



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y ANATOMÍA**

**ESTUDIO *in vitro* DE LA HEMATOPOYESIS DE TRUCHA ARCO IRIS,  
*Oncorhynchus mykiss*. ESTABLECIMIENTO DE UNA LÍNEA CELULAR  
DE ESTROMA DE PRONEFROS. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS  
DE SU CAPACIDAD HEMATOPOYÉTICA.**

**Memoria presentada por**  
**M<sup>a</sup> LUZ DIAGO EGAÑA**  
**para optar al Grado de Doctor en Biología.**

**León, 1996.**



Dña. Pilar López Fierro y D. Alberto Villena Cortés, Profesores Titulares del Departamento de Biología Celular y Anatomía de la Universidad de León.

CERTIFICAN: Que Dña. M<sup>a</sup> Luz Diago Egaña ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Biología Celular y Anatomía de la Universidad de León, el trabajo titulado: “Estudio *in vitro* de la hematopoyesis de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Establecimiento de una línea celular de estroma de pronefros. Caracterización y análisis de su capacidad hematopoyética”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Lo que hacemos constar, a petición de la interesada, para que surta los efectos oportunos.

León, a 17 de Septiembre de 1996.

Fdo.: Pilar López Fierro.

Fdo.:Alberto Villena Cortés.



Trabajo subvencionado por la Excma. Diputación Provincial de León



Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas, que de una u otra forma, han contribuido en la realización de esta tesis.

En primer lugar a mis directores, Pilar López y Alberto Villena, por dirigir, coordinar y supervisar este trabajo. A Pili por nuestras tripsinizaciones, cariotipos, recuentos etc..... y por “formarme” en otros muchos campos que nada tienen que ver con la ciencia.

A Blanca, Paco, Emilio y Valentín por aportar nuevas ideas e intentar dar solución a cualquier problema planteado.

A Arsenio Fernández por el tiempo invertido en solventar mis “atascos” cibernéticos.

Al Dr. J Coll y a A. Estepa por su colaboración en las técnicas de infección y detección de virus. A Amparo, por su amistad.

Al equipo de investigación del Dr. P. Martínez por su ayuda en el análisis de isoenzimas.

Y por último, y no por eso menos importante:

A mis padres y hermanos por su apoyo “siempre” incondicional.

A Miguel Angel por su cariño, su paciencia y por compartir conmigo las desgracias de esta tesis.

A Merce y Juan Carlos por su valiosa amistad.



A mis padres y hermanos

A Miguel Angel



## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
1.- Animales.....	43
1.1.-Condiciones de mantenimiento .....	43
1.2.-Sacrificio de los animales y obtención de sueros y plasma.....	43
1.3.- Inducción de anemia.....	44
1.4.- Inducción de estrés .....	44
2.- Medios de Cultivo.....	44
2.1.- Cultivos de estroma y cocultivos hematopoyéticos .....	44
2.2.- Obtención de medios condicionados.....	46
2.2.1.- Obtención de medio condicionado de macrófagos de trucha .....	46
2.2.2.- Obtención de medio condicionado de leucocitos de sangre periférica de trucha.....	46
2.2.3.- Obtención de medio condicionado de la línea celular del estroma de pronefros .....	46
3.- Condiciones de Cultivo.....	47
3.1.- Cultivos primarios y subcultivos del estroma de pronefros .....	47
3.1.1.- Clonado de células del estroma del pronefros.....	48
3.2.- Otras líneas celulares de peces .....	48
4.- Análisis Estructural y Funcional de la Línea Celular de Estroma de Pronefros.....	49
4.1.- Análisis citoquímico.....	49
4.2.- Análisis inmunocitoquímico.....	49
4.3.- Ensayos de fagocitosis.....	50
4.4.- Detección de micoplasmas .....	50
4.5.- Microscopía electrónica de transmisión.....	50
4.6.- Técnicas citogenéticas.....	51
4.6.1.- Cariotipo.....	51
4.6.2.- Tinción de los organizadores nucleolares (NORs).....	51
4.7.- Análisis de isoenzimas .....	52
4.7.1.- Obtención de los homogeneizados celulares .....	52
4.7.2.- Electroforesis y revelado de los geles .....	52
5.- Crecimiento Celular.....	52

5.1.- Tasa de crecimiento .....	52
5.2.- Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento.....	53
5.3.- Incorporación de timidina tritiada .....	53
6.- Susceptibilidad a Virus .....	54
6.1.- Titulación del virus VHS.....	54
6.2.- Detección del virus VHS por enzimoimmunoensayo (ELISA) de doble anticuerpo .....	54
6.3.- Citometría de flujo.....	55
7.- Inducción de la Hematopoyesis mediante Cocultivos .....	56
7.1.- Análisis de la hematopoyesis <i>in vitro</i> .....	56
8.- Cultivos en medio semisólido.....	57
8.1.- Cultivos en coágulos de fibrinógeno-trombina.....	57
8.2.- Cultivos en agarosa.....	57

## **RESULTADOS..... 59**

1.- Evolución de los Cultivos a largo plazo de Pronefros .....	59
2.- Características de la línea celular TPS.....	60
2.1.- Morfología.....	60
2.2.- Análisis citoquímico.....	61
2.3.- Análisis inmunocitoquímico.....	62
2.4.- Ensayos de fagocitosis.....	62
2.5.- Técnicas citogenéticas .....	62
2.5.1.- Recuento de cromosomas.....	62
2.5.2.- Tinción de los organizadores nucleolares (NORs).....	62
2.6.- Análisis de isoenzimas.....	62
2.7.- Crecimiento celular.....	63
2.7.1.- Tasa de crecimiento.....	63
2.7.2.- Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento .....	63
2.7.3.- Incorporación de timidina tritiada .....	63
2.8.- Susceptibilidad a virus.....	64
2.8.1.- Detección del virus VHS por los métodos TCID <sub>50</sub> y ELISA.....	64
2.8.2.- Citometría de flujo .....	64
3.- Influencia de otros medios de cultivo .....	64
4.- Inducción y análisis de la hematopoyesis sobre las líneas celulares TPS y RTG-2 .....	65
4.1.- Células liberadas a los sobrenadantes de los cocultivos TPS-Pronefros.....	66
4.2 - Análisis citoquímico de las células recogidas en los sobrenadantes de los cocultivos.....	67
4.3. Cinética de producción de células sanguíneas.....	68
5.- Evolución de los cocultivos incubados con el medio de cultivo MCP .....	69
5.1.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS.....	69
5.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2 .....	69
6.- Evolución de los cocultivos incubados con el medio de cultivo d (suplementado con suero de truchas estresadas) .....	70
6.1.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS.....	70
6.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2 .....	71

7.- Evolución de los cocultivos incubados con el medio de cultivo e (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).....	72
7.1.- Determinación de las concentraciones óptimas de hidrocortisona 21-hemisuccinato en el medio de cultivo .....	72
7.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS .....	72
7.3.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2.....	73
8.- Evolución de los cocultivos incubados con el medio de cultivo F (suplementado con complejos cortisol- - ciclodextrinas) .....	73
8.1.- Determinación de las concentraciones óptimas de cortisol -ciclodextrina en el medio de cultivo .....	73
8.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS .....	74
8.3.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2.....	74
9.- Cultivos en medio semisólido.....	74
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
1.- Obtención y mantenimiento de la línea celular TPS .....	78
1.1.- Medios de cultivo .....	79
2.- Caracterización de la línea celular TPS.....	84
2.1.- Células fibroblásticas .....	84
2.2.- Células epitelioides y células gigantes .....	86
2.3.- Características citogenéticas e isoenzimáticas de la línea celular TPS.....	88
2.4.- Cinética de crecimiento .....	88
3.- Capacidades hematopoyéticas de la línea celular tps .....	88
3.1.- Características de la hematopoyesis .....	90
3.2.- Comparación TPS-RTG-2.....	93
3.3.- Angiogénesis <i>in vitro</i> .....	94
4.- Posibles usos de la línea celular y de las técnicas de obtención de cultivos hematopoyéticos mediante cocultivo.....	95
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>99</b>
<b>TABLAS Y GRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>133</b>



## INTRODUCCIÓN

Los peces (Condrictios y Osteictios) comprenden el cuarenta y ocho por ciento de las especies conocidas de vertebrados (Altman y Dittmer, 1972). Aparte del indudable interés que como fuente de alimentación representan algunas de esas especies, esta superclase constituye una enorme reserva de variabilidad genética, que puede proporcionar nuevas herramientas para adquirir conocimientos y solventar problemas de gran importancia en las ciencias biológicas. La posición filogenética de los peces, por otra parte, permite suponer que sus sistemas fisiológicos son más primitivos y, por tanto, quizá más fáciles de analizar que los de los vertebrados más evolucionados.

Sin embargo, el manejo de los peces en el laboratorio presenta diversos problemas, lo que dificulta su utilización como animales de experimentación. Entre ellos cabe destacar a) La necesidad de mantener acuarios, que requieren, a veces, elevadas cantidades de agua de calidad controlada, b) En la gran mayoría de las especies, su reproducción anual, lo que limita la disponibilidad de poblaciones controladas y, c) Su gran variabilidad intraespecífica, que exige en muchos casos, manejar un elevado número de individuos. Aunque se han desarrollado distintos métodos para solventar estos problemas, como la utilización de ciertas especies tropicales y el desarrollo de líneas ginogénicas, el desarrollo de técnicas de estudio *in vitro* es sin duda uno de los más prometedores.

Una de las herramientas básicas de los estudios *in vitro* son los cultivos celulares. Así, los sistemas de cultivo celulares y tisulares han sido utilizados en mamíferos y aves, para la obtención de híbridos celulares, diagnóstico de enfermedades hereditarias y cáncer, propagación de virus y micoplasmas, estudio de los efectos de fármacos y antibióticos,

obtención de productos celulares, o como herramientas para investigar la proliferación, regeneración, diferenciación, transformación celular y los mecanismos que controlan la expresión de genes (Freshney, 1987). Los cultivos tienen ciertas ventajas sobre los estudios *in vivo* puesto que permiten controlar las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas en las que se mantienen las células, aunque todavía muchas líneas celulares necesitan ser suplementadas con sueros u otros nutrientes no muy bien definidos en su composición. Además permiten la producción controlada y estandarizada de un gran número de células, evitando los problemas legales, morales y éticos que conlleva la utilización de animales de experimentación.

En peces, se han desarrollado cultivos celulares primarios a partir de tejidos intactos o de órganos de distintas especies (Kocal y cols., 1988; Cheng y cols., 1993; Diago y cols., 1993; Pärt y cols., 1993; Siegl y cols., 1993; Avella y cols., 1994; Chilmoneczyk y Monge 1994; Blair y cols., 1995; Fernandes y cols., 1995; Mothersill y cols., 1995; Flaño 1996). Además, se han establecido una serie de líneas celulares tanto de peces de agua dulce como marinos (Nicholson y Byrne, 1973; Ellender y cols., 1979; Watanabe y cols., 1981; Wolfe y Ahne, 1982; Nicholson y cols., 1987; Komura y cols., 1988; Nicholson, 1988; Moritomo y cols., 1990; Tung y cols., 1991; Fernández y cols., 1993a, b; Driever y Rangini, 1993; Bols y cols., 1994; Bols y cols., 1995). Sin embargo, en comparación con mamíferos, el número existente de líneas celulares de peces es muy bajo y sólo unas pocas, tales como la BB, BF-2, CAR, CHSE, EPC, FHM y la RTG-2, son utilizadas rutinariamente.

Los cultivos celulares de peces han proporcionado una herramienta útil para realizar diversos estudios sobre el metabolismo hepático (Hayashi y Ooshiro, 1985; Maitre y cols., 1986; Segner y cols., 1994), la comunicación celular (Slater y cols., 1983), el sistema inmunitario (Graham y Secombes, 1988; Miller y Clem, 1988; Nicholson, 1988; Reitan y Thuvander, 1991; Bandín y cols., 1993; Carlson y cols., 1993), y el sistema endocrino (Ribiero y Ahne, 1982; Bols y cols., 1995). Además, los cultivos celulares están adquiriendo importancia para estudios toxicológicos (Shea y Berry, 1982; 1983; Babich y cols., 1986; Babich y Borefreund, 1987; Denizeau y Marion, 1990; Castaño, 1992). Por otra parte, las líneas celulares establecidas de uso más frecuente se emplean para el estudio de las patologías infecciosas de peces, incluyendo el diagnóstico, especialmente de aquellas causadas por virus

(Nims y cols., 1970; Nicholson y Byrne, 1973; Ahne, 1977; Kelly y cols., 1978; Wolf y cols., 1978; Hedrick y Fryer, 1981; Kimura y cols., 1981; Winton y cols., 1981; Lannan y cols., 1984; Nicholson y cols., 1987; Estepa 1992; Coll, 1993; Chilmonczyk y cols., 1995).

Recientemente se han desarrollado cultivos primarios de tegumento, branquia, pronefros y bazo de trucha arco iris que han permitido el estudio de la infección con el patógeno causante de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) (Flaño, 1996). Pese a que el pronefros está considerado como uno de los principales órganos hematopoyéticos de salmónidos, no se han desarrollado, a partir de él, líneas celulares que constituirían un excelente modelo experimental para comprender el mecanismo de infección de estos patógenos, puesto que posibilitarían reducir al mínimo la heterogeneidad derivada del establecimiento de los distintos cultivos primarios necesarios para iniciar estos estudios. Además, muchas de las patologías que afectan a los salmónidos se caracterizan por una infección sistémica y crónica con una marcada afinidad por el tejido renal (Wood y Yasutake, 1956; Yasutake y Rasmussen, 1968; de Kinkelin y cols., 1979), especialmente con una temprana destrucción del tejido hematopoyético renal.

Uno de los campos en el que los métodos de cultivo han proporcionado avances muy significativos ha sido el del estudio de la hematopoyesis y linfopoyesis. Desde las primeras descripciones morfológicas de los órganos hematopoyéticos de los vertebrados (Jordan, 1938; Andrew, 1965), se establecieron diversas teorías acerca del origen de las células sanguíneas. De ellas, la teoría monofilética proponía un origen común de todas las estirpes celulares circulantes a partir de células blásticas, denominadas hemocitoblastos (Jordan, 1938). Sin embargo, la teoría pivotaba sobre el "cómo" se controlaba la diferenciación del precursor común hacia una u otra línea celular. Tras la comprobación experimental de la teoría monofilética (Till y McCulloch, 1961), se acentuó la búsqueda de los factores reguladores de la diferenciación de las células madre totipotentes, lo que desembocó finalmente en la postulación de la teoría de los microambientes hematopoyéticos inductivos (HIM) por Trentin (1970).

No obstante, es tras el establecimiento de métodos de cultivos de los órganos hematopoyéticos y linfopoyéticos cuando se empiezan a adquirir conocimientos sobre los

mecanismos íntimos que regulan la localización, diferenciación y migración de las células madre hematopoyéticas. Durante las tres últimas décadas, se han desarrollado diversos tipos de cultivos de la médula ósea que permiten mantener la hematopoyesis *in vitro*, de los cuales dos son los más habituales. Uno de ellos, denominado cultivo tipo Dexter, es óptimo para mantener mielopoyesis (Dexter y cols., 1977), mientras que el otro, el cultivo de tipo Whitlock-Witte, es óptimo para mantener linfopoyesis (Whitlock y Witte, 1987). Posteriormente, se han desarrollado modificaciones de esos métodos para obtener cultivos eritropoyéticos (Dexter y cols., 1981), o megacariopoyéticos (Mei y Burstein, 1991). Además, se han desarrollado sistemas para el cultivo *in vitro*, y establecimiento de líneas celulares, de las células del estroma de la médula ósea (Dexter y cols., 1984; Collins y Dorshkind, 1987; Hunt y cols., 1987; Whitlock y Müller-Sieburg, 1990; Greenberger, 1991).

Recientemente, Wang y cols., (1995) han desarrollado un sistema tridimensional de cultivos a largo plazo de médula ósea (LTBMC) de ratón, en el que utilizan microesferas de colágeno bovino como soporte para el crecimiento de las células de estroma. Este sistema parece proporcionar un microambiente diferente al de los cultivos en frasco tipo "Dexter" y "Whitlock-Witte" puesto que se producen tanto linfocitos como eritrocitos, macrófagos, granulocitos y megacariocitos. Además, en ausencia de eritropoyetina exógena, estos autores observan grupos de células que se asemejan a los islotes eritroblásticos.

Todos estos métodos de cultivo hematopoyéticos han sido utilizados para la realización de diferentes estudios que han permitido determinar la estructura y fisiología del ambiente en el cual tiene lugar la hematopoyesis, incluyendo la identificación de factores estimulantes de colonias (Shaddock y cols., 1983; Lipschitz y cols., 1984).

El tejido hematopoyético está presente en todos los vertebrados, aunque con distintas localizaciones anatómicas (Jordan, 1938; Andrew, 1965). En los mamíferos el tejido hematopoyético se localiza en el hígado fetal, el bazo y la médula ósea de los adultos. Esta última localización anatómica del tejido hematopoyético se encuentra en todos los vertebrados tetrápodos adultos (a excepción de la mayoría de los anfibios urodelos), aunque las capacidades hematopoyéticas de la médula ósea varían de una especie a otra (Jordan, 1938; Andrew, 1965; Zapata y Cooper, 1990). Los peces carecen de médula ósea y los órganos más

comunes que asumen esa función son el riñón, especialmente el pronefros, y el bazo, aunque existen otros órganos, distintos según las especies, que alojan a dicho tejido (Zapata, 1983). En los teleósteos se han observado en el pronefros todas las líneas de diferenciación hematopoyéticas, incluyendo una considerable capacidad para la linfo- y plasmacitopoyesis (Smith y cols., 1970; Zapata, 1979, 1983) y también están presentes células madre hematopoyéticas pluripotentes (Al-Adhami y Kunz, 1976; Zapata, 1981). Además, se ha propuesto que el pronefros de los teleósteos es homólogo de la médula ósea hematopoyética (Zapata, 1979, 1983), y ha sido considerado como órgano linfoide primario para la producción de células B en salmónidos (Kaattari e Irwin, 1985; Razquin y cols., 1990).

Los tejidos que alojan la hematopoyesis en peces presentan características morfológicas similares entre sí y con los tejidos hematopoyéticos de otros vertebrados, especialmente en lo referido a los componentes del estroma y la vascularización. Estos componentes, en los vertebrados superiores, definen los microambientes hematopoyéticos inductivos (HIM) que inducen y regulan la diferenciación y maduración de las células sanguíneas (Trentin, 1970; Barr, 1988) y estructuralmente están constituidos por vasos sanguíneos sinusoidales y células reticulares asociadas a fibras conjuntivas (Trentin, 1970; Chen y Weiss, 1975; Tavassoli, 1977; Weiss, 1981). El pronefros de peces contiene células reticulares y sinusoides sanguíneos (Zapata, 1979; Zapata y cols., 1981; Álvarez, 1986; Castillo y cols., 1990), cuyas características son similares a sus equivalentes de la médula ósea de los mamíferos (Westen y Bainton, 1979) y aves (Yoshida y Yumoto, 1987). A partir de estudios ultraestructurales (Zapata, 1979) e histoquímicos (Castillo y cols., 1987; Castillo 1991), se ha postulado que el pronefros de teleósteos contiene microambientes hematopoyéticos inductivos homólogos de los de mamíferos. Sin embargo, no existen estudios *in vivo* e *in vitro*, en los que se determinen las funciones que los componentes de los microambientes hematopoyéticos ejercen en la diferenciación de las células madre hacia una estirpe celular sanguínea u otra, semejantes a los realizados en mamíferos (Cline y Golde, 1979; Dexter y Spooncer, 1987; Gulati y cols., 1988; revisado por Barr, 1988).

Durante los últimos cuarenta años se han desarrollado distintas técnicas experimentales con el fin de abordar el estudio de la hematopoyesis en mamíferos que han aportado datos

complementarios. Entre ellas, las experiencias de irradiación-reconstitución (Till y McCulloch, 1961) permitieron iniciar la caracterización de la serie de las células progenitoras hematopoyéticas. Los métodos de cultivo clonogénico (Heyworth y Spooncer, 1993) y las técnicas de separación celular (Visser y cols., 1984; Bertoncello y cols., 1985; 1991; Müller-Sieburg y cols., 1986; Spangrude y cols., 1988) han permitido aislar y clonar diversos estadios de la jerarquía de las células progenitoras hematopoyéticas. Por otra parte, los cultivos a largo plazo de médula ósea (LTBMC) han hecho posible analizar más claramente las interacciones entre las células progenitoras y las formadoras de los microambientes, incluyendo los contactos célula-célula y la secreción de moléculas reguladoras. Por último, el establecimiento de líneas celulares estromáticas de médula ósea ha posibilitado el análisis de la heterogeneidad de las células del estroma, establecer ensayos de producción de citoquinas/factores hematopoyéticos, y el clonado de los genes que codifican estos factores.

Respecto al linaje de las células hematopoyéticas, los experimentos de irradiación-reconstitución realizados *in vivo* en ratones singénicos por Till y McCulloch, (1961) permitieron definir la unidad formadora de colonias esplénicas (CFU-S) como la más primitiva de las células madre hematopoyéticas. Estas unidades se reconocían en trasplantes de médula ósea, en ratones singénicos irradiados letalmente, como las que daban lugar a colonias hematopoyéticas, constituidas por diferentes tipos celulares sanguíneos, en el bazo y la médula ósea. Hoy en día se sabe que las CFU-S en el ratón, corresponden a estadios de diferenciación algo posteriores a la célula madre hematopoyética, ya que en este modelo las células capaces de reconstituir a largo plazo la hematopoyesis de animales irradiados (LTRA ó Pre-CFU-S), no tienen capacidad para formar colonias. Además, diversos estudios de trasplantes sucesivos han demostrado que las pre-CFU-S se hallan en las áreas esplénicas en las que no se han formado CFU-S (Till y McCulloch, 1961; Siminovitch y cols., 1963).

Estas experiencias también pusieron de manifiesto la necesidad de condiciones específicas para el desarrollo de las células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea y el bazo de ratones singénicos irradiados. Se observó que las colonias hematopoyéticas desarrolladas en el bazo eran primariamente eritroides, mientras que las desarrolladas en la médula ósea eran principalmente granulocíticas (Wolf y Trentin, 1968; Trentin, 1971).

Además, entre las colonias esplénicas, las desarrolladas en la pulpa roja eran exclusivamente eritroides, mientras que las desarrolladas bajo la cápsula esplénica o en estrecha asociación con las trabéculas eran colonias granulocíticas (Trentin, 1970).

Entre los distintos modelos *in vitro* que fueron desarrollados para el estudio de la hematopoyesis el primero utilizado fue el cultivo en medio líquido de células de médula ósea (Ginsburg y Sachs, 1963; Sachs, 1964). Este sistema mostró que era posible obtener clones que contenían células cebadas y granulocitos en diferentes estadios de diferenciación. Posteriormente, se aplicó el sistema de cultivo a corto plazo en medio semisólido con el fin de clonar distintas líneas celulares y poder distinguir y aislar colonias. El análisis de los primeros tipos de colonias obtenidos en agar, con capas de células adherentes, mostró colonias que contenían macrófagos, granulocitos o ambos, en diferentes estadios de maduración, y que podían originarse a partir de una única célula (Pluznik y Sach, 1965, 1966; Bradley y Metcalf, 1966). Estos ensayos en medio semisólido, agar (Metcalf, 1972), metilcelulosa (Wilson y cols., 1974) ó geles de colágeno (Lanotte y cols., 1981), fueron aplicados al clonado y diferenciación de macrófagos normales humanos y granulocitos (Paran y cols, 1970; Pike y Robinson, 1970) y de otras estirpes celulares sanguíneas, incluyendo eritrocitos (Stephenson y cols., 1971), eosinófilos, megacariocitos (Metcalf, 1988), linfocitos B (Metcalf y cols., 1975) y linfocitos T (Gerassi y Sachs, 1976).

Durante los últimos años se han desarrollado muchas variantes de la técnica básica del ensayo de células formadoras de colonias (CFCs) que han permitido la identificación y cuantificación de varios tipos de progenitores hematopoyéticos. Por ejemplo, en el modelo murino, el ensayo de células formadoras de colonias mixtas (CFC-Mix) (Johnson y Metcalf, 1977; Heyworth y Spooncer, 1993) permite la obtención de colonias formadas al menos por tres estirpes hematopoyéticas. En humanos, Fauser y Messner, (1987) desarrollaron un ensayo similar en el que los progenitores hematopoyéticos eran capaces de producir colonias compuestas por granulocitos, células eritroides, macrófagos y megacariocitos (CFC-GEMM). El ensayo para células formadoras de colonias-A (CFC-A) en el modelo murino (Pragnel y cols., 1988), permite obtener eosinófilos, además de los tipos celulares encontrados en

humanos. Funcionalmente estas CFC-A se consideran similares a las CFU-S del día 12. Otros tipos de progenitores hematopoyéticos que se han identificado con estos sistemas son:

1) Células formadoras de colonias de alto poder proliferativo (HPP-CFC) (Bradley y Hodgson, 1979; Bradley y cols., 1985), que *in vitro* dan lugar a colonias de megacariocitos, granulocitos y macrófagos y contribuyen a la reconstitución hematopoyética de ratones irradiados letalmente (Watt y Vissert, 1992).

2) Células formadoras de colonias blásticas (CFC-Blast), que dan lugar a colonias de blastos (Gordon y cols., 1983).

3) Células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC), que producen, en ensayos clonogénicos secundarios, CFC-GM (células formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos) y BFC-E (células formadoras de "burst" eritroides). Además, se ha sugerido que tienen capacidad linfopoyética (Fraser y cols., 1990).

4) Por último las células productoras de áreas de proliferación "en empedrado" (CAF-C) (Ploemacher y cols., 1989) se consideran funcionalmente similares a las CFU-S del día 12.

Todos estos sistemas de cultivo a corto plazo en medio semisólido, tienen la ventaja de que son cuantitativos, rápidos (en 2-14 días se obtienen colonias) y permiten utilizar medio de cultivo sin suero (Guilbert e Iscove, 1976; Iscove y cols., 1980). Por el contrario, estos sistemas sólo proporcionan información acerca de los factores que regulan la población de células progenitoras comprometidas que sufren maduración terminal, y no acerca de las condiciones necesarias para la autorrenovación y diferenciación de los compartimientos de células madre tempranas.

Paralelamente al desarrollo de los ensayos en medio semisólido, Allen y Dexter (1976) desarrollaron en mamíferos un sistema de cultivo a largo plazo de médula ósea (LTBMC), siendo éste el único sistema *in vitro* que soporta la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas (Wright y Greenberger, 1984). Con este sistema de cultivo ha sido posible estudiar en las células hematopoyéticas normales las interacciones célula-célula, la transducción de señales, la respuesta de las células a citoquinas y factores de crecimiento, la eficacia y citotoxicidad de nuevos agentes quimioterapéuticos, y de drogas

inmunomoduladoras y antivirales (Berenson y cols., 1988; Verfaillie y cols., 1990; Srour y cols., 1993).

Los sistemas de cultivo a largo plazo presentan características comunes, tales como ser dependientes de la formación de varias capas de células adherentes. Además, se ha sugerido que la misma capa de células adherentes del estroma, puede soportar la diferenciación tanto de progenitores mieloides como linfoides, puesto que cuando se varían las condiciones de cultivo desde "tipo Dexter" a "tipo Whitlock y Witte", dejan de producirse precursores mieloides y pasan a generarse células linfoides pre-B y B (Denis y Witte, 1986; Dorshkind, 1986). Estas capas de células constituyen, por tanto, el soporte para una hematopoyesis activa y en ellas se dan procesos de autorrenovación de las células madre pluripotentes (Schofield y Dexter, 1985), de proliferación y diferenciación de las CFU-S, así como de los distintos precursores hematopoyéticos (Mauch y cols., 1980; Molineux y cols., 1987) hacia eritrocitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, megacariocitos, células cebadas y linfocitos B (Dexter y cols., 1984). Por otra parte, estos sistemas de cultivo no necesitan la adición de ningún factor de crecimiento exógeno (Dexter y Spooncer, 1987; Spooncer y cols., 1993), a diferencia de lo que ocurre en los ensayos clonogénicos convencionales realizados en medio semisólido (Heyworth y Spooncer, 1993)

Spooncer y cols., (1993) han atribuido estas características de los LTBMCM a que son capaces de realizar una combinación de las siguientes funciones a) producción y mantenimiento de moléculas de adhesión celular, que permiten la unión de las células madre hematopoyéticas y su progenie a elementos celulares específicos del estroma; b) establecimiento de comunicaciones intercelulares entre los distintos tipos de células del estroma y entre células del estroma y células hematopoyéticas; c) síntesis, secreción y presentación por parte de las células del estroma, de factores inhibidores y estimuladores del crecimiento que regulen la proliferación y desarrollo de las células progenitoras hematopoyéticas; d) síntesis de moléculas de matriz extracelular por las células del estroma, que mantienen la integridad del microambiente hematopoyético y presentan factores de crecimiento a las células hematopoyéticas en desarrollo.

En peces no se han realizado ensayos de irradiación-reconstitución y las técnicas de cultivos hematopoyéticos están poco elaboradas. Un resumen de los métodos aplicados en peces puede verse en la Tabla I. Diversos autores han cultivado rutinariamente linfocitos en medio líquido con el fin de analizar las respuestas de éstos frente a los mitógenos de células T y B de mamíferos, para estudiar la existencia de heterogeneidad entre las poblaciones linfoides de peces (Etlinger y cols., 1976; Chilmonczyk, 1978; Warr y Simon, 1983; Miller y cols., 1987; Graham y Secombes, 1988; Luft y cols., 1991).

Las técnicas de cultivo en medio semisólido han sido aplicadas en los ensayos de formación de placas hemolíticas (PFCs) para detectar células productoras de anticuerpos en peces (Rijkers y cols., 1980; Anderson, 1990). Diversos autores han conseguido cultivar en agar semisólido y estimulando con mitógenos, linfocitos de sangre periférica de trucha arco iris (Finegan y Mulcahy, 1987) o de carpa (Caspi y cols., 1982) obteniendo colonias de linfocitos y linfoblastos. Estepa y Coll, (1993), empleando fitohemaglutinina (PHA), lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) y concanavalina A (Con A), obtienen colonias de blastos en coágulos de fibrinógeno-trombina. Así mismo, Moritomo y cols., (1993) y Moritomo y Watanabe (1994) obtienen colonias de blastos y granulocitos de carpa cultivando en agar y añadiendo suero alogénico.

