mayor expresión se detectó a 24 horas post-estimulación, cuando los niveles de expresión génica para la enzima iNOS y de producción de NO intracelular descendían. Este hecho es congruente con el papel de regulación atribuido a este enzima en la producción de NO vía el agotamiento intracelular de L-arginina, que es el sustrato de iNOS (Vincendeau *et al.*, 2003).

Con referencia al efecto de los inmunoestimulantes en la expresión génica de la arginasa-2, tanto las líneas celulares como los macrófagos mostraban valores más altos de expresión para el Poly I:C, mientras que las primeras no respondían casi al LPS y al Levamisol, y los macrófagos si lo hacían, casi por igual, a estos dos inmunoestimulantes. Es de señalar que en cultivos de macrófagos de carpa (Joerink *et al.*, 2006b) se ha descrito que la estimulación con LPS produce un incremento de la expresión génica de iNOS, pero no de arginasa-2. Aunque estas diferencias pueden ser especie-específicas, es más probable que puedan atribuirse a diferencias cuantitativas en el grado de expresión, que en general es bajo, y discrepancias semejantes en respuesta al LPS se han descrito también mamíferos (Bronte *et al.*, 2003). En cualquier caso, en mamíferos se ha demostrado que iNOS y arginasa se pueden co-expresar en macrófagos estimulados con LPS (Chang *et al.*, 1998) y nuestros resultados indican que los macrófagos de trucha pueden activarse por la ruta alternativa mediada por la expresión de arginasa-2, como se había indicado previamente en estudios en tejidos (Wright *et al.*, 2004).

La expresión génica de las arginasas en mamíferos es inducida por citoquinas de tipo-II, que conducen a respuestas de Th2, tales como IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- β (Bronte *et al.*, 2003). Desafortunadamente, dado que no hemos estudiado la expresión de ninguna de estas citoquinas, no podemos discutir sobre los posibles factores reguladores en nuestro modelo.

4. Expresión génica de COX-2

Al igual que en los mamíferos (Harris *et al.*, 2002), los eicosanoides (prostaglandinas y tromboxanos) son mediadores de los procesos inflamatorios en los peces (Rowley *et al.*, 1995), produciendo vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, pero también ejercen actividades inmunomoduladoras, tanto con efectos estimulantes como inhibitorios de la respuesta inmunitaria (Knight y Rowley, 1995). Sin embargo, tanto en mamíferos como en peces, las prostaglandinas (PGE₂) tienen efectos predominantemente inhibidores sobre los leucocitos, reduciendo la expresión de IL-1 β , TNF- α y IL-8, la proliferación celular, así como la explosión respiratoria y la expresión de *iNOS* en mamíferos (Knudsen *et al.*, 1986 y Harris *et al.*, 2002), y la actividad microbiciida de macrófagos y de expresión de MHC-II en leucocitos de trucha (Secombes *et al.*, 2001) y en la línea celular macrofágica SHK-1 de *S. salar* (Fast *et al.*, 2005).

En este estudio, analizamos la expresión del gen *COX-2* como una medida de actividad COX-2, la cual media la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas H₂ (PGH₂) que son luego metabolizadas por otras enzimas para producir prostaglandinas, prostaciclinas y tromboxanos (Knight y Rowley, 1995; Rowley, 1996). En nuestros resultados encontramos expresión del gen *COX-2* en los controles, no expuestos a inmunoestimulantes, tanto en las líneas celulares como en los macrófagos en cultivo, de forma claramente más intensa en la línea TSS. No obstante, la expresión de *COX-2* aumentaba notablemente en respuesta a la estimulación con LPS o Poly I:C, con picos de las ratios de expresión a las 4 horas de estimulación que descendían claramente a las 24 horas. La respuesta a la exposición a Levamisol era muy inferior, incluso con un pequeño descenso de la expresión en relación a los controles a las 24 horas.

Respecto a la expresión de COX-2 en los cultivos control, esta puede ser debida a que existe realmente una expresión constitutiva del gen o a que las células, especialmente los macrófagos, se encuentren estimulados inespecíficamente por las condiciones del cultivo, como se ha indicado en el caso de la producción de ROS. En cuanto a los macrófagos, existen datos contradictorios en la bibliografía; en las líneas celulares macrofágicas RTS11 de trucha arco iris (Brubacher *et al.*, 2000) y en la SHK-1 de salmón Atlántico (Fast *et al.*, 2005) se encontró expresión constitutiva muy débil de este gen, al igual que se ha descrito en pronefros, bazo y branquias de individuos sanos de salmón Atlántico (Ingerslev *et al.*, 2006) y, más débilmente, en leucocitos de pronefros

de lubina (Buonocore *et al.*, 2005b). Por otra parte, estudios *in vivo* en trucha arco iris Zou *et al.* (1999b) describieron que la expresión de dicha enzima era no constitutiva, sino inducible por infección con *Aeromonas salmonicida*.

En cuanto a las líneas celulares, es de resaltar que los mayores niveles de expresión de COX-2 en los cultivos control se encontraron en la línea TSS, que contiene un mayor porcentaje de células endoteliales. Es posible que la mayor expresión basal se deba a estas últimas, dado que también en teleósteos las células endoteliales expresan COX-2 y producen eicosanoides (Secombes *et al.*, 2001). En este sentido, entre otras citoquinas que ejercen efectos reguladores sobre la expresión de COX-2, es interesante resaltar el VEGF. Este factor induce la expresión de COX-2 en células endoteliales humanas (HUVEC) (Wu *et al.*, 2003), y puesto que la línea TSS (y también TPS-2) expresa VEGF (Riaño, 2004), esto contribuiría a explicar el mayor nivel de expresión basal de COX-2 en TSS.

Con respecto a la respuesta a los inmunoestimulantes, el notable incremento de la expresión de COX-2 tras la estimulación con LPS ha sido descrito en peces, tanto *in vivo* (Zou *et al.*, 1999b; Buonocore *et al.*, 2005a), como *in vitro*, usando en este caso cultivos de leucocitos de pronefros (Buonocore *et al.*, 2005a) y líneas celulares macrofágicas (Hong *et al.*, 2001; Brubacher *et al.*, 2000; Fast *et al.*, 2005).

Sin embargo, el efecto del Poly I:C sobre la expresión de COX-2 ha sido poco estudiado. En nuestros resultados, es notable el efecto del Poly I:C, que indujo respuestas de un orden de magnitud unas 10 veces superior a las observadas para el LPS. Los datos bibliográficos encontrados a este respecto son contradictorios. En un trabajo usando cultivos de monocitos de trucha se ha descrito que el tratamiento con este inmunoestimulante induce muy débilmente la expresión de COX-2, con un valor máximo a las 24 horas (Iliev *et al.*, 2005b), lo que se relacionó con el hecho de que el Poly I:C induce preferentemente respuestas antivirales, mientras que el LPS induce respuestas antibacterianas. Por otra parte, en cultivos de macrófagos purificados del pronefros de dorada (Sepulcre *et al.*, 2007) se ha descrito una situación semejante a la de nuestros resultados, en la que el Poly I:C inducía niveles de expresión de COX-2 mucho más elevados que el LPS.

Una posible explicación a esos efectos contradictorios pudiera deberse al efecto de las citoquinas liberadas al medio, de forma que no es directamente la activación debida al reconocimiento de Poly I:C la que media la expresión de COX-2, sino la acción de citoquinas liberadas en respuesta al inmunoestimulante y que, secundariamente, inducen la expresión de la enzima. Este efecto podría estar mediado por IL1- β ya que tanto *in vivo* (Lindenstrøm *et al.*, 2004; Buonocore *et al.*, 2005b) como en líneas celulares macrofágicas (Hong *et al.*, 2001; Fast *et al.*, 2005) se ha descrito que esta interleuquina induce la expresión de COX-2 en peces. Un dato complementario a esta hipótesis es la respuesta diferencial observada en nuestros resultados entre los cultivos de macrófagos y

la línea celular TPS-2, ya que esta responde mejor a la concentración más baja de Poly I:C (1 µg/ml) que aquellos en cuanto a la expresión de COX-2 (ver Fig. 49). Esto coincide con los perfiles de expresión de IL-1β producidos en respuesta a Poly I:C en ambos casos (ver Fig. 37).

En cuanto al efecto del Levamisol, no hemos encontrado referencias relativas a su efecto sobre la expresión de COX-2 en peces, ni *in vivo* ni *in vitro*. No obstante, se ha descrito que ejerce un efecto inhibitorio de la expresión de COX-2 y de producción de PGE₂ en células cancerosas humanas de colon estimuladas con LPS (Liu *et al.*, 2004). Estos autores sugirieron que el efecto inmunoestimulante *in vivo* del Levamisol podría estar mediado, en parte, por este efecto inhibitorio de la producción de prostaglandinas que, como se ha indicado, tienen un efecto inmunosupresor.

Respecto a la cinética de expresión de COX-2, el notable descenso de las ratios de expresión observado las 24 horas en todos los casos puede atribuirse a la retroinhibición que los eicosanoides, principalmente prostaglandinas, ejercen sobre la expresión de COX-2, que ha sido descrita en mamíferos y planteada como hipótesis para explicar el efecto de PGE₂ en la expresión de COX-2 en la línea células SHK-1 de salmón Atlántico (Fast *et al.*, 2005). Una segunda explicación, puede deberse a la acción de IL-1b y TNF-α, dos citoquinas que se han descrito como principales mediadoras de la expresión de COX-2. En nuestros resultados, las cinéticas de expresión de COX-2, IL-1b y TNF-α son semejantes, con picos a las 4 horas post-exposición y un marcado descenso a las 24 horas. Ya se ha indicado anteriormente, que en peces, al igual que en mamíferos, la expresión de COX-2 es inducida por IL-1β (Hong *et al.*, 2001; Lindenstrøm *et al.*, 2004; Buonocore *et al.*, 2005b; Fast *et al.*, 2005). En macrófagos de mamíferos se ha demostrado que la exposición *in vitro* a IL-1β o a TNF-α incrementa la expresión de COX-2 a través de la estabilización del RNAm, antes que por incremento de la velocidad de transcripción, pero esa estabilización es dependiente de la presencia continua de IL-1β, mientras que la exposición a largo plazo a TNF-α induce la desestabilización del RNAm (Huang *et al.*, 2000).

5. Expresión génica MHC-II

Al igual que en mamíferos, el MHC-II tiene un papel fundamental en las respuestas inmunitarias antígeno-específicas de peces a través de la interacción TCR-péptido-MHC-II (Vallejo *et al.*, 1992a). Igualmente, en peces la expresión de MHC-II sucede fundamentalmente en monocito-macrófagos (Vallejo *et al.*, 1992a; Rodrigues *et al.*, 1995) y en células dendríticas (Koppang *et al.*, 2003), pero también se puede inducir en otros tipos celulares, como células endoteliales (Roca *et al.*, 2008).

En nuestros resultados, los cultivos control (no estimulados) de macrófagos y de las líneas celulares mostraron expresión de la cadena β del MHC-II de *O. mykiss*. Tras la

exposición a los distintos inmunoestimulantes, los cultivos de macrófagos mostraron un claro incremento (superior a 5 veces el control) de las ratios de expresión para la dosis alta de LPS, pero únicamente a las 4 horas post-estimulación. Por su parte, en cuanto a los perfiles de expresión de MHC-II, las líneas celulares se caracterizaron por responder al LPS de forma semejante a los macrófagos, pero además la línea TPS-2 mostraba un incremento de la expresión en respuesta a Poly I:C, que aumentaba a las 24 horas, y que en los otros tipos celulares era mucho más débil (ver Fig. 45).

Mientras que la expresión constitutiva de MHC-II se ha descrito previamente en diversas líneas celulares macrofágicas de peces, como RTS-11 (Brubacher *et al.*, 2000) y SHK-1 (Koppang *et al.*, 1999; Fast *et al.*, 2005), la situación es más variable tras la estimulación con diversos PAMPs o citoquinas. Así, el LPS y el TNF- α incrementan la expresión del MHC-II en macrófagos de trucha (Knight *et al.*, 1998), mientras que en la línea celular RTS11 no se apreciaron alteraciones al exponerlas a LPS (Brubacher *et al.*, 2000). Sin embargo, Koppang *et al.*, (1999) y Fast *et al.* (2005) describieron que en la línea SHK-1 se producía un incremento de la expresión de MHC-II a las 4 horas tras la estimulación con LPS, seguida de un marcado descenso a las 24 horas / 72 horas. Este resultado de incremento temprano de la expresión de MHC-II, seguido de un marcado descenso a tiempos más largos tras la estimulación con LPS se ha descrito también en cultivos de leucocitos de pronefros de lubina (Buonocore *et al.*, 2007). En el caso de la línea SHK-1 este efecto se relacionó la represión de la expresión de MHC-II con la producción de PGE2, un factor que también inhibe, de forma dosis dependiente, la expresión de MHC-II en mamíferos (Harizi y Gualde, 2002).

La respuesta de la línea celular TPS-2 frente al Poly I:C es claramente distinta de la encontrada en los cultivos de macrófagos y en la línea TSS. Dicha respuesta podría explicarse por la interacción entre las poblaciones de células endoteliales y de macrófagos, tal como indicaron Roca *et al.* (2008). Es posible que, en respuesta al Poly I:C, las células endoteliales liberen quimioquinas o expresen moléculas accesorias que induzcan una respuesta sostenida de la expresión de MHC-II en los macrófagos. En ese sentido, el Poly I:C induce un notable incremento de la expresión de arginasa a las 24 horas en la línea TPS-2, una actividad que se ha correlacionado con la activación alternativa de los macrófagos, una vía que – en mamíferos – incrementa la expresión de MHC-II en macrófagos (Joerink *et al.*, 2006a,b). Tanto en los macrófagos como en la línea TSS hay expresión sostenida de arginasa, pero no el incremento que se observa en la línea TPS-2 y esto podría contribuir a explicar las diferencias observadas.

6. Comparación de los perfiles de expresión de citoquinas y de la proteína Mx1

Dado que un objetivo de esta Tesis es establecer si las líneas celulares de estroma que hemos usado pueden servir como modelos, que repliquen las respuestas de cultivos

primarios de macrófagos, para la selección de potenciales inmunoestimulantes, finalizamos la discusión comparando los perfiles de expresión de estos mediadores de las respuestas inmunitarias innatas.