En cuanto a los cultivos hematopoyéticos a largo plazo, en peces, se han desarrollado sistemas de cultivo en medio líquido que permiten mantener células granulopoyéticas durante periodos de tiempo más o menos largos. Estos modelos incluyen tanto cultivos primarios de riñón de carpa (Moritomo y cols., 1994) y bazo de trucha arco iris (Flaño 1996), como cultivos a largo plazo de riñón cefálico (Diago y cols, 1993; Siegl y cols, 1993; Chilmonczyk y Monge 1994) y de bazo de trucha arco iris (Siegl y cols., 1993; Ganassin y Bols, 1996) y al igual que ocurre en mamíferos, estos sistemas son dependientes de la formación de una capa de células adherentes del estroma del órgano.

Para el análisis de los componentes del estroma de los órganos hematopoyéticos de mamíferos se han utilizado cultivos formados por capas de células adherentes purificadas que no contienen células hematopoyéticas (Dorshkind, 1990). Sin embargo, el análisis de la heterogeneidad de las células del estroma, los ensayos de producción de citoquinas, y el

clonado de los genes que codifican estos factores requiere el uso de líneas celulares del estroma. En consecuencia, numerosos laboratorios han clonado células del estroma a partir de médula ósea fresca o a partir de capas adherentes de cultivos a largo plazo de médula ósea (Katsuno y cols., 1985; Zipori y cols., 1985; Kodama y cols., 1986; Collins y Dorshkind, 1987; Hunt y cols., 1987) que han sido caracterizadas desde distintos aspectos, incluyendo morfología, tipo de matriz extracelular secretada, número de cromosomas, tiempo de duplicación, etc. Estas líneas generalmente no son fagocíticas, expresan moléculas del MHC-I y no expresan marcadores característicos de las células hematopoyéticas. Todas ellas secretan componentes de la matriz extracelular y mediadores solubles que actúan como factores de crecimiento sobre células hematopoyéticas. Finalmente, no se han encontrado líneas celulares que soporten una línea hematopoyética definida.

En peces, se han establecido algunas líneas celulares a partir del pronefros y del bazo de diversas especies (Ellender y cols., 1979; Chen y Kou, 1987; Moritomo y cols., 1990; Tung y cols., 1991; Cheng y cols., 1993) que presentan morfología bien epiteliode, bien fibroblástica o ambas y son mayoritariamente susceptibles a la infección por birnavirus, herpesvirus o rhabdovirus de peces. No obstante, no se han caracterizado sus componentes como elementos del estroma hematopoyético, ni se ha descrito ninguna línea celular que sea capaz de mantener hematopoyesis.

De acuerdo con la definición de microambientes hematopoyéticos inductivos (Trentin, 1970), los componentes estructurales de los mismos son: las células del estroma y de la vascularización. Respecto a las primeras, se han definido dos tipos de células reticulares en los cordones de tejidos hematopoyéticos: 1) Células reticulares fibroblásticas, que se encuentran localizadas en los espacios intersinusoidales formando un entramado y constituyen el elemento de soporte para las células hematopoyéticas en desarrollo (Dorshkind, 1990); 2) Células reticulares adventicias, que se sitúan en el polo basal de las células sinusoidales, no son fagocíticas y pueden acumular lípidos (Weiss, 1988). Los principales elementos celulares de la vascularización implicados en los microambientes hematopoyéticos han sido las células sinusoidales (Weiss, 1988; Dorshkind, 1990). Estas células tapizan de forma discontinua los

sinusoides y constituyen la barrera entre la circulación y el compartimiento hematopoyético (Weiss, 1988).

Además de las células estromáticas y las de la vascularización, los macrófagos constituyen otro de los componentes no estromáticos de los microambientes hematopoyéticos inductivos. Topográficamente, se encuentran en tres localizaciones distintas (Mayani y cols., 1992): 1) Como macrófagos centrales de los islotes eritroblásticos, participando en el control de la maduración eritroide; 2) Alrededor de la cara abluminal del endotelio de los senos sanguíneos, fagocitando células rojas senescentes o defectivas; 3) Dispersos entre las células hematopoyéticas en desarrollo.

*In vitro*, los cultivos de médula ósea reproducen los microambientes hematopoyéticos inductivos, pero los datos obtenidos respecto a sus componentes celulares son difícilmente comparables con las observaciones *in vivo*. Esto es debido a que dependiendo de la metodología utilizada se han descrito poblaciones muy heterogéneas de células adherentes, no hematopoyéticas, que pueden ser consideradas o no como parte de dichos microambientes. Además, algunos de los tipos celulares descritos *in vitro* han sido considerados homólogos de diferentes tipos de células *in vivo*, dependiendo de los autores. Así, inicialmente los estudios estructurales de los LTBMC demostraron una amplia diversidad de células adherentes, tales como células reticulares, endoteliales, adipocitos, fibroblastos, células "manta" y macrófagos (Allen y Dexter, 1976; Bentley y Foidart, 1980; Allen, 1981; Dexter, 1982). Otros autores han reducido el número de poblaciones a dos tipos fundamentales, en un caso describiendo células epitelioides y macrófagos (Tavassoli y Takahashi, 1982), en otro células "manta" y adipocitos, las cuales se originan a partir de células de morfología fibroblástica (Dexter y cols., 1990).

Además del componente celular, los cultivos hematopoyéticos han permitido caracterizar otros dos elementos que forman parte de los mecanismos de control de la hematopoyesis y, por tanto, son considerados elementos de los microambientes hematopoyéticos inductivos (HIM), la matriz extracelular y los factores de crecimiento hematopoyéticos. Las células del estroma de la médula ósea de mamíferos producen y secretan macromoléculas que forman la matriz extracelular, tales como colágenos,

fibronectina, laminina y proteoglicanos (Bentley, 1982; Wight y cols., 1986; Keating y Gordon, 1988), de tal modo, que ésta no sólo actúa como soporte físico para los elementos hematopoyéticos, sino que juega un papel dinámico en la regulación de la hematopoyesis (Zuckerman y cols., 1989).

Las células que componen los HIM son la principal fuente de factores de crecimiento hematopoyéticos y citoquinas que pueden influenciar de manera positiva o negativa la hematopoyesis (Mayani y cols., 1992). Una característica de las citoquinas y de los factores de crecimiento es que además de poder actuar directamente sobre las células diana, son capaces de estimular e inhibir la producción de otras citoquinas. Como resultado de esto muchas de las acciones de las citoquinas son indirectas, pudiendo actuar sobre la producción de otras citoquinas (Vilcek y Le, 1991), de manera que la acción biológica resultante refleja las interacciones sinérgicas y antagonistas entre la red de citoquinas y los factores de crecimiento hematopoyéticos.

A pesar de esta gran complejidad, en los últimos años, se han caracterizado un grupo de moléculas con capacidad para estimular, generalmente, la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas. Entre ellas se encuentran las interleuquinas (IL-1- IL-12), el factor de células madre (SCF) y factores estimuladores de colonias, como el GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos). Otros factores como el TNF- (factor de necrosis tumoral- ), TGF- (factor de crecimiento transformante- ) y el IFN- (interferón- ), han sido clasificados como factores inhibidores de la hematopoyesis (Torok-Storb, 1988). Algunos de estos factores de crecimiento son producidos por células activadas, linfocitos T y macrófagos, y desempeñan un papel importante en la producción de células sanguíneas bajo condiciones de estrés agudo tales como la infección (Torok-Storb, 1988). Otros factores, como el G-CSF y M-CSF, son sintetizados constitutivamente por las células del estroma (Janowska-Wieczorek y cols., 1988)

A continuación repasaremos brevemente las características de los elementos celulares y no celulares que se consideran formadores de los microambientes hematopoyéticos inductivos

(HIM), agrupando los datos para aquellos que se consideran homólogos *in vivo* e *in vitro* y considerando los cultivos mielopoyéticos y linfopoyéticos.

### **Cultivos mielopoyéticos (Tipo “Dexter”).**

#### **Células reticulares**

Las células reticulares son el componente celular mayoritario del estroma de la médula ósea *in vivo* (Tavassoli y Yoffey, 1983) y se han descrito dos tipos dependiendo de su localización: adventicias y fibroblásticas. Histoquímicamente, las células reticulares de mamíferos (Westen y Bainton, 1979) y aves (Yoshida y Yumoto, 1987) presentan actividad fosfatasa alcalina.

En la médula ósea de mamíferos y aves, las células reticulares adventicias se encuentran localizadas en la periferia de pequeños senos sanguíneos, formando una capa que cubre parcialmente la superficie abluminal del endotelio (Weiss, 1988). Estas células han sido consideradas fibroblásticas en origen debido a su morfología y estrecha relación con fibras reticulares (Hoshi y Weiss, 1978; Litchman, 1981; Weiss, 1981), no son fagocíticas, sintetizan fibras reticulares y con frecuencia contienen en su citoplasma grandes inclusiones lipídicas, por lo que se las ha relacionado con los adipocitos (Weiss y Chen, 1975). Los estudios morfológicos indican que uno de los principales papeles de estas células es regular la migración de las células sanguíneas maduras desde la médula ósea hasta la circulación (Saklai, 1989).

Por otra parte, las células reticulares fibroblásticas constituyen la red de soporte para las células hematopoyéticas de la médula ósea. Se ha demostrado que estas células contienen y producen colágenos de tipo I y III (Bentley, 1982; Castro-Malaspina y cols., 1980). Además, sus delgadas prolongaciones citoplasmáticas envuelven a las células hematopoyéticas que están madurando (Saklai y Tavassoli, 1979), encontrándose normalmente en íntima asociación con células granulocíticas, lo cual sugiere que existen interacciones funcionales entre estos dos tipos celulares (LaPushin y Trentin, 1977; Westen y Bainton, 1979).

*In vitro*, células de morfología fibroblástica (Weiss y Chen, 1975; Litchman, 1981) o epitelioide (Allen, 1981) han sido consideradas como los equivalentes de las células

reticulares. En cultivos a largo plazo de médula ósea de cobaya y humanos el componente principal de la capa de células adherentes son fibroblastos (Friedenstein y cols., 1974; Andreoni y cols., 1992), capaces de producir colágeno de tipos I y III así como fibronectina (Bentley, 1982). Los fibroblastos pueden crecer durante largos periodos de tiempo *in vitro* y la implantación de estas células en la cápsula renal induce la formación de estroma óseo y de hematopoyesis (Friedenstein y cols., 1974). No obstante, estas células no mantienen la proliferación de la célula madre hematopoyética *in vitro* (Lubennikova y Domaratskay, 1976), por lo que la hematopoyesis observada tras la implantación de fibroblastos *in vivo* se ha atribuido a la contaminación con elementos del estroma del huésped (Dexter, 1982).

En los cultivos a largo plazo de ratón aproximadamente las dos terceras partes de las colonias de fibroblastos son fosfatasa alcalina positivas, un marcador histoquímico de las células reticulares en la médula ósea (Westen y Bainton, 1979), aunque en conejo y cobaya todas las colonias de fibroblastos muestran una baja positividad para esta actividad enzimática (Ploemacher, y cols., 1984). Dexter y cols., (1990) describen variaciones en la expresión de la actividad fosfatasa alcalina en los LT BMC murinos. Estos autores observan una pérdida progresiva de esta actividad, a medida que los precursores fibroblastoides van incrementando su tamaño y transformándose en células "manta".

Además, las células fibroblásticas cultivadas a partir de los órganos hematopoyéticos presentan marcadores diferentes a los de las células hematopoyéticas y otros tipos celulares del estroma (Ploemacher y cols., 1984). Broudy y cols., (1986) encuentran que las células fibroblastoides del estroma de la médula ósea humana son negativas para los marcadores T28 y S33 de linfocitos-T, y M1 y M120 de monocitos. Las células fibroblásticas no expresan ciertos marcadores presentes en los fagocitos mononucleares como el receptor Fc y el antígeno Mac-1 (Bentley y cols., 1981). Los fibroblastos derivados de la médula ósea no muestran el antígeno Thy-1 presente en los fibroblastos que se originan en el bazo, timo y piel y reaccionan positivamente con anticuerpos anti-T200 al igual que los fibroblastos de timo y bazo (Ploemacher y cols., 1984).

En teleosteos, diversos estudios *in situ* han descrito la presencia de células reticulares en el tejido linfohematopoyético renal de algunas especies como *G. gobio* y *R. rutilus* (Zapata,

1979), *S. trutta fario* (Álvarez, 1986) y *O. mykiss* (Castillo, 1991). En el pronefros de trucha arco iris (Castillo y cols., 1987) se ha descrito, *in situ*, la presencia de células reticulares fosfatasa alcalina positivas que son semejantes en su morfología y localización a las células reticulares descritas como constituyentes del estroma de la médula ósea de mamíferos (Westen y Bainton, 1979) y de aves (Yoshida y Yumoto, 1987). Diversos estudios *in vitro* han mostrado la presencia de células reticulares en el pronefros de *O. mykiss* (Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993) semejantes ultraestructural e histoquímicamente a las células reticulares descritas *in situ* en esta misma especie (Castillo, 1991). Este tipo celular pierde *in vitro* la expresión de la actividad fosfatasa alcalina a lo largo del tiempo de cultivo (Diago y cols., 1993), al igual que ocurre en los cultivos a largo plazo de médula ósea (Dexter y cols., 1990).

### **Células endoteliales**

Las células limitantes de los senos sanguíneos de la médula ósea de mamíferos y aves forman la barrera entre el compartimiento hematopoyético y la circulación sanguínea (Tavassoli, 1979) y parecen ejercer un significativo papel en la regulación de la hematopoyesis (Allen y Dexter, 1984). Estas células presentan núcleos alargados y aplanados y prolongaciones citoplasmáticas que normalmente se solapan o interdigitan y presentan uniones que han sido caracterizadas como *maculae occludentes* (Campbell 1972, Tavassoli y Crosby, 1973). Además, se ha sugerido que este tipo celular controla la migración de las células sanguíneas (Campbell, 1972), y participa junto con los macrófagos en la eliminación de materiales de la circulación, puesto que presentan cierta capacidad endocítica (de Bruyn, 1981).

En cultivo, las células endoteliales constituyen el 10-20% del total de células adherentes en los LTBMHC humanos (Simmons y cols., 1987), donde han sido caracterizadas por la presencia de cuerpos de Weibel-Palade y la detección inmunológica del factor de von Willebrand (Keating y Singer, 1983). Sin embargo, debido a la falta de marcadores morfológicos y anticuerpos específicos, la presencia de células endoteliales en LTBMHC de ratón ha sido muy discutida y existen algunos trabajos en los que se niega su existencia (Bentley, 1982). Aunque en los LTBMHC tradicionales no se forman estructuras vasculares, se ha descrito la presencia de células endoteliales, capaces de formar estructuras semejantes a

sinusoides, en cultivos tridimensionales de células de médula ósea de ratón en geles de colágeno (Mori y cols., 1989, 1992).

En los LTBMCM murinos se han descrito grandes células muy extendidas, de más de 100µm de diámetro, que se encuentran siempre asociadas con áreas de granulopoyesis (Tavassoli y Takahashi, 1982; Furcht y cols., 1984; Dexter y cols., 1990) y en algunos casos de linfopoyesis (Dexter y cols., 1990). La terminología empleada para designar a estas células ha sido variada y su origen ha sido también muy discutido. Algunos autores han denominado a este tipo celular células epitelioides (Tavassoli y Takahashi, 1982), y las han descrito como células que presentan el fenotipo fosfatasa alcalina y esterasa positivas y fosfatasa ácida y -glucuronidasa negativas (Tavassoli, 1982). No obstante, se ha utilizado con más frecuencia el término de células "manta" para referirse a ellas (Dexter y cols., 1984; Allen y cols., 1990). Las células "manta" se han descrito como células dispersas en la capa adherente y que recubren las áreas de granulopoyesis. Además, sintetizan fibronectina y laminina, promoviendo la migración celular (Furcht y cols., 1984). En cuanto a su origen, distintos autores han sugerido que provienen de precursores fibroblastoides que son fosfatasa alcalina positivos durante los primeros días de cultivo y que van perdiendo la actividad fosfatasa alcalina a medida que incrementan su tamaño (Dexter y col., 1990). Sin embargo, Hasthorpe y cols., (1992), mediante estudios inmunocitoquímicos en los que utilizan el anticuerpo monoclonal H513E3 específico para células endoteliales de ratón, han demostrado que tanto las células "manta" como las epitelioides de los cultivos a largo plazo de médula ósea de ratón son células endoteliales.

Los estudios realizados *in vitro*, en mamíferos, han puesto de manifiesto que las células endoteliales participan en el control de la proliferación y diferenciación de los granulocitos-macrófagos de médula ósea, puesto que son capaces de secretar GM-CSF y G-CSF (Quesenberry y Grimbone, 1980; Zsebo y cols., 1988), y la producción de estos factores de crecimiento puede verse afectada por la IL-1 que estimula la liberación de GM-CSF (Bagby y cols., 1986; Broudy y cols., 1987; Sieff y cols., 1987) y factores de crecimiento multilinea (Segal y cols., 1987). Además, se ha demostrado *in vitro* que las células endoteliales tienen capacidad de presentar antígenos (Hirschberg y cols., 1980), y de secretar IL-1 (Wagner y

cols., 1985; Miosecc y cols., 1986), así como IL-8 cuando son inducidas con histamina (Jeannin y cols., 1994).

En teleósteos, los sinusoides sanguíneos del tejido linfohematopoyético renal están limitados por una capa discontinua de células limitantes sinusoidales estructuralmente semejantes a las de la médula ósea de otros vertebrados (Zapata, 1979; Álvarez, 1986; Castillo, 1991). Estas células carecen de membrana basal y muestran actividad fagocítica en *R. rutilus* y *G. gobio* (Zapata, 1979) y *S. trutta fario* (Álvarez, 1986). Diversos autores han puesto de manifiesto la capacidad endocítica de las células limitantes de los sinusoides del pronefros de *S. salar* (Press y cols., 1994), *S. trutta fario* (Álvarez, 1986), *S. alpinus* (Dannevig y Berg, 1986) y *O. mykiss* (Dannevig y cols., 1994). En trucha arco iris, las células endoteliales de los sinusoides presentan un fenotipo fosfatasa ácida y esterasa inespecífica débilmente positivo y fosfatasa alcalina negativo (Castillo y cols., 1987). El patrón histoenzimático y ultraestructural coincide con el descrito para las células endoteliales de los sinusoides sanguíneos de la médula ósea de mamíferos (Westen y Bainton, 1979) y aves (Yoshida y Yumoto, 1987), lugar donde se les ha atribuido un papel en el intercambio de proteínas y lípidos entre la circulación y el estroma (de Bruyn y cols., 1975; Soda y Tavassoli, 1984).

*In vitro*, los cultivos del pronefros de trucha arco iris presentan células epitelioides con características ultraestructurales y citoenzimáticas similares a las descritas *in situ* para las células limitantes de los sinusoides del pronefros de esta misma especie, por lo que han sido consideradas como el equivalente de este tipo celular (Diago y cols., 1993).

### **Macrófagos**

Los macrófagos son otro de los componentes tanto de la médula ósea de mamíferos (Saklai, 1989) como de aves (Fujita y cols., 1982). En los mamíferos la eritropoyesis es extravascular y tiene lugar en los islotes eritroblásticos (Bessis, 1958; Westen y Bainton, 1979) en los que un macrófago central interacciona con las células eritroides que se encuentran aproximadamente en el mismo estadio de diferenciación (Mohandas y Prenant, 1978; Campbell, 1980), aportando ferritina a los eritroblastos en desarrollo (Bessis y Breton-Gorius, 1962).

En los cultivos a largo plazo de médula ósea, los macrófagos comprenden el 25-35% del total de células adherentes (Allen y Dexter, 1984). Este tipo celular presenta positividad para la fosfatasa ácida, la  $\alpha$ -glucuronidasa y esterasas (Tavassoli, 1982). Los macrófagos parecen estar implicados en la granulopoyesis en asociación con células "manta", justo antes de que las áreas en las que se encuentran lleguen a ser granulopoyéticamente activas (Dexter y cols., 1990). En este sentido, se ha descrito que los macrófagos a los 5-7 días de cultivo, migran y se disponen debajo de las células "manta", sufren una o dos divisiones y permanecen en esta localización (Allen y cols., 1990). Posteriormente, a las 2-3 semanas de cultivo, las células precursoras mieloides también migran, situándose debajo de las células "manta", donde en asociación con los macrófagos sufren varias divisiones creando las "áreas de proliferación en empedrado" mieloides. Todas las divisiones de los granulocitos ocurren en este microambiente y posteriormente estas células maduras unidas a macrófagos aislados forman islotes granulocíticos. A partir de estas "áreas de proliferación en empedrado" las células sanguíneas son liberadas al medio de cultivo. Además, los macrófagos son capaces de producir diversos factores estimulantes de colonias que promueven la formación de colonias de granulocitos y/o macrófagos (Witte y cols., 1987)

Los macrófagos parecen estar también implicados en la maduración de la línea eritroide *in vitro* (Allen y Dexter, 1984). Diversos estudios han demostrado que son capaces de producir eritropoyetina (Rich, 1986), actividad promotora de "burst eritroides" (BFU-E), así como IL-1 y TNF- $\alpha$ . A su vez, estos dos últimos factores pueden inducir la liberación de GM-CSF, G-CSF e IL-6 por parte de las células endoteliales (Broudy y cols., 1987) y de los fibroblastos de la médula ósea (Zucali y cols., 1986; Yang y cols., 1988).

En teleosteos, los órganos hematopoyéticos y linfoides contienen dos poblaciones de células macrofágicas: los macrófagos y los melanomacrófagos (Agius, 1981; Braun-Nesje y cols., 1982, Zapata, 1983). Sin embargo, la posible funcionalidad de los macrófagos y de los melanomacrófagos como componentes del microambiente hematopoyético no ha sido aclarado y los islotes eritroblásticos no están presentes en el tejido linfohematopoyético renal de peces (Zapata, 1979; 1983).

En peces se han desarrollado varias técnicas para aislar y cultivar macrófagos (Braun-Nesje y cols., 1982; Secombes, 1990) con el fin de estudiar numerosos aspectos de la respuesta inmunitaria. Estos estudios han permitido confirmar que los monocitos actúan como células accesorias en la respuesta inmunitaria (Clem y cols., 1985; Vallejo y cols., 1992), secretando factores semejantes a la IL-1, tanto en *I. punctatus* (Sizemore y cols., 1984; Miller y cols., 1985, 1986), como en carpa (Verbug-van Kemenade y cols., 1995). En trucha arco iris los macrófagos, estimulados con el ionóforo cálcico A23187 o con zymosan opsonizado, son capaces de liberar varios tipos de eicosanoides (lipoxinas y leucotrienos) (Pettitt y cols., 1989; 1991).

Con respecto a los melanomacrófagos, se ha descrito que están implicados en la inactivación de radicales libres potencialmente peligrosos (Edelstein, 1971; Gan y cols., 1977), en fenómenos de captación antigénica y en el metabolismo del hierro (Agius, 1985; Herráez, 1988; Zapata y Cooper, 1990). Yu y cols. (1971) encuentran que los productos de la degradación de los eritrocitos en los centros melanomacrofágicos de peces pueden ser reutilizados durante la eritropoyesis. Meseguer y cols. (1994) demuestran que los melanomacrófagos aislados de riñón cefálico y bazo de *D. labrax* y *S. aurata* son capaces de fagocitar partículas de látex y bacterias. Estos autores también demuestran que los leucocitos, aislados del pronefros de estas dos especies y ultraestructuralmente semejantes a monocitos-macrófagos, son capaces de fagocitar células senescentes o muertas, principalmente células eritroides, y gránulos de melanina.

### **Adipocitos**

En los mamíferos, la presencia de adipocitos uniloculares está fundamentalmente restringida a la médula ósea grasa, y raramente se encuentran adipocitos en la médula ósea hematopoyéticamente activa (Dexter y cols., 1990). Sin embargo, en la hematopoyesis *in vitro* estas células presentan la característica de situarse en áreas granulopoyéticas (Sorrell y Weiss, 1980; Weiss, 1980). La presencia de adipocitos en los cultivos a largo plazo puede depender de las condiciones de cultivo (Greenberger, 1991). En este sentido, se ha observado que existe una conversión de células fibroblásticas en adipocitos cuando se cultiva con hidrocortisona pero no con insulina (Greenberger, 1978). En los cultivos a largo plazo de médula ósea de

ratón los adipocitos parecen diferenciarse a partir de precursores fibroblastoides durante los primeros días de cultivo (Dexter y cols., 1990).

Algunos autores consideran que las células reticulares adventicias de la médula ósea de mamíferos son realmente preadipocitos, que pueden cargarse de lípidos y convertirse en adipocitos metabólicamente activos (Weiss y Chen, 1975). En cuanto a posibles funciones hematopoyéticas de los adipocitos, se ha sugerido que participan en la granulopoyesis (Allen y Dexter, 1976), producen factores de crecimiento hematopoyéticos (Lanotte y cols., 1982) y tienen capacidad para aromatizar andrógenos a estrógenos (Frisch y cols., 1980; Weiss, 1981).

*In vivo* no se ha descrito la presencia de adipocitos en el tejido hematopoyético renal de teleósteos. Sin embargo, en los cultivos a largo plazo de pronefros de trucha arco iris se ha observado la acumulación de gotas lipídicas en las células reticulares fibroblásticas (Diago y cols., 1993).

### **Matriz extracelular**

Las células del estroma de la médula ósea de mamíferos producen y secretan macromoléculas que forman la matriz extracelular, de tal modo, que ésta no sólo actúa como soporte físico para los elementos hematopoyéticos, sino que juega un papel dinámico en la regulación de la hematopoyesis (Zuckerman y cols., 1989).

Muchas líneas celulares de estroma de médula ósea han sido identificadas como fibroblastos, o células endoteliales o reticulares en función de los componentes de la matriz extracelular que sintetizan. Los componentes mayoritarios que forman la matriz extracelular son colágenos de tipo I, III y IV, fibronectina, laminina y proteoglucanos (Bentley, 1982; Wight y cols., 1986; Keating y Gordon, 1988), aunque se ha descrito la presencia de otras moléculas como la trombospondina (Frazier, 1987; Long y Dixit, 1990) y la hemonectina (Campbell y cols., 1987).

El colágeno proporciona soporte estructural para otros componentes. Se han descrito varios tipos de colágenos, pero en los cultivos a largo plazo, el colágeno de tipo I predomina sobre el colágeno de tipo III (Gordon, 1988). Los colágenos de tipo I y III han sido identificados como los principales componentes de la matriz extracelular derivada de

fibroblastos de la médula ósea (Bentley, 1982; Coulombel y cols., 1988), mientras que el colágeno de tipo IV, que también ha sido detectado en los cultivos a largo plazo, es sintetizado por las células endoteliales (Zuckerman, 1984). Algunos estudios han demostrado que las células progenitoras eritroides y mieloides tienen la capacidad de unirse a colágeno de tipo I (Koenigsman y cols., 1992), sugiriendo que esta proteína puede jugar un papel en la localización de estos progenitores comprometidos dentro de la médula ósea.

La fibronectina es un componente de la matriz extracelular de los cultivos de médula ósea de humanos y ratones (Castro-Malaspina y cols., 1980; Bentley y Tralka, 1983; Liesveld y cols., 1989; Lerat y cols., 1993) y participa en la adhesión, migración y diferenciación de las células hematopoyéticas (Allen y Dexter, 1984). Esta molécula posee dos sitios de unión, uno de ellos para colágeno con lo cual se refuerza la red de colágeno extracelular y otro para células hematopoyéticas inmaduras (Lerat y cols., 1993). Este segundo sitio de unión está cercano al heparán sulfato de la membrana plasmática de las células del estroma y puede unir factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos e IL-3 (Roberts y cols., 1988). Otra asociación interesante incluye la unión del factor de crecimiento de células T (TGF)- a la fibronectina (Fava y McClure, 1987). De esta forma, la fibronectina parece mediar las interacciones entre las células del estroma y los granulocitos y macrófagos en diferenciación (Bentley y Tralka, 1983), aunque algunos autores sugieren que la unión de estos progenitores a la fibronectina es débil (Tsai y cols., 1987).

La fibronectina también parece estar implicada en las interacciones que tienen lugar entre las células del estroma y los progenitores eritroides. Así, Coulombel y cols., (1988) demuestran que las interacciones *in vitro* entre los progenitores eritroides y matrices extracelulares derivadas de fibroblastos de médula ósea están mediadas por esta molécula. Otros investigadores han demostrado que en las etapas finales de la diferenciación eritroide se pierde esta unión a la fibronectina, permitiendo así la liberación a la circulación de las células eritroides maduras (Vuillet-Gaugler y cols., 1990).

La laminina también ha sido encontrada en los cultivos a largo plazo (Zuckerman y Wicha, 1983) y su producción indica la presencia de células endoteliales (Zuckerman y Wicha, 1983; Gordon, 1988). Esta proteína puede interactuar con otros componentes de la

matriz extracelular tales como el heparán sulfato y el colágeno tipo IV (Edgar y cols., 1984; Timpl y Oziadek, 1986).

En cuanto a los proteoglucanos, el hecho de que su adición a los cultivos a largo plazo o la adición de agentes que pueden incrementar su síntesis, puedan inhibir o estimular la producción celular hematopoyética sugiere que pueden jugar un importante papel en la regulación de la producción de células sanguíneas (Ploemacher y cols., 1978; Spooncer y cols., 1983). Los proteoglucanos están formados por un núcleo de proteínas al que se unen covalentemente glucosaminoglucanos (GAGs). Utilizando cultivos a largo plazo de "tipo Dexter", Wight y cols., (1986) llegan a la conclusión de que el condroitín sulfato predomina en la capa adherente y en los sobrenadantes de cultivo. Gallagher y cols., (1983) describen que el heparán sulfato está presente en las capas adherentes, mientras que el ácido hialurónico y el condroitín sulfato están presentes en el sobrenadante. Otros autores han demostrado que determinadas líneas celulares de estroma también producen condroitín sulfato y heparán sulfato (Kirby y Bentley, 1987; Bentley y cols., 1988).

Los proteoglucanos regulan la adhesión, la migración y la proliferación celular (Wight y cols., 1992). Varios estudios demuestran la selectividad en cuanto a la unión de líneas particulares de células sanguíneas a los componentes de la matriz extracelular (Campbell y cols., 1987; Tsai y cols., 1987). Estos estudios sugieren, que esta unión puede ocurrir directamente o vía moléculas intermedias. De este modo, otra de las posibles funciones de los GAGs en la hematopoyesis podría ser la de retener factores de crecimiento, sintetizados localmente por las células del estroma, y presentárselos a las células hematopoyéticas. Así, Gordon y cols., (1987) demuestran, en cultivos de médula ósea humanos, que el GM-CSF exógeno se une predominantemente al ácido hialurónico y el GM-CSF biológicamente activo puede ser extraído a partir de la matriz extracelular de capas de estroma cultivadas. Por otra parte, Roberts y cols., (1988) indican que el heparán sulfato es el componente principal de la matriz extracelular que une factores de crecimiento (GM-CSF y IL-3) y que estos factores pueden ser presentados a las células hematopoyéticas asociadas a la membrana celular de las células del estroma, mientras que la matriz extracelular que no está asociada a la membrana, no participa en el proceso.

En peces, en los cultivos a largo plazo de pronefros de trucha arco iris (Diago y cols., 1993) también se ha descrito la presencia de matriz extracelular, con fibras que ultraestructuralmente se asemejan a las fibras de reticulina, como las encontradas en la médula ósea de mamíferos *in vitro* (Allen y Dexter, 1984; Bainton y cols., 1986). Sin embargo, no existen estudios similares a los realizados en mamíferos en los que se describa la composición y posible funcionalidad de los componentes de la matriz extracelular.

### **Cultivos linfopoyéticos (Tipo “Whitlock-Witte”)**

En los cultivos a largo plazo de "tipo Whitlock-Witte" de mamíferos, se ha descrito la existencia de un microambiente muy similar al encontrado en los cultivos mielopoyéticos de "tipo Dexter". Cuando los LT BMC son modificados mediante el uso de una concentración de suero fetal bovino baja, la adición de mercaptoetanol y la incubación a 37°C (en contraposición con los 33°C, utilizados en los cultivos de “tipo Dexter”) se forma una capa de células adherentes que no promueve la granulopoyesis, sino que soporta el crecimiento selectivo de linfocitos B (Whitlock y Witte, 1987). Al igual que en los cultivos mielopoyéticos, la linfopoyesis es absolutamente dependiente del crecimiento de una capa de estroma adherente (Kincade, 1987) y las células linfoides se encuentran en asociación con células poligonales grandes de apariencia muy similar a las áreas de proliferación en empedrado de la producción mieloide, aunque no se ha descrito la existencia de la población de macrófagos.

Además, en mamíferos, la maduración de las células pre-B es dependiente de las interacciones de estos precursores con las células del estroma que forman el microambiente hematopoyético (Gisler y cols., 1987) y en la diferenciación de estas células parecen estar implicadas las células del estroma AKPH positivas (Witte y cols., 1986; 1987). En este sentido, algunos estudios *in vitro* han demostrado que una línea celular del estroma de médula ósea humana, fosfatasa alcalina positiva (Song y cols., 1985) produce un factor de crecimiento hematopoyético soluble (HLFG-1) que es capaz de estimular la proliferación de colonias granulocíticas (Song y cols., 1985) así como la expresión de la cadena  $\mu$  citoplásmica en células pre-B de la médula ósea (Dorshkind, 1987). Esta relación también podría estar presente en peces, ya que en el tejido linfohematopoyético renal de *O. mykiss* se ha indicado

una relación en el tiempo entre la aparición de células IgM positivas y el desarrollo de la actividad fosfatasa alcalina en las células reticulares durante la ontogenia (Razquin y cols., 1990). Sin embargo, en peces, no existe ningún estudio en el que se establezcan las condiciones necesarias para el desarrollo de cultivos a largo plazo linfopoyéticos.

### **Interacción entre células hematopoyéticas y su microambiente**

El análisis morfológico tanto de secciones histológicas como de cultivos a largo plazo de médula ósea, ha demostrado que las células hematopoyéticas y las células del estroma están íntimamente asociadas. Además, se ha sugerido que estas interacciones célula-célula están induciendo y regulando la hematopoyesis (Weiss y Chen, 1975). Bentley (1981) observó que la pérdida de unidades formadoras de colonias de bazo (CFU-S) a partir de cultivos en cámaras de difusión era significativamente mayor que a partir de cultivos paralelos en los que las células habían sido directamente sembradas sobre la capa adherente. Kodama y cols., (1982; 1986) también observaron un incremento en la capacidad para soportar CFU-S cuando se permitió el contacto entre las células hematopoyéticas y los preadipocitos MC3TJ-G2/PA6. Igualmente, la producción de los primeros estadios de células B son dependientes de la asociación con células del estroma (Kierney y Dorshkind, 1987).

Se sabe poco acerca de la naturaleza de las interacciones entre células hematopoyéticas-estroma. Se ha discutido la existencia de uniones gap y algún estudio ha sugerido la existencia de proyecciones citoplasmáticas en las cuales se situarían moléculas de adhesión celular (Campbell, 1982; Yamazaki y cols., 1989). En este sentido, se han realizado estudios sobre la expresión de antígenos de superficie en las células de estroma de cultivos primarios y líneas celulares, encontrándose que no expresan moléculas características de células hematopoyéticas aunque varias líneas y poblaciones presentes en cultivos primarios expresan MAC-2, MAC-3, Thy-1, Qa2, o lectinas (Ebell y cols., 1985; Kataoka y Tavassoli, 1985; Pietrangeli y cols., 1988; Kincade y cols., 1989).

Pese a todo, hay evidencias de que se produce adhesión entre células sanguíneas y células del estroma. Así, es posible romper la unión de los linfocitos a las células del estroma en cultivo mediante la adición de EDTA ó EGTA (Witte y cols., 1987). También están implicadas las moléculas ancladas al fosfatidil-inositol ya que la adición de fosfolipasa

purificada específica del fosfatidil-inositol a los cultivos linfoides libera más del 97% de los linfocitos asociados a las células del estroma. Además las proteínas de membrana que se unen vía fosfatidil-inositol incluyen miembros de la familia N-CAM y esta última molécula está presente en las células del estroma (Thomas y cols., 1988).

En peces no se ha realizado ningún estudio abordando estos aspectos y se desconoce la naturaleza de las interacciones entre las células del estroma y las células hematopoyéticas.

## OBJETIVOS

Tal como ha quedado de manifiesto en la introducción, los cultivos celulares han tenido y tienen gran importancia en la caracterización funcional de la hematopoyesis y de los microambientes hematopoyéticos de aves y mamíferos. Sin embargo, estos estudios son muy escasos en peces. La obtención de datos en este campo podría tener gran importancia no sólo para el conocimiento científico básico, sino también para el análisis de la patogenia de agentes infecciosos que afectan al sistema hematopoyético de peces, tales como el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) o el patógeno causante de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD).

En un estudio previo hemos descrito las condiciones necesarias para el establecimiento de cultivos a largo plazo del pronefros de trucha arco iris. En ese trabajo se caracterizaron citoquímica y ultraestructuralmente las diferentes poblaciones celulares y se describieron las capacidades hematopoyéticas de estos cultivos (Diago, 1990; Diago y cols., 1993). Estos estaban constituidos por una población heterogénea de células del estroma que formaban un microambiente capaz de mantener *in vitro* mielopoyesis. Los componentes mayoritarios del estroma eran las células reticulares fibroblásticas y las células epitelioides, mientras que el número de macrófagos, principalmente melanomacrófagos, era reducido. Sin embargo, la obtención de hematopoyesis *in vitro* con esta metodología requiere largos tiempos de cultivo, generalmente superiores a tres meses, y la producción hematopoyética es limitada.

Como una continuación de esos estudios y con el fin de obtener nuevos métodos, rápidos y estandarizables, que permitieran analizar más fácilmente la hematopoyesis en peces, en este trabajo nos propusimos:

1. Desarrollar nuevos métodos para inducir hematopoyesis *in vitro*.
2. Obtener líneas celulares de pronefros de trucha arco iris, que fueran capaces de soportar hematopoyesis.
3. Caracterizar fenotípicamente esas líneas y analizar la hematopoyesis inducida.
4. Analizar las posibles aplicaciones de los cultivos al estudio de la patogenia de agentes infecciosos que afectan al sistema hematopoyético de peces.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1.- ANIMALES.

### 1.1.- Condiciones de mantenimiento.

En el presente trabajo se han utilizado ejemplares adultos y sanos, sin distinción de sexo, de *Oncorhynchus mykiss* adquiridos en la piscifactoría comercial “Los Leoneses”, Castrillo de Porma (León).

Los animales fueron mantenidos en tanques de 300 litros de agua corriente, desclorada con tiosulfato de sodio, a una temperatura de  $14\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperiodo constante de 12 h de luz/12 h de oscuridad y fueron alimentados con el preparado comercial Tetrapond (TetraWerke, Alemania Federal), cuyo contenido era del 25% de proteínas, 51,5% de hidratos de carbono, 1,5% de grasas, 5% de fibras, 7% de cenizas y 10% de humedad.

### 1.2.- Sacrificio de los animales y obtención de sueros y plasma.

Los animales fueron sacrificados por sobrianestesia con tricaina metano sulfonato (MS-222, Sandoz) diluido 1:5.000 (p/v) en agua. Los peces fueron exanguinados mediante punción en el seno caudal, empleándose tubos Vacutainer con o sin heparina para la obtención de plasma o suero respectivamente. En este último caso, la sangre se mantenía a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 h para facilitar la formación del coágulo. Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 300g y  $4^{\circ}\text{C}$ , y los sobrenadantes se recogieron en tubos Eppendorf, y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **1.3.- Inducción de anemia.**

Se obtuvieron truchas anémicas mediante tres extracciones consecutivas de 1 ml de sangre cada una en un periodo de 8 días. Los ejemplares fueron anestesiados con tricaina metano sulfonato (MS-222, Sandoz) diluido 1:20.000 (p/v) en agua y sangrados mediante punción en el seno caudal. A los 5 días tras la última extracción, los animales fueron sacrificados y se obtuvo el suero según se detalla en el apartado correspondiente.

### **1.4.- Inducción de estrés.**

Se siguió la metodología indicada por Patiño y cols. (1987) para inducir una elevación de los niveles de cortisol en sangre de salmónidos mediante estrés agudo. Éste se provocó manteniendo a las truchas suspendidas en una red fuera del agua durante 30 segundos. Al cabo de 2 horas los animales fueron sacrificados y la obtención de suero se realizó según se detalla en el apartado 1.2.

## **2.- MEDIOS DE CULTIVO.**

A continuación se describen los medios utilizados en los diversos cultivos.

### **2.1.- Cultivos de estroma y cocultivos hematopoyéticos.**

a) MEDIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS DE PRONEFROS (a partir de ahora, MCP): RPMI-1640 con tampón Hepes 25mM y L-glutamina (BioWhittacker), suplementado con 2mM de L-glutamina (Biochrom), 2,5mM de piruvato sódico (Merck), 50µg ml<sup>-1</sup> de gentamicina (Biochrom), 5x10<sup>-5</sup>M de 2-mercaptoetanol (Merck), nucleósidos (Sigma) - 8,8x10<sup>-2</sup> mM de guanosina, 22,5x10<sup>-2</sup> mM de citosina, 9,4x10<sup>-2</sup> mM de adenosina y 10,2x10<sup>-2</sup> mM de uridina -, 10% de suero fetal bovino (FCS) (Boehringer Mannheim) y 5% de suero de trucha. Tras ajustar el pH a 7,4-7,6 y la osmolaridad a 295 mOs por Kg de agua, el medio fue esterilizado por filtración y conservado a 4°C hasta su utilización.

b) MEDIO DE CULTIVO B: MCP en el que la concentración de suero de trucha se rebajó al 2,5%.

c) MEDIO DE CULTIVO C: MCP en el que se omitió el suero alogénico y fue suplementado con un 10% de suero de caballo (Gibco) e hidrocortisona 21-hemisuccinato (Sigma)  $10^{-5}$ M.

d) MEDIO DE CULTIVO D: MCP suplementado con un 2,5% de suero de trucha y 2,5% de suero de truchas estresadas.

La concentración de cortisol en el suero se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA), utilizando un kit ( $I^{125}$ -Cortisol COATRIA, Biomerieux). Para obtener la curva patrón, se prepararon 6 muestras estándar, en el rango de concentraciones 0 a 500 ng ml<sup>-1</sup>, utilizando una mezcla de sueros de trucha absorbido con carbón activo, al cual se añadieron cantidades apropiadas de cortisol (Sigma). Los ensayos se realizaron por duplicado, y la medición de la radiactividad, la construcción de la curva patrón, así como la determinación de las concentraciones en las muestras, se realizaron en un equipo de RIA provisto de contador gamma y sistema informático de análisis (Serono Diagnostic Gamma Chem 9612, Labsystem).

Según los resultados del RIA, la mezcla de sueros obtenida de truchas estresadas contenía una concentración de cortisol de 180 ng ml<sup>-1</sup> ( la concentración de cortisol en el suero de truchas no estresadas varió entre 1 y 10 ng ml<sup>-1</sup>). La concentración final de cortisol en el medio de cultivo D era 5 ng ml<sup>-1</sup> (frente a una concentración media de 0,275 ng ml<sup>-1</sup> en el medio de cultivo MCP).

e) MEDIO DE CULTIVO E: MCP suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato (Sigma)  $10^{-5}$ M.

f) MEDIO DE CULTIVO F: MCP suplementado con complejos 17-hidrocortisona- - ciclodextrina, solubles en agua (Sigma)  $10^{-10}$ M.

g) MEDIO DE CULTIVO G: MCP suplementado con 2,5% de suero de trucha y 10% de suero de truchas anémicas.

h) MEDIO DE CULTIVO H: MCP suplementado con 2,5% de suero de trucha y 10% de medio condicionado de macrófagos de trucha (cuya obtención se describe a continuación).

## **2.2.- Obtención de medios condicionados.**

### **2.2.1.- Obtención de medio condicionado de macrófagos de trucha.**

La obtención de medio condicionado se realizó a partir de cultivos de macrófagos, aislados de pronefros de truchas mediante centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia), siguiendo la metodología descrita por Rose y Levine (1992). El medio de cultivo empleado fue RPMI-1640 (BioWhittaker), suplementado con un 10% de suero fetal bovino descomplementado (Boehringer Mannheim) y  $50\mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina (Biochrom). La naturaleza fagocítica de estas células se comprobó mediante ensayos de fagocitosis de levaduras según la técnica descrita en el apartado 4.3. Los macrófagos fueron estimulados durante 48 horas con LPS ( $100\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Transcurrido este tiempo se retiró el medio con el mitógeno, se añadió medio fresco y los cultivos se incubaron durante 48 horas a  $18\pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire. Los sobrenadantes de estos cultivos se recogieron y se mantuvieron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **2.2.2.- Obtención de medio condicionado de leucocitos de sangre periférica de trucha.**

Los leucocitos se separaron a partir de sangre periférica por centrifugación sobre Lymphoprep (Nyegaard), a 800g, 30 min,  $22^\circ\text{C}$ . Se recogió la banda de células localizada en la interfase Lymphoprep-sobrenadante y éstas se lavaron tres veces en RPMI-1640 con un 10% de FCS a 300g, 10 min.,  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente los leucocitos se resuspendieron en medio de cultivo MCP que no contenía suero alogénico, se ajustaron a una concentración de  $5\times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  y se sembraron en frascos de cultivo de  $25\text{ cm}^2$  (Costar). A continuación se añadieron los mitógenos Concanavalina A (concentración final  $50\mu\text{g ml}^{-1}$ ) o LPS (concentración final  $100\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y las células se incubaron durante cuatro días a  $18\pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire. Transcurrido este tiempo se retiraron los mitógenos lavando dos veces las células con RPMI-1640, se añadió medio de cultivo fresco y se incubaron los cultivos durante dos días más. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron, se filtraron a través de filtros de  $0,22\mu\text{m}$  y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **2.2.3.- Obtención de medio condicionado de la línea celular del estroma de pronefros.**

Con el fin de tratar de inducir la producción de citoquinas en la línea celular del estroma de pronefros se incubaron cultivos de los pases 108, 112 y 117 con una modificación del medio de cultivo MCP que contenía una baja concentración de suero (0,1% de FCS y carecía de suero alogénico), y que había sido suplementado con dietil-ditiocarbamato (DDTC) (Sigma) a la concentración final de 30  $\mu\text{M}$ , según el protocolo de East y cols., (1992). Los cultivos fueron incubados a  $18\pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire durante 2 días, lavados en RPMI-1640, e incubados con el mismo medio de cultivo en el que se había omitido el DDTC, durante 2 días más. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron, se filtraron a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Este medio condicionado fue utilizado como suplemento a una concentración final del 10%.

## **3.- CONDICIONES DE CULTIVO.**

### **3.1.- Cultivos primarios y subcultivos del estroma del pronefros.**

Los cultivos celulares primarios fueron obtenidos a partir de explantes de pronefros de trucha arco iris, según la técnica descrita por Diago y cols., (1993). Estas células fueron subcultivadas 5 veces, en un periodo de tiempo de 8 meses (Diago y cols., 1993). Con el fin de obtener líneas celulares, estos cultivos comenzaron a ser subcultivados semanalmente. Para ello, las células se tripsinizaron con una solución de tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,05%/0,02%) (Boehringer Mannheim) en PBS (0,16M, libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ), a la que fueron expuestas durante 3 min a  $18\pm 1^\circ\text{C}$ . El número de células viables se determinó por el método de exclusión con azul tripán y se sembraron  $3,5-5 \times 10^5$  células viables en frascos de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  (Costar).

Las células se cultivaron rutinariamente en medio MCP, pero para estudiar el efecto del medio de cultivo sobre su crecimiento, se utilizaron también las modificaciones b y c del medio MCP, descritas en el apartado 2.1. Los cultivos se incubaron a  $18\pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire, se observaron regularmente y se fotografiaron en un microscopio invertido (Nikon) equipado con contraste de fases.

A diferentes pases de cultivo, las células fueron congeladas en nitrógeno líquido en viales de 1,5 ml (Nunc). Cada vial contenía  $1-3 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  resuspendidas en suero fetal bovino con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). En su caso, para establecer nuevos cultivos, las células se descongelaron por inmersión de los viales en agua a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 min, fueron resuspendidas en el medio de cultivo MCP y cultivadas como se ha descrito.

### **3.1.1.- Clonado de células del estroma del pronefros.**

Con el fin de clonar la línea celular del estroma de pronefros se realizaron ensayos de dilución límite en placas de 96 pocillos, utilizando el medio de cultivo MCP y siguiendo la metodología de Freshney, (1987).

### **3.2.- Otras líneas celulares de peces.**

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de peces, todas ellas suministradas por la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) (Porton Down, Salisbury, Gran Bretaña):

- RTG-2: Línea celular fibroblástica de cultivo continuo obtenida a partir de gónada de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por Wolf y Quimby (1962).

- CHSE-214: Línea celular epitelial de cultivo continuo obtenida de embriones de salmón *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) (Fryer y cols., 1965).

- BF-2: Línea celular fibroblástica de pedúnculo caudal de *Lepomis macrochirus*.

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento rutinario de estas líneas celulares fue EMEM (BioWhittaker) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS) (Boehringer Mannheim) y 1% de aminoácidos no esenciales (Seromed), y la incubación se realizó a las siguientes temperaturas: RTG-2 a  $18^\circ\text{C}$ , CHSE-214 a  $21^\circ\text{C}$  y BF-2 a  $23^\circ\text{C}$ .

#### **4.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA LÍNEA CELULAR DE ESTROMA DE PRONEFROS.**

##### **4.1.- Análisis citoquímico.**

Para los estudios citoquímicos se utilizaron células de los pases 14, 34, 60, 82 y 145 de la línea celular del estroma. Las actividades enzimáticas analizadas fueron la fosfatasa ácida (ACPH) (Barka y Anderson, 1962), la fosfatasa alcalina (AKPH) (Burstone, 1958) y la alfa-naftil acetato esterasa inespecífica (ANAE) (Pearse, 1972).

La especificidad de las reacciones se verificó efectuando controles positivos y negativos sobre secciones de criostato de timo, bazo, pronefros e intestino de trucha, así como controles negativos sobre la línea celular del estroma de pronefros. Para los controles negativos se empleó el medio de incubación en el que se había omitido el correspondiente sustrato.

La demostración citoquímica de lípidos se realizó mediante la técnica de tinción con Rojo al aceite O (Bancroft y Cook, 1984). Para ello se emplearon cultivos de pronefros a largo plazo incubados durante 10 semanas y cultivos de la línea celular de los pases 45 y 143. Las células del pase 45 fueron mantenidas en el mismo frasco durante 3 meses y las células del pase 143 fueron mantenidas durante 6 días. Además, se utilizaron células del pase 38 que fueron mantenidas en el mismo frasco de cultivo durante 3 años y cinco meses a baja temperatura (4°C).

##### **4.2.- Análisis inmunocitoquímico.**

La caracterización inmunocitoquímica de la línea celular del estroma se realizó mediante el método de la inmunoperoxidasa indirecta sobre los pases de cultivo señalados en el apartado 4.1. Para ello, se utilizaron los anticuerpos contra marcadores específicos de distintos tipos celulares y fibras de tejido conectivo de mamíferos que se indican en la Tabla II.

La peroxidasa endógena fue inhibida durante 10 minutos, con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol. Los cultivos fueron incubados durante 1 hora con las diluciones apropiadas de los anticuerpos primarios y durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y diluidos en PBS 0,16M. La actividad peroxidasa se

puso de manifiesto utilizando 3-3' diaminobencidina tetrahidroclorhídrica (Sigma) a una concentración de  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  en tampón Tris-HCl  $0,05\text{M}$ , pH 7,6 con un 0,03% de peróxido de hidrógeno.

Como controles positivos se utilizaron secciones de criostato de los distintos órganos de mamíferos contra los cuales se produjeron los anticuerpos primarios, así como cortes de timo, riñón, tegumento, intestino y bazo de trucha arco iris. En todos los casos se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario.

#### **4.3.- Ensayos de fagocitosis.**

La capacidad fagocítica de la línea celular se ensayó en el pase 34 utilizando el método descrito por Martín-Fontecha (1992). Para ello, se incubaron los cultivos con levaduras (*Candida lipolytica*) inactivadas por calor ( $121^{\circ}\text{C}$ , 30 min, 1 atmósfera) y teñidas con una solución al 0,5% de rojo neutro en etanol al 96%. Los cultivos se mantuvieron a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Posteriormente, se contaron un total de 200 células por frasco de cultivo, repartidas en tres campos distintos y se calculó el porcentaje de células que habían fagocitado levaduras.

#### **4.4.- Detección de micoplasmas.**

La línea celular del estroma de pronefros de trucha fue sometida a distintos controles para la detección de micoplasmas. Estas pruebas se realizaron en cultivos confluentes al 50-70% de los pases 91, 93 y 136. Las células fueron cultivadas con el medio de cultivo MCP, sin gentamicina, en cámaras-portaobjetos (Nunc) durante 14 días a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente fueron lavadas con metanol-bisbenzimidazolo (Hoechst 33258, SeraLab) a una concentración final de  $1\mu\text{g ml}^{-1}$  e incubadas con esta misma solución durante 15 min a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Las células fueron examinadas en un microscopio Nikon equipado con epifluorescencia con un filtro de excitación de 340/380nm y un filtro barrera LP 430nm.

#### **4.5.- Microscopía electrónica de transmisión.**

El estudio ultraestructural se realizó sobre el pase 58 de la línea celular del estroma. Las células se fijaron, durante 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato  $0,2\text{M}$  pH 7,2-7,4 y se lavaron en el mismo tampón suplementado con un

10% de sacarosa. Seguidamente las células se recogieron utilizando rascadores desechables (Costar) y se dio consistencia a las muestras añadiendo agar al 2%. Las muestras se postfijaron durante 1 hora con tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón con sacarosa, se deshidrataron en una serie de acetonas de graduación creciente, se contrastaron con acetato de uranilo al 1% en acetona al 70% y se incluyeron en araldita (Durcupan ACM) (Fluka).

Los cortes semifinos y ultrafinos se obtuvieron en un ultramicrotomo Ultracut-E (Reichert-Jung). Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina al 1% en solución acuosa de bórax al 1%. A partir de estos cortes se seleccionaron las áreas más apropiadas para la obtención de cortes ultrafinos. Estos cortes se recogieron sobre rejillas de cobre recubiertas con formvar, se contrastaron con citrato de plomo (Reynolds, 1963) y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL EM-1010) a 60 Kv.

#### **4.6.- Técnicas citogenéticas.**

##### **4.6.1.- Cariotipo.**

La obtención de placas metafásicas de la línea celular se realizó en los pases 6, 16, 28, 42, 60, 62 y 74 según el método descrito por Worton y Duff (1979). Posteriormente, los cromosomas se hidrolizaron con HCl 1N (11 minutos a 56°C), se lavaron con agua corriente y con tampón Giemsa al 1% en agua destilada, y se tiñeron en solución de Giemsa durante 11 minutos. Tras otro lavado en tampón Giemsa al 1% en agua destilada, las preparaciones se dejaron secar y se montaron con Entellán (Merck).

- *Tampón Giemsa pH 6,8*: 49,2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (9,465 g l<sup>-1</sup>) más 50,8 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (9,066 g l<sup>-1</sup>).

- *Solución de Giemsa*: Colorante Giemsa/Tampón Giemsa pH 6,8 (1:25)

##### **4.6.2.- Tinción de los organizadores nucleolares (NORs).**

La detección de los organizadores nucleolares activos de células en metafase se realizó mediante tinción con plata, según el método descrito por Gold y Ellison (1982).

#### **4.7.- Análisis de isoenzimas.**

El perfil isoenzimático de la línea celular del estroma de pronefros fue comparado, mediante electroforesis horizontal en geles de almidón, con el de las líneas celulares RTG-2, CHSE-214 y BF-2.

##### **4.7.1.- Obtención de los homogeneizados celulares.**

Partiendo de cultivos confluentes de cada una de las cuatro líneas celulares se obtuvo una suspensión celular utilizando tripsina-EDTA tal y como se ha indicado en el apartado 3.1. Las células fueron homogeneizadas (v/v) en el tampón de extracción PTP, que contenía Pipes (Sigma) 0,05M, Tritón X-100 (Sigma) al 0,05% y piridoxal-5 fosfato (Sigma) 0,2M ajustado a pH 6,8 con NaOH 1M, y se almacenaron a -40°C hasta el momento de su utilización.

##### **4.7.2.- Electroforesis y revelado de los geles.**

La técnica de electroforesis horizontal en geles de almidón así como los ensayos enzimáticos específicos para la resolución de las variantes enzimáticas analizadas se realizaron según el método descrito por Taggart y cols. (1981).

Los enzimas analizados fueron los siguientes: adenilato quinasa (AK), alcohol deshidrogenasa (ADH), aspartato aminotransferasa (AAT), creatina quinasa (CK), enzima málico (MEP), fosfoglucomutasa (PGM), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH), fosfoglucosa isomerasa (PGI), fosfomanosa isomerasa (PMI), fructosa 1,6 difosfatasa (FDP), fumarasa (FUM), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G-3-PDH), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH), hexoquinasa (HK), isocitrato deshidrogenasa (IDH), lactato deshidrogenasa (LDH), malato deshidrogenasa (MDH) y sorbitol deshidrogenasa (SDH).

#### **5.- CRECIMIENTO CELULAR.**

##### **5.1.- Tasa de crecimiento.**

La determinación de la curva de crecimiento de la línea celular del estroma (pase 65) se realizó por triplicado según el método descrito por Freshney (1987) utilizando placas de cultivo de 24 y 96 pocillos de fondo plano (Costar). Para ello, en las placas de 24 pocillos se

sembraron  $10^5$ ,  $3 \times 10^4$  y  $10^4$  células por pocillo y en 1 ml de medio de cultivo, mientras que en placas de 96 pocillos se sembraron  $1,6 \times 10^4$ ,  $4,8 \times 10^3$  y  $1,6 \times 10^3$  células por pocillo en 200  $\mu$ l de medio de cultivo. En todos los casos las células fueron incubadas a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire.

Diariamente se recogieron, utilizando tripsina-EDTA, las células de tres pocillos (para las placas de 24 pocillos) y de 12 pocillos (para las placas de 96 pocillos) y se contó el número de células en un hemocitómetro. La viabilidad celular fue calculada por el método de exclusión con azul tripán.

### **5.2.- Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento.**

Para determinar el crecimiento a diferentes temperaturas se sembraron placas de 24 pocillos con  $3 \times 10^4$  células por pocillo en 1 ml de medio de cultivo y se incubaron a 4, 10, 12, 18 y  $22^\circ\text{C}$ . El experimento se realizó por triplicado y durante un periodo de 15 días. Las células se recogieron diariamente, se contaron y se determinó la viabilidad celular como se ha indicado en el apartado anterior.

### **5.3.- Incorporación de timidina tritiada.**

La síntesis de DNA en la línea celular fue cuantificada mediante incorporación de timidina tritiada. Los experimentos se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano y durante un periodo de 20 días. Las células se sembraron a concentraciones de  $1,6 \times 10^4$ ,  $4,8 \times 10^3$  y  $1,6 \times 10^3$  células por pocillo en 200  $\mu$ l de medio de cultivo y se incubaron a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ . Veinticuatro horas antes de recoger las células se renovó el medio de cultivo de una fila completa de cada placa y en ese momento se añadieron, sobre el medio recién renovado, 10  $\mu$ l por pocillo de una solución de timidina tritiada  $50 \mu\text{Ci ml}^{-1}$  (DuPont).

Las células se recogieron cada dos días sobre filtros de fibra de vidrio utilizando un colector de células semiautomático (Skatron, Noruega). Los filtros se secaron durante 30 minutos a  $80^\circ\text{C}$ , se depositaron en viales de centelleo y seguidamente se añadieron 5 ml de cóctel de centelleo (Biogreen-1, Scharlau) por vial. El número de desintegraciones por minuto (DPMs) fue calculado utilizando un contador de centelleo calibrado (Beckman LS 6000TA).

## **6.- SUSCEPTIBILIDAD A VIRUS.**

Se utilizaron los virus causantes de la septicemia hemorrágica (VHSV cepa 0.7.71) (de Kinkelin y Bearzotti, 1981), de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV cepa Cedar) y de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV cepa 140) (Jiménez y cols., 1988), todos ellos aislados de trucha arco iris.

Los virus VHSV, IHNV e IPNV fueron cultivados, titulados y cedidos por el Dr. Julio Coll (CISA. Valdeolmos. Madrid) y se utilizaron para infectar los cultivos de estroma según el método de Estepa y Coll (1991a, b). Se infectaron cultivos confluentes de la línea celular (pases 9, 86 y 93) a diferentes multiplicidades de infección (número de partículas infectivas de virus por célula del cultivo), entre 0,001 y 0,5. Los virus se añadieron en un volumen final de 100 µl por frasco de 25 cm<sup>2</sup>, diluidos en las proporciones 1:3, 1:9 y 1:27 en RPMI-1640 con 2% de FCS, y se mantuvieron en adsorción durante 1 hora a 14°C, con agitación suave cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió RPMI-1640 con 2% de FCS, se incubaron a 14°C durante tres semanas y se controló la evolución del efecto citopático.