Tal como se ha visto a lo largo de la discusión, tanto los cultivos de macrófagos como ambas líneas celulares de trucha respondieron a los diversos inmunoestimulantes modulando la expresión génica de las citoquinas estudiadas: IL-1, IL-8, TNF- α 1 y α 2. Además, también se observó la modulación de la expresión de la proteína Mx inducible por interferón. La elección de estas moléculas para nuestro estudio, que se realizó en el momento de iniciar el trabajo, se hizo de forma que representaran las principales familias estructurales y funcionales de citoquinas pro-inflamatorias de las que, entonces, se disponía de información suficiente para el estudio de su expresión génica en *O. mykiss*. Así, IL-1 β es representativa de la familia de la interleuquina-1, con efectos proinflamatorios, IL-8 es una de las quimioquinas tipo CXC mejor caracterizadas funcionalmente en teleósteos, y TNF- α 1 y α 2, factores característicos de la superfamilia del TNF, cuyas funciones mediadoras de las respuestas inflamatorias han sido claramente demostradas en peces. En aquel momento, no se disponía de la secuencia de IFNs en peces y, por tanto, usamos el estudio de la expresión de la proteína Mx1, inducible por IFN, como medida indirecta de la producción de este mediador de la inflamación perteneciente a la familia de las citoquinas de clase II.

En primer lugar, es interesante resaltar que, en nuestro estudio, tanto los cultivos de macrófagos como de las líneas celulares TSS y TPS-2 no expuestos a los inmunoestimulantes mostraron expresión génica para las citoquinas IL-1, IL-8, TNF- α 1 y α 2. En cuanto a la proteína Mx1, también se expresaba en los cultivos no expuestos a los inmunoestimulantes de macrófagos y de la línea TPS-2, pero no en los de la línea TSS. Nos referimos a expresión basal en lugar de constitutiva, término comúnmente usado por numerosos autores en experiencias *in vitro* similares a las nuestras usando cultivos celulares (ver por ejemplo, Brubacher *et al.*, 2000), porque *in vitro* es difícil asegurar que no se produzca un cierto grado de estimulación inespecífica, bien debida al proceso de aislamiento de los macrófagos o a componentes del medio, aunque estos estén certificados como libres de endotoxinas, que induzca la expresión de los genes estudiados.

Aunque la expresión de los genes para las citoquinas indicadas anteriormente y para la familia de las proteínas Mx está asociada a la inducción de respuestas inmunitarias y de inflamación (Savan y Sakai, 2006), existen referencias previas que ponen de manifiesto un cierto grado de expresión basal de las mismas en cultivos de macrófagos y de líneas celulares macrofágicas de teleósteos. Así, la expresión basal de IL-1 se ha observado también en la línea celular RTS11 de macrófagos de trucha arco iris (Brubacher *et al.*, 2000) y en cultivo de leucocitos de pronefros de trucha (Pleguezuelos *et al.*, 2000). Igualmente, se ha observado expresión basal de IL-8 en cultivos de

leucocitos de pronefros de carpa común (Huisin *et al.*, 2003) y de trucha arco iris (Montero *et al.*, 2008). En cuanto a TNF- α , no se ha descrito expresión basal de este factor en cultivos de macrófagos aislados de trucha arco iris o carpa (Zou *et al.*, 2002; Saeij *et al.*, 2003), pero si en la línea celular RTS11 de trucha arco iris (Laing *et al.*, 2001).

Por lo que respecta a la falta de expresión basal de Mx1 en la línea TSS, no tenemos hipótesis que expliquen este hecho diferencial respecto a los cultivos de macrófagos y la línea TPS-2. Podría ser debido a las interacciones entre sus diversas poblaciones celulares, con una mayor proporción de células endoteliales, o a que presente una expresión inconstante de este gen, como se ha descrito para la línea RTS11, en la que la expresión es ocasional, e incluso en la línea no macrofágica RTG-2 de gónada de *O. mykiss* (DeWitte-Orr *et al.*, 2007).

En cuanto a los perfiles de expresión de las citoquinas en respuesta a los inmunoestimulantes (ver Fig. 37, 39, 41 y 43), los macrófagos y las líneas celulares se diferenciaron principalmente en los valores máximos de las ratios de expresión para cada citoquina y los tiempos a los que se alcanzaban esos valores máximos, tras la exposición a LPS o Levamisol. En cuanto a las respuestas al Poly I:C, los perfiles de expresión génica fueron más semejantes entre los diferentes tipos de células. En general, las mejores respuestas se observaron frente al Poly I:C y los macrófagos presentaron respuestas más altas frente al LPS que las líneas celulares.

En cuanto a la expresión de Mx1, esta fue inducida en todos los tipos celulares por la exposición al Poly I:C, alcanzándose los valores más altos a las 24 horas, mientras que la respuesta fue pequeña y variable tras la exposición a los otros inmunoestimulantes.

Para explicar las diferencias observadas respecto a los cultivos de macrófagos, los resultados obtenidos en las líneas TSS y TPS-2 deben correlacionarse con la variedad de poblaciones celulares que contienen (macrófagos, células endoteliales y células fibroblásticas / reticulares), que establecerán interacciones entre ellas, mediadas por contactos célula-célula (Roca *et al.*, 2008) y redes de citoquinas (con acción paracrina y endocrina). En los teleósteos existen muchas lagunas en el conocimiento de las citoquinas producidas por tipos celulares distintos de los leucocitos y, menos aún, de las interacciones que se establecen mediante redes de citoquinas y contactos célula-célula. No obstante, si se considera la variedad de citoquinas y factores de crecimiento producidos por células endoteliales y células fibroblásticas / reticulares en mamíferos (ver revisiones por Ibelgafts, 2009; Oppenheim *et al.*, 2009), se puede hipotetizar acerca de lo que sucede en nuestros cultivos de células del estroma de pronefros y bazo de *O. mykiss*.

En cuanto a la capacidad de los macrófagos de peces teleósteos, a manera de resumen, ya se ha indicado a lo largo de esta Discusión que estos responden a diversos

inmunoestimulantes, especialmente a LPS, incrementando la expresión de génica de IL-1 (Engelsma *et al.*, 2001,2003; Zou *et al.*, 2002; Saeij *et al.*, 2003), IL-8 (Lee *et al.*, 2001), y TNF- α 1 y α 2 (Zou *et al.*, 2002; Saeij *et al.*, 2003; Grayfer *et al.*, 2008). Además, las células de líneas macrofágicas, como RTS-11 de trucha, TO de salmón Atlántico o SHK-1 incrementan la expresión de IL-1, IL-11, IL-8 y TNF- α tras la estimulación con diversos inmunoestimulantes (LPS., Poly I:C) o citoquinas recombinantes (rIL-8, rCK-6) (Zou *et al.*, 1999b; Fast *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2008; Pettersen *et al.*, 2008).

Respecto a las células endoteliales en peces, se ha descrito la expresión génica de IL-1 en células sinusoidales de *S. salar* (Martín-Armas *et al.*, 2008) y de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y TGF- β 1 en células endoteliales cardíacas de dorada (Roca *et al.*, 2008). Además, en este último tipo celular se demostró que la exposición a TNF- α recombinante y otros PAMPs (flagelina o DNA de *Vibrio anguillarum*) incrementaba la expresión de E-selectinas, lo que se correlacionaba con un incremento de la adhesión de leucocitos a las células endoteliales *in vitro* (Roca *et al.*, 2008).

En cuanto a las células fibroblásticas de las líneas TSS y TPS-2, se ha indicado que este tipo debe corresponderse con células reticulares del estroma del pronefros y del bazo respectivamente (Carracedo, 2003), que son fenotípicamente semejantes a las de la médula ósea de mamíferos (Castillo *et al.*, 1987; Razquin *et al.*, 1990). En mamíferos estos tipos celulares (fibroblastos y células del estroma de la médula ósea) son capaces de producir citoquinas inmunorreguladoras, como IL-1, IL8, IL-11, TNF- α , y TGF- β (Ibelgaufts, 2009; Oppenheim *et al.*, 2009). En teleósteos no conocemos de la existencia de estudios detallados sobre la expresión de citoquinas en estos tipos celulares *in vivo*, y no se han realizado estudios diferenciales para este tipo celular en líneas celulares como las aquí descritas, procedentes del estroma de órganos hematopoyéticos y que contengan células de tipo fibroblástico / reticular.

Sobre estas bases, se pueden establecer hipótesis que intenten explicar las diferencias que hemos observado entre los cultivos de macrófagos y las líneas TSS y TPS-2 en cuanto a producción de citoquinas, sobre la base de las redes de citoquinas que se establezcan en los cultivos expuestos a los inmunoestimulantes. Así, en respuesta a la estimulación directa de las células endoteliales y fibroblásticas / reticulares, o bien indirectamente por la acción de citoquinas liberadas por los macrófagos activados, por los PAMPs, las células endoteliales podrían producir factores que modulen la respuesta de los macrófagos contenidos en estas líneas. Entre esos factores inhibitorios de la activación de los macrófagos producidos por los otros tipos celulares se encontrarían TGF- β y IL-11, como se ha descrito en mamíferos (Werner *et al.*, 2000; Trepicchio *et al.*, 1996).

También, las células endoteliales y las fibroblásticas / reticulares son probablemente capaces de producir eicosanoides, incluida prostaglandina E2, como indican nuestros resultados de expresión de COX-2. Las prostaglandinas tienen un claro efecto inhibitor de las repuestas inflamatorias en los macrófagos, tanto en mamíferos (Betz y Fox, 1991; Pinge-Filho *et al.*, 1999) como en peces (Rowley *et al.*, 1995) y reduce la expresión de IL-1, TNF- α y de MHC-II en la línea macrofágica SHK1 de salmón Atlántico (Fast *et al.*, 2005).

7. Las líneas celulares con poblaciones celulares heterogéneas como modelos de cribado para la selección de inmunoestimulantes.

En esta Tesis hemos utilizado dos líneas celulares obtenidas a partir de subcultivos de tejido del bazo y del pronefros de trucha arco iris, que están formadas por varias poblaciones celulares del estroma hematopoyético y que tienen la capacidad de formar espontáneamente cultivos histotípicos (Diago, 1996; Diago *et al.*, 1993, 1995; Carracedo, 2003), para estudiar su posible uso como sistemas para la selección preliminar de inmunoestimulantes sobre la base de ensayos *in vitro* y de expresión génica de factores pro-inflamatorios.

Hasta el momento, ha predominado el uso de sistemas de ensayos que incluyen cultivos primarios de leucocitos o de líneas celulares clonadas, o al menos enriquecidas en un tipo celular, que generalmente forman cultivos en monocapa (bidimensionales), para realizar estudios *in vitro* semejantes a los utilizados en este trabajo. Aunque en principio el uso de estos sistemas representa una ventaja para la manejabilidad y repetitividad del modelo, esto no es siempre cierto, especialmente cuando se trata de establecer modelos que se asemejan más en su comportamiento a la situación *in vivo*.

Así, hoy en día se reconoce que sistemas más complejos, que incluyen varios tipos celulares y cultivos tridimensionales, que pueden dar lugar a modelos histotípicos u organotípicos, reproducen de manera más fiel el escenario *in vivo* y son mejores para predecir resultados *in vivo* en estudios toxicológicos y farmacológicos o del cáncer *in vitro* (Griffith y Swartz, 2006; Yamada y Cukierman, 2007). Al igual que sucede en las líneas celulares que nosotros hemos utilizado, estos modelos permiten que se establezcan interrelaciones celulares complejas, tanto físicas como mediadas por microambientes humorales (redes de citoquinas y otros factores).

En ese sentido y en el contexto de esta Tesis, se ha demostrado que componentes de la matriz extracelular, tales como el colágeno y los derivados de su proteólisis modulan las respuestas inflamatorias (Pacifci *et al.*, 1991). Esta modulación afecta a la activación de los macrófagos, tanto en mamíferos como en peces (Castillo-Briceno *et al.*, 2009). Estos autores han demostrado en *S. aurata* que el colágeno nativo prima la explosión respiratoria, así como la expresión génica de genes proinflamatorios (como IL-1 β y

COX-2) de macrófagos en cultivo, lo que es un reflejo de los procesos de regulación que la matriz celular ejerce sobre las células. Es evidente que en los cultivos primarios de macrófagos no se da esta interacción, que si está presente en los cultivos de las líneas de estroma hematopoyético TPS-2 y TSS, en las cuales se demostró la presencia de matriz extracelular, incluyendo fibras estructuralmente semejantes a colágeno (Carracedo, 2003).

El conjunto de nuestros resultados, en comparación con los encontrados en cultivos primarios de macrófagos, demuestran que las líneas TSS y TPS-2, aunque replican parcialmente las respuestas de los macrófagos, muestran características diferenciales que pueden ser atribuidas a las interacciones que se establecen entre los diversos tipos celulares que las componen. Nuestros resultados indican que estas interrelaciones en las líneas TPS-2 y TSS replican, en cierta medida, el conjunto de respuestas inmunorreguladoras que suceden *in vivo* tras la exposición a los inmunoestimulantes.

Por tanto, estas líneas celulares pueden ser mejores modelos para el estudio *in vitro* de la acción pro-inflamatoria de los inmunoestimulantes que los cultivos de macrófagos purificados y podrían servir como un mejor sistema de cribado inicial, con resultados más trasladables a las respuestas *in vivo*, para la búsqueda de nuevos inmunoestimulantes aplicables a la acuicultura comercial.

———— **Conclusiones** ————

1. Las líneas celulares TSS y TPS-2, derivadas respectivamente del estroma del bazo y del pronefros de *Oncorhynchus mykiss*, al igual que los cultivos primarios de macrófagos, responden a la exposición a los inmunoestimulantes LPS, Levamisol y Poly I:C y a actividad MAF incrementando la fagocitosis y la producción de radicales oxidativos, que son algunos de los mecanismos de defensa innata que se producen *in vivo* tras la inmunoestimulación. Por lo tanto, para salmónidos, ambas líneas celulares pueden ser utilizadas como modelos para la experimentación *in vitro* que implique ensayos biológicos para esas actividades de la inmunidad innata.
2. Dichas líneas celulares estromáticas son capaces de elaborar respuestas de tipo proinflamatorio tras la exposición a los inmunoestimulantes LPS, Levamisol y Poly I:C, como demuestra la activación de la expresión génica de las enzimas inducibles COX-2, iNOS y arginasa-2, de las citoquinas IL-1 β , TNF- α , IL-8, de la proteína Mx-1 inducible por interferón y de la cadena β del MHC-II de *O. mykiss*. En consecuencia, para salmónidos, las dos líneas celulares pueden ser utilizadas como modelos para la experimentación *in vitro* que implique ensayos de expresión de genes inmunorreguladores de las respuestas inflamatorias.
3. Tanto en los ensayos biológicos como en los de expresión de genes inmunorreguladores, las respuestas de las líneas celulares estromáticas TSS y TPS-2 para cada inmunoestimulante difieren cualitativa y cuantitativamente de las observadas en los cultivos primarios de macrófagos para ese mismo inmunoestimulante. Este hecho indica la existencia de procesos de modulación de las respuestas, que se pueden atribuir a las interacciones entre poblaciones celulares heterogéneas en las líneas celulares.
4. El conjunto de los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que las líneas celulares TSS y TPS-2, que originan cultivos con características histotípicas, pueden ser utilizadas como modelos alternativos a la experimentación *in vivo*, así como a los cultivos primarios de macrófagos (que requieren el uso continuo de animales para su obtención), para realizar ensayos biológicos y de expresión de genes inmunorreguladores *in vitro* que estudien el efecto de productos inmunoestimulantes sobre la activación de mecanismos de defensa innata y proinflamatorios en salmónidos.