Paralelamente se realizaron cultivos control que se mantuvieron sin infectar en las mismas condiciones y durante el mismo periodo de tiempo.

### **6.1.- Titulación del virus VHS.**

La titulación del virus VHS obtenido después de la infección de la línea celular se realizó sobre monocapas de EPC por el método de la TCID<sub>50</sub> (Basurco y Coll, 1989). Inmediatamente antes de la titulación, se añadió VHSV a los pocillos control con el fin de distinguir entre replicación viral y supervivencia del virus.

### **6.2.- Detección del virus VHS por enzimoimmunoensayo (ELISA) de doble anticuerpo.**

Para demostrar la presencia de la nucleoproteína N del virus VHSV (proteína de la nucleocápsida), los sobrenadantes centrifugados, recogidos de los cultivos infectados, se ensayaron por medio de ELISA indirecto siguiendo el método de Sanz y Coll (1992).

Los anticuerpos monoclonales utilizados (con especificidad para la proteína N, Nx del virus) fueron el 2D5 para tapizar las placas y el 2C9 conjugado con peroxidasa, obtenidos en el Departamento de Sanidad Animal del I.N.I.A (Sanz y cols, 1993).

Los sobrenadantes se ensayaron haciendo dobles diluciones seriadas y por duplicado. El título fue definido como el inverso de la dilución para dar una absorbancia a 492nm de 0,4.

### **6.3.- Citometría de flujo.**

La presencia de antígenos virales en la línea celular se analizó mediante citometría de flujo siguiendo el método descrito por Estepa y cols., (1992).

A los 5 días post-infección, la línea celular se tripsinizó y las células se resuspendieron en PBS pH 7,4 que contenía un 1% de albúmina sérica bovina, un 0,1% de azida sódica y un 0,01% de Tritón X-100 (PBS-BSA-NaN<sub>3</sub>). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 300g durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en PBS-BSA-NaN<sub>3</sub> que contenía una dilución 1:100 de líquido ascítico de ratón con el anticuerpo monoclonal 1H10 isotipo IgG<sub>1</sub> (anti-proteína G), o el anticuerpo monoclonal 2C9 isotipo IgG<sub>2a</sub> (anti-proteína N) (Estepa y cols., 1991). Como controles negativos se utilizaron por una parte, suspensiones celulares de la línea de pronefros no infectada que fueron incubadas con el anticuerpo 1H10, o 2C9, o bien en PBS-BSA-NaN<sub>3</sub> que contenía una dilución 1:100 de líquido ascítico de ratón con el anticuerpo 1A6 (isotipo IgG<sub>1</sub>) anti-IgM de trucha (Sánchez y cols. 1989), o bien PBS-BSA-NaN<sub>3</sub> sólo. Además se utilizaron suspensiones celulares de los cultivos infectados incubados con el anticuerpo 1A6 como se ha descrito anteriormente o incubados en PBS-BSA-NaN<sub>3</sub> sólo.

Después de una hora de incubación a 20°C, con agitación ocasional, las suspensiones celulares se lavaron en PBS-BSA-NaN<sub>3</sub>, se resuspendieron en el mismo tampón que contenía inmunoglobulinas de conejo anti-IgG de ratón marcadas con fluoresceína (Nordiv, Tilburg, Holanda) a una dilución 1:700 y se incubaron 30 minutos a 20°C. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS con/sin Tritón X-100 y un 0,3% de paraformaldehído. Seguidamente se realizó el análisis de 5.000 células en un FACScan (Becton-Dickinson, San José, CA) utilizando el programa LYSIS II (v. 1.0) y midiendo la fluorescencia verde a 514-545nm (filtro FL1).

## **7.- INDUCCIÓN DE LA HEMATOPOYESIS MEDIANTE COCULTIVOS.**

Con el fin de inducir hematopoyesis sobre la línea celular del estroma de pronefros, se cocultivaron cultivos subconfluentes de la misma (aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por frasco de 25 cm<sup>2</sup>) con suspensiones celulares alogénicas de pronefros, obtenidas por disociación mecánica de este órgano en RPMI-1640 con 10% FCS. Se sembraron  $3-6 \times 10^7$  células de pronefros, que contenían  $1,5-4,5 \times 10^7$  células de aspecto linfoide, en un volumen final de 5 ml de medio de cultivo.

En algunos casos, se establecieron cocultivos de la línea celular del estroma de pronefros con leucocitos de pronefros separados según el protocolo descrito en el apartado 2.2.2.

Con el fin de estudiar el efecto de diversos suplementos sobre la hematopoyesis en los cocultivos, se utilizaron las modificaciones D, E y F del medio MCP, descritas en el apartado 2.1. En todos los casos el primer cambio de medio se realizó a los 7-10 días de cocultivo, mientras que los cambios posteriores se efectuaron cada 2-4 días. Los cocultivos se incubaron a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire.

Este protocolo también se utilizó para establecer cocultivos entre suspensiones celulares de pronefros de trucha y la línea celular RTG-2. Esta línea celular fue adaptada, durante 1 mes, a crecer con el medio de cultivo MCP y sus modificaciones D, E y F (apartado 2.1).

### **7.1.- Análisis de la hematopoyesis *in vitro*.**

En el caso de los cocultivos entre la línea celular del estroma de pronefros y la línea celular RTG-2 con suspensiones celulares alogénicas de pronefros, las células libres de los sobrenadantes se analizaron regularmente tiñéndolas con hematoxilina-eosina, azul alcian-hemalumbre-picroíndigo de carmín y May Grünwald-Giemsa.

Para los estudios citoquímicos se utilizaron células recogidas de cocultivos realizados sobre los pases 42, 43, 136 y 137 de la línea celular del estroma y células recogidas de los cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2. Se analizaron las actividades enzimáticas ACPH, AKPH y ANAE, efectuando controles positivos y negativos tal y como se indica en el apartado 4.1.

El estudio ultraestructural se realizó sobre cocultivos de la línea celular del estroma (pases 42, 43, 50, 136, 137) con células de pronefros, sobre cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2 y sobre las células recogidas de los sobrenadantes de estos cocultivos, según se indica en el apartado 4.5.

## **8.- CULTIVOS EN MEDIO SEMISÓLIDO.**

### **8.1.- Cultivos en coágulos de fibrinógeno-trombina.**

Con el fin de obtener colonias hematopoyéticas aisladas se realizaron ensayos en coágulos de fibrinógeno-trombina, siguiendo la metodología descrita por Estepa y Coll, (1993). Para estos cultivos se utilizaron leucocitos de trucha, aislados a partir de sangre periférica (PBLs) por centrifugación sobre Lymphoprep, durante 30 min, a 800g y 22°C. Los leucocitos se sembraron en placas de 96 pocillos bien sólo o bien junto con células de la línea celular del estroma de pronefros (pase 112) en proporción 3:1 respectivamente. En todos los casos la concentración celular de partida fue de  $2 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$ .

La trombina (Sigma) se añadió a los pocillos a una concentración final de 2-4 NIH U  $\text{ml}^{-1}$ . Posteriormente se pipetearon 100  $\mu\text{l}$  /pocillo de la suspensión celular, a la cual se añadió el fibrinógeno (Sigma), a una concentración final de 0,2  $\text{mg ml}^{-1}$ , inmediatamente antes de la siembra. Una vez obtenidos los coágulos, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de suero de truchas anémicas (medio G) o del medio condicionado de macrófagos de trucha (medio H) por pocillo. Los cultivos se incubaron a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire, se observaron regularmente y se fotografiaron en un microscopio invertido (Nikon) equipado con contraste de fases.

### **8.2.- Cultivos en agarosa.**

Con el fin de obtener colonias hematopoyéticas aisladas se realizaron diversos ensayos en medio semisólido utilizando agarosa (Seaprep, FMC) a concentraciones finales de 0,66, 0,33 y 1%, siguiendo los protocolos descritos por Moritomo y Watanabe (1994) para la obtención de colonias hematopoyéticas a partir de pronefros de carpa, y de Heyworth y Spooncer (1993) para los ensayos de células formadoras de colonias mixtas (CFC-Mix) en mamíferos.

Los cultivos en medio semisólido se realizaron a partir de a) suspensiones celulares de pronefros de trucha obtenidas por disociación mecánica según el apartado 4., b) células no adherentes recogidas tras 2h de permanencia de las suspensiones de pronefros a las placas de cultivo, c) leucocitos de pronefros y de sangre periférica separados en Lymphoprep.

Las células fueron resuspendidas a concentraciones finales de  $10^5$ - $10^6$  células por pocillo en los siguientes medios de cultivo a) RPMI-1640, b) medio MCP sin FCS y suero de trucha, c) medio MCP sin suero alogénico, y d) MCP.

Como suplementos del medio de cultivo se utilizaron las siguientes variantes: a) suero de truchas anémicas (medio G), b) medio condicionado de macrófagos de trucha (medio H), c) medio condicionado de linfocitos de sangre periférica de trucha estimulados con concanavalina A (Con A) o con LPS (apartado 2.2.2). d) medio condicionado de la línea celular del estroma de pronefros cultivada en medio sin suero durante dos días, e) medio condicionado de la línea celular del estroma de pronefros estimulada con LPS ( $20\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y cultivada en medio sin suero durante dos días, y f) medio condicionado de la línea celular del estroma de pronefros estimulada con DDTC (dietilditiocarbamato, Sigma) según se detalla en el apartado 2.2.3.

## **RESULTADOS**

### **1.- EVOLUCIÓN DE LOS CULTIVOS A LARGO PLAZO DE PRONEFROS.**

A partir de los cultivos hematopoyéticos a largo plazo de pronefros de trucha (Diago y cols., 1993), se estableció una línea celular cuya evolución a través de los diferentes pases se caracterizó por:

A) El mantenimiento de los tipos celulares del estroma, descritos previamente en los cultivos a largo plazo, formados fundamentalmente por células reticulares de morfología fibroblástica, células epitelioides de morfología poligonal y la aparición de un pequeño número de células gigantes multinucleadas.

B) Un progresivo descenso en el número de melanomacrófagos.

C) Una evolución de las actividades enzimáticas expresadas por los distintos tipos celulares, la cual se indica en la Tabla III.

Uno de estos cultivos a largo plazo (5 pases en 8 meses), mantenido en MCP, fue subcultivado semanalmente mediante tripsinización. En los pases siguientes se observó una disminución gradual de la actividad hematopoyética, los subcultivos adquirieron características fenotípicas homogéneas y alcanzaron la confluencia más rápidamente (1 semana para un frasco de 25 cm<sup>2</sup> a 18°C). Estas células se han cultivado 145 veces, constituyendo una línea celular a la que hemos denominado TPS (trout pronephric stroma).

## **2.- CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR TPS.**

La línea celular TPS se mantiene como cultivos adherentes en frascos o placas de plástico, creciendo tanto con el 5% como con el 2,5% de suero de trucha (medios MCP y B). Con estos medios de cultivo y hasta el pase 145 (25-07-96), la línea celular TPS está formada por células que presentan una morfología mayoritariamente fibroblástica. Estas células no exhiben inhibición por contacto, sino que forman multicapas, incluso antes de alcanzar la confluencia en el frasco.

Los intentos realizados para cultivar la línea TPS en suspensión y los experimentos de clonado no dieron resultados positivos.

### **2.1.- Morfología.**

Utilizando el medio de cultivo MCP y tras realizar los subcultivos, las células TPS comenzaban a crecer formando agrupaciones en las cuales aparecían células gigantes, con núcleos multilobulados, que estaban rodeadas por células fibroblásticas [Fig. 1]. A medida que se incrementaba el número de células, éstas se superponían formando multicapas [Fig. 2]. Los cultivos confluentes estaban formados por tres tipos celulares adherentes: 1) Células fibroblásticas, con morfología fusiforme (6-15 $\mu$ m de ancho y hasta 100 $\mu$ m de longitud), núcleo ovoide y prolongaciones filiformes [Fig. 2] que constituían el componente mayoritario de los cultivos. 2) Células epitelioideas, con morfología poligonal (50-70 $\mu$ m) y núcleos redondeados, cuyo citoplasma contenía a veces numerosas vesículas pequeñas [Figs. 2, 3].; y 3) Células gigantes [Figs. 2, 4] de tamaño variable entre 50 y 330 $\mu$ m, que mostraban núcleos de apariencia multilobulada o eran claramente multinucleadas y presentaban numerosas vesículas claras agrupadas alrededor del área nuclear [Fig. 4].

Ultraestructuralmente los cultivos estaban formados por varias capas de células elongadas y los espacios intercelulares estaban parcialmente llenos de matriz extracelular, que contenía un material amorfo y algunas fibras estriadas semejantes a colágeno [Figs. 5, 6]. Las células fibroblásticas tenían forma fusiforme y delgadas ramificaciones celulares. Su núcleo, también alargado presentaba una banda de heterocromatina perinuclear, y uno o más nucléolos [Fig. 5]. En su citoplasma se encontraron numerosos ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado, formado por cisternas dilatadas y elongadas que

contenían un material de moderada electrodensidad [Fig. 6]. Además se observaron mitocondrias, dictiosomas del aparato de Golgi, cuerpos multivesiculares, algunos cuerpos densos [Figs. 5, 6] y haces de microfilamentos [Figs. 5, 6]. Estas células no presentaban uniones entre sí ni con otros tipos celulares, aunque era frecuente observar estrechas aposiciones entre células vecinas [Fig. 5].

Las células epitelioides se caracterizaban por su núcleo irregular, lobulado y eucromático [Fig. 7]. En el citoplasma contenían aparato de Golgi muy bien desarrollado, retículo endoplásmico rugoso y liso, y numerosas mitocondrias de elevada electrodensidad [Figs. 7, 11]. La característica más relevante de las células epitelioides era la presencia de numerosas y grandes vesículas electroclaras, que a veces contenían material heterogéneo [Figs. 7, 11]. Estas células presentaban haces compactos de microfilamentos y estaban unidas entre sí por desmosomas [Figs. 8, 9] y presentaban contactos semejantes a uniones gap [Figs. 9, 10].

Las células gigantes fueron difíciles de reconocer en las secciones ultrafinas, debido a su disposición en las monocapas ocupando grandes áreas y a que sus características ultraestructurales eran similares a las descritas para las células epitelioides [ver Fig. 51]. Su característica más distintiva era la presencia de varias secciones nucleares de contorno muy irregular [Fig. 11].

## **2.2.- Análisis citoquímico.**

Los controles, en los que se omitió el sustrato correspondiente, para las actividades enzimáticas ensayadas fueron siempre negativos. Las características citoquímicas de los tipos celulares encontrados en la línea celular TPS se resumen en la Tabla III. Las células fibroblásticas únicamente mostraron actividad ANAE débilmente positiva en los pases 82 y 145. Las células epitelioides mostraron actividad fosfatasa ácida y alfa-naftil acetato esterasa inespecífica baja en los pases 82 y 145. Las células gigantes mostraron actividad fosfatasa ácida baja en el pase 82 y alfa-naftil acetato esterasa inespecífica moderadamente positiva en los pases 60, 82 y 145.

La tinción de lípidos con Rojo al aceite O demostró la acumulación progresiva de gotas lipídicas en todos los tipos celulares presentes tanto en los cultivos a largo plazo de pronefros

[Fig. 13], como en la línea celular TPS, en función del tiempo de permanencia de las células en los frascos de cultivo. Así, las células (pase 143) mantenidas durante 6 días en el mismo frasco no acumulaban grasa, mientras que en los cultivos mantenidos durante 3 meses (pase 45) presentaban gotas lipídicas. A muy largo plazo, utilizando un cultivo (pase 38) mantenido en el mismo frasco a baja temperatura (4°C) durante 3 años y 5 meses, todos los tipos celulares acumulaban abundantes gotas lipídicas [Fig. 14].

### **2.3.- Análisis inmunocitoquímico.**

Los controles positivos confirmaron que los anticuerpos primarios frente a los marcadores de mamíferos ensayados (Tabla II) presentan reactividad cruzada con componentes similares de los tejidos de trucha. Sin embargo, las células TPS fueron negativas para todos ellos.

### **2.4.- Ensayos de fagocitosis.**

Después de 1 h de incubación de la línea celular TPS con *C. lipolytica*, sólo un 1% de las células habían internalizado levaduras.

### **2.5.- Técnicas citogenéticas.**

#### **2.5.1.- Recuento de cromosomas.**

El análisis de las placas metafásicas mostró que las células TPS eran heteroploides y contenían 46-66 cromosomas [Fig. 15], siendo el número de cromosomas metacéntricos (42-50) mayor que el de acrocéntricos (10-18). La gráfica 1 muestra la frecuencia de distribución de cromosomas en 100 células TPS (pase 60). El número modal de cromosomas es de 58.

#### **2.5.2.- Tinción de los organizadores nucleolares (NORs).**

En todas las metafases teñidas con plata se encontraron dos cromosomas que presentaban los NOR [Fig. 16]. Este par de cromosomas era submetacéntrico, con los NOR localizados en los brazos largos de los dos cromosomas.

### **2.6.- Análisis de isoenzimas.**

La línea celular TPS fue positiva para los isoenzimas AK, CK, FDP, HK, IDH, LDH, MDH, 6-PGDH, PGI, PGM y PMI. En la Tabla IV se recoge la comparación de los perfiles de

actividad y migración electroforética relativa de cada isoenzima en la línea celular TPS y en las líneas celulares BF-2, RTG-2 y CHS-214.

La isoenzima malato deshidrogenasa (MDH) presentaba perfiles de actividad y migración electroforética relativa distintos para cada una de las cuatro líneas celulares ensayadas. Los isoenzimas AK, CK, HK, IDH, LDH, 6-PGDH y PGM mostraron perfiles diferentes en la línea celular TPS y la línea BF-2. Los perfiles mostrados por las isoenzimas CK, IDH y PGM eran diferentes en la línea celular TPS y la línea RTG-2.

## **2.7.- Crecimiento celular.**

### **2.7.1.- Tasa de crecimiento.**

Las gráficas 2a y 2b representan las curvas de crecimiento de la línea celular TPS (pase 65) a 18°C, en placas de 24 y de 96 pocillos respectivamente. El tiempo de duplicación de la población a esta temperatura, calculado en el punto medio de la fase exponencial de crecimiento para la densidad celular inicial de  $3 \times 10^4$  células por ml ( $1,5 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ ), fue de 27 horas.

### **2.7.2.- Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento.**

Las curvas de crecimiento para la línea celular TPS cultivada a diferentes temperaturas se muestran en la gráfica 2c. Durante los 15 días de duración del experimento no se observó incremento en el número de células cultivadas a 10°C ó 12°C. En el rango de las temperaturas probadas, el crecimiento óptimo se obtuvo entre 18 y 22°C. A 4°C las células permanecieron viables durante largos periodos de tiempo. En este caso, el crecimiento celular tiene lugar lentamente y las células TPS, mantenidas en frascos de  $25\text{-cm}^2$ , pueden ser subcultivadas una vez al año.

### **2.7.3.- Incorporación de timidina tritiada.**

Con una concentración inicial de  $1,6 \times 10^4$  células por pocillo ( $5 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ ) la máxima incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina se alcanzó tras 6 días de cultivo [Gráfica. 3]. Este valor se corresponde con el incremento en el número de células observado entre los días 6 y 8 de cultivo [Gráfica 2b]. A la densidad de siembra de  $4,8 \times 10^3$  células por pocillo ( $1,5 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ ), la máxima incorporación de timidina tritiada se alcanzó tras 12 días de cultivo. Con

una concentración inicial de  $1,6 \times 10^3$  células por pocillo ( $5 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$ ) se observó un continuo incremento en la incorporación de timidina tritiada a lo largo de todo el experimento.

## **2.8.- Susceptibilidad a virus.**

La línea celular TPS es susceptible a la infección con los virus VHS e IHN, mientras que el virus IPN no causa efecto citopático. Entre los 3 y 5 días post-infección con los virus VHS e IHN, dependiendo de la multiplicidad de infección, se observaban algunas células despegadas, y entre los 6 y 10 días post-infección aparecían pequeñas calvas en la monocapa [Fig. 17]. A las tres semanas post-infección era patente el efecto citopático y los cultivos se lisaban totalmente, con independencia de la multiplicidad de infección inicial utilizada.

### **2.8.1.- Detección del virus VHS por los métodos TCID<sub>50</sub> y ELISA.**

La Tabla V muestra los resultados de los análisis de los sobrenadantes de cultivos infectados con el virus VHS por los métodos TCID<sub>50</sub> y ELISA. Tras una semana post-infección y a una multiplicidad de infección de 0,5 virus por célula se observó un incremento en el título de 25 veces por el método TCID<sub>50</sub> y 20 veces por ELISA (Tabla V).

### **2.8.2.- Citometría de flujo.**

La presencia de antígenos virales en la línea celular TPS fue analizada por citometría de flujo con el fin de corroborar la infección con VHS. La tinción con los anticuerpos 1H10 y 2C9 (frente a las proteínas G y N del virus respectivamente) mostró un incremento de 2 a 3 veces en la intensidad de fluorescencia intracelular en las células infectadas con respecto a los controles no infectados o a los cultivos control teñidos con el anticuerpo 1A6 (anti-IgM de trucha) [Gráfica 4].

## **3.- INFLUENCIA DE OTROS MEDIOS DE CULTIVO.**

La línea celular TPS es capaz de crecer con medio MCP suplementado con suero de caballo e hidrocortisona (medio C). Este medio de cultivo provocó tres efectos en las células. El primero se observó a partir de las dos primeras semanas de cultivo y afectaba a la adherencia de las células al plástico de cultivo, de manera que con el medio de cultivo C las células presentaban una mayor adhesividad. El segundo se observó a partir de los cuatro

meses de cultivo, periodo a partir del cual las células TPS adquirirían mayoritariamente una morfología epitelioide [Fig. 18]. El tercer efecto afectaba al comportamiento de las células *in vitro* de manera que, en los cultivos mantenidos durante largos periodos de tiempo en el mismo frasco (7 meses) se observaba la formación de estructuras tubulares semejantes a capilares. El primer indicio en la formación de estas estructuras era la aparición de una “vacuola” cilíndrica en el interior de algunas células epitelioides [Fig. 19], que a veces atravesaba el citoplasma por la región nuclear. Posteriormente las células contiguas desarrollaban “vacuolas” similares [Fig. 20], que llegaban a conectar unas células con otras formando estructuras tubulares [Figs. 21, 22]. A partir de este momento se observaron procesos de elongación y ramificación de dichas estructuras, que se extendían tanto en el plano de la monocapa de células originales [Fig. 23] como en el plano localizado por encima de éste [Figs. 24,25, 26].

#### **4.- INDUCCIÓN Y ANÁLISIS DE LA HEMATOPOYESIS SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES TPS Y RTG-2.**

Para demostrar la capacidad hematopoyética de la línea celular TPS, se cocultivó con suspensiones celulares alogénicas de pronefros, utilizando el medio MCP y sus variantes D, E, y F, que se detallan en el apartado 2.1 de Material y Métodos. Además, como control de la capacidad de soporte hematopoyético de la línea celular de pronefros, se utilizaron cocultivos con la línea celular RTG-2.

Tanto para la línea celular TPS, como para la RTG-2, se observó actividad hematopoyética en los cocultivos con suspensiones celulares alogénicas de pronefros, pero no en los realizados sembrando leucocitos de pronefros separados en Lymphoprep. Para ambas líneas celulares, los cocultivos presentaban actividad granulopoyética, linfopoyética y eritropoyética. Así, independientemente del medio utilizado y tras el primer cambio del mismo (a los 7 días), los sobrenadantes de los cocultivos realizados con suspensiones celulares de pronefros y la línea celular TPS, así como con la RTG-2, contenían células sanguíneas [Fig. 27], cuya viabilidad oscilaba entre 95-99%.

La capacidad para mantener hematopoyesis a lo largo del tiempo en los cocultivos varió dependiendo de la línea celular y de los medios utilizados [Tabla VI]. Los cocultivos realizados sobre pases jóvenes de la línea celular TPS (40-50) e incubados con el medio de cultivo MCP fueron capaces de mantener hematopoyesis durante 10 meses. Los cocultivos incubados con el medio de cultivo D durante 1 año y cuatro meses. Los incubados con el medio E durante 11 meses y los incubados con el medio F durante los cuatro meses que duró el experimento. Por el contrario, los cocultivos realizados sobre pases avanzados de la línea celular TPS (entre los pases 130-137) mantuvieron actividad hematopoyética hasta 3-4 meses. Los realizados sobre la línea celular RTG-2 solo soportaron hematopoyesis hasta 1 mes y medio de cultivo.

#### **4.1.- Células liberadas a los sobrenadantes en los cocultivos TPS-pronefros.**

Durante el primer mes de cocultivo, en los sobrenadantes de los cocultivos incubados con el medio MCP se recogieron numerosas células sanguíneas diferenciadas entre las cuales se pudieron reconocer linfocitos, heterófilos, monocitos y eritrocitos [Fig. 28], así como melanomacrófagos [Fig. 29]. La presencia de macrófagos [Fig. 30] y de mielocitos [Fig. 31] pudo confirmarse a microscopía electrónica de transmisión.

En los sobrenadantes de los cocultivos incubados con el medio D (suplementado con suero de truchas estresadas) , se recogieron eritrocitos únicamente durante el primer mes de cocultivo. No obstante, a lo largo de 1 año pudieron recogerse pequeñas colonias en las que se observaron monocitos, heterófilos y linfocitos dispuestos sobre células del estroma [Fig. 32], así como linfocitos [Fig. 33], melanomacrófagos y granulocitos libres [Fig. 34].

En los sobrenadantes de los cocultivos incubados con el medio E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato) se recogieron melanomacrófagos, linfocitos, heterófilos, monocitos y eritrocitos [Fig. 35] durante el primer mes de cocultivo. A partir de este momento el número de eritrocitos libres comenzó a descender y, hasta los once meses de cocultivo, se recogieron linfocitos, heterófilos, monocitos y numerosos melanomacrófagos.

En los sobrenadantes de los cocultivos incubados con el medio F (suplementado con hidrocortisona- -ciclodextrina) se recogieron melanomacrófagos, linfocitos [Fig. 36],

mieloblastos [Fig. 37], y heterófilos en distintos grados de diferenciación, desde mielocitos [Fig. 38] a metamielocitos [Fig. 39].

#### **4.2.- Análisis citoquímico de las células recogidas de los sobrenadantes de los cocultivos.**

Las características citoquímicas de los tipos celulares encontrados en los sobrenadantes de los cocultivos realizados entre la línea celular TPS y RTG-2 y células del pronefros se resumen en la Tabla VII. En los cultivos realizados sobre pases jóvenes de la línea celular TPS (42, 43), los linfocitos y las células de la serie eritroide siempre fueron negativas para las tres enzimas. Las células de la serie heterófila mostraban actividad AKPH positiva [Fig. 40], aunque era frecuente encontrar metamielocitos negativos, y eran negativas para las actividades ACPH y ANAE. Los monocitos eran negativos para AKPH y mostraban actividad ACPH y ANAE. Estas dos actividades variaban desde negativo a positivo en los melanomacrófagos [Figs. 41, 42]. Por último, las células del estroma no presentaban actividad AKPH y las actividades ACPH [Fig. 41] y ANAE variaban desde negativo a positivo débil.

Estas características eran semejantes en los cocultivos realizados sobre pases jóvenes (42, 43) y avanzados (136, 137) de la línea celular TPS, salvo la presencia en estos últimos de células ligeramente ovaladas, semejantes a linfocitos, que presentaban el núcleo desplazado a uno de los polos celulares y actividad ACPH positiva en el citoplasma del polo opuesto (Tabla VII) [Fig. 43].

En los cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2 las características citoquímicas de las células liberadas a los sobrenadantes eran idénticas a las descritas para las células recogidas en los sobrenadantes de los cocultivos TPS (pases jóvenes)-pronefros. La única diferencia encontrada correspondía a la presencia de células ANAE positivas y AKPH y la ACPH negativas [Fig. 44], que presentaban las características de las células RTG-2.

Con respecto a los diferentes medios de cultivo utilizados, en los cocultivos incubados con los medios D (suplementado con suero de truchas estresadas) y F (suplementado con 17-hidroocortisona complejada en  $\alpha$ -ciclodextrinas) las células de la serie heterófila liberadas a los sobrenadantes presentaban un mayor grado de diferenciación y era frecuente observar metamielocitos, muchos de ellos carentes de actividad AKPH.

### 4.3.- Cinética de producción de células sanguíneas.

La producción de células sanguíneas, fundamentalmente linfocitos y granulocitos, era continua a lo largo del tiempo en todos los cocultivos, independientemente del medio utilizado y del pase de la línea celular TPS empleado, y llegaba a presentar niveles máximos durante los tres primeros meses de cultivo. Las gráficas 5, 6 y 7 muestran el número de células de las diversas estirpes recogidas a distintos días de cultivo en los sobrenadantes de cocultivos TPS-pronefros representativos, para los diferentes medios. El número de linfocitos y granulocitos recogidos cada 3-4 días en los cocultivos realizados sobre pases jóvenes (42 y 43) [Gráficas 5a, b, d, e] o avanzados (136 y 137) de la línea celular TPS [Gráficas 6a, b, d, e] oscilaba entre  $10^4$  y  $10^6$  para ambos. En los cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2 el número de linfocitos y granulocitos recogidos cada 3-4 días oscilaba entre  $10^3$ - $10^5$  y  $10^4$ - $10^6$  respectivamente [Gráficas 7a, b, d, e].

La eritropoyesis se producía mayoritariamente durante el primer mes de incubación tanto en los cocultivos realizados sobre la línea celular TPS como en los realizados sobre la línea RTG-2. En los cocultivos realizados sobre los pases 42 y 43 de la línea celular TPS que fueron incubados con el medio de cultivo MCP, el número de eritrocitos recogidos durante los primeros 16 días de cocultivo era del orden de  $10^4$  [Gráfica 5c, f]. Esta situación se mantenía para los cocultivos incubados con el medio F, aunque en éste último se recogieron entre los días 23-27 del orden de  $10^4$  eritrocitos en cada muestreo. En los cocultivos realizados sobre los pases 136 y 137 de la línea celular TPS e independientemente del medio de cultivo utilizado, el número de eritrocitos recogidos durante los primeros 16 días de cocultivo oscilaba entre  $10^3$  y  $10^5$  [Gráfica 6c, f]. En los cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2 [Gráfica 7c, f] incubados con el medio MCP únicamente se recogieron eritrocitos durante los primeros 16 días de cocultivo. En los cocultivos incubados con los medios D y F la producción era variable recogándose durante los 27 días de muestro entre  $10^3$  y  $10^4$  eritrocitos. Por último en los cocultivos incubados con el medio E, la producción de eritrocitos era continua durante el primer mes de cocultivo y se recogieron entre  $10^3$  y  $10^5$  eritrocitos en cada muestreo [Gráfica 7c].

## **5.- EVOLUCIÓN DE LOS COCULTIVOS INCUBADOS CON EL MEDIO DE CULTIVO MCP.**

### **5.1.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS.**

A los 14 días de cocultivo se observaban células hematopoyéticas, distinguibles por su forma redondeada y pequeño tamaño, dispuestas de forma dispersa sobre o entre las células del estroma que constituían las multicapas [Fig. 45]. El número de células hematopoyéticas se incrementaba a los 21 días de cocultivo [Fig. 46]. Al cabo de 1 mes los melanomacrófagos eran abundantes [Fig. 47], y se observaban células oscuras dispersas, así como pequeñas colonias eritrocíticas que no presentaban límites claros [Fig. 47]. Tras dos meses de cocultivo, se observaban colonias que presentaban el aspecto de un empedrado [Fig. 48], que se mantuvo hasta los 9-10 meses de cocultivo, momento a partir del cual se perdía progresivamente la actividad hematopoyética y los cultivos aparecían formados fundamentalmente por células del estroma, con aspecto epitelioide y fibroblástico, muchas de ellas con acumulaciones de grasa [Fig. 49].

Las multicapas estaban formadas por células fibroblásticas, epitelioides y gigantes [Figs. 50, 51, 52] que mostraban las mismas características ultraestructurales que las células TPS [Figs. 5-12]. Entre estas células se observaban abundantes haces de fibras semejantes a colágeno [Fig. 53] que presentaban estriación característica [Fig. 54]. Las multicapas contenían melanomacrófagos [Fig. 52], células linfoides [Fig. 55] y células de la serie granulopoyética, tanto aisladas [Fig. 52] como en pequeñas colonias asociadas a células epitelioides [Fig. 56].

### **5.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2.**

A los 21 días de cocultivo entre las monocapas de células adherentes aparecían dispersas células hematopoyéticas oscuras [Fig. 57] y en algunas zonas se observaban pequeñas colonias localizadas sobre las células adherentes [Fig. 58]. A los 48 días, la hematopoyesis declinaba en estos cocultivos [Fig. 59]. El estudio ultraestructural reveló que las colonias encontradas a los 21 días contenían melanomacrófagos y mielocitos [Figs. 60, 61].

## **6.- EVOLUCIÓN DE LOS COCULTIVOS INCUBADOS CON EL MEDIO DE CULTIVO D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

### **6.1.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS.**

Durante el primer mes de cocultivo la distribución de las células hematopoyéticas era similar a la encontrada en los cocultivos incubados con el medio de cultivo MCP, apareciendo células dispersas entre las multicapas [Fig. 62]. A partir del primer mes empezaban a observarse colonias hematopoyéticas, dispuestas entre las multicapas, que presentaban el aspecto de un empedrado y que en algunos casos estaban rodeadas por acumulaciones de melanomacrófagos [Fig. 63]. Junto a este tipo de colonias y hasta los dos meses de cocultivo, se pudo observar además la presencia de pequeñas colonias eritropoyéticas [Fig. 64]. Las colonias que presentaban el aspecto de empedrado se mantuvieron al menos hasta los diez meses de cocultivo [Fig. 65]. A partir de este momento en algunas zonas de los cocultivos pudieron observarse estructuras tubulares, muy alargadas, que discurrían entre las células hematopoyéticas [Fig. 66].

En las secciones histológicas, no se observaron claras diferencias entre las células fibroblásticas y epitelioides del estroma de estos cultivos y las descritas en los cultivos con medio MCP. Sin embargo, a partir de los diez meses de cultivo era llamativa la presencia de células gigantes [Figs. 67, 68], que frecuentemente se disponían próximas a estructuras similares a vasos sanguíneos [Figs. 68, 69, 70].

Ultraestructuralmente, las células gigantes [Figs. 69, 70, 71] presentaban un núcleo irregular [Fig. 60] y en su citoplasma se encontraban pequeñas vesículas electrolúcidas [Figs. 69, 72], ribosomas, pequeños cuerpos multivesiculares, haces compactos de microfilamentos [Fig. 72], gotas lipídicas [Figs. 69, 71] y grandes vesículas electrolúcidas [Figs. 69, 70, 71] que parecían llegar a fusionarse entre sí [Figs. 70, 71].

Las estructuras vasculares estaban constituidas por células de aspecto epitelioides/endotelial organizadas alrededor de una luz central, de tamaño variable y que contenía células y/o restos celulares [Figs. 68, 73-79]. Las células que limitaban la luz poseían núcleos muy irregulares y muy lobulados [Figs. 74, 76, 78, 79], con un ribete de cromatina periférica marcado. En su citoplasma se encontraban cisternas del aparato de Golgi [Fig. 80] y

de retículo endoplásmico rugoso [Fig. 80], polirribosomas, algunos microfilamentos y microtúbulos [Figs. 81, 82], y gotas lipídicas [Figs. 76, 78, 82]. Era característica la presencia de abundantes vesículas de pequeño tamaño y contenido electroclaro, que a veces aparecían fusionadas con la membrana plasmática [Fig. 81] o entre sí y que se disponían alineadas en las porciones laterales de la célula [Fig. 83]. Aunque estas células presentaban estrechas aposiciones de las membranas plasmáticas en las porciones apicales [Figs. 80, 82], sólo encontramos uniones gap en las porciones laterobasales [Figs. 80, 82, 84].

En la zona basal de las estructuras de aspecto vascular ocasionalmente se encontraban células que presentaban características similares a las descritas para las células que limitaban la luz central [Figs. 75, 79]. Además, los elementos vasculares aparecían bordeados por matriz extracelular en la que destacaban abundantes fibras [Figs. 77-79], algunas de ellas ultraestructuralmente semejantes a colágeno [Fig. 85].

En la luz de las estructuras vasculares de mayor calibre [Fig. 75] se encontraban melanomacrófagos [Fig. 86] y células sanguíneas libres, incluyendo granulocitos [Figs. 87, 89], células plasmáticas [Figs. 87, 90] y linfocitos [Figs. 88, 91].

Entre la trama de células del estroma se disponían diferentes estirpes de células sanguíneas, encontrándose mieloblastos [Fig. 92] células plasmáticas [Figs. 93, 94], así como granulocitos [Figs. 95, 96] y melanomacrófagos [Fig. 95]. También se encontraron linfocitos libres [Figs. 97, 98], granulocitos [Figs. 97, 99] y colonias de melanomacrófagos [Fig. 100] cerca del borde de las multicapas.

## **6.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2.**

A los 14 días de cocultivo se encontraban pequeñas colonias refringentes, eritrocitos y células redondeadas dispuestas sobre las monocapas de células adherentes [Fig. 101], así como células oscuras dispersas entre las células adherentes [Fig. 102]. A los 21 días de cocultivo se mantenía esta situación, aunque en este caso era difícil observar eritrocitos [Fig. 103]. A los 48 días cesaba la actividad hematopoyética de estos cocultivos [Fig. 104].

## **7.- EVOLUCIÓN DE LOS COCULTIVOS INCUBADOS CON EL MEDIO DE CULTIVO E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

### **7.1.- Determinación de las concentraciones óptimas de hidrocortisona 21-hemisuccinato en el medio de cultivo.**

El efecto del cortisol comercial fue probado sobre los pases 73, 77 y 79 de la línea celular TPS, como suplemento del medio de cultivo MCP a concentraciones seriadas finales de  $10^{-3}$  a  $10^{-11}$  M. A los 21 días, los cultivos suplementados con  $10^{-3}$  M de cortisol habían crecido menos que los controles y que los cultivos suplementados con el resto de las concentraciones, y las células presentaban numerosas vesículas en el citoplasma. Los cultivos suplementados con concentraciones variables desde  $10^{-4}$  hasta  $10^{-11}$  no diferían ni en la tasa de crecimiento ni en la morfología con respecto a los controles. Se eligió la concentración final de trabajo de  $10^{-5}$  M, que además es comúnmente utilizada para el establecimiento de cultivos a largo plazo de médula ósea de mamíferos.

### **7.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS.**

A los 14 días de cocultivo se observaban células hematopoyéticas dispersas dispuestas sobre o entre las células del estroma que constituían las monocapas [Fig. 105] así como pequeñas colonias con aspecto de empedrado y eritrocitos libres [Fig. 106]. Esta situación se mantenía tras 1 mes de cocultivo, pudiendo encontrarse entonces un elevado número de melanomacrófagos [Fig. 107]. A partir de este momento el tamaño de las colonias aumentaba y podían observarse colonias mixtas que contenían eritrocitos y células de aspecto mieloide [Fig. 108]. Estas colonias permanecieron hasta los tres meses de cocultivo [Fig. 109], momento a partir del cual su número fue descendiendo.

A los 5 meses, mediante un proceso semejante al descrito para la línea TPS cultivada con medio suplementado con suero de caballo, suero fetal bovino e hidrocortisona (apartado 3), se observó el desarrollo en los cocultivos de estructuras vasculares, que se disponían entre las multicapas de células del estroma [Fig. 110] y en el plano localizado por encima de éstas [Figs. 111-113]. Sobre las células del estroma se observaron eritrocitos [Fig. 112], células de aspecto mieloide, [Figs. 110-113] y linfoide [Fig. 112] libres, así como pequeñas y grandes colonias hematopoyéticas. Estas colonias estaban formadas o bien por melanomacrófagos y

células de aspecto mielóide [Fig. 112] o por melanomacrófagos, células de aspecto mielóide y eritrocitos [Figs. 111, 113] y, generalmente, se encontraban asociadas a las estructuras vasculares [Fig. 113]. A los once meses de cocultivo las colonias asociadas a las estructuras vasculares contenían principalmente eritrocitos [Fig. 114].

A microscopía electrónica se observaba una multicapa formada por células fibroblásticas y epitelioideas [Figs. 115-117], entre las que era frecuente observar haces de fibras semejantes a colágeno [Figs. 115, 118]. Además, se encontraron numerosos melanomacrófagos [Figs. 117, 119], mieloblastos [Figs. 117, 120], linfocitos [Fig. 121], mielocitos [Fig. 122] y macrófagos [Fig. 122].

Cuando cesó la actividad hematopoyética la morfología de las células de estos cocultivos era similar a la observada en la línea celular TPS incubada con el medio de cultivo E (apartado 3) [Fig. 123].

### **7.3.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2.**

A los 14 días de incubación se observaban numerosos eritrocitos y células de aspecto mielóide dispuestas sobre las monocapas RTG-2 [Fig. 124]. A los 21 días aparecían pequeñas colonias que formaban empedrados [Fig. 125]. Esta situación se mantenía a los 33 días de cocultivo, pero estas áreas eran difícilmente observables a los 48 días de cultivo [Fig. 126].

## **8.- EVOLUCIÓN DE LOS COCULTIVOS INCUBADOS CON EL MEDIO DE CULTIVO F (suplementado con complejos cortisol- -ciclodextrina).**

### **8.1.- Determinación de las concentraciones óptimas de cortisol- -ciclodextrina en el medio de cultivo.**

Los complejos cortisol- -ciclodextrina se utilizaron como suplemento del medio de cultivo MCP, B (con un 2.5% de suero de trucha) y de una modificación del MCP que no contenía suero alógeno. El rango de concentraciones finales ensayadas fue desde  $10^{-8}$  M hasta  $10^{-11}$  M. A los 10 días de incubación todos los cultivos suplementados con las concentraciones desde  $10^{-8}$  M hasta  $10^{-9}$  M habían muerto. A los 17 días de cultivo las células cultivadas sin suero de trucha también habían muerto. Tras un mes de cultivo los mejores

resultados, en cuanto a proliferación y viabilidad celular, se obtuvieron con el medio de cultivo MCP y las concentraciones comprendidas entre  $10^{-10}$  M y  $10^{-11}$  M. Se eligió la concentración final de trabajo de  $10^{-10}$  M.

### **8.2.- Cocultivos realizados sobre la línea celular TPS.**

A los 14 días de cocultivo se observaban eritrocitos libres y células hematopoyéticas dispersas dispuestas sobre o entre las células del estroma [Fig. 127]. A los 21 de cultivo aparecían células oscuras formando pequeñas áreas en empedrado y dispuestas próximas a acumulaciones de melanomacrófagos [Fig. 128]. Al cabo de un mes de cocultivo el número de melanomacrófagos era muy abundante [Figs. 129, 130] y entre la multicapa de células del estroma se apreciaban células hematopoyéticas libres [Fig. 131] o formando pequeñas colonias con aspecto de empedrado que contenían eritrocitos [Figs. 129, 130]. El tamaño de estas colonias fue aumentando progresivamente [Fig. 132] y se mantuvieron durante el tiempo que duró el experimento (4 meses).

En estos cultivos las células fibroblásticas y epitelioides presentaban las mismas características ultraestructurales que las de las células descritas en la línea celular TPS [Figs. 133, 134], y entre ellas se disponía un elevado número de melanomacrófagos [Fig. 134], células linfoides [Fig. 135] y granulocitos [Fig. 136].

### **8.3.- Cocultivos realizados sobre la línea celular RTG-2.**

A los 14 días de incubación se observaban numerosos eritrocitos y células de aspecto mieloide dispuestos sobre las monocapas de células adherentes [Fig. 137] y a los 21 días de cocultivo se apreciaban células oscuras entre las multicapas [Fig. 138]. La hematopoyesis comenzaba a cesar a los 33 días de incubación [Fig. 139] y a los 48 días los cocultivos dejaron de ser hematopoyéticamente activos.

## **9.- CULTIVOS EN MEDIO SEMISÓLIDO.**

Los cultivos en medio semisólido, tanto en coágulos de fibrinógeno-trombina como en agar, que contenían únicamente células sanguíneas aisladas de sangre periférica (PBLs) o de riñón, no desarrollaron hematopoyesis en ninguna de las condiciones empleadas. Sin

embargo, en los ensayos de cocultivo con la línea TPS y células sanguíneas, sobre coágulos de fibrinógeno-trombina, se obtuvieron resultados positivos cuando se utilizaron los medios suplementados G (con suero de truchas anémicas) y H (con medio condicionado de macrófagos).

Los leucocitos de sangre periférica de truchas incubados con el medio de cultivo G y sin la línea celular TPS sólo sobrevivieron 3 días en cultivo. Cuando se cultivaron los PBLs sobre la línea celular TPS, a los 8 días de cultivo se observaban grupos formados por 12-24 células [Fig. 140] que, en ocasiones, contenían eritrocitos [Fig. 141], asociadas a grupos de células TPS estrelladas. Dichos grupos desaparecían en los siguientes días de cultivo y eran reemplazados por nuevos clones. A los 13 días de cultivo las células TPS llenaban el cultivo, los eritrocitos habían desaparecido y se observaban colonias formadas por células de aspecto linfoide [Fig. 142, 143] que se mantuvieron hasta los 20 días [Fig. 144].

Los leucocitos incubados con el medio de cultivo H y sin la línea celular TPS permanecieron viables durante ocho días en cultivo [Fig. 145]. Los cocultivos TPS-PBLs presentaban a los 13 días de incubación leucocitos libres y pequeños grupos formados por células de aspecto linfoide [Fig. 146], que se mantuvieron hasta los 20 días [Fig. 147], dispuestos entre la trama de células TPS.



## DISCUSIÓN

Con el fin de desarrollar métodos que permitan analizar la hematopoyesis de teleósteos, en este trabajo hemos obtenido una línea celular a partir del pronefros de trucha arco iris, a la que hemos denominado TPS (trout pronephric stroma), capaz de soportar hematopoyesis inducida *in vitro*. La línea celular TPS está formada por células fibroblásticas, epitelioides y gigantes y, en determinadas condiciones de cultivo, exhibe procesos de angiogénesis, por lo que parece contener los elementos del microambiente hematopoyético del pronefros necesarios para alojar a las células hematopoyéticas madre, así como para permitir su proliferación y diferenciación. Hemos determinado las principales propiedades de la línea celular, incluyendo sus características estructurales, citogenéticas y condiciones de mantenimiento. La línea celular es susceptible a los virus de la septicemia hemorrágica viral (VHS) y de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN). Además, hemos desarrollado un método de cocultivo con suspensiones alogénicas de pronefros para la inducción de hematopoyesis *in vitro*, con el cual hemos demostrado que la línea celular TPS es capaz de soportar mielo- y linfopoyesis y, bajo determinadas condiciones de cultivo, también eritropoyesis.

A continuación, discutiremos los resultados obtenidos considerando los siguientes apartados: 1) Obtención y mantenimiento de la línea celular TPS; 2) Caracterización de la línea celular TPS; 3) Capacidades hematopoyéticas de los cocultivos de la línea celular TPS con suspensiones alogénicas de pronefros y 4) Posibles usos de la línea celular y de las técnicas de obtención de cultivos hematopoyéticos mediante cocultivo.

## 1.- OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR TPS.

Aunque existen estudios *in vitro* en relación con la capacidad inmunológica del pronefros de peces, y se han desarrollado algunas líneas celulares de estroma de riñón (Chen y Kou, 1987; Tung y cols., 1991), no se había puesto especial atención, hasta ahora, en el establecimiento de cultivos a largo plazo de pronefros, que pudieran soportar la hematopoyesis *in vitro*. Recientemente, se han desarrollado cultivos a largo plazo a partir del pronefros (Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993) y del bazo de *O. mykiss* (Ganassin y Bols., 1996) que son capaces de mantener hematopoyesis *in vitro*. A partir de uno de estos cultivos de pronefros a largo plazo, hemos obtenido la línea celular TPS descrita aquí. En los subcultivos sucesivos la línea TPS perdió la capacidad hematopoyética y llegó a estar formada sólo por tipos celulares de estroma, de los que hemos caracterizado poblaciones de células fibroblásticas, epitelioideas y gigantes, distinguibles por su morfología y sus perfiles citoenzimáticos. Estos tipos celulares crecen en cultivo formando multicapas, las cuales se parecen a las encontradas en los cultivos hematopoyéticos a largo plazo de pronefros (Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993). Este tipo de disposición es también similar a la observada en los cultivos a largo plazo de la médula ósea de mamíferos, y las zonas donde las células de estroma cultivadas se organizan tridimensionalmente parecen ser los sitios donde tiene lugar la hematopoyesis (Spooncer y Dexter, 1984).

Dos hechos destacables son que la línea celular TPS es adherente, y que no ha sido posible clonarla. Esto indica una fuerte dependencia del sustrato de las células TPS, como cabría esperar de su naturaleza estromática, y que existen interacciones celulares que son necesarias para el crecimiento de las distintas estirpes de la línea. La explicación de este último hecho debe basarse necesariamente en la naturaleza fibroblástica y endotelial de las poblaciones celulares que forman la línea, como discutiremos en el apartado 2. Sin embargo, es más fácil explicar la dependencia de las células endoteliales de las fibroblásticas que a la inversa, ya que en una gran mayoría de los cultivos animales los fibroblastos llegan a formar la totalidad de la población de líneas celulares obtenidas a partir de cultivos primarios (Freshney, 1987).

### 1.1.- Medios de cultivo.

En este estudio utilizamos un medio de cultivo que contenía RPMI-1640 como medio base, que fue suplementado con un agente tamponante (Hepes), 2-Mercaptoetanol (2-ME), y sueros heterólogos, fetal y opcionalmente, de caballo, y/o cortisol. Aunque para el establecimiento de cultivos celulares de órganos hematopoyéticos y linfoides de peces se han utilizado una amplia variedad de medios de cultivo [Tabla I], nosotros elegimos el RPMI-1640 como componente base del medio de cultivo porque ha sido empleado en diversos ensayos *in vitro* tanto en mamíferos (Mishell y Dutton, 1967) como en peces (Miller y Clem, 1984; Bayne, 1986; Thuvander y cols., 1987; Koumans-van Diepen y cols, 1994a,b; Verburg-van Kemenade y cols., 1994). Con respecto a los cultivos hematopoyéticos, este medio ha sido utilizado en la iniciación y mantenimiento de cultivos a largo plazo de médula ósea de ratón (Whitlock y Witte, 1987) y en la obtención de agregados celulares de médula ósea de ratón que son capaces de desarrollar cultivos de tipo “Whitlock-Witte” (Funk y Witte, 1992; Funk y cols., 1994). Además, su utilización en mamíferos ha comprendido el desarrollo de líneas celulares murinas que soportan linfopoyesis (Whitlock y Müller-Sierburg, 1990; Henderson y cols., 1990), el cultivo de distintos tipos de linfocitos -células asesinas activadas por linfoquinas (LAK) (Grimm y cols., 1982; Hartwig y Körner, 1990), linfocitos que infiltran tumores (TIL) (Rosenberg y cols., 1988) y células asesinas naturales (NK) (Cannarile y cols., 1992; Pollack y cols, 1992; Rabinowich y cols., 1992; Sitnicka y Hansson, 1992).

En peces, el RPMI-1640 se ha utilizado en el establecimiento de cultivos hematopoyéticos a largo plazo del pronefros (Diago y cols., 1993; Flaño, 1996) y del bazo de trucha arco iris (Flaño, 1996), en ensayos clonogénicos en agar de granulocitos del pronefros de carpa (Moritomo y cols., 1993; Moritomo y Watanabe, 1994) y de colonias de blastos del pronefros de trucha arco iris en coágulos de fibrinógeno-trombina (Estepa y Coll, 1993). Además, Miller y cols. (comunicación personal) han utilizado este medio para el establecimiento de cultivos inmortalizados de leucocitos (linfocitos y macrófagos) de pez gato, *Ictalurus punctatus*.

Por otra parte, el RPMI-1640 ha sido también utilizado en nuestro laboratorio para establecer y mantener cultivos primarios de branquias y tegumento de trucha arco iris, así como para estudios de patología *in vitro* (Flaño, 1996).

Con respecto a los distintos suplementos del medio, la utilización de HEPES permite mantener los cultivos en una atmósfera de aire (0,03% de CO<sub>2</sub>), ya que se ha propuesto que las altas concentraciones de dióxido de carbono (5% aprox.), habituales en los cultivos de mamíferos, son inhibitorias para la iniciación y mantenimiento de cultivos celulares en peces (Wolf y Quimby, 1969). El HEPES ha sido utilizado en el establecimiento de cultivos primarios de hepatocitos de trucha arco iris (Kocal y cols., 1988) y en los cultivos de colonias de blastos del pronefros de trucha arco iris en coágulos de fibrinógeno-trombina (Estepa y Coll, 1993). Aunque en algunos casos se ha descrito que este agente tamponante produce vacuolización celular (Bowers y Dahm, 1993), en nuestros cultivos no hemos observado este proceso, posiblemente debido al empleo simultáneo de suero en el medio, como proponen Bowers y Dahm, (1993) para el establecimiento de cultivos celulares en mamíferos.

El 2-Mercaptoetanol (2-ME) es uno de los componentes del medio de cultivo de los LTBM de tipo "Whitlock" (Whitlock y Witte, 1987) y parece ser esencial para el mantenimiento de la viabilidad en la línea celular AC6.21 obtenida a partir de LTBM de ratón y que soporta linfopoyesis (Whitlock y Müller-Sieburg, 1990). Por otra parte, en ensayos clonogénicos se ha demostrado que el 2-ME favorece la formación de colonias mieloides (Johnson y Metcalf, 1977), células progenitoras pluripotentes y megacariocitos humanos (Katahira y Mizoguchi, 1987). El 2-ME es un antioxidante que evita el efecto nocivo de las altas concentraciones de oxígeno en cultivo (Lin y Hsu, 1986; Katahira y Mizoguchi, 1987; Ishikawa e Ito, 1988) e incrementa la proliferación celular (Lin y Hsu, 1986). Sin embargo, su mecanismo de acción no está muy claro. Algunos autores han demostrado que su adición al medio de cultivo es necesaria para la inducción de la actividad asesina activada por IL-2 (actividad LAK) en esplenocitos murinos (Kuppen y cols., 1991), mientras que otros autores, trabajando con células mononucleares de sangre periférica bovina, encuentran que el 2-ME aumenta de manera dosis dependiente la producción de anticuerpos frente a coronavirus bovinos e incrementa la producción de interferón por estas células (Larsson y cols., 1992).

Además, se ha descrito que el 2-ME aumenta la proliferación de linfocitos de sangre periférica de ratón (Fidelus y Tsan, 1986) y su efecto parece estar mediado, en parte, por su capacidad para incrementar el transporte de cistina en estas células (Ohomori y Yamamoto, 1983).

Con respecto a los sueros, los cultivos primarios a partir de los cuales se obtuvo la línea celular TPS fueron iniciados utilizando un 10% de suero alogénico no descomplementado tanto fresco como congelado y luego las células TPS crecieron indistintamente con el 5% o el 2,5% de suero de trucha. Posteriormente, comprobamos que el suero alogénico podía ser sustituido por suero de caballo e hidrocortisona 21-hemisuccinato.

En nuestro medio de cultivo el suplemento de suero alogénico procedía de una mezcla de sueros y/o plasma almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y no hemos observado efectos tóxicos sobre las células TPS. El plasma y el suero alogénico, descomplementados o no, han sido empleados en casi todos los sistemas de cultivos celulares en peces. Su utilización ha sido mencionada en algunos casos como necesaria, mientras que otros autores han descrito un efecto tóxico, dependiendo de su preparación (Collodi y Barnes 1990; de Koning y Kaattari, 1991, 1992; Pärt y cols., 1993). El suero alogénico no descomplementado ha sido empleado satisfactoriamente por Kocal y cols., (1988) para el cultivo de hepatocitos de trucha en placas recubiertas con colágeno y estos autores describen que favorece la unión al sustrato y la expansión de las células, y por Flaño, (1996) en cultivos de branquia y tegumento. Además, ha sido empleado en ensayos clonogénicos en agar (Moritomo y cols., 1993; Moritomo y Watanabe, 1994) o en coágulos de fibrinógeno-trombina (Estepa y Coll, 1993).

La utilización de suero bovino fetal es común en la mayoría de los medios de cultivos de la médula ósea de mamíferos (Tavassoli y Takahashi, 1982; Spooncer y Dexter, 1984; Whitlock y cols., 1987; Whitlock y Witte, 1987; Itoh y cols., 1989). En salmónidos ha sido utilizado como suplemento del medio de cultivo de leucocitos (Blaxhall, 1985; Tillit y cols., 1988), pero en ensayos de estimulación mitogénica o antigénica no parece proporcionar, por sí mismo, las condiciones óptimas para una máxima respuesta de leucocitos (Etlinger y cols., 1976; Tillit y cols., 1988; de Koning y Kaattari, 1992). Además, se ha utilizado en el establecimiento de cultivos de linfocitos aislados de sangre periférica de carpa (Faisal y Ahne,

1990), de cultivos a largo plazo de pronefros (Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993), y bazo (Flaño, 1996; Ganassin y Bols., 1996), así como de branquias (Pärt y cols., 1993; Flaño, 1996) y tegumento (Flaño, 1996) de trucha arco iris, de branquias de *D. labrax* (Avella y cols., 1994), y en el establecimiento de distintas líneas celulares de peces (Nicholson y Byrne, 1973; Ellender y cols., 1979; Lannan y cols., 1984; Nicholson y cols., 1987; Komura y cols., 1988; Moritomo y cols., 1990; Tung y cols., 1991; Cheng y cols., 1993; Fernández y cols., 1993a,b).

En nuestro caso, la utilización de una concentración del 10% de FCS para el establecimiento de los cultivos a largo plazo de pronefros y para la obtención de la línea celular TPS fue empleada, además, para seleccionar los tipos celulares presentes, evitando la presencia predominante de macrófagos en los cultivos, ya que esta concentración de suero fetal bovino inhibe la adherencia al plástico de los macrófagos de salmónidos (Secombes, 1990) y de *Limanda limanda* (Field y cols., 1995).

El resultado más destacable, en lo referido a los medios de cultivo, es que la línea celular TPS es capaz de crecer en medio carente de suero alogénico cuando es suplementado con 10 % de FCS, 10% de suero de caballo y hidrocortisona 21-hemisuccinato. Estos tres suplementos han sido empleados conjuntamente para el establecimiento de LTBMCM de ratón (Van den Heuvel y cols., 1988, 1991) y humanos (Gartner y Kaplan, 1980; Koller y cols., 1992), y de líneas celulares de estroma de médula ósea humana (Thalmeier y cols., 1994). Potter y cols., (1981) señalan que el crecimiento óptimo de las células del estroma ocurre cuando se utilizan a partes iguales únicamente el suero de caballo y el FCS (entre el 10-30%).

En nuestros resultados, la hidrocortisona 21-hemisuccinato causa vacuolización celular y un retraso en el crecimiento en la línea celular TPS cuando se utiliza a una concentración final superior a  $10^{-4}$  M. Se eligió la concentración final de trabajo de  $10^{-5}$  M, que coincide con la que rutinariamente se utiliza para el establecimiento de los cultivos a largo plazo de médula ósea de mamíferos (Hasthorpe y cols., 1992). Sin embargo, el corticosteroide principal de trucha es el cortisol (17-hidroxycorticosterona) (Matty, 1985), por lo que ensayamos la actividad del cortisol, en forma de un preparado comercial de 17-hidrocortisona complejada con  $\alpha$ -ciclodextrinas. Esta forma de suplemento de cortisol es mucho más activa que la hidrocortisona 21-hemisuccinato, y aparentemente que el cortisol endógeno, obtenido a partir

de suero de truchas estresadas, cuando se utiliza como suplemento en los cocultivos TPS-pronefros. Así, el complejo cortisol-  $\alpha$ -ciclodextrinas provoca un efecto tóxico sobre la línea celular cuando se utiliza a concentraciones finales superiores a  $10^{-9}$  M. Esto podría ser debido a que las  $\alpha$ -ciclodextrinas favorecen la solubilidad en soluciones acuosas de los compuestos liposolubles y mejoran la biodisponibilidad de estos compuestos, o bien a un efecto tóxico de las ciclodextrinas sobre las células de la línea celular. Esta última posibilidad podría también explicar, al menos en parte, las diferencias encontradas entre las capacidades hematopoyéticas de los cocultivos TPS-pronefros suplementados con cortisol endógeno o con el complejo cortisol-  $\alpha$ -ciclodextrinas.