———— **Anexos** ————

Anexo I. Ejemplos de gráficas obtenidas para hallar las eficiencias de los diferentes cebadores utilizados para PCR a tiempo real, y tablas de todas las eficiencias para las diferentes muestras.

β -actina TSS 4h

IL-1 TSS 4h

IL-8 TSS 4h

TNF-1 TSS 4h

TNF-2 TSS 4h

MHC-II TSS 4h

Mx-1 TSS 4h

Cox-2 TSS 4h

iNOS TSS 4h

Arginasa TSS 4h

Cebadores	TSS 4h	TPS-2 4h	Macrófagos 4h
B-actina	1,98	1,99	2,03
IL-1	1,92	1,99	1,92
IL-8	1,96	1,98	2,01
TNF-1	1,98	2,02	2,05
TNF-2	1,96	1,99	1,89
MHC-II	2	2,07	2,03
Mx-1	1,91	1,92	1,95
Cox-2	1,99	2,01	1,89
iNOS	1,99	2,02	1,98
Arginasa	1,98	2,02	2,09

Tabla 19.- Eficiencias obtenidas de todos los cebadores para las muestras estimuladas durante 4 horas

Cebadores	TSS 24h	TPS-2 24h	Macrófagos 24h
B-actina	2,01	2,02	1,99
IL-1	2,04	1,98	1,98
IL-8	2,02	2	1,98
TNF-1	2,02	2	1,99
TNF-2	1,98	2,04	1,98
MHC-II	2,01	2,05	1,99
Mx-1	1,98	1,97	1,92
Cox-2	2,06	1,96	1,98
iNOS	2,08	2	2,04
Arginasa	2,03	2,07	2

Tabla 20.- Eficiencias obtenidas de todos los cebadores para las muestras estimuladas durante 24 horas

---

Bibliografía

- Acosta, F.**, Real, F., Ellis, A.E., Tabraue, C., Padilla, D. y Ruiz de Galarreta, C.M. 2005. Influence of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection with *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida. *Fish and Shellfish Immunology*. 18: 31-38.
- Aderem, A. y Ulevitch, R. J.** 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406: 782-787.
- Afonso, A.**, Silva, J., Lousada, S., Ellis, A. E., y Silva, M. T. 1998a. Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 319-338.
- Afonso, A.**, Lousada, S., Silva, J., Ellis, A. E., y Silva, M. T. 1998b. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 27-37.
- Agius, C.** 1985. The melano-macrophages centers of fish: a review. En *Fish Immunology*. Manning, M.J. y Tatner, M.F. (Ed). Academic Press, London, Pags.: 85-99.
- Agius, C. y Agbede, S. A.** 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology*. 24:471-488.
- Agnisola, C. y Pellegrino, D.** 2007. Role of nitric oxide in vascular regulation in fish. En *Advances in Experimental Biology Nitric Oxide*. Bruno Tota y Barry Trimmer (Eds). Elsevier, Pags.: 293-310.
- Ainsworth, A. J.** 1992. Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 123-148.
- Ajuebor, M. N.**, Das, A. M., Virag, L., Flower, R. J., Szabo, C., y Perretti, M. 1999. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *Journal Immunology*. 162: 1685-1691.
- Akira, S. y Takeda, K.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Review Immunology*. 4: 499-511.
- Akira, S.**, Takeda, K., y Kaisho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2: 675-680.
- Akira, S.**, Uematsu, S., y Takeuchi, O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 124: 783-801.

- Alderton, W. K.**, Cooper, C. E., y Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357: 593-615.
- Aldridge, C.**, Razzak, A., Babcock, T. A., Helton, W. S., y Espot, N. J. 2008. Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production is decreased by an omega-3 fatty acid lipid emulsion. *The Journal of Surgical Research*. 149: 296-302.
- Alexander, J. B.** 1985. Non-immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish. En *Fish Immunology.*, M.J.Manning y M.F.Tatner, (Eds). Academic Press, Londres, Pags. 133-140.
- Alexander, J. B. y Ingram, G. A.** 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 249-279.
- Alexopoulou, L.**, Holt, A. C., Medzhitov, R., y Flavell, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413: 732-738.
- Altmann, S. M.**, Mellon, M. T., Distel, D. L., y Kim, C. H. 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Virology*. 77: 1992-2002.
- Álvarez, F.** 1986. Caracterización de elementos inmunocompetentes en *Salmo trutta fario*. Cambios en los órganos linfoides periféricos en truchas infectadas por *Saprolegnia*. Tesina de licenciatura, Facultad de Biología, Universidad de León, España.
- Álvarez, F.**, Razquin, B.E., Villena, A.J., Lopez-Fierro, P., y Zapata, A. G. 1988. Alterations in the peripheral lymphoid organs and differential leukocyte counts in *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta fario*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 18: 181-193.
- Álvarez, F.**, Razquin, B.E., Villena, A.J. y Zapata, A. G. 1998. Seasonal changes in the lymphoid organs of wild brown trout, *Salmo trutta* L: a morphometrical study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 64: 267-278.
- Álvarez-Pellitero, P.** 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 126: 171-198.
- Anderson, C.D., Roberts R. J.** 1975. A comparison of effects of temperature on wound healing in a tropical and temperate teleost. *Journal of Fish Biology*. 7: 173-182.
- Anderson, D.P.** 1990. Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. *American Fisheries Society Symposium*. 8: 38-50.
- Anderson, D.P.** 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 281-307.
- Anderson, D. P.** 1997. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. *Developments in Biological Standardization*. 90: 257-265.
- Anderson, D. P. y Jeney, G.** 1992. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 34: 379-389.

- Anderson, K. V. y Nusslein-Volhard, C.** 1984. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*. 311: 223-227.
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D., Kondo, H. y Hirono, I.** 2008. Molecular innate in teleosts fish: Review and future perspectives. *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress*. Pags.: 263–276.
- Arkoosh, M. R. y Kaattari, S. L.** 1991. Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental and Comparative Immunology*. 15: 279-293.
- Auch, C. J., Saha, R. N., Sheikh, F. G., Liu, X., Jacobs, B. L., y Pahan, K.** 2004. Role of protein kinase R in double-stranded RNA-induced expression of nitric oxide synthase in human astroglia. *FEBS Letters*. 563: 223-228.
- Austin B.A. y Austin D.A** 1999. Pathogenicity. En *Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and Wild Fish*. Praxis Publishing Ltd., Chichester, UK Pags 243-2803.
- Baba, T., Watase, Y., y Yoshinaga, Y.** 1993. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakko*. 59: 301-307.
- Babior, B. M.** 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New England Journal Medicine*. 298: 659-668.
- Barton, G. M.** 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*. 118: 413-420.
- Barton, G. M. y Medzhitov, R.** 2002. Toll-like receptors and their ligands. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 270: 81-92.
- Bayne, C. J. y Gerwick, L.** 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 725-743.
- Bayne, C. J. y Levy, S.** 1991. The respiratory burst of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), phagocytes is modulated by sympathetic neurotransmitters and the "neuro" peptide ACTH. *Journal of Fish Biology*. 38: 77-86.
- Bayne, C. J., Gerwick, L., Fujiki, K., Nakao, M., y Yano, T.** 2001. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*. 25:205-217.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., y Freeman, B. A.** 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 1620-1624.
- Bernard, D., Six, A., Rigottier-Gois, L., Messiaen, S., Chilmonczyk, S., Quillet, E., Boudinot, P., y Benmansour, A.** 2006. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *Journal Immunology*. 176: 3942-3949.
- Bernstein R. M., Schluter S.F., y Marchalonis J.J.** 1998. Immunity. En *The physiology of fishes*. Evans, D.H. (Ed). CRR Press LLC, USA, Pags. 2215-242.

- Betz, M. y Fox, B.S.** 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *Journal Immunology*. 146: 108-113.
- Bielek, E.** 1981. Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell and Tissue Research*. 220: 163-180.
- Bird, S., Zou, J., Kono, T., Sakai, M., Dijkstra, J. M., y Secombes, C.** 2004. Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by syntenry. *Immunogenetics*. 56: 909-923.
- Bird, S., Zou, J., Savan, R., Kono, T., Sakai, M., Woo, J., y Secombes, C.** 2005. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 775-789.
- Biron, C. A.** 2001. Interferons α and β as immune regulators-A new look. *Immunity*. 14: 661-664.
- Bjorkman, P. J. y Parham, P.** 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual Review of Biochemistry*. 59: 253-288.
- Blackstock, N. y Pickering, A. D.** 1980. Acidophilic granular cells in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Cell and Tissue Research*. 210: 359-369.
- Blazer, V. S.** 1991. Piscine macrophage function and nutritional influences. *A review. Journal of Aquatic Animal Health*. 3: 77-86.
- Blazer, V. S.** 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 309-323.
- Bly, J. E. y Clem, L. W.** 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish and Shellfish Immunology*. 2: 159-171.
- Bly, J. E., Quiniou, S. M., y Clem, L. W.** 1997. Environmental effects on fish immune mechanisms. *Developments in Biological Standardization*. 90: 33-43.
- Bogdan, C.** 1997. Of microbes, macrophages and nitric oxide. *Behring Institute Mitteilungen*. 99: 58-72.
- Bogdan, C.** 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. 2: 907-916.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., y Diefenbach, A.** 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*. 12: 64-76.
- Bols, N. C., Yang, B. Y., Lee, L. E., y Chen, T. T.** 1995. Development of a rainbow trout pituitary cell line that expresses growth hormone, prolactin, and somatolactin. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 4: 154-163.
- Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., y Schirmer, K.** 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. En *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Environmental Toxicology*. Mommsen, T. P. y Moon, T.W. (Eds). Elsevier, Pags. 43-84.

- Boltaña, S.,** Donate, C., Goetz, F. W., MacKenzie, S., y Balasch, J. C. 2009. Characterization and expression of NADPH oxidase in LPS-, poly(I:C)- and zymosan-stimulated trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*.
- Bose, M. y Farnia, P.** 1995. Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation-dependent process. *Immunology Letters*. 48: 59-64.
- Boshra, H.,** Li, J., y Sunyer, J. O. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 239-262.
- Bourhis, L. L. y Werts, C.** 2007. Role of Nods in bacterial infection. *Microbes and Infection*. 9: 629-636.
- Bowden, T. J.** 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish and Shellfish Immunology*. 25:373-383.
- Bowden, T. J.,** Thompson, K. D., Morgan, A. L., Gratacap, R. M., Nikoskelainen, S. 2007. Seasonal variation and the immune response: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 695-706.
- Bowie, A. y O'Neill, L. A.** 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*. 67: 508-514.
- Bricknell, I. y Dalmo, R.A.** 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*. 19: 457-472.
- Bridle, A. R.,** Morrison, R. N., y Nowak, B. F. 2006. The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during amoebic gill disease (AGD). *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 346-364.
- Bronte, V.,** Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D. M., y Zanovello, P. 2003. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends in Immunology*. 24: 302-306.
- Brubacher, J. L.,** Secombes, C. J., Zou, J., y Bols, N. C. 2000. Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*. 24: 565-574.
- Buonocore, F.,** Randelli, E., Casani, D., Mazzini, M., Cappuccio, I., Secombes, C. J., y Scapigliati, G. 2005a. cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after vaccination. *Aquaculture*. 245: 301-310.
- Buonocore, F.,** Forlenza, M., Randelli, E., Benedetti, S., Bossu, P., Meloni, S., Secombes, C. J., Mazzini, M., y Scapigliati, G. 2005b. Biological activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) recombinant interleukin-1beta. *Marine Biotechnology (NY)*. 7: 609-617.
- Buonocore, F.,** Randelli, E., Casani, D., Costantini, S., Facchiano, A., Scapigliati, G., y Stet, R. J. 2007. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II beta chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 853-866.

- Campos-Perez, J. J.** 1998. *The role of reactive oxygen and nitrogen species in the immune response of rainbow trout to Renibacterium salmoninarum*. Ph. Thesis, University of Aberdeen, Aberdeen, UK.
- Campos-Perez, J. J.**, Ward, M., Grabowski, P. S., Ellis, A. E., y Secombes, C. J. 2000. The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunology*. 99: 153-161.
- Carracedo, B.** 2003. *Caracterización de cultivos celulares angiogénicos obtenidos de órganos linfoides de trucha arco iris, Oncorhynchus mykiss*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León, España.
- Caruzo, D. y Lazard, J.** 1999. Subordination stress in Nile tilapia and its effect on plasma lysozyme activity. *Journal of Fish Biology*. 55: 451-454.
- Castaño, A.**, Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. E., Mothersill, C., Part, P., Repetto, G., Sintes, J. R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., y Segner, H. 2003. The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 47. *Alternatives to Laboratory Animals*. 31: 317-351.
- Castillo, A.**, Razquin, B.E., Lopez-Fierro, P., Álvarez F., Zapata, A.G. y Villena, A. J. 1987. An enzyme-histochemical study of the stromal cells and vascularization of the lymphoid organs of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Cuadernos Marisqueros Publicación Técnica*. 12: 167-172.
- Castillo, A.**, Lopez-Fierro, P., Zapata, A. G., Villena, A.J., y Razquin, B.E. 1991. Post-hatching development of the thymic epithelial cells in the rainbow trout *Salmo gairdneri*: an ultrastructural study. *The American Journal of Anatomy*. 190: 299-307.
- Castillo, A.**, Razquin, B.E., Villena, A.J., Zapata, A. G. y López-Fierro, P. 1998, Thymic barriers to antigen entry during the post-hatching development of the thymus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 157-170.
- Castillo-Briceno, P.**, Sepulcre, M. P., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J., Garcia-Ayala, A. y Mulero, V. 2009. Collagen regulates the activation of professional phagocytes of the teleost fish gilthead seabream. *Molecular Immunology*. 46: 1409-1415.
- Castro, R.**, 2003. *Efecto de varios glucanos y extractos de algas sobre el sistema inmunitario innato del rodaballo (Psetta maxima L.)*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Castro, R.**, Couso N., Obach A., y Lamas J. 1999. Effect of different B-glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 529-541.
- Chang, C. I.**, Liao, J. C., y Kuo, L. 1998. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *The American Journal of Physiology*. 274: H342-H348.
- Chang, C. I.**, Pleguezuelos, O., Zhang, Y. A., Zou, J., y Secombes, C. J. 2005. Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infection and Immunity*. 73: 5053-5064.