En la línea celular TPS incubada con el medio de cultivo que contenía suero de caballo e hidrocortisona 21-hemisuccinato se observó una mayor adherencia de las células al plástico y un efecto tardío, que se ponía de manifiesto a partir de los cuatro meses de cultivo, y que consistía en un cambio en la morfología celular de manera que las células adoptaban mayoritariamente una morfología epitelial. Estos hechos podrían ser debidos por tanto a la presencia de algún componente en el suero de caballo o bien a la hidrocortisona. En este sentido, se ha indicado que la hidrocortisona facilita el establecimiento de las capas adherentes en los LTBMCMieloides de médula ósea murina (Dexter y cols., 1984), e incrementa la adherencia al plástico de cultivo, expansión y proliferación de los fibroblastos en los LTBMChumanos (Hoshi y cols., 1982). Igualmente, en peces, el cortisol (17-hidroxycorticosterona) altera la morfología de las células RTG-2 (Lee y cols., 1986; Lee y Bols., 1989) e incrementa el metabolismo de la fibronectina y su liberación al medio de cultivo y este medio condicionado con fibronectina y libre de suero, favorece la adherencia de las células RTG-2 a placas bacteriológicas (Lee y Bols., 1991). Además, se ha comprobado que el cortisol incrementa la adhesividad de las células RTG-2 al plástico de cultivo, retrasa su entrada en la fase S y disminuye la densidad celular a la cual se inhibe la proliferación celular (Lee y cols., 1986; Lee y Bols., 1989).

Por otra parte, el cortisol no parece promover la lipogénesis en la línea celular TPS, a diferencia de lo que ocurre en los LTBMChumanos tanto de ratón como de humanos (Greenberger, 1978; Greenberger, 1979; Spooncer y Dexter, 1984). La acumulación de grasa en la línea

celular TPS parece estar relacionada con el tiempo de permanencia de las células en un mismo frasco de cultivo. Así, las células que son mantenidas durante periodos largos de tiempo en el mismo frasco acumulan grasa, mientras que las células que son subcultivadas rutinariamente apenas almacenan lípidos. Este hecho fue también observado en todos los cocultivos (donde las células se mantienen en el mismo frasco durante largos periodos de tiempo) e independientemente del medio de cultivo utilizado. Este mismo proceso ha sido descrito en los LT BMC humanos (Touw y Löwenberg 1983) y de ratones  $W^x/W^v$  reconstituidos intraplacentariamente (Perkins y Fleichman, 1988) en los que el número de adipocitos se incrementa con la edad del cultivo y a medida que disminuye la actividad hematopoyética.

## **2.- CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR TPS.**

A continuación discutiremos el posible origen y significado de las poblaciones celulares que forman la línea celular TPS.

### **2.1.- Células fibroblásticas.**

Las células fibroblásticas mostraban una morfología y características ultraestructurales semejantes a las de las células reticulares fibroblásticas y las células fibroblásticas, descritas respectivamente por Allen (1981) y Xu y cols. (1983) en cultivos de médula ósea de mamíferos, así como a las de las células reticulares del pronefros de trucha (Castillo, 1991), y de médula ósea de aves (Yoshida y Yumoto, 1987; Fonfría, 1992) y de mamífero (Westen y Bainton, 1979). Por otra parte, las células fibroblásticas de la línea celular TPS presentaban un fenotipo AKPH y ACPH negativo y ANAE débilmente positivo (Tabla III). Este perfil citoenzimático es similar, en cuanto a la expresión de las actividades AKPH y ANAE, al encontrado para este mismo tipo celular en los cultivos a largo plazo de pronefros (Diago y cols., 1993) sin embargo, en la línea celular TPS se pierde también la actividad fosfatasa ácida. Así, este perfil difiere del de las células reticulares fibroblásticas del pronefros (AKPH positivas), de las cuales podrían proceder.

Si se asume como probable ese origen para las células fibroblásticas de la línea celular TPS, la pérdida de la actividad fosfatasa alcalina podría explicarse, por la interrupción de las

interacciones entre las células del estroma y los elementos hematopoyéticos, al no existir en esta línea hematopoyesis, o bien por el estado de diferenciación de estas células. Así, la fosfatasa alcalina es un marcador enzimático de células reticulares del pronefros de trucha (Castillo y cols., 1987), de la médula ósea hematopoyética de mamíferos (Westen y Bainton, 1979) y de aves (Yoshida y Yumoto, 1987) y está también presente en las células fibroblásticas de los LTBM de mamíferos (Dexter y cols., 1977), donde esta actividad se ha relacionado con la actividad granulocítica (Wilson y cols., 1981; Tavassoli y Friedenstein, 1983; Gualtieri y cols., 1984; Broudy y cols., 1986; Liesveld y cols., 1989) y con actividades secretoras de las células fibroblásticas, bien de elementos de la matriz extracelular (sustancia fundamental y fibras conjuntivas), o de factores hematopoyéticos liberados por estas células (Song y cols., 1985; Dorshkind, 1987; Liesveld y cols., 1989).

Por otra parte, en ensayos clonogénicos a corto plazo de células del estroma (CFU-f) y en los cultivos a largo plazo de hígado fetal, hígado adulto y médula ósea neonatal y de ratón adulto se ha descrito la presencia de células similares a fibroblastos que forman una población heterogénea de células AKPH positivas y negativas (Van den Heuvel y cols., 1991). Estos autores sostienen que la AKPH está inversamente relacionada con la capacidad de proliferación de las células del estroma, más que con la actividad hematopoyética de estos cultivos y posiblemente con su estado de diferenciación puesto que la AKPH no está presente en las CFU-f de hígado fetal y sí en los cultivos a largo plazo. Otros autores han puesto de manifiesto la heterogeneidad existente en cuanto a la expresión de la actividad fosfatasa alcalina, así en los LTBM de ratón aproximadamente las dos terceras partes de las colonias de fibroblastos son fosfatasa alcalina positivos, mientras que en los LTBM de cobayas y humanos el componente principal de la capa de células adherentes son fibroblastos (Friendstein y cols., 1974; Andreoni y cols., 1992) capaces de producir colágenos de tipo I y III así como fibronectina (Bentley, 1982) y que presentan una baja actividad fosfatasa alcalina (Ploemacher y cols., 1984).

El posible origen reticular de las células fibroblásticas de la línea TPS se apoya también en la similitud, a nivel ultraestructural, entre ellas y las de médula ósea de mamíferos (Weiss, 1981, 1988), y del pronefros de peces (Castillo, 1991). Es especialmente interesante, en este

tipo celular, el desarrollo de los orgánulos secretores y el hecho de que estas células aparezcan asociadas con material amorfo y fibrilar depositado extracelularmente. La morfología del material fibrilar se asemeja a la de las fibras de reticulina, sugiriendo así que la línea celular TPS es capaz de liberar componentes de la matriz del tejido conectivo. Este hecho también se ha observado en los cultivos hematopoyéticos a largo plazo del pronefros (Diago y cols., 1993) y en los LT BMC de médula ósea de mamíferos donde los colágenos tipo I y III son producidos por fibroblastos (Bentley, 1982). Sin embargo, las inmunodetecciones para los tipos de colágeno I y III en los cultivos TPS fueron negativas, lo cual puede indicar que las fibras semejantes a colágeno no son de esos tipos o que, alternativamente, *in vitro* existe una síntesis defectiva de colágeno, que da lugar a la pérdida de sus propiedades antigénicas.

## **2.2.- Células epitelioides y células gigantes.**

Ultraestructuralmente estos dos tipos celulares contienen núcleos lobulados y eucromáticos y un citoplasma con aparato de Golgi muy desarrollado, cisternas de RER y REL, abundantes haces de microfilamentos y vesículas electrolúcidas a veces con contenido heterogéneo. Citoquímicamente, las células epitelioides y las células gigantes muestran fenotipos similares, aunque las últimas presentan una mayor actividad ANAE.

La presencia de células gigantes multinucleadas ha sido descrita en los cultivos a largo plazo del pronefros de trucha arco iris (Siegl y cols., 1993), y este hecho ha sido relacionado con la capacidad de los macrófagos para fusionarse en cultivo (Secombes, 1985). Sin embargo, nosotros no hemos observado fusión de células epitelioides en los cultivos TPS y aunque las células gigantes y epitelioides muestran actividad ANAE, un marcador enzimático de macrófagos de trucha (Razquin y cols., 1990), no hay ni melanomacrófagos ni típicos macrófagos, ni tampoco actividad fagocítica remarcable en la línea celular TPS. Teniendo en cuenta estas observaciones, pensamos que las células gigantes podrían diferenciarse a partir de las células epitelioides.

Las características citoenzimáticas y ultraestructurales de las células epitelioides de la línea celular TPS, son similares a las de las células epitelioides de los cultivos a largo plazo de pronefros (Diago y cols., 1993), y coinciden con las descritas *in situ* para las células limitantes de los sinusoides, tanto del tejido linfohematopoyético renal de trucha arco iris (Castillo,

1991) como de la médula ósea de mamíferos (Westen y Bainton, 1979; Yoshida y Yumoto, 1987; Hasthorpe y cols., 1992), por lo que, tanto en los cultivos a largo plazo del pronefros (Diago y cols., 1993), como en la línea TPS, las consideramos equivalentes *in vitro* de células sinusoidales. Este hecho está también apoyado por la presencia de angiogénesis en la línea celular (ver apartado 3.3), lo que indica la existencia de precursores endoteliales en la misma.

Diversos estudios realizados *in vitro*, con médula ósea de mamíferos, han puesto de manifiesto la necesidad de distintos tipos de células del estroma, incluyendo las células endoteliales de los sinusoides sanguíneos, para el mantenimiento de la hematopoyesis (Allen y Dexter, 1976). Con respecto a estas últimas, se ha sugerido que este tipo celular parece albergar a las células madre hematopoyéticas (Tavassoli, 1984), y participar en el control de la proliferación y diferenciación de los granulocitos-macrófagos de médula ósea, puesto que son capaces de secretar distintos factores de crecimiento como CSA (actividad estimuladora de colonias) (Bagby y cols., 1986), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) y G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) (Quesenberry y Grimbone, 1980; Zsebo y cols., 1988; Bagby y cols., 1986; Sieff y cols., 1987; Broudy y cols., 1987), IL-1 (Miosecc y cols., 1986; Wagner y cols., 1985), así como IL-8 cuando son cultivadas con histamina (Jeannin y cols., 1994).

La importancia de las células endoteliales también parece manifestarse en nuestros cocultivos, donde las colonias ó células libres de la serie mielopoyética aparecían asociadas a células de aspecto epitelioide. Esta situación parece por tanto similar a la encontrada en los LTBMCM murinos donde se ha descrito que las células "manta" se encuentran siempre asociadas con áreas de granulopoyesis (Tavassoli y Takahashi, 1982;) y en algunos casos de linfopoyesis (Dexter y cols., 1990). Sin embargo, el origen de estas células no está claro, dado que algunos autores proponen un origen fibroblástico (Dexter y cols., 1990), mientras que otros les atribuyen un origen endotelial (Hasthorpe y cols., 1992). Nuestros resultados sugieren que las células epitelioides y gigantes pueden ser equivalentes de las células "manta" de mamíferos y, por tanto, de origen endotelial.

### **2.3.- Características citogenéticas e isoenzimáticas de la línea celular TPS.**

La línea celular TPS permanece citogenéticamente estable a través de los pases de cultivo, como demostró el clásico cariotipo. El tipo y el número modal de cromosomas de la línea celular está en el rango de los valores descritos para trucha arco iris (Thorgaard, 1976; Hartley, 1987). Además, los resultados obtenidos en la tinción selectiva de los organizadores nucleolares están en concordancia con los publicados para el cariotipo diploide normal de trucha arco iris (Phillips e Ihssen, 1985; Lozano y cols., 1992).

El análisis de isoenzimas demostró que el perfil de la isoenzima malato deshidrogenasa (MDH) es adecuado para distinguir las cuatro líneas celulares de peces aquí estudiadas. Además, la línea celular TPS pudo ser diferenciada de la línea BF-2 por las isoenzimas AK, CK, HK, IDH, LDH, 6-PGDH y PGM y de la línea RTG-2 por el perfil de los isoenzimas CK, IDH y PGM. Las otras siete enzimas ensayadas no fueron adecuadas para diferenciar estas líneas celulares, bien porque no se detectó actividad en la mayoría de ellas o bien porque mostraron perfiles isoenzimáticos difusos.

### **2.4.- Cinética de crecimiento.**

El crecimiento a diferentes temperaturas de incubación fue evaluado en varios experimentos para determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento. Al igual que otras líneas celulares de salmónidos (Gravell y Malsberger, 1965; Wolf y Quimby, 1969; Bruce y Byrne, 1973), las células TPS son capaces de crecer en el rango de temperaturas de 4°C a 22°C, con un máximo de crecimiento de 18°C a 22°C. La determinación de la proporción de síntesis de DNA mediante incorporación de <sup>3</sup>H-timidina demostró que a lo largo del experimento permanecía una cierta actividad residual detectable, la cual probablemente sea debida a 1) la capacidad de las células para crecer en multicapas, y 2) el reemplazamiento de células muertas.

## **3.- CAPACIDADES HEMATOPOYÉTICAS DE LA LÍNEA CELULAR TPS.**

Uno de los principales objetivos de esta tesis era obtener líneas celulares del estroma del pronefros, que puedan ser utilizadas para definir factores del microambiente hematopoyético

en trucha. Tal como hemos expuesto anteriormente, la línea celular TPS contiene los principales tipos celulares del estroma del pronefros de trucha. Sin embargo era necesario demostrar si dicha línea celular era capaz de soportar hematopoyesis. Para ello realizamos distintas experiencias de inducción de hematopoyesis, mediante cocultivos de células TPS y suspensiones celulares del pronefros, o de leucocitos circulantes, en distintas condiciones. Además, los resultados se compararon con los obtenidos utilizando otra línea celular de trucha, obtenida a partir de un órgano no hematopoyético, como es la línea RTG-2, que podría actuar como capa de soporte para el establecimiento de cultivos hematopoyéticos.

El método más efectivo para inducir hematopoyesis en la línea celular TPS fue el establecimiento de cocultivos con suspensiones alogénicas de pronefros. Este sistema ha sido empleado también en mamíferos por Kodama y cols., (1984), quienes realizan este tipo de cocultivos sobre la línea celular preadiposa MC3T3-G2/PA6 y consiguen que estas células soporten el crecimiento *in vitro* de células madre hematopoyéticas (CFU-S). Por otra parte, el sistema de recarga con un nuevo inóculo de médula ósea ha sido también empleado en los cultivos a largo plazo hematopoyéticos de médula ósea de ratón (Tavassoli, 1982; Tavassoli y Takahashi, 1982; Heard y cols., 1982; Spooncer y Dexter, 1984; Johnson y Dorshkind, 1986; Collins y Dorshkind, 1987; Van den Heuvel y cols., 1991; Pollack y cols., 1992; Spooncer y cols., 1993), del primate *Tupaia glis* (Moore y cols., 1979) y de humanos (Touw y Löwenberg, 1983).

Sin embargo, la capacidad de la línea celular TPS para soportar hematopoyesis no se puso de manifiesto cuando esta línea se inoculó con leucocitos de pronefros previamente separados en Lymphoprep. Por tanto, parece posible que o bien el proceso de separación en gradiente discontinuo no sea útil para separar precursores hematopoyéticos y/o que sean necesarios otros tipos celulares, procedentes de la suspensión celular del pronefros, complementarios a los de la línea celular para permitir la hematopoyesis. Aunque en mamíferos existen métodos para purificar y caracterizar precursores hematopoyéticos, utilizando técnicas de separación celular por FACS y marcadores como la aglutinina de germen de trigo fluoresceinada y (Visser y cols., 1984; Vries y cols., 1988; Ploemacher y cols., 1993) una diversa gama de anticuerpos monoclonales (Fritsch y cols., 1991; McCarthy

y cols., 1985, 1987; Müller-Sieburg y cols., 1986; Spangrude y cols., 1988; Spangrude y Johnson, 1990; Ogata y cols., 1992; Knapp y cols., 1995), estas técnicas no han sido aplicadas en peces.

Con el fin de comprobar si las separaciones de células sanguíneas en gradientes de Lymphoprep contenían precursores hematopoyéticos, realizamos ensayos clonogénicos en medio semisólido de agarosa. Este sistema de cultivo en agarosa ha sido utilizado para obtener colonias de linfocitos y linfoblastos a partir de linfocitos de sangre periférica de trucha arco iris (Finegan y Mulcahy, 1987) o de carpa (Caspi y cols., 1982), así como para la obtención de colonias de blastos y granulocitos a partir de riñón de carpa (Moritomo y cols., 1993; Moritomo y Watanabe, 1994). Sin embargo, las diversas combinaciones de separación de células de pronefros, de PBLs, así como de suspensiones leucocitarias no fraccionadas, dieron resultados negativos con cualquiera de los suplementos del medio, bien con sobrenadante de PBLs previamente estimulados con Con A y LPS (como una fuente de citoquinas) o con medios condicionados de la línea celular TPS. Por tanto, en nuestras manos, los cultivos en agarosa no permiten la inducción de hematopoyesis *in vitro* en trucha arco iris.

Como una alternativa a lo anterior, intentamos inducir hematopoyesis en coágulos de fibrinógeno-trombina utilizando la línea celular TPS como soporte. Estos ensayos demostraron que cuando se cocultivaron PBLs, separados en Lymphoprep, con la línea celular TPS era posible obtener pequeñas colonias hematopoyéticas de aspecto linfoide, tanto con el medio de cultivo G (suero de truchas anémicas) como con el H (medio condicionado de macrófagos de trucha). Esto parece indicar que el Lymphoprep separa algunas células hematopoyéticas, aunque en número muy bajo y, probablemente, con capacidad proliferativa restringida, y que la presencia de las células TPS alarga el periodo de supervivencia de las colonias hematopoyéticas.

### **3.1.- Características de la hematopoyesis.**

Los cocultivos TPS-pronefros son capaces de soportar granulopoyesis, linfopoyesis y eritropoyesis, pero sin embargo, el inicio de la hematopoyesis en los cocultivos se produce de manera explosiva, a diferencia de lo que ocurre en los cultivos a largo plazo iniciados a partir de explantes de pronefros de trucha (Diago y cols., 1993). Por tanto, la línea celular TPS

parece funcionar como una capa de soporte ("feeder layer"). Tras la inoculación de los cultivos de TPS con la suspensión celular del pronefros, el primer cambio de medio se realizó entre los 7-10 días para facilitar la adhesión de los precursores hematopoyéticos, como se ha indicado en mamíferos (Moreau y cols., 1992). A partir de este momento, la producción de células sanguíneas era tan elevada que era necesario renovar completamente el medio cada 3-4 días.

Además, los cocultivos TPS-pronefros mantuvieron la actividad hematopoyética hasta 16 meses, lo que indica la presencia de una población de células hematopoyéticas con capacidad autorregenerativa. Tanto el inicio temprano de la hematopoyesis, como su prolongación en el tiempo indican que las células TPS permiten el alojamiento y proliferación de las células hematopoyéticas, aunque no podemos asegurar que la línea TPS sea capaz de mantener por sí sola células madre hematopoyéticas. Así, es posible que las células del estroma procedentes del inóculo del pronefros establezcan, posteriormente, un cultivo a largo plazo, como los que hemos descrito previamente (Diago y cols., 1993).

Por otra parte, una diferencia importante observada en cuanto a la duración de la hematopoyesis en los cocultivos TPS-pronefros, se refiere a la utilización de pases jóvenes o avanzados de la línea celular TPS, siendo estos últimos menos efectivos que los primeros. En mamíferos se ha observado también este fenómeno, y se han apuntado dos causas principales: 1) La selección de las poblaciones celulares que proliferan más rápidamente a través de los sucesivos pases de la línea (Naughton y Naughton, 1988; Naughton y cols., 1994); 2) El envejecimiento de los microambientes creados por las células adherentes y la menor capacidad de éstas para renovar los microambientes originales (Moore y Sheridan, 1979; Moore y cols., 1979).

En los cocultivos TPS-pronefros se produce eritropoyesis, mielopoyesis y linfopoyesis simultáneamente, sin que hayamos observado una selección hacia cultivos tipo Dexter o Whitlock-Witte en ninguna de las condiciones de cultivo. La existencia de mielopoyesis y linfopoyesis conjunta se ha descrito también en mamíferos, tanto en los cultivos tempranos mieloides de "tipo Dexter" como en los cultivos linfoides tipo "Whitlock-Witte". Así, se ha identificado un precursor de células B en los primeros (Dorshkind y Phillips, 1982;

Dorshkind, 1986) y células mieloides y sus precursores en los últimos, sin embargo estas células son deplecionadas a las pocas semanas de haberse iniciado los cultivos (Dorshkind, 1990), quedando ambos tipos de cultivo restringidos a mielopoyéticos o linfopoyéticos. Johnson y Dorshkind, (1986) indican que las condiciones de cultivo afectan a la fisiología celular y sugieren que la pérdida de la mielopoyesis en los cultivos linfoides se debe a que existen condiciones subóptimas para la supervivencia y diferenciación de las células mieloides, en parte debido al fallo del estroma para producir un microambiente adecuado y factores de crecimiento mieloides. No obstante, estos autores han demostrado que las células del estroma que se cultivan bajo condiciones linfoides o mieloides no están restringidas a soportar linfopoyesis y mielopoyesis respectivamente y así, cuando se varían las condiciones de cultivo *in vitro* los LTBMCL linfoides pueden soportar mielopoyesis (Johnson y Dorshkind, 1986). Igualmente Collins y Dorshkind, (1987) han demostrado que la línea celular S17 obtenida a partir de LTBMCL de ratón es capaz de soportar linfopoyesis B después de la transferencia de condiciones mieloides a linfoides. Por tanto, según nuestros resultados, los cocultivos TPS-pronefros contienen los microambientes celulares y humorales necesarios para mantener mielopoyesis y linfopoyesis, y será necesario definir en un futuro las condiciones de cultivo que permitan obtener cultivos hematopoyéticos de uno u otro tipo.

Un hecho interesante es que en los cocultivos incubados con el medio de cultivo suplementado con hormonas esteroideas se observaba linfopoyesis y pudimos recoger linfocitos en los sobrenadantes. Este hecho contrasta con el descrito en los LTBMCL linfoides de ratón y humanos, en los que la hidrocortisona tiene un efecto tóxico para las células linfoides que están proliferando (Phillips, 1980; Homo-Delarche, 1984; Gisler y cols., 1987). Aunque se ha descrito que el cortisol provoca efectos supresivos en las poblaciones de linfocitos tanto *in vivo* (Pickering, 1984; Anderson y cols., 1982) como *in vitro* (Grimm, 1985), inhibe la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos de salmónidos (Tripp y cols., 1987) y suprime la activación de precursores de células B (Kaattari y Tripp, 1987; Tripp y cols., 1987), estos efectos son observables a concentraciones muy superiores a las que nosotros utilizamos.

Con respecto a la eritropoyesis, en los cocultivos TPS-pronefros, e independientemente del medio de cultivo utilizado, la liberación de eritrocitos al medio se mantiene durante las dos primeras semanas, aunque en las multicapas de células del estroma se observan colonias eritrocíticas durante el primer mes de cocultivo. Esta situación parece ser similar a la observada en los cultivos a largo plazo de "tipo Dexter", donde los eritrocitos se mantienen durante las dos primeras semanas de cultivo, y luego van desapareciendo progresivamente (William y Golde, 1980; Dexter y cols, 1981). William y Golde (1980) atribuyen la escasa duración de la eritropoyesis en los LTBMHC humanos a la ausencia de eritropoyetina. En este sentido, otros autores han descrito que los LTBMHC de ratón sólo llegan a ser eritropoyéticos si se añade al medio de cultivo suero de ratones anémicos o eritropoyetina (Dexter y cols., 1981; Wang y cols., 1995).

Tras un mes de cultivo, sólo se observó el mantenimiento de la eritropoyesis en los cocultivos incubados con medio suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato, donde aparecían colonias mixtas que contenían eritrocitos y que se mantuvieron hasta los once meses de cultivo, aunque en los sobrenadantes únicamente pudieron recogerse eritrocitos durante el primer mes de cocultivo, posiblemente debido a que el número de estas colonias era escaso. Es difícil dar una explicación a la actividad promotora de la hidrocortisona sobre la eritropoyesis en nuestros cocultivos. Podrían apuntarse dos posibles causas: 1) La activación de posibles células secretoras de eritropoyetina que puedan estar bien en la línea TPS o en el inóculo del pronefros, órgano que probablemente aloja a dichas células en los peces; 2) La activación de macrófagos, que parecen estar implicados en la maduración de la línea eritroide tanto *in vivo* (Westen y Bainton, 1979) como *in vitro* (Allen y Dexter, 1984) ya que son capaces de producir eritropoyetina (Rich, 1986), y actividad promotora de "burst eritroides" (BFU-E). Sin embargo en peces no se ha descrito la presencia en el tejido linfohematopoyético renal de islotes eritroblásticos y la posible funcionalidad de las relaciones macrófago-precursores eritropoyéticos es desconocida.

### **3.2.- Comparación TPS-RTG-2.**

Con el fin de averiguar si la línea celular TPS tiene propiedades específicas para soportar la hematopoyesis, o si simplemente actúa como una capa de soporte ("feeder layer")

que facilita el establecimiento de los cultivos primarios del pronefros, comparamos las actividades hematopoyéticas de cocultivos establecidos con esta línea y con una línea celular fibroblástica de trucha de origen no renal: la RTG-2 obtenida a partir de gónadas de trucha arco iris (Wolf y Quimby, 1962). En ambos casos, la hematopoyesis se inició más tempranamente que en los cultivos primarios, pero existen notables diferencias entre ambos tipos de cocultivos en cuanto a la duración de la actividad hematopoyética. En este sentido, las células RTG-2 y el inóculo de células del estroma del pronefros adicionado a estos cocultivos no proporcionan los microambientes adecuados para mantener la proliferación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos durante más de un mes y medio. Por tanto, aunque ambas líneas celulares parecen actuar inicialmente como capas de soporte, sólo la TPS proporciona un microambiente duradero favorable a la hematopoyesis. Esto parece indicar que la línea TPS posee características específicas para soportar hematopoyesis, que van más allá de la simple actividad "feeder-layer".

### **3.3.- Angiogénesis *in vitro*.**

La línea celular TPS y los cocultivos TPS-pronefros exhiben procesos de angiogénesis bajo determinadas condiciones de cultivo, hecho que resulta interesante puesto que es la primera vez que, en peces, se describe la formación *in vitro* de estructuras vasculares, y confirma la presencia de células endoteliales en la línea celular TPS (ver apartado 2.2).

A microscopía óptica, la formación de las estructuras vasculares en la línea celular TPS y los cocultivos TPS-pronefros sigue el patrón de desarrollo propuesto en varios modelos experimentales en los que las células endoteliales, aisladas a partir de distintos tejidos y órganos (córtex adrenal, piel, bazo, tumor ovárico, médula ósea, aorta, músculo y tejido adiposo) y especies (ratón, rata, ternera y humanos) se organizan formando estructuras multicelulares que se asemejan a redes de microvasculatura (Folkman y Haudenschild, 1980, 1982; Nicosia y cols., 1982; Feder y cols., 1983; Montesano y cols., 1985; Mori y cols., 1988, 1989, 1992; Ingber y Folkman, 1989; Battegay y cols., 1994). Tanto en nuestros resultados, como en los de mamíferos (Folkman y Haudenschild, 1980, 1982), la angiogénesis *in vitro* comienza con la formación de "vacuolas" dentro de las células endoteliales que van conectando entre sí y con las de otras células hasta llegar a formar capilares.

Ultraestructuralmente, en los cocultivos TPS-pronefros observamos células gigantes que presentaban grandes vesículas electrolúcidas que parecían llegar a fusionarse entre sí. Estas células se disponían cercanas a estructuras que se asemejaban a sinusoides sanguíneos, por lo que pensamos que las células gigantes podrían estar implicadas en la formación de estas estructuras vasculares. Además, las células que tapizan la luz de estas estructuras presentan las características típicas descritas para las células sinusoidales de teleósteos (Zapata, 1979; Álvarez, 1986; Dannevig y cols., 1994), así como de las endoteliales de los senos de la médula ósea de mamíferos (Weiss, 1988; Mori y cols., 1989). Dichas características comprenden la presencia de abundantes vesículas electrolúcidas, algunas de ellas fusionadas a la membrana plasmática, las uniones intercelulares tipo gap, y la ausencia de membrana basal. Además, en la luz de las estructuras vasculares más grandes pudieron encontrarse células hematopoyéticas maduras, como se ha descrito en cultivos de médula ósea de ratón en geles de colágeno (Mori y cols., 1992).

#### **4.- POSIBLES USOS DE LA LÍNEA CELULAR Y DE LAS TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE CULTIVOS HEMATOPOYÉTICOS MEDIANTE COCULTIVO.**

La facilidad para establecer cultivos hematopoyéticos de trucha utilizando la técnica de cocultivo con la línea celular TPS, que contrasta con los largos periodos necesarios para obtener actividad hematopoyética a partir de cultivos primarios (Diago y cols, 1993; Siegl y cols. 1993), permitirá avanzar más rápidamente en el análisis de los factores y requerimientos necesarios para controlar la hematopoyesis en teleósteos. En este sentido, cabe resaltar que la línea celular TPS puede representar una fuente, fácilmente disponible, de factores humorales (citoquinas) y de otros componentes del microambiente hematopoyético del pronefros, tanto para su análisis fisiológico y bioquímico, como de material genético para caracterizar los genes respectivos. Sin embargo, para facilitar este trabajo, aún se requieren diversos estudios sobre dicha línea, especialmente los referidos a: 1) Determinación de medios sin suero que soporten el crecimiento de la línea y de los cocultivos hematopoyéticos; 2) Caracterización fenotípica más precisa de los componentes celulares de la línea, lo que requiere el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos. Además, en referencia a los cocultivos, será

necesario en el futuro: 1) Desarrollar métodos y herramientas para la caracterización y separación de células madre hematopoyéticas; 2) Establecer una metodología que permita analizar, con técnicas relativamente fáciles de aplicar (como la citometría de flujo), la hematopoyesis *in vitro*; 3) Definir las condiciones para obtener cultivos con producción hematopoyética restringida, semejante a los cultivos tipo Dexter o Whitlock-Witte de mamíferos.

Por otra parte, el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) (de Kinkelin y cols., 1979) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) pueden replicar en numerosas líneas celulares de peces o en leucocitos de truchas (Estepa y Coll, 1991a, b). Sin embargo, hasta ahora no había estudios *in vitro* utilizando cultivos de células de estroma de tejido linfohematopoyético, el cual histológicamente, parece ser una de las principales dianas *in vivo* para ambos rabdovirus (de Kinkelin y cols., 1979). La línea celular TPS es susceptible al VHSV y al IHNV. La tinción citoplasmática de las células de estroma con los anticuerpos monoclonales frente a las proteínas G y N del VHSV, la liberación de partículas víricas a los sobrenadantes, tal como demuestran los ensayos de cultivo celular sobre la línea EPC, y el incremento del antígeno de la nucleoproteína N, tal y como demuestran los ELISA, indican que el virus VHSV puede replicar en las células del estroma de pronefros.