- Chanock, S. J.**, el Benna, J., Smith, R. M., y Babior, B. M. 1994. The respiratory burst oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 24519-24522.
- Chelbi-Alix, M. K. y Wietzerbin, J.** 2007. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie*. 89: 713-718.
- Chen, L.**, He, C., Baoprasertkul, P., Xu, P., Li, P., Serapion, J., Waldbieser, G., Wolters, W., y Liu, Z. 2005. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 135-142.
- Chen, S. N. y Wang, C. S.** 1999. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Röding. *Methods Cell Science*. 21: 183-192.
- Chesrown, S. E.**, Monnier, J., Visner, G., y Nick, H. S. 1994. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, IFN-gamma, TGF-beta, and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 200: 126-134.
- Chilmonczyk, S.** 1992. The thymus in fish: Development and possible function in the immune response. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 181-200.
- Cho, H. J.**, Xie, Q. W., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., y Nathan, C. 1992. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 176: 599-604.
- Chung, S. y Secombes C.J.** 1987. Activation of rainbow trout macrophages. *Journal of Fish Biology*. 31: 51-56.
- Chung, S. y Secombes C.J.** 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 89B: 539-544.
- Clark-Lewis, I.**, Schumacher, C., Baggiolini, M., y Moser, B. 1991. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 23128-23134.
- Clem, L. W.**, Sizemore, R. C., Ellsaesser, C. F., y Miller, N. W. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*. 9: 803-809.
- Cole, A. M.**, Weis, P., y Diamond, G. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 12008-12013.
- Collet, B. y Secombes, C. J.** 2001. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization. *European Journal of Biochemistry*. 268: 1577-1584.
- Collet, B. y Secombes, C. J.** 2002. Type I-interferon signalling in fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 389-397.
- Collet, B.**, Hovens, G. C., Mazzoni, D., Hirono, I., Aoki, T., y Secombes, C. J. 2003. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

- interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2). *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 111-126.
- Collins, H. L. y Bancroft, G. J.** 1992. Cytokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *European Journal of Immunology*. 22: 1447-1454.
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, J. E., y Mantovani, A.** 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*. 261: 472-475.
- Cook, M. T., Hayball, P. J., Hutchinson, W., Nowak, B., y Hayball, J. D.** 2001. The efficacy of a commercial β -glucan preparation, EcoActiva™, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. *Fish and Shellfish Immunology*. 11: 661-672.
- Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Tsamopoulos, K., y Secombes, C. J.** 2006. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Molecular Immunology*. 44: 1361-1373.
- Cross, A. R.** 1990. Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase: mechanisms of action and methods for their elucidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 8: 71-93.
- Cuesta, A., Esteban, M. A., y Meseguer, J.** 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes: Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 71: 161-171.
- Cuesta, A., Esteban, M. A., y Meseguer, J.** 2002. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 89: 169-174.
- Cuesta, A., Meseguer, J., y Esteban, M. A.** 2004. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 101: 203-210.
- Dabbagh, K. y Lewis, D. B.** 2003. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Current Opinion in Infectious Disease*. 16: 199-204.
- Dalmo, R. A., Leifson, R. M., y Bogwald, J.** 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*. 20: 241-273.
- Dalmo, R. A., Seternes T, Arnesen SM, Jorgensen, T., y Bogwald, J.** 1998. Tissue distribution and cellular uptake of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide. *Journal of Fish Diseases*. 21: 321-334.
- Dannevig, B. H., Lauve, A., Press, C. M., y Landsverk, T.** 1994. Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish and Shellfish Immunology*. 4: 3-18.
- Decoursey, T. E. y Ligeti, E.** 2005. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell and Molecular Life Sciences*. 62: 2173-2193.

- De Kinkelin, P.**, Dorson, M., y Hattenberger-Baudouy, A. M. 1982. Interferon synthesis on trout and carp after viral infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 2: 167-174.
- DeLuca, D.**, Wilson, M., y Warr, G. W. 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *European Journal of Immunology*. 13: 546-551.
- DeWitte-Orr, S. J.**, Leong, J. A., y Bols, N. C. 2007. Induction of antiviral genes, Mx and vig-1, by dsRNA and Chum salmon reovirus in rainbow trout monocyte/macrophage and fibroblast cell lines. *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 670-682.
- Diago, M.L.** 1996. Estudio *in vitro* de la hematopoyesis de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Establecimiento de una línea celular de estroma de pronefros. Caracterización y análisis de su capacidad hematopoyética. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León, España.
- Diago, M.L.**, Lopez-Fierro, P., Razquin, B.E. y Villena, A.J. 1993. Long-term myelopoietic cultures from the renal hematopoietic tissue of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W.: phenotypic characterization of the stromal cells. *Experimental Hematology*. 21:1277-1287.
- Diago, M.L.**, Lopez-Fierro, P., Razquin, B.E. y Villena, A.J. 1995. Establishment and characterization of a pronephric stromal cell line (TPS) from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W. *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 441-457.
- Dinarello, C. A.** 1997. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 11: 91-103.
- Dixon, B.**, Shum, B., Adams, E. J., Magor, K. E., Hedrick, R. P., Muir, D. G., y Parham, P. 1998. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunological Reviews*. 166: 341-348.
- Du Clos, T. W.** 2000. Function of C-reactive protein. *Annals of Medicine*. 32: 274-278.
- Du Clos, T. W. y Mold, C.** 2001. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Current Opinion in Infectious Disease*. 14: 289-293.
- Dworakowski, R.**, Alom-Ruiz, S. P., y Shah, A. M. 2008. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacological Reports*. 60: 21-28.
- Eaton, W. D.** 1990. Antiviral activity in four species of salmonids following exposure to poly(I)-poly(C). *Diseases of Aquatic Organisms*. 9: 193-198.
- Ehrt, S.**, Schnappinger, D., Bekiranov, S., Drenkow, J., Shi, S., Gingeras, T. R., Gaasterland, T., Schoolnik, G., y Nathan, C. 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *The Journal of Experimental Medicine*. 194: 1123-1140.
- El Gayar, S.**, Thuring-Nahler, H., Pfeilschifter, J., Rollinghoff, M., y Bogdan, C. 2003. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *Journal Immunology*. 171: 4561-4568.

- Ellis, A.E.** 1977. The leucocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology*. 11: 453-491.
- Ellis, A. E.** 1980. Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Journal of Fish Diseases*. 3: 413-426.
- Ellis, A. E.** 1981a. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. En *Stress y Fish*. Pickering, A. D.(Ed). Acad Press, London, Pags: 147-169.
- Ellis, A.E.** 1981b. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. *Developments in Biological Standardization*. 49: 337-352.
- Ellis, A.E.** 1982. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. En *Microbial Diseases of Fish*. Roberts, R.J. (Ed). Academic Press, London, Pags: 1-29.
- Ellis, A. E.** 1985. Eosinophilic granular cells (EGC) and histamine responses to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*. 9: 251-260.
- Ellis, A. E.** 1986. The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. *International Journal of Tissue Reactions*. 8: 263-270.
- Ellis, A.E.** 1987. Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by alpha 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microbial Pathogenesis*. 3: 167-177.
- Ellis, A.E.** 1988a. General principles of fish vaccination. En *Fish Vaccination*, Ellis A.E. (Ed). Academic Press, London, Pags: 1-19.
- Ellis, A. E.** 1988b. Ontogeny of the immune system in teleost fish. . En *Fish Vaccination*, Ellis A.E. (Ed). Academic Press, London, Pags: 20-31.
- Ellis, A.E.** 1990. Lysozyme assays. FITC-1. En *Techniques in fish immunology*. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. y Muiswinkel, W.B. (Eds) SOS Publications Fair Haven, USA. pp. 101-103.
- Ellis, A. E.** 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 291-308.
- Ellis, A. E.** 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 827-839.
- Ellsaesser, C. F. y Clem, L. W.** 1994. Functionally distinct high and low molecular weight species of channel catfish and mouse IL-1. *Cytokine*. 6: 10-20.
- Enane, N. A., Frenkel, K., O'Connor, J. M., Squibb, K. S., y Zelikoff, J. T.** 1993. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology*. 80: 68-72.
- Engelsma, M. Y., Stet, R. J., Schipper, H., y Verburg-van Kemenade, B. M.** 2001. Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 195-203.
- Engelsma, M. Y., Stet, R. J., Saeij, J. P., y Verburg-van Kemenade, B. M.** 2003. Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1beta genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cytokine*. 22: 21-32.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., y Poxton, I. R.** 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*. 4: 837-851.

- Estepa, A. y Coll, J. M.** 1991. Infection of mitogen stimulated-colonies from trout head kidney cell cultures with salmonid viruses. *Journal of Fish Diseases*. 14: 555-562.
- Estepa, A., Frias, D. y Coll, J. M.** 1991. Infection of trout kidney cells with infectious pancreatic necrosis and viral haemorrhagic septicaemia viruses. *Bulletin European Association of Fish Pathology*. 11: 101-104.
- Estepa, A., Alvarez, F., Ezquerro, A., y Coll, J. M.** 1999. Viral-antigen dependence and T-cell receptor expression in leucocytes from rhabdovirus immunized trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 68: 73-89.
- Evans, D. L., Graves, S. S., Cobb, D., y Dawe, D. L.** 1984. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). II. Parameters of target cell lysis and specificity. *Developmental y Comparative Immunology*. 8: 303-312.
- Evans, D. L. y Jaso-Friedmann, L.** 1992. The non-specific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. A review. *Journal of Fish Diseases*. 2: 109-121.
- Evans, D. L., Leary, J. H., III, y Jaso-Friedmann, L.** 2001. Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 791-805.
- Evelyn, T. P.** 1997. A historical review of fish vaccinology. *Developments in Biological Standardization*. 90: 3-12.
- Falcó, A., Mas, V., Tafalla, C., Perez, L., Coll, J. M., y Estepa, A.** 2007. Dual antiviral activity of human alpha-defensin-1 against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV): inactivation of virus particles and induction of a type I interferon-related response. *Antiviral Research*. 76: 111-123.
- FAO.** 2003. Fishery Information, Data and Statistics Unit; 2003. *Producción de acuicultura*. <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>
- FAO.** 2007. La acuicultura: única forma de hacer frente al futuro déficit de pescado. Reunión de la FAO para la contribución de la acuicultura al desarrollo sostenible. Roma 2007. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2007/1000701/index.html>
- Farrar, M. A. y Schreiber, R. D.** 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review Immunology*. 11: 571-611.
- Fast, M. D., Sims, D. E., Burka, J. F., Mustafa, A., y Ross, N. W.** 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 132: 645-657.
- Fast, M. D., Ross, N. W., y Johnson, S. C.** 2005. Prostaglandin E(2) modulation of gene expression in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage-like cell line (SHK-1). *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 951-963.
- Ferguson, H. W.** 1989. Systemic Pathology of Fish. En *A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleosts*. Iowa State University Press. Pags.: 64-103.
- Ferri, C. C. y Ferguson, A. V.** 2003. Interleukin-1 beta depolarizes paraventricular nucleus parvocellular neurones. *Journal of Neuroendocrinology*. 15: 126-133.

- Findlay, V. L. y Munday, B. L.** 2000. Immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmon salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 23: 369-378.
- Findlay, V. L., Zilberg, D., y Munday, B. L.** 2000. Evaluation of levamisole as treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmon salar*. *Journal of Fish Diseases*. 23: 193-198.
- Finn, J. P. y Nielsen, N. O.** 1971. Inflammatory response in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 3: 463-478.
- Fischer, U., Utke, K., Ototake, M., Dijkstra, J.M. y Kollner, B.** 2003. Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 323-337.
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Kollner, B., Ototake, M. y Nakanishi, T.** 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 209-226.
- Flaño, E.** 1995. *Establecimiento y caracterización de cultivos de tejidos de trucha arco iris. Estudio in vitro de la infección con Renibacterium salmoninarum*, Tesis Doctoral Facultad de Biología Universidad de León.
- Flaño, E., López-Fierro, P., Razquin, B. E., y Villena, A.J.** 1996. In vitro differentiation of eosinophilic granular cells in *Renibacterium salmoninarum*-infected gill cultures from rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology*. 6: 173-184.
- Flaño, E., López-Fierro, P., Razquin, B. E., y Villena, A.J.** 1997. In vitro proliferation of eosinophilic granular cells in gill cultures from rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology*. 7: 519-521.
- Flesch, I. E. y Kaufmann, S. H.** 1990. Stimulation of antibacterial macrophage activities by B-cell stimulatory factor 2 (interleukin-6). *Infection and Immunity*. 58: 269-271.
- Freedman, S. J.** 1991. The role of alpha 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 98: 549-553.
- Frendl, G., Fenton, M. J., y Beller, D. I.** 1990. Regulation of macrophage activation by IL-3. II. IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression. *Journal Immunology*. 144: 3400-3410.
- Fryer, J. L. y Lannan, C. N.** 1994. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines. *Journal of Tissue Culture Methods*. 16: 87-94.
- Fujita, T., Matsushita, M., y Endo, Y.** 2004. The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunological Review*. 198: 185-202.
- Ganassin C.R. y Bols, N. C.** 1998. Development of a monocyte/macrophage-like cell line, RTS11, from rainbow trout spleen. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 457-476.
- Ganz, T.** 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 3: 710-720.

- Garner, C. V., D'Amico, R., y Simms, H. H.** 1996. Cytokine-mediated human polymorphonuclear neutrophil phagocytosis: evidence of differential sensitivities to manipulation of intracellular mechanisms. *The Journal of Surgical Research*. 60: 84-90.
- Geets, A., Liewes, E. W., y Ollevier, F.** 1992. Efficacy of some antihelminthics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*. 13: 123-128.
- Gerwick, L., Steinhauer, R., Lapatra, S., Sandell, T., Ortuno, J., Hajiseyedjavadi, N., y Bayne, C. J.** 2002. The acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma proteins to viral, bacterial and fungal inflammatory agents. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 229-242.
- Glamann, J.** 1995. Complete coding sequence of rainbow trout Mhc II beta chain. *Scandinavia Journal of Immunology*. 41: 365-372.
- Gobert, A. P., Daulouede, S., Lepoivre, M., Boucher, J. L., Bouteille, B., Buguet, A., Cespuglio, R., Veyret, B., y Vincendeau, P.** 2000. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infection and Immunity*. 68: 4653-4657.
- Goetz, F. W., Planas, J. V., y MacKenzie, S.** 2004. Tumor necrosis factors. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 487-497.
- Gomez, G. D. y Balcazar, J. L.** 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 52: 145-154.
- Goodbourn, S., Didcock, L., y Randall, R. E.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *The Journal of General Virology*. 81: 2341-2364.
- Gordon, S.** 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 3: 23-35.
- Gordon, S. y Taylor, P. R.** 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 5: 953-964.
- Gould, J. M. y Weiser, J. N.** 2002. The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *The Journal of Infectious Diseases*. 186: 361-371.
- Graham, S. y Secombes, C. J.** 1988. The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology*. 65: 293-297.
- Graham, S. y Secombes, C. J.** 1990a. Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 14: 59-68.
- Graham, S. y Secombes, C. J.** 1990b. Do fish lymphocytes secrete interferon- γ ?. *Journal of Fish Biology*. 36: 563-573.
- Graves, S. S., Evans, D. L., y Dawe, D. L.** 1985a. Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Immunology*. 134: 78-85.

- Graves, S. S.**, Evans, D. L., y Dawe, D. L. 1985b. Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (ncc) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 8: 43-51.
- Grayfer, L.**, Walsh, J. G., y Belosevic, M. 2008. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor- α . *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 532-543.
- Grayson, T. H.**, Cooper, L. F., Wrathmell, A. B., Roper, J., Evenden, A. J., y Gilpin, M. L. 2002. Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. *Immunology*. 106: 273-283.
- Green, L. C.**, Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., y Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126: 131-138.
- Greenlee, A. R.**, Brown, R. A., y Ristow, S. S. 1991. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptic mechanisms. *Developmental and Comparative Immunology*. 15: 153-164.
- Griffith, L.G. y Swartz, M.A.** 2006. Capturing complex 3D tissue physiology *in Vitro*. *Nature Reviews. Molecular cell biology*. 7: 211-224.
- Grimholt, U.**, Hordvik, I., Fosse, V. M., Olsaker, I., Endresen, C., y Lie, O. 1993. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*. 37: 469-473.
- Grinde, B.** 1989. A lysozyme isolated from rainbow trout acts on mastitis pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. 51: 179-182.
- Hansen, J. D.**, Strassburger, P., Thorgaard, G. H., Young, W. P., y Du, P. L. 1999. Expression, linkage, and polymorphism of MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Immunology*. 163: 774-786.
- Hardie, L. J.**, Fletcher, T. C., y Secombes, C. J. 1994a. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 18: 57-66.
- Hardie, L. J.**, Grabowski, P. S., Ralston, S., McGuigan F, y Secombes C.J. 1994b. Isolation and partial coding sequence for nitric oxide synthase from rainbow trout macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*. 18 (1), S88.
- Hardie, L. J.**, Ellis, A. E., y Secombes C.J. 1996. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates inhibition of *Renibacterium salmoninarum* growth concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25: 175-183.
- Harizi, H. y Gualde, N.** 2002. Dendritic cells produce eicosanoids, which modulate generation and functions of antigen-presenting cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 66: 459-466.
- Harris, S. G.**, Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., y Phipps, R. P. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*. 23: 144-150.

- Hart, S.**, Wrathmell, A. B., Harris, J. E., y Grayson, T. H. 1988. Gut immunology in fish: A review. *Developmental and Comparative Immunology*. 12: 453-480.
- Hashimoto, K.**, Okamura, K., Yamaguchi, H., Ototake, M., Nakanishi, T., y Kurosawa, Y. 1999. Conservation and diversification of MHC class I and its related molecules in vertebrates. *Immunological Reviews*. 167: 81-100.
- Hedrick, R.P.** 1998. Relationships of the host, pathogen, and environment: implications for diseases of cultured and wild fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health*. 10: 107-111.
- Heitmeier, M. R.**, Scarim, A. L., y Corbett, J. A. 1998. Double-stranded RNA-induced inducible nitric-oxide synthase expression and interleukin-1 release by murine macrophages requires NF- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 15301-15307.
- Herráez, M. P. y Zapata, A. G.** 1986. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12: 117-126.
- Herráez, M. P. y Zapata A.G.** 1991. Structure characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. *European Journal of Morphology*. 29: 89-102.
- Hibbs, J. B. Jr.** 1992. Overview of cytotoxic mechanisms and defence of intracellular environment against microbes. En *The Biology of Nitric Oxide. 2. Enzymology, Biochemistry and Immunology*. Moncada S., -marletta, M.A., Hibbs, J.B., Higgs, E.A. (Eds). Portland Press, London, Pags.: 201-206.
- Hibbs, J. B. Jr.**, Taintor, R. R., y Vavrin, Z. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 235: 473-476.
- Hine, P. M.** 1992. The granulocytes of fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 2: 79-98.
- Hirono, I.**, Nam, B. H., Kurobe, T., y Aoki, T. 2000. Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal Immunology*. 165: 4423-4427.
- Hjelmeland, K.** 1983. Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 76: 365-372.
- Holland, M. C. y Lambris, J. D.** 2002. The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 399-420.
- Holland, J. W.**, Gould, C. R., Jones, C. S., Noble, L. R., y Secombes, C. J. 2003. The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD). *Parasitology*. 126: 95-102.
- Hong, S.**, Zou, J., Crampe, M., Peddie, S., Scapigliati, G., Bols, N., Cunningham, C., y Secombes, C. J. 2001. The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 beta. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 81: 1-14.

- Howgate, P.C.**, Lima dos Santos, C., y Shehadeh, Z.H. 1997. Safety of Food Products from Aquaculture. *Review of the State of World Aquaculture. FAO Fisheries Circular*. 886 FIRI/C886.
- Huang, P. H.**, Chen, J. Y., y Kuo, C. M. 2007. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. *Molecular Immunology*. 44: 1922-1934.
- Huang, Z. F.**, Massey, J. B., y Via, D. P. 2000. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human *in vitro* differentiated macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 59: 187-194.
- Huising, M. O.**, Stolte, E., Flik, G., Savelkoul, H. F., y Verburg-van Kemenade, B. M. 2003. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 875-888.
- Ibelgaufs, H.** 2009. En: COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. <http://www.copewithcytokines.de/> . *webcite* 2009.
- Iliev, D. B.**, Liarte, C. Q., MacKenzie, S., y Goetz, F. W. 2005a. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents. *Molecular Immunology*. 42: 1215-1223.
- Iliev, D. B.**, Roach, J. C., MacKenzie, S., Planas, J. V., y Goetz, F. W. 2005b. Endotoxin recognition: in fish or not in fish?. *FEBS Letters*. 579: 6519-6528.
- Inagawa, H.**, Honda, T., Kohchi, C., Nishizawa, T., Yoshiura, Y., Nakanishi, T., Yokomizo, Y., y Soma, G. 2002. Cloning and characterization of the homolog of mammalian lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal permeability-increasing protein in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Immunology*. 168: 5638-5644.
- Ingerslev, H. C.**, Cunningham, C., y Wergeland, H. I. 2006. Cloning and expression of TNF-alpha, IL-1beta and COX-2 in an anadromous and landlocked strain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the smolting period. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 450-461.
- Irwin, M. J. y Kaattari, S. L.** 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12: 39-45.
- Ispir, Ü. y Dörücü, M.** 2005. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 29: 1169-1176.
- Iwasaki, A. y Medzhitov, R.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 5: 987-995.
- JACUMAR.** 2009. Junta Asesora de Cultivos Marinos. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino 2009. <http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar>
- Jalanka, H. y Lindberg, L. A.** 1975. Inhibition of the alkaline phosphatase of equine, bovine and rat neutrophilic leukocytes with levamisole at low concentrations. *Histochemistry*. 45: 267-270.

- Janeway, CA. Jr. y Medzhitov, R.** 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 20: 197-216.
- Jang, S. I., Hardie, L. J., y Secombes, C. J.** 1995. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *Journal of Leukocyte Biology*. 57: 943-947.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, J. H., III, y Evans, D. L.** 1994. Pathways of signaling in nonspecific cytotoxic cells: effects of protein kinase and phosphatase inhibitors and evidence for membrane tyrosine phosphorylation. *Cell Immunology*. 153: 142-153.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, J. H., y Evans, D. L.** 2001. The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 701-711.
- Jault, C., Pichon, L., y Chluba, J.** 2004. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Molecular Immunology*. 40: 759-771.
- Jeney, Z., G. Jeney, y A.G. Maule** 1992. Cortisol measurements in Fish. En *Techniques in Fish Immunology* 2. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaatari, S.L. y Rowley, A.F. (Eds). SOS Publications, N.J. USA. Pags.: 157-166.
- Jeney, G. y Anderson, D. P.** 1993. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish and Shellfish Immunology*. 3: 51-58.
- Jenkins, J. A. y Ourth, D. D.** 1993. Opsonic effect of the alternative complement pathway on channel catfish peripheral blood phagocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 39: 447-459.
- Jensen, V. y Robertsen, B.** 2000. Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Interferon Cytokine Research*. 20: 701-710.
- Jensen, I. y Robertsen, B.** 2002. Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 13: 221-241.
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A. I., y Robertsen, B.** 2002. Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in *Atlantic salmon*. *Fish and Shellfish Immunology*. 13: 311-326.
- Jia, H. P., Kline, J. N., Penisten, A., Apicella, M. A., Gioannini, T. L., Weiss, J., y McCray, PB. Jr.** 2004. Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low expression of MD-2. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 287: L428-L437.
- Joerink, M., Savelkoul, H. F., y Wiegertjes, G. F.** 2006a. Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Molecular Immunology*. 43: 1116-1128.

- Joerink, M.**, Forlenza, M., Ribeiro, C. M. S., de Vries, B. J., Savelkoul, H. F. J., y Wiegertjes, G. F. 2006b. Differential macrophage polarisation during parasitic infections in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 21: 561-571.
- Jørgensen, J. B.**, Sharp, G. J. E., Secombes, C. J., y Robertsen, B. 1993. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*. 3: 267-277.
- Jørgensen, J. B.**, Zou, J., Johansen, A., y Secombes, C. J. 2001. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 β and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish and Shellfish Immunology*. 11: 673-682.
- Jørgensen, J. B.**, Johansen, L. H., Steiro, K., y Johansen, A. 2003. CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology*. 77: 11471-11479.
- Jørgensen, J. B.**, Johansen, A., Hegseth, M. N., Zou, J., Robertsen, B., Collet, B., y Secombes, C. J. 2007. A recombinant CHSE-214 cell line expressing an Mx1 promoter-reporter system responds to both interferon type I and type II from salmonids and represents a versatile tool to study the IFN-system in teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 1294-1303.
- Kaattari, S. L.** 1992. Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 161-180.
- Kaattari, S. L.** y Irwin, M. J. 1985. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental and Comparative Immunology*. 9: 433-444.
- Kaattari, S. L.** y Piganelli, J. D. 1996. The Specific Immune System: Humoral Defense. En *The fish immune system: Organism, Pathogen, and Environment*. George Iwama and Teruyuki Nakanishi, (Eds). Academic Press, San Diego, USA, Pags.: 207-254.
- Kaisho, T.** y Akira, S. 2003. Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Current Molecular Medicine*. 3: 759-771.
- Kajita, Y.**, Sakai, M., Atsuta, S. y Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout *O. mykiss*. *Fish Pathology*. 25: 93-98.
- Kajita, Y.**, Sakai, M., Kobayashi, M., y Kawauchi, H. 1992. Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. *Fish and Shellfish Immunology*. 2: 155-157.
- Kanno, K.**, Hirata, Y., Imai, T., Iwashina, M., y Marumo, F. 1994. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 β in rat vascular endothelial cells. *The American Journal of Physiology*. 267: H2318-H2324.
- Kawakami, K.**, Kohno, S., Kadota, J., Tohyama, M., Teruya, K., Kudaken, N., Saito, A., y Hara, K. 1995. T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus neoformans*: involvement of IFN- γ and its protective effect against cryptococcal infection. *Microbiology and Immunology*. 39: 135-143.

- Klinman, D. M.**, Barnhart, K. M., y Conover, J. 1999. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*. 17: 19-25.
- Knight, J. y Rowley, A. F.** 1995. Immunoregulatory activities of eicosanoids in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunology*. 85: 389-393.
- Knight, J.**, Stet, R. J. M., y Secombes, C. J. 1998. Modulation of MHC class II expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages by TNF α and LPS. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 545-553.
- Knudsen, P. J.**, Dinarello, C. A., y Strom, T. B. 1986. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *Journal Immunology*. 137: 3189-3194.
- Koppang, E. O.**, Dannevig, B. H., Lie, I., Rnningen, K., y Press, C. M. 1999. Expression of Mhc class I and II mRNA in a macrophage-like cell line (SHK-1) derived from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 473-489.
- Koppang, E. O.**, Hordvik, I., Bjerkas, I., Torvund, J., Aune, L., Thevarajan, J. y Endresen, C. 2003. Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II beta chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*. 14: 115-132.
- Koren, C. W.**, Sveinbjornsson, B., y Smedsrod, B. 1997. Isolation and culture of endocardial endothelial cells from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Cell and Tissue Research*. 290: 89-99.
- Krieg, A. M.** 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5: 471-484.
- Kulka, M.**, Alexopoulou, L., Flavell, R. A., y Metcalfe, D. D. 2004. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 114: 174-182.
- Kunkel, S. L.**, Strieter, R. M., Lindley, I. J., y Westwick, J. 1995. Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol.Today*. 16: 559-561.
- Laing, K. J. y Secombes, C. J.** 2004. Chemokines. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 443-460.
- Laing, K. J.**, Hardie, L. J., Aartsen, W., Grabowski, P. S., y Secombes, C. J. 1999. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*. 23: 71-85.
- Laing, K. J.**, Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T., y Secombes, C. J. 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *European Journal of Biochemistry*. 268: 1315-1322.
- Laing, K. J.**, Zou, J. J., Wang, T., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T., y Secombes, C. J. 2002. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 433-444.