Estos resultados *in vitro* ayudan a explicar las observaciones realizadas *in vivo*, en las cuales se describe la destrucción del tejido intersticial renal durante las enfermedades causadas por VHSV (Yasutake y Rasmussen, 1968; de Kinkelin y cols., 1979; Amlacher y cols., 1980) e IHNV (Amend y Chambers, 1970; Yasutake, 1978). Además, la naturaleza lítica de la línea celular TPS infectada sugiere, que las células de estroma infectadas con rabdovirus no constituyen reservorios virales para la recurrencia de la infección. Puesto que las células TPS son susceptibles a la infección con estos dos rabdovirus y esta propiedad se mantiene a través de los pases de cultivo sucesivos, esta línea celular podría ser utilizada para analizar los mecanismos patogénicos de estos agentes virales, así como para diagnóstico.

## CONCLUSIONES

1.- Hemos desarrollado una nueva línea celular del estroma del pronefros de *Oncorhynchus mykiss*, a la que hemos denominado TPS (trout pronephric stroma).

2.- La línea celular TPS está formada por células fibroblásticas, epitelioides y gigantes. Las células fibroblásticas parecen originarse a partir de las células reticulares del tejido linfohematopoyético renal. Las células epitelioides se asemejan a las células limitantes de los sinusoides renales y dan lugar a las células gigantes. Estas últimas, podrían ser el equivalente de las células “manta” descritas *in vitro* en los cultivos a largo plazo de la médula ósea de mamíferos y consideradas de origen endotelial.

3.- La línea celular TPS crece con medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino y entre un 5 y un 2,5% de suero de trucha. El suero alogénico puede ser sustituido por un 10% de suero de caballo e hidrocortisona 21-hemisuccinato. La temperatura óptima de crecimiento es de 18 a 22°C, con un tiempo de duplicación de la población de 27 h. El número modal de cromosomas de las células TPS es 58. La línea celular TPS puede distinguirse de las líneas celulares de peces BF-2, CHSE-214 y RTG-2 por el perfil isoenzimático de la enzima malato deshidrogenasa (MDH).

4.- Hemos desarrollado una técnica de cocultivos de la línea celular TPS con suspensiones alogénicas de pronefros que permite obtener cultivos hematopoyéticos, que se desarrollan mucho más rápidamente y presentan una mayor producción de células sanguíneas, que los cultivos a largo plazo de pronefros.

5.- Los tipos celulares presentes en la línea celular TPS se organizan formando redes tridimensionales que, junto con la matriz extracelular, parecen proporcionar los microambientes necesarios para el mantenimiento de la hematopoyesis. Esta capacidad parece ser específica de la línea celular TPS, tal y como se demuestra cuando se comparan, en las mismas condiciones de cocultivo, su capacidad hematopoyética y la de la línea celular fibroblástica de salmónidos RTG-2.

6.- La línea celular TPS es capaz de mantener mielo- y linfopoyesis. Además, es capaz de mantener eritropoyesis cuando se cocultiva en medio suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato. Asimismo, el mantenimiento de la actividad hematopoyética durante largos periodos de tiempo, indica la presencia en los cocultivos de una población de células hematopoyéticas con capacidad autorregenerativa.

7.- Hemos descrito, por primera vez en peces, procesos de angiogénesis *in vitro*, que suceden en la línea celular TPS y en los cocultivos TPS-suspensiones alogénicas de pronefros mantenidos con medio de cultivo suplementado con hormonas esteroideas. La formación de estructuras vasculares sigue el patrón de desarrollo descrito *in vitro* en mamíferos.

8.- La línea celular TPS es susceptible a los virus de la septicemia hemorrágica viral (VHS) y de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN). Esto demuestra que el estroma del pronefros es diana para estos patógenos y explica la especial sensibilidad del riñón a estas enfermedades. Además, la disponibilidad de la línea celular TPS, así como la metodología desarrollada en este trabajo para establecer cultivos hematopoyéticos, permitirá el desarrollo futuro de nuevos métodos de estudio de la patogénesis de enfermedades que afectan al sistema hematopoyético de peces.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agius C (1981) Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Dev. Comp. Immunol.*, 5: 597-606
- Agius C (1985) The melano-macrophage centers of fish: a review. En: *Fish Immunology*. MJ Manning y MF Tatner (Eds.) Academic Press. Londres. pp. 85-105
- Ahne W (1977) Persistent infection in CHSE-214 cells with IPN virus isolated from pike (*Esox lucius*). *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 87: 415-416
- Al-Adhami MA y Kunz YW (1976) Haemopoietic centres in the developing angelfish *Pterophyllum scalare* (Curier and Valenciennes). *Wilhelm Roux's Arch.*, 179: 393-401
- Allen TD (1981) Haemopoietic microenvironments *in vitro*: ultrastructural aspects. En: *Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation*. R Porter y J Whelan (Eds.). Ciba Foundation Symposium. Vol. 84. Pitman, Londres. pp. 38-67
- Allen TD y Dexter TM (1976) Cellular interrelationships during *in vitro* granulopoiesis. *Differentiation*, 6: 191-194
- Allen TD y Dexter TM (1984) The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp. Hematol.*, 12: 517-521
- Allen TD, Dexter TM y Simmons PJ (1990) Marrow biology and stem cells. En: *Colony stimulating factors: molecular and cellular biology*. TM Dexter, JM Garland y NG Testa (Eds.). Marcel Dekker. Nueva York. p. 1
- Altman PL y Dittmer DS (1972) *Biology Data Book*, 2nd Ed. Federation of American Societies for Experimental Biology. Vol 1. Bethesda M.D. p. 519
- 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.
- Amend DF y Chambers VC (1970) Morphology of certain viruses of salmonid fishes. II. In vivo studies of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 27: 1385-1388
- Amlacher E, Ude J, Rudolph C y Ernst G (1980) Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and additional histopathological and haematological observations. *J. Fish Dis.*, 3: 55-62
- Anderson DP (1990) Passive hemolytic plaque assay for detecting antibody-producing cells in fish. En: *Techniques in Fish Immunology*. JS Stolen, TC Fletcher, DP Anderson, SL Kaattari, AF Rowley (Eds.). SOS Publications. Fair Haven. USA. pp. 9-13
- Anderson DP, Roberson BS y Dixon OW (1982) Immunosuppression induced by a corticosteroid or an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) administered a *Yersinia ruckeri* bacterin. *Dev. Comp. Immunol.*, 2: 197-204
- Andreoni MI, Caux C, Saeland S y Rigal D (1992) Modification of human long-term bone marrow cultures: establishment of a functional stromal microenvironment devoid of myeloid progenitors. *Eur. J. Immunol.*, 49: 29-35

- Andrew W (1965) Comparative hematology. Grune y Stratton (Ed.) NY y Londres pp. 126-139
- Avella M, Berhaut J y Payan P (1994) Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass *Dicentrarchus labrax*. In Vitro Cell. Dev. Biol., 30A: 41-49
- Babich H y Borefreund E (1987) Fathead minnow FHM cells for use in *in vitro* cytotoxicity assays of aquatic pollutants. Ecotox. Environ. Safety, 14: 1-10
- Babich H, Shopsis C y Borefreund E (1986) *In vitro* cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines. Ecotox. Environ. Safety, 11: 91-99
- Bagby GC, Jr, Dinarello CA, Wallace P, Wagner C, Hefeneider S y McCall E (1986) Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. J. Clin. Invest., 78: 1316-1323
- Bainton DF, Maloney MA, Patt KM y Stern R (1986) Characterization of rabbit stromal fibroblast derived from red and yellow bone marrow. J. Exp. Med., 163: 400-413
- Bancroft JD y Cook HC (1984) Lipids. En: Manual of histological techniques. JD Bancroft y HC Cook (Eds). Churchill Livingstone. Edinburgo, Escocia. pp 129-140
- Bandín I, Ellis AE, Barja JL y Secombes CJ (1993) Interaction between rainbow trout macrophages and *Renibacterium salmoninarum in vitro*. Fish Shellfish Immunol., 3: 25-33.
- Barka T y Anderson PJ (1962) Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem., 10: 741-753
- Barr RD (1988) Hematopoietic stem cells. En: Developmental and neonatal hematology. JA Stockman III y C Pochedly (Eds.) Raven Press. Nueva York. pp. 1-38
- Basurco B y Coll JM (1989) Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus show similar protein size patterns. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 9: 92-95
- Battagay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH y Pech M (1994) PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis *in vitro* via PDGF –receptors. J.Cell Biol., 125: 917-928.
- Bayne CJ (1986) Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: isolation, separation and characterization. Vet. Immunol. Immunopathol., 12: 141-151
- Bentley SA (1981) Close range cell: cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture. Exp. Hematol., 9: 308-312
- Bentley SA (1982) Collagen synthesis by bone marrow stromal cells: A quantitative study. Br. J. Haematol., 50: 491-497.
- Bentley SA y Foidart JM (1980) Some properties of marrow derived adherent cells in tissue culture. Blood, 56: 1006-1016
- Bentley SA y Tralka TS (1983) Fibronectin mediated attachment of hematopoietic cells to stromal elements in continuous bone marrow culture. Exp. Hematol., 11: 129-138
- Bentley SA, Kirby SL, Anklesaria P y Greenberger JS (1988) Bone marrow stromal proteoglycan heterogeneity: phenotypic variability between cell lines and the effects of glucocorticoid. J. Cell Physiol., 136: 182-187
- Bentley SA, Tralka TS, Alabaster O (1981) Phagocytic properties of bone marrow fibroblasts. Exp. Hematol., 9: 313-318
- Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D y Knitter G (1988) Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. J. Clin. Invest., 81: 951-955
- Bertoncello I, Bartelmez SH y Bradley R (1985) Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine-123 fluorescence. Exp. Hematol., 13: 999-1006
- Bertoncello I, Bradley R y Watt SM (1991) An improved negative immunomagnetic selection strategy for the purification of primitive hemopoietic cells from normal bone marrow. Exp. Hematol., 19: 95-100

- Bessis M (1958) L'îlot érythroblastique, unit fonctionnelle de la moelle osseuse. *Rev. Hematol.*, 13: 8-11
- Bessis M y Breton-Gorius J (1962) Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review. *Blood*, 19: 635-663
- Blair JB, Ostrander GK, Miller MR y Hinton DE (1995) Isolation and characterization of biliary cells from rainbow trout liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 31: 778-787
- Blaxhall PC (1985) The separation and cultivation of fish lymphocytes. En: *Fish Immunology*. MJ Manning y MF Tatner (Eds.). Academic Press Inc. Londres. pp. 245-259
- Bols NC, Barlian A, Chirino-Trejo M, Caldwell SJ, Goegan P y Lee LEJ (1994) Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *J. Fish Dis.*, 17: 601-611
- Bols NC, Yang BY, Lee LEJ y Chen TT (1995) Development of a rainbow trout pituitary cell line that expresses growth hormone, prolactin and somatolactin. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.*, 4(2): 154-163
- Bowers CW y Dahm LM (1993) Buffers for cell culture. *Trends in Cell Biol.*, 3: 76-77
- Bradley TR y Hodgson GS (1979) Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow. *Blood*. 54: 1446-1450
- Bradley TR y Metcalf D (1966) The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 44: 287-300
- Bradley TR, Hodgson GS, Kriegler AB y McNiece IK (1985) Generation of CFU-S *in vitro*. En: *Progress in Clinical and Biological Research*. Cronkite, Dainiak, McCaffrey, Palek, Quesenberry (Eds.). Alan R. Liss y Co. Vol. 184. Nueva York. pp. 39-56
- Braun-Nesje R, Bertheussen K, Kaplan G y Seljelid R (1981) Salmonid macrophages: separation, *in vitro* culture and characterization. *J. Fish Dis.* 4: 141-151
- Braun-Nesje R, Kaplan G y Seljelid R (1982) Rainbow trout macrophages *in vitro*: morphology and phagocytic activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 6: 281-291
- Broudy VC, Kauchansky K, Harlan JM y Adamson JW (1987) Interleukin-1 stimulates human endothelial cells to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 139: 464-468
- Broudy VC, Zuckerman KS, Jetmalani S, Fitchen JH y Bagby GC (1986) Monocytes stimulate fibroblastoid bone marrow stromal cells to produce multilineage hematopoietic growth factors. *Blood*, 68: 530-534
- Bruce LN y Byrne C (1973) An established cell line from the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 30: 913-916
- Burstone MS (1958) Histochemical comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J. Nat. Cancer Inst.*, 20: 601-615
- Campbell FR (1972) Ultrastructural studies of transmural migration of blood cells in the bone marrow of the rats, mice and guinea pigs. *Anat. J.*, 135: 521-536
- Campbell FR (1980) Gap junctions between cells of bone marrow: an ultrastructural study using tannic acid. *Anat. Rec.*, 196: 101-111
- Campbell FR (1982) Intercellular contacts between migrating blood cells and cells of one sinusoidal wall of bone marrow: an ultrastructural study using tannic acid. *Anat. Rec.*, 203: 365-374
- Campbell AD, Long MW y Wicha MS (1987) Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage. *Nature*, 329: 744-746
- Cannarile L, Ayroldi E, Migliorati G, D'Adamio F y Riccardi C (1992) Comparative analysis of different culture systems for *in vitro* generation of NK cells from bone marrow precursors. *J. Immunol. Res.*, 4: 106-110
- Carlson RE, Anderson DP, Bodammer JE (1993) *In vitro* cortisol administration suppresses the *in vitro* primary immune response of winter flounder lymphocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 3: 299-312

- Caspi RR, Rozenszajn LA, Gothelf Y, Pergamenikov-Litvak T y Avtalion RR (1982) The cells involved in the immune response of fish: II. PHA-induced clonal proliferation of carp lymphocytes in soft agar culture. *Dev. Comp. Immunol.*, 6: 683-692
- Castaño MA (1992) Utilización de líneas celulares de peces para la valoración ecotoxicológica del medio acuático. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Castillo A (1991) Ontogenia del sistema inmunitario de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Análisis estructural, inmunocitoquímico y funcional. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de León.
- Castillo A, Razquin B, López-Fierro P, Álvarez A, Zapata A y Villena AJ (1987) An enzyme-histochemical study of the stromal cells and vascularization of the lymphoid organs of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *Cuad. Marisqu. Publ. Tec.*, 12: 167-172
- Castillo A, Razquin B, López-Fierro P, Álvarez F, Zapata AG y Villena AJ (1990) Enzyme- and immuno- histochemical study of the thymic stroma in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *Thymus*, 15: 153-166.
- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE y Moore MAS (1980) Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56: 289-301.
- Clem LW, Sizemore EC, Ellsaesser CF y Miller NW (1985) Monocyte as accessory cells in fish immune responses. *Dev. Comp. Immunol.*, 9: 803-809
- Cline MJ y Golde DW (1979) Cellular interactions in haematopoiesis. *Nature*, 227: 177-181
- Coll J (1993) Neutralización de virus con anticuerpos. En: *Técnicas de diagnóstico en virología*. Díaz Santos S.A. (Ed). Madrid. pp: 135-187
- Collins LS y Dorshkind K (1987) A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. *J. Immunol.*, 138: 1082-1087
- Collodi P y Barnes DW (1990) Mitogenic activity from trout embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3498-3502
- Coulombel L, Vuillet MH, Leroy C y Tchernia G (1988) Lineage and stage-specific adhesion of human hematopoietic progenitor cells to extracellular matrices from marrow fibroblasts. *Blood*, 71: 329-334
- Chen LT y Weiss L (1975) The development of vertebral bone marrow of human fetuses. *Blood*, 46: 389-408
- Chen SN y Kou GH (1987) Establishment, characterization and application of 14 cell lines from warm-water fish. En: *Invertebrate and fish tissue culture*. Y Kuroda, E Kurstak y K Maramorosch (Eds.). Tokio. Jap. Sci. Soc. Press. pp. 218-227
- Cheng LL, Bowser PR y Spitsbergen JM (1993) Development of cell cultures derived from lake trout liver and kidney in a hormone-supplemented, serum-reduced medium. *J. Aquat. Animal Health*, 5: 119-126
- Chilmonczyk S (1978) *In vitro* stimulation by mitogens of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Ann. D'Immunol.*, 129C: 3-12
- Chilmonczyk S y Monge D (1994) Effects of heterologous and allogenic sera on the long-term culture of rainbow trout leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: H8
- Chilmonczyk S, Voccia I y Monge D (1995) Pathogenesis of viral haemorrhagic septicaemia virus: cellular aspects. *Vet. Res.*, 26: 505-511
- Dannevig BH y Berg T (1986) Isolation of pronephros cells which endocytose chemically modified proteins in the rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.*, 10: 25-34
- Dannevig BH, Lauve A, Press C McL y Landsverk T (1994) Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish Shellfish Immunol.*, 4: 3-18
- de Bruyn PPH (1981) Structural substrates of bone marrow function. *Semin. Hematol.*, 18:179-193

- de Bruyn PPH, Michelson S y Becker RP (1975) Endocytosis, transfer tubules and lisosomal activity in myeloid sinusoidal endothelium. *J. Ultrastruct. Res.*, 53: 133-151
- de Kinkelin P y Bearzotti M (1981) Immunization of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. En: *Developments in biological standardization. International Symposium of Fish Biologies: Serodiagnostics and Vaccines. Vol. 49.* Leetown. Virginia. USA. pp. 431-439
- de Kinkelin P, Chilmonczyk S, Dorson M, Le Berre M y Baudouy AM (1979) Some pathogenic facets of rhabdoviral infection of salmonid fish. En: *Symposia on Microbiology: Mechamisms of Viral Pathogenesis and Virulence.* PA Bachmann (Ed.). Munich. pp.357-375
- de Koning J y Kaattari SL (1991) Mitogenesis of rainbow trout peripheral blood lymphocytes requires homologous plasma for optimal responsiveness. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27: 381-386
- de Koning J y Kaattari SL (1992) Use of homologous salmonid plasma for the improved responsiveness of salmonid leukocyte cultures. En: *Techniques in Fish Immunology.* JS Stolen, TC Fletcher, DP Anderson, SL Kaattari, AF Rowley (Eds.). SOS Publications. Fair Haven. USA. pp. 61-65
- Denis KA y Witte ON (1986) *In vitro* development of B lymphocytes from long-term cultured precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 441-445
- Denizeau F y Marion M (1990) Toxicity of cadmium, copper and mercury to isolated trout hepatocytes. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 47: 1038-1042
- Dexter TM (1982) Stromal cell associated haemopoiesis. *J. Cell Phys.*, 1: 87-94
- Dexter TM y Spooncer E (1987) Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 3: 423-441
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG (1977) Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 91: 335-344
- Dexter TM, Coutinho LH, Spooncer E, Heyworth CM, Daniel CP, Schiro R, Chang J y Allen TD (1990) Stromal cells in haemopoiesis. En: *Molecular control of haemopoiesis.* Ciba Foundation Symposium. Vol. 148 Wiley. Chichester. pp. 76-95
- Dexter TM, Spooncer E, Simmons P y Allen TD (1984) Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience. Alan R. Liss Inc. Nueva York. pp. 57-96
- Dexter TM, Testa NG, Allen TD, Rutherford T, Scolnick E (1981) Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood*, 58: 699-707
- Diago ML (1990) Estudio de los microambientes linfo-hematopoyéticos de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*: Cultivo y caracterización *in vitro* de las células del estroma del timo y del pronefros. Tesina de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad de León.
- Diago ML, López-Fierro MP, Razquin B y Villena A (1993) Long-term myelopoietic cultures from the renal hematopoietic tissue of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W.: phenotypic characterization of the stromal cells. *Exp. Hematol.*, 21: 1277-1287
- Dorshkind K (1986) *In vitro* differentiation of B lymphocytes from primitive hemopoietic precursors present in long-term bone marrow cultures. *J. Immunol.*, 136: 422-429
- Dorshkind K (1987) Bone marrow stromal cells and their factors regulate B-cell differentiation. *Immunol. Today*, 8: 191-193
- Dorshkind K (1990) Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu.Rev. Immunol.*, 8: 111-137
- Dorshkind K y Phillips RA (1982) Characterization of early B lymphocyte precursors present in long-term bone marrow cultures. *J. Immunol.*, 13: 2240-2245
- Driever W y Rangini Z (1993) Characterization of a cell line derived from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29A: 749-754
- East CJ, Abboud CN y Borch RF (1992) Diethyldithiocarbamate induction of cytokine release in human long-term bone marrow cultures. *Blood*, 80: 1172-1177

- Ebell W, Castro-Malaspina H, Moore MAS y O'Reilly RJ (1985) Depletion of stromal cell elements in human marrow grafts separated by soybean agglutinin. *Blood*, 65: 1105-1111
- Edelstein LM (1971) Melanin: a unique biopolymer. En: *Pathobiology Annual*. HL Ioachim (Ed.) Vol. 1. Londres. p. 309
- Edgar D, Timpl R y Thoenen H (1984) The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 3: 1463-1468
- Ellender RD, Wharton JH y Middlebrooks BL (1979) An established spleen cell line from *Bairdiella chrysura*. *In vitro*, 15: 112-113
- Estepa A (1992) Estudios de inmunización con proteínas electroeluidas y clonadas del virus de la septicemia hemorrágica vírica de la trucha. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Estepa A y Coll JM (1991a) Infection of trout kidney cells with infectious pancreatic necrosis and viral haemorrhagic septicaemia viruses. *Bull. Eur. Assoc. Fish Dis.*, 11: 101-104
- Estepa A y Coll JM (1991b) Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *J. Fish Dis.*, 14: 555-562
- Estepa A y Coll JM (1993) Properties of blast colonies obtained from trout head-kidney in fibrin clot cultures. *Fish Shellfish Immunol.*, 3: 71-75
- Estepa A, Basurco B, Sanz F y Coll JM (1991) Stimulation of adherent cells by the addition of purified proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus to trout kidney cultures. *Viral Immunol.*, 4: 43-52
- Estepa A, Frías D y Coll JM (1992) Susceptibility to trout kidney macrophages to viral hemorrhagic septicemia virus. *Viral Immunol.*, 5: 283-292
- Etlinger HM, Hodgins HO y Chiller JM (1976) Evolution of the lymphoid system I. Evidence of lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of the mitogenic responses. *J. Immunol.*, 116: 1547-1553
- Faisal M y Ahne W (1990) A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear leucocytes of normal common carp *Cyprinus carpio*. *Dev. Comp. Immunol.*, 14: 255-260
- Fausser AA y Messner HA (1987) Identification of megacaryocytes, macrophages and eosinophils on colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood*, 53: 1023-1027
- Fava RA y McClure DB (1987) Fibronectin-associated transforming growth factor. *J. Cell. Physiol.*, 131: 184-189
- Feder J, Marasa JC, Olander JV (1983) The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 116: 1-6
- Fernandes MN, Eddy FB y Penrice WS (1995) Primary cell culture from gill explants of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 47: 641-651
- Fernández RD, Yoshimizu M, Kimura T y Ezura Y (1993a) Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish. *J. Aquat. Animal Health*, 5: 137-147
- Fernández RD, Yoshimizu M, Kimura T y Ezura Y (1993b) Characterization of three continuous cell lines from marine fish. *J. Aquat. Animal Health*, 5: 127-136
- Fidelus RK y Tsan MF (1986) Enhancement of intracellular glutathione promotes lymphocyte activation by mitogen. *Cell. Immunol.*, 97: 155-163
- Field MDR, Hutchinson TH, Manning MJ (1995) Development of adherence techniques for collecting kidney phagocytes from marine fish (*Limanda limanda* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 505-517
- Finegan CB y Mulcahy MF (1987) Successful culture of rainbow trout lymphocytes in soft agar. *Dev. Comp. Immunol.*, 11: 419-425
- Flaño E (1996) 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

- Folkman J y Haudenschild C (1980) Angiogenesis *in vitro*. Nature, 288: 551-556
- Folkman J y Haudenschild C (1982) Angiogenesis *in vitro*: implications for tumor biology. En: Pathobiology of the endothelial cells. Academic Press. pp. 79-93
- Fonfría J (1992) Órganos linfoides en *Sturnus unicolor*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.
- Francis CH y Ellis AE (1994) Production of a lymphokine (macrophage activating factor) by salmon (*Salmo salar*) leucocytes stimulated with outer membrane protein antigens of *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol., 4: 489-497
- Fraser CC, Eaves CJ, Szilivassy SJ y Humphries RK (1990) Expansion *in vitro* of retrovirally marked totipotent hematopoietic stem cells. Blood, 76: 1071-1076
- Frazier WA (1987) Thrombospondin: a modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. J. Cell Biol., 105: 625-632
- Freshney RI (1987) Culture of animal cells. A manual of basic technique. AR Liss (Ed). Wiley-Liss. Nueva York
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Latsinik NB, Panasyuk AF y Keiliss-Borok ZV (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. Transplantation, 17: 331-340
- Frisch RE, Canick JA, Tulchinsky D (1980) Human fatty marrow aromatizes androgen to estrogen. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51: 394-396
- Fritsch G, Nelson RT, Muiya P, Naessens J y Black SJ (1991) Characterization of bovine haemopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies and fluorocytometry. Vet. Immunol. Immunopathol., 27: 277-292.
- Fryer JL, Yusha A y Pilcher KS (1965) The *in vitro* cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. Ann. NY. Acad. Sci., 126: 566-586
- Fujita T, Sigimura M y Suzuki Y (1982) The migration of macrophages after phagocytosis in chick bone marrow. Archiv. Histol. Japon, 45: 473-482
- Funk PE y Witte PL (1992) Enrichment of primary lymphocyte-supporting stromal cells and characterization of associated B lymphocyte progenitors. Eur. J. Immunol., 22: 1305-1313
- Funk PE, Kincade PW y Witte PL (1994) Native associations of early hematopoietic stem cells and stromal cells isolated in bone marrow aggregates. Blood, 83: 361-369
- Furcht LT, McCarthy JB, Palm SL, Enestein J y Basara M (1984) Laminin and fibronectin peptides defined by monoclonal antibodies promote haptotaxis of metastatic cells En: Basement membranes and cell movement. R Porter y J Whelan (Eds.). CIBA Foundation Symposium. Vol. 108. Pitman Medical. Londres.
- Gallagher JT, Spooncer E y Dexter TM (1983) Role of the cellular matrix in haemopoiesis. I. Synthesis of glycosaminoglycans by mouse bone marrow cell cultures. J. Cell Sci., 63: 155-171
- Gan EV, Lam HF, Haberman HF y Menon IA (1977) Oxidising and reducing properties of melanins. Br. J. Dermatol., 96: 25-28
- Ganassin RC y Bols NC (1996) Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. Fish Shellfish Immunol., 6: 17-34
- Gartner S y Kaplan HS (1980) Long-term culture of human bone marrow cells. Proc. Anat. Acad. Sci. USA, 77: 4756-4759
- Gerassi E y Sachs L (1976) Regulation of the induction of colonies *in vitro* by normal human lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 4546-4550
- Ginsburg H y Sachs L (1963) Formation of pure suspensions of mast cells in tissue culture by differentiation of lymphoid cells from the mouse thymus. J. Natl. Cancer Inst., 31: 1-40
- Gisler RH, Söderberg A y Kamber M (1987) Functional maturation of murine B lymphocyte precursors. II. Analysis of cells required from the bone marrow microenvironment. J. Immunol., 138: 2433-2438

- Gold JR y Ellison JR (1982) Silver staining for nucleolar organizing regions of vertebrate chromosomes. *Stain Technol.*, 58: 51-55
- Gordon MY (1988) Extracellular matrix of the marrow microenvironment. *Brit. J. Haematol.*, 70: 1-4
- Gordon MY, Goldman JM y Gordon-Smith EC (1983) Spatial and functional relationships between human hemopoietic and marrow stromal cells *in vitro*. *Int. J. Cell. Cloning*, 1: 429-439
- Gordon MY, Riley GP, Watt SM y Greaves MF (1987) Compartmentalization of a haemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature*, 326: 403-405
- Graham S y Secombes CJ (1988) The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology*, 65: 293-297
- Gravell M y Malsberger RG (1965) A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 26: 555-565
- Greenberger JS (1978) Sensitivity of corticosteroid-dependent insulin-resistant lipogenesis in marrow preadipocytes of obese-diabetic (db/db) mice. *Nature*, 275: 752-754
- Greenberger JS (1979) Corticosteroid-dependent differentiation of human marrow preadipocytes *in vitro*. *In vitro*, 15: 823-828
- Greenberger JS (1991) The hematopoietic microenvironment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 11: 65-84
- Grimm AS (1985) Suppression by cortisol of the mitogen-induced proliferation of peripheral blood leucocytes from plaice, *Pleuronectes platessa* L. En: *Fish Immunology*. MJ Manning y MF Tatner (Eds.). Academic Press. Londres. p.263
- Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ y Rosenberg SA (1982) The human lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural-killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 155: 1823-1841
- Gualtieri RJ, Shadduck RK, Baker DG y Quesenberry PJ (1984) Hematopoietic regulatory factors produced in long-term murine bone marrow cultures and the effect of *in vitro* irradiation. *Blood*, 64: 516-525
- Guilbert LJ e Iscove NN (1976) Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature*, 263: 594-595
- Gulati GL, Ashton JK y Hyun BH (1988) Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. *Hematol. Oncol. Clin. N.A.*, 2: 495-511.
- Hartley SE (1987) The chromosomes of salmonid fishes. *Biol. Rev.*, 62: 197-214
- Hartwig M y Körner IJ (1990) Generation of lymphokine-activated killer cells in long-term cultures. *Immunology*, 71: 145-147
- Hasthorpe S, Bogdanovski M, Rogerson J y Radley JM (1992) Characterization of endothelial cells in murine long-term bone marrow culture. Implication for hemopoietic regulation *Exp. Hematol.*, 20: 476-481
- Hayashi S y Ooshiro Z (1985) Effects of glucagon, insulin and eel serum in the eel liver cells in primary culture. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 51: 1123-1127
- Heard JM, Fichelson S y Varet B (1982) Role of colony-stimulating activity in murine long-term bone marrow cultures: evidence for its production and consumption by the adherent cells. *Blood*, 59: 761-767
- Hedrick RP y Fryer JL (1981) Persistent infection of three salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Pathol.*, 15: 163- 172
- Henderson AJ, Johnson A y Dorshkind K (1990) Functional characterization of two stromal cell lines that support B lymphopoiesis. *J. Immunol.*, 145: 423-428
- Herráez MP (1988) Estructura y función de los centros melanomacrofágicos de *Carassius auratus*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de León.