- Lamas, J. y Ellis, A. E.** 1994. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*. 4: 201-219.
- Lamas J., Bruno D.W., Santos Y., Anadón R., y Ellis A.E.** 1991. Eosinophilic granular cell response to intraperitoneal injection with *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*. 1: 187-194.
- Lamas, J., Santos, Y., y Bruno D. W., Toranzo, A. E. y. Anadón, R.** 1994. Non-specific cellular responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *Journal of Fish Biology*. 45: 839-854.
- Lambris, J. D.** 1993. The chemistry, biology and phylogeny of C3. *Complement Today. Complement Profiles*. 1: 16-45.
- Lammens, M., Decostere, A., y Haesebrouck, F.** 2000. Effect of *Flavobacterium psychrophilum* strains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 41: 173-179.
- Lee, E. Y., Park, H. H., Kim, Y. T., y Choi, T. J.** 2001. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gene*. 274: 237-243.
- Lee, S. H. y Vidal, S. M.** 2002. Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Research*. 12: 527-530.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., y Hoffmann, J. A.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86: 973-983.
- Leon, L. R.** 2002. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *Journal of Applied Physiology*. 92: 2648-2655.
- Li, J. H., Shao, J. Z., Xiang, L. X., y Wen, Y.** 2007. Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Molecular Immunology*. 44: 2078-2086.
- Lin, O. E., Ohira, T., Hirono, I., Saito-Taki, T., y Aoki, T.** 2005. Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 443-455.
- Lindenstrøm, T., Secombes, C. J., y Buchmann, K.** 2004. Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 97: 137-148.
- Lindsay, G. J. H.** 1986. The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. *Aquaculture*. 51: 169-173.
- Liu, C. Y., Lai, Y. Y., y Lo, C. J.** 2004. Levamisole modulates prostaglandin E2 production and cyclooxygenase II gene expression in human colonic cancer cells. *The Journal of Surgical Research*. 117: 223-231.
- Lobb, C. J. y Hayman, J. R.** 1989. Activation of complement by different immunoglobulin heavy chain isotypes of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Molecular Immunology*. 26: 457-465.

- Lockhart, K.**, Gahlawat, S. K., Soto-Mosquera, D., Bowden, T. J., y Ellis, A. E. 2004. IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C-induced Mx response does not cure the carrier state. *Fish and Shellfish Immunology*. 17: 347-352.
- Lutfalla, G.**, Roest, C. H., Stange-Thomann, N., Jaillon, O., Mogensen, K., y Monneron, D. 2003. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics*. 4: 29.
- MacArthur, J. I. y Fletcher, T.C.** 1985. Phagocytosis in Fish. En *Fish Immunology*. Manning, M.J. y Tatner, M.F.(Eds). Academic Press, Londres, Pags.: 29-46.
- MacKenzie, S.**, Planas, J. V., y Goetz, F. W. 2003. LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and *in vitro* differentiated macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 393-400.
- MacMicking, J.**, Xie, Q. W., y Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15: 323-350.
- Magnadottir, B.** 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 137-151.
- Manning, M. J. y Nakanishi, T.** 1996. The specific immune system: cellular defenses. En *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Iwama, G. K. y Nakanishi, T. (Eds). Academic Press, San Diego. USA. Pags.: 159-205.
- Mantovani, A.**, Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., y Sica, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunology*. 23: 549-555.
- Mantovani, A.**, Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., y Locati, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunology*. 25: 677-686.
- Marodi, L. y Johnston, RB. Jr.** 1993. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. *Immunodeficiency*. 4: 181-185.
- Martin, S. A.**, Mohanty, B. P., Cash, P., Houlihan, D. F., y Secombes, C. J. 2007a. Proteome analysis of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) cell line SHK-1 following recombinant IFN-gamma stimulation. *Proteomics*. 7: 2275-2286.
- Martin, S. A.**, Zou, J., Houlihan, D. F., y Secombes, C. J. 2007b. Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 macrophage cells as revealed by transcriptome profiling. *BMC Genomics*. 8: 150.
- Martin-Armas, M.**, Zykova, S., y Smedsrod, B. 2008. Effects of CpG-oligonucleotides, poly I:C and LPS on Atlantic cod scavenger endothelial cells (SEC). *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 100-107.
- Masycheva, V. I.**, Alikin, Y. S., Klimenko, V. P., Fadina, V. A., Shchelkunov, I. S., Shchelkunova, T. I., y Kupinskaya, O. A. 1995. Comparative antiviral effects of dsRNA on lower and higher vertebrates. *Veterinary Research*. 26: 536-538.

- Mathison, J. C.**, Tobias, P. S., Wolfson, E., y Ulevitch, R. J. 1992. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *Journal Immunology*. 149: 200-206.
- Matsumoto, M.**, Funami, K., Oshiumi, H., y Seya, T. 2004. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiology and Immunology*. 48: 147-154.
- Matsuyama, H.**, Tanaka, K., Nakao, M., y Yano, T. 1988. Characterization of the alternative complement pathway of carp. *Developmental and Comparative Immunology*. 12: 403-408.
- Matsuyama, H.**, Yano, T., Yamakawa, T., y Nakao, M. 1992. Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish and Shellfish Immunology*. 2: 69-78.
- McCartney-Francis, N.**, Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F., y Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *The Journal of Experimental Medicine*. 178: 749-754.
- McCord, J. M.** 1995. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 209: 112-117.
- McMillan, D. N.** y **Secombes, C. J.** 1997. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish and Shellfish Immunology*. 7: 527-541.
- Medzhitov, R.**, Preston-Hurlburt, P., y Janeway, C. A., Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388: 394-397.
- Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Review Immunology*. 1: 135-145.
- Meijer, A. H.**, Gabby Krens, S. F., Medina Rodriguez, I. A., He, S., Bitter, W., Ewa Snaar-Jagalska, B., y Spaink, H. P. 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Molecular Immunology*. 40: 773-783.
- Meseguer, J.**, Esteban, M. A., Garcia, A. A., Lopez, R. A., y Agulleiro, B. 1990. Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology*. 53: 287-296.
- Meseguer, J.**, Lopez, R. A., y Esteban, M. A. 1994. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. *Cell and Tissue Research*. vol. 277: 1-10.
- Meurs, E.**, Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S.; Kerr, I.M.; Williams, B.R. y Hovanessian, A.G. 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*. 62: 379-390.
- Michel, C.**, Gonzalez, R. y Avrameas, S. 1990. Opsonizing properties of natural antibodies of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum *Journal of Fish Biology*. 37: 617-622.

- Middlyng, P. J.,** Reitan, L. J., y Speilberg, L. 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology*. 6: 335-350.
- Miller, N.,** Wilson, M., Bengten, E., Stuge, T., Warr, G., y Clem, W. 1998. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological Reviews*. 166: 187-197.
- Mirand, C. D. y Zemelman, R.** 2002a. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *The Science Total Environment*. 293: 207-218.
- Miranda, C. D. y Zemelman, R.** 2002b. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*. 212: 31-47.
- Mishell, R. I. y Dutton, R. W.** 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 126: 423-442.
- Moats, W. A.** 1999. The effect of processing on veterinary residues in foods. *Advance in Experimental Medicine and Biology*. 459: 233-241.
- Mold, C.,** Du Clos, T. W., Nakayama, S., Edwards, K. M., y Gewurz, H. 1982. C-reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 389: 251-262.
- Moncada, S. y Higgs, E. A.** 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 147: S193-S201.
- Moncada, S.,** Palmer, R. M., y Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43: 109-142.
- Montero, J.,** Estepa, A., Coll, J., y Tafalla, C. 2008. Regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-8 receptor (IL-8R) gene transcription in response to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), DNA vaccination and chemokines. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 271-280.
- Montuschi, P.** 2002. Indirect monitoring of lung inflammation. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 1: 238-242.
- Mookherjee, N. y Hancock, R. E.** 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64: 922-933.
- Morgan, A.L.,** Thompson, K.D., Auchinachie, N.A. y Migaud, H. 2008. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 791-799.
- Morris, S.M. Jr.,** Kepka-Lenhart, D., y Chen, L. C. 1998. Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *The American Journal of Physiology*. 275: E740-E747.
- Mulero, V. y Meseguer, J.** 1998. Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 143-156.
- Mulero, V.,** Esteban, M. A., Muñoz, J. y Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 49-62.

- Munday, B. L. y Zilberg, D.** 2003. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. *Fish Pathology*. 23: 3-6.
- Nakanishi, T.** 1986. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of the marine teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12: 213-221.
- Nakanishi, T., Aoyagi, K., Xia, C., Dijkstra, J. M., y Ototake, M.** 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 72: 101-109.
- Nakanishi, Y., Kodama, H., Murai, T., Mikami, T., y Izawa, H.** 1991. Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *American Journal of Veterinary Research*. 52: 397-401.
- Nathan, C.** 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*. 6: 3051-3064.
- Nathan, C.** 1995. Natural resistance and nitric oxide. *Cell*. 82: 873-876.
- Nathan, C. y Xie, Q. W.** 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 13725-13728.
- Nathan, C. F. y Hibbs, J.B., Jr.** 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*. 3: 65-70.
- Nayak, S. K., Swain, P., Nanda, P. K., Dash, S., Shukla, S., Meher, P. K., y Maiti, N. K.** 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*. 24: 394-399.
- Neumann, N. F. y Belosevic, M.** 1996. Deactivation of primed respiratory burst response of goldfish macrophages by leukocyte-derived macrophage activating factor(s). *Developmental y Comparative Immunology*. 20: 427-439.
- Neumann, N. F., Fagan, D., y Belosevic, M.** 1995. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental y Comparative Immunology*. 19: 473-482.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., y Belosevic, M.** 2000. Biochemical and functional characterisation of macrophage stimulating factors secreted by mitogen-induced goldfish kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 10: 167-186.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., y Belosevic, M.** 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 807-825.
- Newman, S. G.** 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 3: 145-185.
- Nicholson, B.L.** 1989. Fish cell culture: an update. En *Advances in Cell Culture*. Nicholson, B.L. (Ed). Academic Press Inc, New York. 7: 1-18.
- Noel, W., Raes, G., Hassanzadeh, G. G., De Baetselier, P., y Beschin, A.** 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol.* 20: 126-133.

- Nonaka, M.**, Natsuume-Sakai, S., y Takahashi, M. 1981. The complement system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Purification and characterization of the fifth component (C5). *Journal Immunology*. 126: 1495-1498.
- Novoa, B.**, Figueras, A., Ashton, I., y Secombes, C. J. 1996. *In vitro* studies on the regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity. *Developmental and Comparative Immunology*. 20: 207-216.
- Nussler, A. K. y Billiar, T. R.** 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology*. 54: 171-178.
- Nygaard, R.**, Husgard, S., Sommer, A. I., Leong, J. A., y Robertsen, B. 2000. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish and Shellfish Immunology*. 10: 435-450.
- O'Neill, L. A.**, Fitzgerald, K. A., y Bowie, A. G. 2003. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunology*. 24: 286-290.
- Oppenheim, J. J.**, Kovacs, E. J., Matsushima, K., y Durum, S. K. 1986. There is more than one interleukin 1. *Immunology Today*. 7: 45-56.
- Oppenheim, J.J.**, Feldmann, M., Durum, S.K., Hirano, T., Vilcek, J. y Nicola, N.A. 2009. En: The Online Cytokine Reference Database. <http://apresslp.gvpi.net/apcyto/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm&2.0>. webcite 2009.
- Ourth, D. D.** 1980. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 4: 65-74.
- Pacifici, R.**, Carano, A., Santoro, S.A., Rifas, L., Jeffrey, J.J., Malone, J.D., McCracken, R. y Avioli, L.V. 1991. Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 87: 221-228.
- Palomera, S.**, Baron, C., Weil, B., y Lang, P. 1996. Comparison between allogeneic and xenogeneic lymphocyte reactivity. *Transplantation Proceedings*. 28: 2915-2916.
- Pelegrin, P.**, Garcia-Castillo, J., Mulero, V., y Meseguer, J. 2001. Interleukin-1beta isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines. *Cytokine*. 16: 67-72.
- Peleteiro, M. C. y Richards, R. H.** 1985. Identification of lymphocytes in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*. 8: 161-172.
- Pelster, B.** 2007. NO in the development of fish. En *Advances in Experimental Biology Nitric Oxide*. Bruno Tota y Barry Trimmer, (Ed). Elsevier, 1: 275-291.
- Pettersen, E. F.**, Ingerslev, H. C., Stavang, V., Egenberg, M., y Wergeland, H. I. 2008. A highly phagocytic cell line TO from Atlantic salmon is CD83 positive and M-CSFR negative, indicating a dendritic-like cell type. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 809-819.
- Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29: e45.

- Pick, E.**, Charon, J., y Mizel, D. 1981. A rapid densitometric microassay for nitroblue tetrazolium reduction and application of the microassay to macrophages. *Journal of the Reticuloendothelial Society*. 30: 581-593.
- Pinge-Filho, P.**, Tadokoro, C.E. y Abrahamsohn, I.A. 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cellular Immunology*. 193: 90-98
- Pleguezuelos, O.**, Zou, J., Cunningham, C., y Secombes, C. J. 2000. Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1beta gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*. 51: 1002-1011.
- Popovic, P. J.**, Zeh, H. J., III, y Ochoa, J. B. 2007. Arginine and immunity. *The Journal of Nutrition*. 137: 1681S-1686S.
- Powell, M. D.**, Wright, M.D., y Burka, J. F. 1990. Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration?. *Journal of Fish Biology*. 37: 495-497.
- Press, C. M. y Evensen, Ī.** 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 309-318.
- Press, C. M.**, Dannevig, B. H., y Landsverk, T. 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and non lymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 4: 79-93.
- Press, C. M.**, Reitan, L. J., y Landsverk, T. 1995. Antigen retention and enzyme reactivity in the spleen of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following administration of injectable furunculosis vaccine. *Journal of Fish Diseases*. 18: 199-210.
- Purcell, M. K.**, Kurath, G., Garver, K.A., Herwig, R.P. y Winton, J.R. 2004. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*. 17: 447-462.
- Purcell, M. K.**, Smith, K. D., Hood, L., Winton, J. R., y Roach, J. C. 2006. Conservation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways in Teleost Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D. Genomics Proteomics*. 1: 77-88.
- Radi, R.**, Beckman, J. S., Bush, K. M., y Freeman, B. A. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 4244-4250.
- Randelli, E.**, Buonocore, F. y Scapigliati, G. 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 326-340.
- Ray, R. y Shah, A. M.** 2005. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science (London)*. 109: 217-226.
- Razquin, B. E.**, Castillo, A., Lopez-Fierro, P., Álvarez, F., Zapata, A. G., Villena, A.J. 1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno and enzyme histochemical study. *Journal of Fish Biology*. 36: 159-173.

- Reinhardt, R. L.**, Kang, S. J., Liang, H.E. y Locksley, R.M. 2006. T Helper cell effector fates — who, how and where?. *Current Opinion in Immunology*. 18: 271-277.
- Reite, O. B.** 1997. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish and Shellfish Immunology*. 7: 567-584.
- Reite, O. B.** 1998. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 489-513.
- Renoux, G.** 1980. The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs*. 20: 89-99.
- Riaño, J.** 2004. Clonación y estudios de expresión del factor de crecimiento vasculotendotial (*VEGF*) en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León, España.
- Robalino, J.**, Browdy, C. L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., y Warr, G. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology*. 78: 10442-10448.
- Roberts, R. J.** 1989. The immunology of Teleost. En *Fish Pathology*. Baillière Tindall, London, Pags.:135-150.
- Robertsen, B.** 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 269-290.
- Robertsen, B.** 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 172-191.
- Robertsen, B.**, Rorstad G., Engstad R., y Raa J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmon salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases*. 13: 391-400.
- Robertsen, B.**, Trobridge, G., y Leong, J. A. 1997. Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 21: 397-412.
- Robertsen, B.**, Bergan, V., Rokenes, T., Larsen, R., y Albuquerque, A. 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon Cytokine Research*. 23: 601-612.
- Robertsen, B.**, Zou, J., Secombes, C., y Leong, J. A. 2006. Molecular and expression analysis of an interferon-gamma-inducible guanylate-binding protein from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 1023-1033.
- Roca, F. J.**, Mulero, I., Lopez-Muñoz, A., Sepulcre, M. P., Renshaw, S. A., Meseguer, J., y Mulero, V. 2008. Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *Journal Immunology*. 181: 5071-5081.
- Rodrigues, P. N.**, Hermesen, T. T., Rombout, J. H., Egberts, E., y Stet, R. J. 1995. Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 19: 483-496.
- Rodriguez, M. F.**, Wiens, G. D., Purcell, M. K., y Palti, Y. 2005. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*. 57: 510-519.

- Roitt, I.**, Brostoff, J., y Male, D. 2001. *Immunology*. 6th edn, London Mosby.
- Rombout, J. H.**, Taverne-Thiele, A. J., y Villena, M. I. 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Developmental and Comparative Immunology*. 17: 55-66.
- Rombout, J. H.**, Huttenhuis, H. B., Picchiatti, S., y Scapigliati, G. 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 19: 441-455.
- Rook, G. A.**, Steele, J., Umar, S., y Dockrell, H. M. 1985. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. *Journal of Immunological Methods*. 82: 161-167.
- Rowley, A. F.** 1996. The evolution of inflammatory mediators. *Mediators of Inflammation*. 5: 3-13.
- Rowley, A. F.**, Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J. W., y Vickers, P. J. 1995. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish--a brief overview. *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 549-567.
- Saeij, J. P.**, Stet, R. J., Groeneveld, A., Verburg-van Kemenade, L. B., van Muiswinkel, W. B., y Wiegertjes, G. F. 2000. Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase. *Immunogenetics*. 51: 339-346.
- Saeij, J. P.**, Stet, R. J., de Vries, B. J., van Muiswinkel, W. B., y Wiegertjes, G. F. 2003. Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance?. *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 29-41.
- Sakai, D. K.** 1984. Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*. 7: 29-38.
- Sakai, D. K.** 1992. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 223-247.
- Sakai, D. K.**, Suzuki, K., y Awakura, T. 1994. Ontogenesis of salmonid complement and its nonspecific defense to viral infections. *Scientific Reports of the Hokkaido Salmon Hatchery*. 48: 25-31.
- Sakai, M.** 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92.
- Salvemini, D.**, Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G., y Needleman, P. 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 7240-7244.
- Sambrook, J.**, Maniatis, T. y Fritsch, E.F. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Harbor- Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, E.**, Coll, J., y Tafalla, C. 2007. Expression of inducible CC chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) DNA vaccine and interleukin 8. *Developmental and Comparative Immunology*. 31: 916-926.

- Sangrador-Vegas, A.**, Lennington, J. B., y Smith, T. J. 2002. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization. *Cytokine*. 17: 66-70.
- Sarmiento, A.**, Marques, F., Ellis, A. E., y Afonso, A. 2004. Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 16: 79-92.
- Savan, R.**, Igawa, D., y Sakai, M. 2003. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, *Cyprinus carpio* L. *European Journal of Biochemistry*. 270: 4647-4654.
- Savan, R. y Sakai, M.** 2004. Presence of multiple isoforms of TNF alpha in carp (*Cyprinus carpio* L.): genomic and expression analysis. *Fish and Shellfish Immunology*. 17: 87-94.
- Savan, R. y Sakai, M.** 2006. Genomics of fish cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 1: 89-101.
- Savan, R.**, Kono, T., Igawa, D., y Sakai, M. 2005. A novel tumor necrosis factor (TNF) gene present in tandem with the TNF-alpha gene on the same chromosome in teleosts. *Immunogenetics*. 57: 140-150.
- Scapigliati, G.**, Ghiara, P., Bartalini, M., Tagliabue, A., y Boraschi, D. 1989. Differential binding of IL-1 α and IL-1 β to receptors on B and T cells. *FEBS Letters*. 243: 394-398.
- Scapigliati, G.**, Bird, S., y Secombes, C. J. 2000. Invertebrate and fish cytokines. *European Cytokine Network*. 11: 354-361.
- Scapigliati, G.**, Costantini, S., Colonna, G., Facchiano, A., Buonocore, F., Bossù, P., Cunningham, C., Holland, J. W., y Secombes, C. J. 2004. Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 429-441.
- Schirmer, K.** 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology*. 224: 163-183.
- Schreck C.B.** 1996. Immunomodulation: endogenous factors. En *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Iwama, G. K. y Nakanishi, T. (Eds). Academic Press, San Diego (USA), Pags.: 311-337.
- Schultz, R. M.** 1991. Autocrine versus lymphocyte-dependent mechanisms for macrophage activation. *Cell Signal*. 3: 515-522.
- Secombes, C. J.** 1987. Lymphokine-release from rainbow trout leucocytes stimulated with concanavalin A. Effects upon macrophage spreading and adherence. *Developmental and Comparative Immunology*. 11: 513-520.
- Secombes C.J.** 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. En *Techniques in fish Immunology*. Estolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S. y Van Muiswinkel W.B. (Eds). SOS Publications USA, Pags.: 137-154.
- Secombes, C. J.** 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish and Shellfish Immunology*. 4: 421-436.

- Secombes C.J.** 1996. The non specific immune system:cellular defences. En *The Fish Immune System. Fish physiology series 15*. Iwama, G. K. y Nakanishi, T. (Eds). Academic Press, San Diego USA, Pags.: 63-103.
- Secombes, C. J. y Fletcher, T. C.** 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 53-71.
- Secombes, C. J., Chung, S., y Jeffries, A. H.** 1988. Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. *Developmental and Comparative Immunology*. 12: 201-206.
- Secombes, C. J., Cross, A. R., Sharp, G. J., y Garcia, R.** 1992. NADPH oxidase-like activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*. 16: 405-413.
- Secombes, C. J., Clements, K., Ashton, I., y Rowley, A. F.** 1994. The effect of eicosanoids on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, leucocyte proliferation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 42: 367-378.
- Secombes, C. J., Hardie, L. J., y Daniels, G.** 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish and Shellfish Immunology*. 6: 291-304.
- Secombes, C. J., Zou, J., Laing, K., Daniels, G. D., y Cunningham, C.** 1999a. Cytokine genes in fish. *Aquaculture*. 172: 93-102.
- Secombes, C. J., Bird, S., Cunningham, C., y Zou, J.** 1999b. Interleukin-1 in fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 335-343.
- Secombes, C. J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K. J., Cunningham, C., y Zou, J.** 2001. Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 713-723.
- Sepulcre, M. P., Lopez-Castejon, G., Meseguer, J., y Mulero, V.** 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology*. 44: 2009-2016.
- Sepulcre, M. P., Alcaraz-Perez, F., Lopez-Munoz, A., Roca, F.J., Meseguer, J., Cayuela, M.L. y Mulero, V.** 2009. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *Journal Immunology*. 182: 1836-1845.
- Shao, Z. J.** 2001. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advance Drug Delivery Reviews*. 50: 229-243.
- Sharp, G. J., Pike, A.W. y C.J.Secombes** 1989. The immune response of wild rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to naturally acquired plerocercoid infection of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzach, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1825). *Journal of Fish Biology*. 35: 781-793.
- Sharp, G. J. E. y Secombes, C. J.** 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*. 3: 119-129.
- Shephard, K. L.** 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4: 401-429.

- Shi, J. y Camus, A. C.** 2006. Hecidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 746-755.
- Shike, H.,** Lauth, X., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Van Olst, J. C., Shimizu, C., Bulet, P., y Burns, J. C. 2002. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge *European Journal of Biochemistry*. 269: 2232-2237.
- Sigh, J.,** Lindenstrøm, T., y Buchmann, K. 2004. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish and Shellfish Immunology*. 17: 75-86.
- Silphaduang, U. y Noga, E. J.** 2001. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*. 414: 268-269.
- Sims, J. E. y Dower, S. K.** 1994. Interleukin-1 receptors. *European Cytokine Network*. 5: 539-546.
- Sims, J. E.,** Gayle, M. A., Slack, J. L., Alderson, M. R., Bird, T. A., Giri, J. G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., y . 1993. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 6155-6159.
- Siwicki, A. K.** 1989. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental and Comparative Immunology*. 13: 87-91.
- Siwicki, A. K. y Studnicka, M.** 1987. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*. 31: 57-60.
- Siwicki, A. K.,** Anderson, D. P., y Dixon, O. W. 1990. *In vitro* immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Developmental and Comparative Immunology*. 14: 231-237.
- Siwicki, A. K.,** Anderson, D. P., y Rumsey, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 41: 125-139.
- Skarmeta, A. M.,** Bandín, I., Santos, Y. y Toranzo, A.E. 1995. *In vitro* killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23: 51-57.
- Slater, M. A.,** Mosser, D. D., y Bols, N. C. 1983. Established cell lines from different groups of vertebrates undergo metabolic cooperation with one another. *In Vitro*. 19: 683-692.
- Slater, C.H. y Schreck, C.B.** 1998. Season and physiological parameters modulate salmonid leucocyte androgen receptor affinity and abundance. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 379- 391.
- Smedsrød, B.,** Olsen, R., y Sveinbjørnsson, B. 1995. Circulating collagen is catabolized by endocytosis mainly by endothelial cells of endocardium in cod (*Gadus morhua*). *Cell and Tissue Research*. 280: 39-48.

- Smith, P.**, Hiney, M. P., y Samuelson, O. B. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*. 4: 273-313.
- Solem, S. T.**, Jørgensen, J. B., y Robertsen, B.r. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 475-491.
- Solem, S. T. y Stenvik, J.** 2006. Antibody repertoire development in teleosts--a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 57-76.
- Sørensen, K.K.**, Sveinbjørnsson, B., Dalmao, R. A., Smedsød B., y Bertheussen K. 1997. Isolation, cultivation and characterization of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases*. 20: 93-107.
- Sørensen, K. K.**, Melkko, J., y Smedsrod, B. 1998. Scavenger-receptor-mediated endocytosis in endocardial endothelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*. 201: 1707-1718.
- Sorum, H. y Lund, T. M. L.** 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria--a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*. 78: 43-56.
- Stafford, J. L.**, McLauchlan, P. E., Secombes, C. J., Ellis, A. E., y Belosevic, M. 2001. Generation of primary monocyte-like cultures from rainbow trout head kidney leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 447-459.
- Stafford, J. L. y Belosevic, M.** 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 539-554.
- Starkey, P. M.**, Fletcher, T. C., y Barrett, A. J. 1982. Evolution of alpha 2-macroglobulin. The purification and characterization of a protein homologous with human alpha 2-macroglobulin from plaice (*Pleuronectes platessa* L.) plasma. *Biochemical Journal*. 205: 97-104.
- Stensvag, K.**, Bogwald, J., Steiro, K., y Jorgensen, T. İ. 1995. In vitro degradation of *Aeromonas salmonicida* and *Limulus polyphemus* hemocyanin by Atlantic salmon, *Salmo salar* L. macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 427-439.
- Stenvik, J.**, Solstad, T., Strand, C., Leiros, I., y Jorgensen, T. T. 2004. Cloning and analyses of a BPI/LBP cDNA of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 307-323.
- Stet, R. J. M. y Egberts, E.** 1991. The histocompatibility system in teleostean fishes: From multiple histocompatibility loci to a major histocompatibility complex. *Fish and Shellfish Immunology*. 1: 1-16.
- Stet, R. J.**, Kruiswijk, C. P., Saeij, J. P., y Wiegertjes, G. F. 1998. Major histocompatibility genes in cyprinid fishes: theory and practice. *Immunological Reviews*. 166: 301-316.
- Stuehr, D. J. y Griffith, O. W.** 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 65: 287-346.

- Subasinghe, R. P.** 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine*. 67: 117-124.
- Sunyer, J. O.,** Tort, L., y Lambris, J. D. 1997. Structural C3 diversity in fish: characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Journal Immunology*. 158: 2813-2821.
- Sveinbjørnsson, B. y Seljelid, R.** 1994. Aminated beta-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 41: 113-123.
- Sveinbjørnsson, B.,** Olsen, R., y Paulsen, S. 1996. Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinaleosinophilic granule cells (EGC's) of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Diseases*. 19: 349-355.
- Swain, P.,** Nayak, S. K., Nanda, P. K., y Dash, S. 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 191-201.
- Szalai, A. J.,** Bly, J. E., y Clem, L. W. 1994. Changes in serum concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus Rafinesque*) phosphorylcholine-reactive protein (PRP) in response to inflammatory agents, low temperature-shock and infection by the fungus *Saprolegnia* sp. *Fish and Shellfish Immunology*. 4: 323-336.
- Takashima, F y Hibiya, T.** 1994. An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Gustav Fischer Verlag (distribuidor) New York.
- Tabona, P.,** Reddi, K., Khan, S., Nair, S. P., Crean, S. J., Meghji, S., Wilson, M., Preuss, M., Miller, A. D., Poole, S., Carne, S., y Henderson, B. 1998. Homogeneous *Escherichia coli* chaperonin 60 induces IL-1 beta and IL-6 gene expression in human monocytes by a mechanism independent of protein conformation. *Journal Immunology*. 161: 1414-1421.
- Tafalla, C. y Novoa, B.** 2000. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*. 24: 623-631.
- Tafalla, C.,** Coll, J., y Secombes, C. J. 2005. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 615-626.
- Tahira, A. y Secombes C.J.** 1996. Modulation of dab (*Limanda limanda*, L.) macrophage respiratory burst activity. *Fish and Shellfish Immunology*. 1: 135-146.
- Takemura, A.** 1996. Immunological localization of lysozyme in the prelarvae of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 6: 75-77.
- Takeuchi, O.,** Hemmi, H. y Akira, S. 2004. Interferon response induced by Toll-like receptor signaling. *Journal of Endotoxin Research*. 10: 252-256.
- Tapay, L. M.,** Lu, Y., Brock, J. A., Nadala, E. C., Jr., y Loh, P. C. 1995. Transformation of primary cultures of shrimp (*Penaeus stylirostris*) lymphoid (Oka) organ with

- Simian virus-40 (T) antigen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 209: 73-78.
- Thompson, I.**, White, A., Fletcher, T. C., Houlihan, D. F., y Secombes, C. J. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*. 114: 1-18.
- Tischendorf, F.** 1985. On the evolution of the spleen. *Experientia*. 41: 145-152.
- Titus, R. G.**, Sherry, B., y Cerami, A. 1991. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunology Today*. 12: A13-A16.
- Tizard, I.** 1992. The phylogeny of the immune system. En *Veterinary Immunology an introduction*. W.B. Saunders Company, USA, Pags.: 457-469.
- Tort, L.**, Rotllant, J. y Rovira, L. 1998. Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 120: 175-179.
- Toshchakov, V.**, Jones, B. W., Lentschat, A., Silva, A., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J., y Vogel, S. N. 2003. TLR2 and TLR4 agonists stimulate unique repertoires of host resistance genes in murine macrophages: interferon-beta-dependent signaling in TLR4-mediated responses. *Journal of Endotoxin Research*. 9: 169-175.
- Trachootham, D.**, Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R. D., y Huang, P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants and Redox Signaling*. 10: 1343-1374.
- Trepicchio, W.L.**, Bozza, M., Pedneault, G. y Dorner, A.J. 1996. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *Journal Immunology*. 157: 3627-3634.
- Trobridge, G. D. y Leong, J. A.** 1995. Characterization of a rainbow trout Mx gene. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 15: 691-702.
- Trobridge, G. D.**, Chiou, P. P., y Leong, J. A. 1997. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *Journal of Virology*. 71: 5304-5311.
- Trowsdale, J.** 2001. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*. 15: 363-374.
- Ushio-Fukai, M.** 2006. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovascular Research*. 71: 226-235.
- Utke, K.**, Bergmann, S., Lorenzen, N., Kollner, B., Ototake, M., y Fischer, U. 2007. Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 182-196.
- Vallejo, A. N.**, Miller, N. W., y William Clem, L. 1992a. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 73-89.

- Vallejo, A. N.,** Miller, N. W., y Clem, L. W. 1992b. Cellular pathway(s) of antigen processing in fish APC: Effect of varying *in vitro* temperatures on antigen catabolism. *Developmental and Comparative Immunology*. 16: 367-381.
- Vane, J. R.,** Bakhle, Y. S., y Botting, R. M. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38: 97-120.
- Vassalli, P.** 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual Review of Immunology*. 10: 411-452.
- Vilcek, J. y Lee, T. H.** 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 7313-7316.
- Villena, A. J.** 2003, Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Fish Biology and Fisheries*. 13: 111-140.
- Vincendeau, P.,** Gobert, A. P., Daulouede, S., Moynet, D., y Mossalayi, M. D. 2003. Arginases in parasitic diseases. *Trends in Parasitology*. 19: 9-12.
- Vodovotz, Y.,** Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., Weidner, J., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A. B., Lippa, C. F., y Sporn, M. B. 1996. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 184: 1425-1433.
- Vogelbein, W. K.,** Fournie, J. W., Overstreet, y R.M. 1987. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in *Rivulus marmoratus*. *Journal of Fish Biology*. 31: 145-153.
- Walbaum, J. J.** 1792. Petri Artedi Sueci Genera piscium. In quibus systema totum ichthyologiae proponitur cum classibus, ordinibus, generum characteribus, specierum differentiis, observationibus plurimis. Redactis speciebus 242 ad genera 52. Ichthyologiae, pars iii. Artedi Piscium 1-723. Citado en : Catalogo of Fishes. California Academy of Sciences. 2002. Sitio Web: <http://www.calacademy.org/research/ichthyology/>
- Wang, R.,** Neumann, N. F., Shen, Q., y Belosevic, M. 1995. Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 329-346.
- Wang, T.,** Jhonson N, Zou, J., Bols, N., y Secombes C.J. 2000. Sequencing of a second interleukin-1B allele: analysis and frequency distribution and expression. EMBL accession No. AJ278242, 2000. Cloning and functional characterisation of the interleukin-1h1 promoter of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1575:108– 116.
- Wang, T.,** Ward, M., Grabowski, P., y Secombes, C. J. 2001. Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. EMBL accesion No AJ295231. *The Biochemical Journal*. 358: 747-755.
- Wang, T.,** Holland, J.W., Bols, N. y Secombes, C.J. 2005. Cloning and expression of the first nonmammalian interleukin-11 gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The FEBS Journal*. 272: 1136-1147.

- Wang, Y.**, Zhang, J. J., Lei, K. Y., y Pike, J. W. 1997. Dexamethasone and interleukin-1 potently synergize to stimulate the production of granulocyte colony-stimulating factor in differentiated THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 239: 676-680
- Warr, G. W.** 1997. The adaptive immune system of fish. *Developments in Biological Standardization*. 90: 15-21.
- Warr, G. W.** 1998. Immune mechanisms of aquacultured species. En *Fish Vaccinology*. Gudding, R. *et al.*, (Eds). Basel, Switzerland, Pags.: 15-21.
- Watkins, L. R. y Maier, S. F.** 2002. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiological Reviews*. 82: 981-1011.
- Watts, M.**, Munday, B. L., y Burke, C. M. 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*. 79: 570-574.
- Weisz, A.**, Oguchi, S., Cicatiello, L., y Esumi, H. 1994. Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 8324-8333.
- Wentworth, A. D.**, Jones, L. H., Wentworth, P., Jr., Janda, K. D., y Lerner, R. A. 2000. Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 10930-10935.
- Werner, F.**, Jain, M.K., Feinberg, M.W., Sibinga, N.E., Pellacani, A., Wiesel, P., Chin, M.T., Topper, J.N., Perrella, M.A., Lee, M.E. 2000. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 36653-36658
- Weyts, F. A. A.**, Rombout, J. H. W. M., Flik, G., y Verburg-Van Kemenade, B. M. L. 1997. A common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte cell line shares morphological and functional characteristics with macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*. 7: 123-133.
- Whyte, S. K.** 2007. The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 1127-1151.
- Willett, C. E.**, Cortes, A., Zuasti, A., y Zapata, A. G. 1999. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 214: 323-336.
- Williams, J. B.**, Bullock, G., y Carson, M. C. 2002. Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. *Aquaculture*. 205: 221-230.
- Wittwer, C. T.**, Herrmann, M. G., Moss, A. A., y Rasmussen, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22: 130-138.
- Wolke, R. E.** 1992. Piscine macrophage aggregates: A review. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 91-108.
- Woo, P. T. K.** 1992. Immunological response of fish to parasitic organisms., *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 339-366.
- Wood, C. M.**, Gilmour, K. M., y Pärt, P. 1998. Passive and Active Transport Properties of a Gill Model, the Cultured Branchial Epithelium of the Freshwater Rainbow

- Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular y Integrative Physiology*. 119: 87-96.
- Wright, P. A.**, Campbell, A., Morgan, R. L., Rosenberger, A. G., y Murray, B. W. 2004. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: expression of arginase Type I and II genes in rainbow trout: influence of fasting on liver enzyme activity and mRNA levels in juveniles. *The Journal of Experimental Biology*. 207: 2033-2042.
- Wu, G.**, Mannam, A. P., Wu, J., Kirbis, S., Shie, J. L., Chen, C., Laham, R. J., Sellke, F. W., y Li, J. 2003. Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF. *The American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 285: H2420-H2429.
- Xu, W.**, Charles, I. G., Liu, L., Moncada, S., y Emson, P. 1996. Molecular cloning and structural organization of the human inducible nitric oxide synthase gene (NOS2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 219:784-788.
- Xu, Y.**, Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., y Tong, L. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. 408: 111-115.
- Yamada, K.M. y Cukierman, E.** 2007. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 130: 601-610.
- Yamamoto, M.**, Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. y Akira, S. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal Immunology*. 169: 6668-6672.
- Yang, D.**, Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., y Oppenheim, J. J. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology*. 22: 181-215.
- Yang, M.**, Wang, K. J., Chen, J. H., Qu, H. D., y Li, S. J. 2007. Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B). *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 1060-1071.
- Yano, T.** 1996. The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. En *The fish immune system: Organism, Pathogen, and Environment*. George Iwama yd Teruyuki Nakanishi, (Eds). Academic Press, San Diego, USA, Pags.: 105-157.
- Yin, Z.**, Lam, T. J., y Sin, Y. M. 1997. Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. 7: 93-104.
- Yoneyama, M.**, Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., y Fujita, T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*. 5: 730-737.
- Yoshida, T. y. Kitao, T.** 1991. The opsonic effect of specific immune serum on the phagocytic and chemiluminescent response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. *Fish Pathology*. 26: 29-33.

- Yoshinaga, K.**, Okamoto, N., Kurata, O., y Ikeda, Y. 1994. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathology*. 29: 1-4.
- Yu, H.**, Iyer, R. K., Kern, R. M., Rodriguez, W. I., Grody, W. W., y Cederbaum, S. D. 2001. Expression of arginase isozymes in mouse brain. *Journal of Neuroscience Research*. 66: 406-422.
- Zapata, A. G.** 1979. Ultrastructural study of teleost fish kidney. *Developmental and Comparative Immunology*. 3: 55-65.
- Zapata, A. G.** 1982. Lymphoid organs of teleost fish. III. Splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Developmental and Comparative Immunology*. 6: 87-94.
- Zapata, A. G. y Cooper, E. L.** 1990. The immune system: Comparative histopathology. *Cell Biology International Reports. J Wiley and sons Ltd*. 15: 267-267.
- Zapata, A. G.**, Varas, A., y Torroba, M. 1992. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunology Today*. 13: 142-147.
- Zapata, A.G.**, Chibá A., y Varas, A. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. En *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Iwawa, G. y Nakanishi, T. (Eds). Academic Press, San Diego, CA, USA, Pags.: 1-62.
- Zapata, A. G.**, Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., y Cortes, A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 126-136.
- Zasloff, M.** 2002. Antimicrobial peptides in health and disease. *The New England Journal of Medicine*. 347: 1199-1200.
- Zeeman, M.** 1986. Modulation of the immune response in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12: 235-241.
- Zemse, S. M.**, Hilgers, R. H., Simkins, G. B., Rudic, R. D., y Webb, R. C. 2008. Restoration of endothelin-1-induced impairment in endothelium-dependent relaxation by interleukin-10 in murine aortic rings. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 86: 557-565.
- Zhang, Y. B.**, Hu, C. Y., Zhang, J., Huang, G. P., Wei, L. H., Zhang, Q. Y., y Gui, J. F. 2003. Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulatory factor 7. *Fish and Shellfish Immunology*. 15: 453-466.
- Zhu, J. y Paul, W.E.** 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 112: 1557-1569.
- Zou, J.**, Cunningham, C., y Secombes, C. J. 1999a. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 beta gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *European Journal of Biochemistry*. 259: 901-908.
- Zou, J.**, Neumann, N. F., Holland, J. W., Belosevic, M., Cunningham, C., Secombes, C. J., y Rowley, A. F. 1999b. Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *The Biochemical Journal*. 340: 153-159.

- Zou, J.**, Grabowski, P. S., Cunningham, C., y Secombes, C. J. 1999c. Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Cytokine*. 11: 552-560.
- Zou, J.**, Holland, J., Pleguezuelos, O., Cunningham, C., y Secombes, C. J. 2000. Factors influencing the expression of interleukin-1 beta in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 24: 575-582.
- Zou, J.**, Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H., Honda, T., Soma, G. I., Ototake, M., Nakanishi, T., Ellis, A. E., y Secombes, C. J. 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 161-172.
- Zou, J.**, Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N. C., Ellis, A. E., y Secombes, C. J. 2003. Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 813-822.
- Zou, J.**, Yoshiura, Y., Dijkstra, J. M., Sakai, M., Ototake, M., y Secombes, C. 2004a. Identification of an interferon gamma homologue in Fugu, *Takifugu rubripes*. *Fish and Shellfish Immunology*. 17: 403-409.
- Zou, J.**, Bird, S., y Secombes C.J. 2004b. Fish cytokine gene discovery and linkage using genomic approaches. *Aquatic genomics*. II.
- Zou, J.**, Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J. M., Yoshiura, Y., Bols, N., y Secombes, C. 2005. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *Journal Immunology*. 175: 2484-2494.
- Zou, J.**, Tafalla, C., Truckle, J., y Secombes, C. J. 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *Journal Immunology*. 179: 3859-3871.
- Zuo, X. y Woo, P. T.** 1997. Natural anti-proteases in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* and brook charr, *Salvelinus fontinalis* and the *in vitro* neutralization of fish alpha 2-macroglobulin by the metalloprotease from the pathogenic haemoflagellate, *Cryptobia salmositica*. *Parasitology*. 114: 375-381.