- Heyworth CM y Spooncer E (1993) *In vitro* clonal assays for murine multipotential and lineage restricted myeloid progenitor cells cultures. En: Haemopoiesis: a practical approach. NG Testa y Molineux G (Eds.) IRL Press. Oxford. pp. 37-53
- Hirschberg H, Bergh OJ y Thorsby E (1980) Antigen presenting properties of human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.*, 152: 249-255
- Homo-Delarche R (1984) Glucocorticoid receptors and steroid sensitivity in normal and neoplastic human lymphoid tissues: a review. *Cancer Res.*, 44: 431-437
- Hoshi H y Weiss T (1978) Rabbit bone marrow after administration of saponin. An electron microscopic study. *Lab. Invest.*, 38: 67-80
- Hoshi H, Kan M, Minamoto Y y Yamane I (1982) Hydrocortisone potentiates cell proliferation and promotes cell spreading on tissue culture substrata of human diploid fibroblasts in a serum-free hormone-supplemented medium. *Biomed. Res.*, 3: 546-552
- Hunt P, Robertson D, Weiss D, Rennick D, Lee F y Witte ON (1987) A single bone marrow-derived stromal cell type supports the *in vitro* growth of early lymphoid and myeloid cells. *Cell*, 48: 997-1007
- Ingber DE y Folkman J (1989) Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis *in vitro*: Role of extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, 109: 317-330
- Iscove NN, Guilbert LJ y Wayman C (1980) Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Expl. Cell Res.*, 126: 121-126
- Ishikawa Y y Ito T (1988) Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture. *Eur. J. Haematol.*, 40: 126-129
- Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, Uchiyama T, Uchino H y Mori KJ (1989) Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol.*, 17: 145-153
- Janowska-Wieczorek A, Tupas J y Friesen I (1988) Kinetics of G-CSF and CSF-1 production in human long-term marrow cultures. *Blood*, 72, suppl. 1: 122a
- Jeannin P, Delneste Y, Gosset P, Molet S, Lassalle P, Hamid Q, Tsicopoulos A y Tonnel AB (1994) Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. *Blood*, 84: 2229-2233
- Jiménez J, Marcotegui MA, San Juan ML y Basurco B (1988) Diagnosis of viral diseases in salmonid farms in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 271: 3-4
- Johnson A y Dorshkind K (1986) Stromal cells in myeloid and lymphoid long-term bone marrow cultures can support multiple hemopoietic lineages and modulate their production of hemopoietic growth factors. *Blood*, 68: 1348-1354
- Johnson GR y Metcalf D (1977) Pure and mixed erythroid colony formation *in vitro* stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3879-3882
- Jordan HE (1938) Comparative hematology. En: Handbook of hematology. H Downey (Ed.) PB Hoeber. Vol. II. Nueva York. pp. 700-862
- Kaattari SL y Irwin MJ (1985) Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Dev. Comp. Immunol.*, 9: 433-444
- Kaattari SL y Tripp RA (1987) Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *J. Fish Biol.*, 31A: 129-132
- Katahira J y Mizoguchi H (1987) Improvement of culture conditions for human megakaryocytic and pluripotent progenitor cells by low oxygen tension. *Int. J. Cell Cloning*, 5: 412-420
- Kataoka M y Tavassoli M (1985) Identification of lectin-like substances recognizing galactosyl residues of glycoconjugates on the plasma membrane of marrow sinus endothelium. *Blood*, 65: 1163-1171

- Katsuno M, Motomura S, Kaneko S, Sakai H e Ibayasi H (1985) A preadipocyte cell line from mouse bone marrow stroma: Characterization of morphological, enzymatic and functional nature of the cells. *Int. J. Cell Cloning*, 3: 81-90
- Keating A y Gordon MY(1988) Hierarchical organization of hemopoietic microenvironments. *Leukemia*, 2: 766-769
- Keating A y Singer JW (1983) Further characterization of the *in vitro* microenvironment. *Exp. Hematol.*, 11: 144
- Kelly RK, Souter BW y Miller HR (1978) Fish cell lines: comparisons of CHSE-214, FHM y RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 1009-1011
- Kierney PC y Dorshkind, K (1987) B lymphocyte precursors and myeloid progenitors survive in diffusion chamber cultures but B cell differentiation requires close association with stromal cells. *Blood*, 70: 1418-1424
- Kimura T, Yoshimizu M y Tanaka M (1981) Fish viruses: tumor induction in *Oncorhynchus keta* by the herpesvirus. En: Phyletic approaches to cancer. CJ Dawe y cols., (Eds.) Jpn Sci. Soc. Press. Tokio. pp 59-68
- Kincade PW (1987) Experimental models for understanding B lymphocyte formation. *Adv. Immunol.*, 41: 181-267
- Kincade PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi SI y Gimble JM (1989) Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu. Rev Immunol.*, 7: 111-143
- Kirby SL y Bentley SA (1987) Proteoglycan synthesis in two bone marrow stromal cell lines. *Blood*, 70: 1777-1783
- Knapp W, Strobl H, Scheinecker C, Bello-Fernández C y Majdic O (1995) Molecular characterization of CD34<sup>+</sup> human hematopoietic progenitor cells. *Ann. Hematol.*, 70: 281-296
- Kocal T, Quinn BA, Smith IR, Ferguson HW y Hayes MA (1988) Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In *Vitro Cell. Dev. Biol.*, 24: 304-308
- Kodama H, Amagai Y, Koyama H y Kasai S (1982) A new preadipose cell line derived from newborn mouse calvaria can promote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 112: 89-95
- Kodama H, Hagiwara H, Sudo H, Amagai Y, Yokota T, Arai N y Kitamura Y (1986) MC3T3-G2/PA6 preadipocytes support *in vitro* proliferation of hemopoietic stem cells through a mechanism different from that of Interleukin-3. *J. Cell Physiol.*, 129: 20-26
- Kodama HA, Sudo H, Koyama H, Kasai S y Yamamoto S (1984) *In vitro* hemopoiesis within a microenvironment created by MC3T3-G2/PA6 preadipocytes. *J. Cell. Physiol.*, 118: 233-240
- Koenigsmann M, Griffin JD, DiCarlo J y Cannistra SA (1992) Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I. *Blood*, 79: 657-665
- Koller MR, Bender JG, Miller WM y Papoutsakis ET (1992) Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp. Hematol.*, 20: 264-270
- Komura JI, Mitani H y Shima A (1988) Fish cell culture: establishment of two fibroblast-like cell lines (OL-17 and OL-32) from fins of the medaka, *Oryzias latipes*. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 24: 294-298
- Koumans-van Diepen JCE, Harmsen EGM y Rombout JHWM (1994a) Immunocytochemical analysis of mitogen responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) peripheral blood leucocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 42: 209-219
- Koumans-van Diepen JCE, Taverne-Thiele JJ, van Rens BTTM y Rombout JHWM (1994b) Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.): an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.*, 4: 19-28
- Kuppen PJK, Eggermont AMM, Marinelli A, de Heer E, van de Velde CJH y Fleuren GJ (1991) Induction of lymphokine-activated killer activity in rat splenocyte cultures: the importance of 2-mercaptoethanol and indomethacin. *Cancer Immunol. Immunother.*, 33: 28-32

- Lannan CN, Winton JR y Fryer JL (1984) Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, 20: 671-676
- Lanotte M, Schor S, Dexter TM.(1981) Collagen gels as a matrix for haemopoiesis. *J. Cell. Physiol.*, 106: 269-277
- Lanotte M, Scott D, Dexter TM y Allen TD (1982) Clonal preadipocyte cell line with different phenotypes derived from murine marrow stroma: Factors influencing growth and adipogenesis *in vitro*. *J. Cell. Physiol.*, 111: 177-186
- LaPushin RW y Trentin J (1977) Identification of stromal elements in erythroid and neutrophil granuloid spleen colonies: light and electron microscopy study. *Exp. Hematol.*, 5: 505-522
- Larsson B, Anderson H y Fossum C (1992) 2-Mercaptoethanol influences the *in vitro* function of bovine peripheral blood mononuclear cells. *J Vet. Med.*, 39: 226-232
- Lee LEJ y Bols NC (1989) Action of cortisol on the proliferation of rainbow trout fibroblast. *Cell Tissue Kinet.*, 22: 291-301
- Lee LEJ y Bols NC (1991) Identification of fibronectin in rainbow trout and influence of cortisol on fibronectin accumulation by rainbow trout cell cultures. *J. Aquat. Animal Health*, 3: 31-40
- Lee LEJ, Pochmursky V y Bols NC (1986) Effect of corticosteroids on the morphology and proliferation of two salmonid cell lines. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 64: 373-380
- Lerat H, Lissitzky JC, Singer JW, Keating A, Herve P y Charbord P (1993) Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures. *Blood*, 82: 1480-1492
- Liesveld JL, Abboud CN, Duerst RE, Ryan DH, Brennan JK y Litchman MA (1989) Characterization of human marrow stromal cells: role in progenitor cell binding and granulopoiesis. *Blood*, 73: 1794-1800
- Lin HS y Hsu S (1986) Modulation of tissue mononuclear phagocyte clonal growth by oxygen and antioxidant enzymes. *Exp. Hematol.*, 14: 840-844
- Lipschitz DA, Taylor JM y Udupa KB (1984) Colony stimulating activity (CSA) and myeloid cell production in the long term bone marrow culture (LTBMC). *Exp. Hematol.*, 12: 463
- Litchman MA (1981) The ultrastructure of hemopoietic environment of the marrow: A review. *Exp. Hematol.*, 9: 391-410
- Long MW y Dixit VM (1990) Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 75: 2311-2318
- López-Ruiz A, Esteban MA, Mulero V y Meseguer J (1994) *In vitro* activation of the macrophages from gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): a morphofunctional study. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: S86
- Lozano R, Ruíz Rejón C y Ruíz Rejón M (1992) A comparative analysis of NORs in diploid and triploid salmonids: implications with respect to the diploidization process occurring in this fish group. *Heredity*, 69: 450-457
- Lubennikova EI y Domaratskay EI (1976) Changes in the number of the stem cells during cultivation of mouse bone marrow on a bed of fibroblastic-like cells. *Byull. Eksp. Biol. Med.*, 81: 718-719
- Luft JC, Clem WL y Bly JE (1991) A serum-free culture medium for channel catfish *in vitro* immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 1: 131-139
- Maitre JL, Valotaire Y y Guguen-Guillouzo P (1986) Estradiol-17  $\beta$ -stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 22: 337-343
- Marsden MJ, Cox D y Secombes CJ (1994) Antigen-induced release of macrophage activating factor from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 42: 199-208
- Martín-Fontecha A(1992) Caracterización fenotípica del estroma tímico de rata *in vitro*. Efectos de la desoxiguanosina y del trasplante *in vivo* a través de barreras histoincompatibles. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.

- Matty AJ (1985) The "adrenal" and the kidney hormones. En: Fish Endocrinology. Croom Helm Ltd. Londres. pp. 112-137
- Mauch P, Greenberger JS, Botnick L, Hannon E y Hellman S (1980) Evidence for structured variation in self-renewal capacity within long-term bone marrow cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77: 2927-2930
- Mayani H, Guilbert LJ y Janowska-Wieczorek A (1992) Biology of the hemopoietic microenvironment. Eur. J. Haematol., 49: 225-233
- McCarthy K, Hale M y Fehnel P (1985) Rat colony-forming unit spleen is OX7 positive, W3/13 positive, OX1 positive and OX22 negative. Exp. Hematol., 13:847-854
- McCarthy K, Hale M y Fehnel P (1987) Purification and analysis of rat haemopoietic stem cells by flow cytometry. Cytometry, 8: 296-305
- Mei RL y Burstein SA (1991) Megakaryocytic maturation in murine long-term bone marrow culture. Role of interleukin-6. Blood, 78: 1438-1447
- Meseguer J, López Ruiz A y Esteban MA (1994) Melano-macrophages of the seawater teleost, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. Cell Tissue Res., 277: 1-10
- Metcalf D (1972) Formation in agar of fibroblast-like colonies by cells from the mouse pleural cavity and other sources. J. Cell Physiol., 80: 409-419
- Metcalf D (1988) The molecular control of blood cells. Harvard University Press. Cambridge. Massachussets.
- Metcalf D, Nossal GJV, Warner NL, Miller JFAP, Mandel TE, Layton JE y Gutman GA (1975) Growth of B lymphocyte colonies *in vitro*. J. Exp. Med., 142: 1534-1549
- Miller NW y Clem LW (1984) Microsystem for *in vitro* primary and secondary immunization of channel catfish, (*Ictalurus punctatus*) leukocytes with hapten-carrier conjugates. J. Immunol. Methods, 72: 367-379
- Miller NW y Clem LW (1988) A culture system for mitogen-induced proliferation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) peripheral blood lymphocytes. J. Tiss. Culture Methods, 11: 69-73
- Miller NW, Bly JE, van Ginkel F, Ellsaesser CF y Clem LW (1987) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. Dev. Comp. Immunol., 11: 739-747
- Miller NW, Deuter A y Clem LW (1986) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for the mixed leukocyte reaction with channel catfish. Immunol., 59: 123-128
- Miller NW, Sizemore RC y Clem LW (1985) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for *in vitro* antibody responses of channel catfish leukocytes. J. Immunol., 134: 2884-2888
- Miossec P, Cavender D y Ziff M (1986) Production of interleukin-1 by human endothelial cells. J. Immunol., 136: 2486-2491
- Mishell RI y Dutton RW (1967) Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. J. Exp. Med., 126: 423-442
- Mohandas N y Prenant M (1978) 3-Dimensional model of bone marrow. Blood, 51:633-643
- Molineux G, Schofield R, Hendry JH y Testa NG (1987) Standardization of procedures for ectopic marrow grafting. II. Influence on recipients of radiation dose and field size. Exp. Hematol., 15: 676-678
- Montesano R, Mouron P y Orci L (1985) Vascular outgrowths from tissue explants embedded in fibrin or collagen gels: a simple *in vitro* model of angiogenesis. Cell Biol. Int. Rep., 9: 869-875
- Moore MAS y Sheridan APC (1979) Pluripotencial stem cell replication in continuous human, prosimian and murine bone marrow culture. Blood Cells., 5: 297-312
- Moore MAS, Sheridan APC, Allen TD y Dexter TM (1979) Prolonged hematopoiesis in a primate bone marrow culture system: characteristics of stem cell production and the hematopoietic microenvironment. Blood, 54: 775-793

- Moreau I, Andreoni C, Caux C, Saeland S y Rigal D (1992) Modification of human long-term bone marrow cultures: Establishment of a functional stromal microenvironment devoid of myeloid progenitors. *Eur. J. Haemat.*, 49: 29-35
- Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S, Hayashi T, Notohara K y Awai M (1988) Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel. *Acta Pathol. Jpn.*, 38: 1503-1512
- Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S, Hayashi T y Awai M (1989) Formation of capillary networks from bone marrow cultured in collagen gel. *Cell Struct. Funct.*, 14: 393-398
- Mori M, Tsuchiyama J y Okada S (1992) Long-term maintenance of multilineal hemopoiesis in collagen gel culture. *Cell Struct. Funct.*, 17: 99-104
- Moritomo T y Watanabe T (1994) Colony growth of carp hematopoietic cells *in vitro*. En: *Techniques in Fish Immunology*. JS Stolen, TC Fletcher, AF Rowley, JT Zelikoff, SL Kaattari, SA Smith (Eds.). SOS Publications. Fair Haven. USA. pp. 35-43
- Moritomo T, Anderson DP y Schill WB (1990) Establishment of a cell line with reticulo-endothelial characteristics from a rainbow trout spleen explant. *Fish Pathol.*, 25: 165-170
- Moritomo T, Ito A, Yamaguchi I y Watanabe T (1993) *In vitro* colony formation of carp granulocytes in a semi-solid agar culture system. *Gyobyo Kenkyu*, 28: 59-63
- Moritomo T, Nakayama S, Kihara R, Hirai E y Watanabe T (1994) The growth of carp hematopoietic cells *in vitro*. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: S136
- Mothersill C, Lyng F, Lyons M y Cottell D (1995) Growth and differentiation of epidermal cells from the rainbow trout established as explants and maintained in various media. *J. Fish Biol.*, 46: 1011-1025
- Müller-Sieburg C, Whitlock C y Weissman I (1986) Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: A committed pre-B cell and a clonogenic Thy-1<sup>lo</sup> hemopoietic stem cell. *Cell*, 44: 653-662
- Naughton BA y Naughton GK (1988) Hematopoiesis on nylon screen templates: Modulation of long-term bone marrow culture by stromal support cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 554: 140-155
- Naughton BA, San Román J, Sibanda B, Weintraub JP y Kamali V (1994) Stereotypic culture systems for liver and bone marrow: evidence for the development of functional tissue *in vitro* and following implantation *in vivo*. *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 810-825
- Nicholson BL (1988) Fish cell cultures: an overview. En: *Invertebrate and fish tissue culture*. Kuroda Y, Kurstak E y Maramorosch, K (Eds.). Japan Scientific Societies Press. Tokio. pp. 191-194
- Nicholson BL y Byrne C (1973) An established cell line from the atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish Res. Board Can.*, 30: 913-916
- Nicholson BL, Danner DJ y Wu JL (1987) Three new continuous cell lines from marine fishes of Asia. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 23: 199-204
- Nicosia RF, Tchao T y Leighton J (1982) Histotypic angiogenesis *in vitro*: light microscopic, ultrastructural and radioautographic studies. *In vitro*, 18: 538-549
- Nims L, Fryer JL y Pilcher KS (1970) Studies of replication of four selected viruses in two cell lines derived from salmonid fish. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 135: 6-12
- Ogata H, Taniguchi S, Inaba M, Sugawara M, Ohta Y, Inaba K, Mori KJ y Ikehara S (1992) Separation of hematopoietic stem cells into two populations and their characterization. *Blood*, 80: 91-95
- Ohomori H y Yamamoto I (1983) Mechanism of augmentation of the antibody response *in vitro* by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. II. A major role of the mixed disulfide between 2-mercaptoethanol and cystine. *Cell. Immunol.*, 79: 173-185
- Paran M, Sachs L, Barak Y y Resnitzky P (1970) *In vitro* induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67: 1542-1549
- Pärt P, Norrgren L, Bergström E y Sjöberg P (1993) Primary cultures of epithelial cells from rainbow trout gills. *J. Exp. Biol.*, 175: 219-232

- Patiño R, Redding JM y Shreck CB (1987) Interrenal secretion of corticosteroids and cortisone concentrations after acute stress and during seawater acclimation in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Gen. Comp. Endocrinol., 68: 431-439
- Pearse AGE (1972) Histochemistry. Theoretical and Applied. 3rd. Ed. Vol. 2. Churchill Livingstone. Edinburgo.
- Perkins S y Fleichman RA (1988) Hematopoietic microenvironment: Origin, lineage and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice. J. Clin. Invest., 81: 1072-1080
- Pettitt TR, Rowley AF, Barrow SE, Mallet AI y Secombes CJ (1991) Synthesis of lipoxins and other lipoxygenase products by macrophages from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Biol. Chem., 266: 8720-8726
- Pettitt TR, Rowley AF y Secombes CJ (1989) Lipoxins are major lipoxygenase products of rainbow trout macrophages. FEBS Letters, 259:168-170
- Phillips RA (1980) Enhanced lymphoid and decreased myeloid reconstituting ability of stem cells from long-term cultures of mouse bone marrow. J. Supramol. Struct., 14: 77-84
- Phillips RB e Ihssen PE (1985) Chromosome banding in salmonid fish: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. Can. J. Gen. Cytol., 27: 433-440
- Pickering AD (1984) Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. Gen. Comp. Endocrinol., 53: 252-259
- Pietrangeli CE, Hayashi SI y Kincade PW (1988) Stromal cell lines which support lymphocyte growth: Characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors. Eur. J. Immunol., 18: 863-872
- Pike B y Robinson WA (1970) Human bone marrow growth in agar gel. J. Cell Physiol., 76: 77-84
- Ploemacher RE, Piersma AH y Brockbank KGM (1984) The nature and function of granulopoietic microenvironments. Blood Cells, 10: 341-367
- Ploemacher RE, van der Loo JCM, van Beurden CAJ y Baert MRM (1993) Wheat germ agglutinin affinity of murine hemopoietic stem cell subpopulations is an inverse function of their long-term repopulating ability *in vitro* and *in vivo*. Leukemia, 7: 120-130
- Ploemacher RE, Van Der Sluis JP, Voerman JSA y Brons NHC (1989) An *in vitro* limiting dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. Blood, 74: 2755-2763
- Ploemacher RE, Vant Hull E y van Soest PL (1978) Studies of the hemopoietic microenvironments: Effects of acid mucopolysaccharides and dextran sulfate on erythroid and granuloid differentiation *in vitro*. Exp. Hematol., 6: 311-320
- Pluznik DH y Sach L (1965) The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. J. Cell Comp. Physiol., 66: 319-324
- Pluznik DH y Sach L (1966) The induction of clones of normal "mast" cells by a substance from conditioned medium. Expl. Cell. Res., 43: 553-563
- Pollack SB, Tsuji J y Rosse C (1992) Production and differentiation of NK lineage cells in long-term bone marrow cultures in the absence of exogenous growth factors. Cell. Immunol., 139: 352-362
- Potter CG, Rowell AC y Weatherall DJ (1981) Continuous long-term culture of human bone marrow. Clin. Lab. Haematol., 3: 245-255
- Pragnel IB, Wright EG, Lorimore SA, Adam J, Roendal M, Dalmanter JF, Freshney M, Eckmann L, Spround A y Wilkie N (1988) The effect of stem cell proliferation regulators demonstrated with an *in vitro* assay. Blood, 72: 186-201
- Press C McL, Dannevig BH y Landsverk T (1994) Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of atlantic salmon (*Salmo salar* L). Fish Shellfish Immunol., 4: 79-93
- Quesemberry PJ y Grimbone, Jr MA (1980) Vascular endothelium as a regulator of granulopoiesis: production of colony-stimulating activity by cultured human endothelial cells. Blood, 56: 1060-1067

- Rabinowich H, Vitrolo D, Altarac S, Herberman RB y Whiteside TL (1992) Role of cytokines in the adoptive immunotherapy of an experimental model of human head and neck cancer by human IL-2-activated natural killer cells. *J. Immunol.*, 149: 340-349
- Razquin BE, Castillo A, López-Fierro P, Álvarez F, Zapata A y Villena AJ (1990) Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, 36: 159-173
- Reitan LJ y Thuvander A (1991) *In vitro* stimulation of salmonid leukocytes with mitogens and with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 1: 297-308
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Stain Technol.*, 35: 313-323
- Ribeiro L y Ahne W (1982) Fish cell culture: initiation of a line of pituitary cells from carp (*Cyprinus carpio*) to study the release of gonadotropin *in vitro*. *In Vitro*, 18: 419-420
- Rich IN (1986) A role for the macrophage in normal hemopoiesis. II. Effect of varying physiological oxygen tensions on the release of hemopoietic growth factors from bone marrow-derived macrophages *in vitro*. *Exp. Hematol.*, 14: 746-751
- Rijkers GT, Frederix-Wolters EMH y Van Muiswinkel WB (1980) The haemolytic plaque assay in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol. Methods*, 33: 79-86
- Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F y Dexter TM (1988) Heparan sulphate-bound growth factors: a mechanism for stromal cell-mediated haemopoiesis. *Nature*, 332: 376-378
- Rose AS y Levine RP (1992) Complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2: 223-240
- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Soloman D, Topalian S, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, Simpson C, Carter C, Bock S, Schwartzentruber, D, Wei JP y Whitte DE (1988) Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 319: 1676-1680
- Sachs L (1964) The analysis of regulatory mechanisms in cell differentiation En: *New Perspectives in Biology*. M Sela (Ed.). Elsevier. Amsterdam. pp. 246-260
- Saklai M (1989) Cellular components of stroma *in vivo* in comparison with *in vitro* systems. En: *Handbook of the hemopoietic microenvironment*. M Tavassoli (Ed.) Humana Press Inc.. pp. 219-251
- Saklai M y Tavassoli, M (1979) Cellular relationship in the rat bone marrow studied by freeze-fracture and lanthanum impregnation thin sectioning electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, 69: 343-361
- Sánchez C, Domínguez J y Coll JM (1989) Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 12: 459-465
- Sanz F y Coll JM (1992) Detection of the viral haemorrhagic septicaemia virus by ELISA using two non-competitive monoclonal antibodies to the early nucleoproteins at high salt concentration. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 897-903
- Sanz F, Basurco B, Babin M, Domínguez J y Coll JM (1993) Monoclonal antibodies against the structural proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus isolates. *J. Fish Dis.*, 16: 53-63
- Schofield R y Dexter TM (1985) Studies on the self-renewal ability of CFU-S which have been serially transferred in long-term culture or *in vivo*. *Leukemia Res.*, 9: 305-313
- Secombes CJ (1985) The *in vitro* formation of teleost multinucleate giant cells. *J. Fish Dis.*, 8: 461-464
- Secombes CJ (1987) Lymphokine-release from rainbow trout leucocytes stimulated with concanavalin A. Effects upon macrophage spreading and adherence. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 513-520
- Secombes CJ (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. En: *Techniques in Fish Immunology*. JS Stolen, TC Fletcher, DP Anderson, BS Roberson y WB van Muiswinkel (Eds.). SOS Publications. Fair Haven. USA. pp. 137-154
- Segal GM, McCall E, Stueve T y Bagby GC (1987) Interleukin 1 stimulates endothelial cells to release multilineage human colony-stimulating activity. *J. Immunol.*, 138: 1772-1778

- Segner H, Blair JB, Wirtz G y Miller MR (1994) Cultured trout liver cells: utilization of substrates and response to hormones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30A: 306-311
- Shadduck RK, Waheed A, Greenberger JS y Dexter TM (1983) Production of colony stimulating factor in long-term bone marrow cultures. *J. Cell Physiol.*, 114, 88-92
- Shea TB y Berry ES (1982) Uptake and toxicity of toxaphene to cell cultures derived from goldfish (*Carassius auratus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 68-75
- Shea TB y Berry ES (1983) Toxicity and localization of carbaril and 1-naphthol in cell cultures derived from goldfish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 30: 99-104
- Sieff CA (1987) Hematopoietic growth factors. *J. Clin. Invest.*, 79: 1549-1557
- Sieff CA, Tsai S y Faller DV (1987) Interleukin-1 induces cultured human endothelial cell production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Invest.*, 79: 48-51
- Siegl E, Albrecht S y Lütke B (1993) Long-term liquid culture of haematopoietic precursor cells from the head kidney and spleen of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Haematol. Int.*, 3: 168-173
- Siminovitch L, McCulloch EA y Till JE (1963) Distribution of colony forming cells among spleen colonies. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 62: 327-336
- Simmons PJ, Przepiorcka D, Thomas ED y Torok-Storb B (1987) Host origin of the bone marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature*, 328: 429
- Sitnicka E y Hansson M (1992) Natural Killer (NK) cell activity in human long-term bone marrow cultures (LTBMC): effects of interleukin-2 (IL-2) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on the progenitor cells. *Immunology*, 76: 292-298
- Sizemore RC, Miller NW, Cuchens MA, Lobb CJ y Clem LW (1984) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for *in vitro* mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.*, 133: 2920-2924
- Slater MA, Mosser DD y Bols NC (1983) Established cell lines from different groups of vertebrates undergo metabolic cooperation with one another. *In Vitro*, 19: 683-692
- Smith AM, Wivel NA y Porter M (1970) Plasmacytopoiesis in the pronephros of the carp (*Cyprinus carpio*). *Anat. Rec.*, 167: 351-370
- Snegaroff J (1993) Induction of interferon synthesis in rainbow trout leucocytes by various homeotherm viruses. *Fish Shellfish Immunol.*, 3: 191-198
- Soda R y Tavassoli M (1984) Transendothelial transport (transcytosis) of iron-transferrin complex in bone marrow. *J. Ultrastruct. Res.*, 88: 18-29
- Song ZX, Shadduck RK, Innes DJ, Waheed A y Quesenberry PJ (1985) Hematopoietic factor production by a cell line (TC-1) derived from adherent murine marrow cells. *Blood*, 66: 273-281
- Sorrell JM y Weiss L (1980) Cell interactions between hematopoietic and stromal cells in embryonic chick bone marrow. *Anat. Rec.*, 197: 1-19
- Spangrude G y Johnson G (1990) Resting and activated subsets of mouse multipotent stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87: 7433-7437
- Spangrude G, Heimfeld S y Weissman I (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241: 58-62
- Sponcer E y Dexter TM (1984) B Long-Term Bone Marrow Cultures. *Bibliotheca Haemat.*, 48, 366-383.
- Sponcer E, Eliason J y Dexter TM (1993) Long-term mouse bone marrow cultures. En: *Haemopoiesis: a practical approach*. NG Testa y Molineux G (Eds.) IRL Press. Oxford. pp. 55-73
- Sponcer E, Gallagher JT, Krizsa F y Dexter TM (1983) Regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. IV Glycosaminoglycans synthesis and the stimulation of haemopoiesis by -D-xylosides. *J. Cell Biol.*, 96: 510-514
- Srouf EF, Brandt JE, Briddel RA, Grigsby S, Leemhuis T y Hoffman R (1993) Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells *in vitro*. *Blood*, 81: 661-669

- Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL y Shreeve MM (1971) Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68: 1542-1546
- Stocker M y MacPherson C (1961) Studies on transformation of hamster cells polyoma virus *in vitro*. Virology, 14: 359-370
- Taggart J, Ferguson A y Mason FM (1981) Genetic variation in irish populations of brown trout (*Salmo trutta L.*): electrophoretic analysis of allozymes. Comp. Biochem. Physiol., 69B: 393-412
- Tavassoli M (1977). Adaptation of marrow sinus wall to fluctuation in the rate of cell delivery: Studies in rabbits after bloodletting. Br. J. Haemat., 35: 25-32.
- Tavassoli M (1979) The marrow-blood barrier. Br. J. Haematol., 41: 297-302
- Tavassoli M (1982) Ultrastructural and radiobiological characterization of stromal cells in continuous, long-term marrow culture. Sca. Elec. Mic., 1: 349-357
- Tavassoli M (1984) Lodgement of haemopoietic cells in the course of haemopoiesis on cellulose ester membrane: an experimental model for haemopoietic cell trapping. Br. J. Haematol., 57: 71-80
- Tavassoli M y Crosby WH (1973) Fate of the nucleus of the marrow erythroblast. Science, 179: 912-913
- Tavassoli M y Takahashi K (1982) Morphological studies on long-term culture of marrow cells: Characterization of the adherent stromal cells and their interactions in maintaining the proliferation of hemopoietic stem cells. Am. J. Anat., 164, 91-111.
- Tavassoli M y Yoffey JM (1983) Bone marrow: structure and function. Alan R Liss Inc.. Nueva York. pp. 47-64
- Tavassoli P y Friedenstein A (1983) Hemopoietic stromal microenvironment. Am. J. Hematol., 15: 195-203
- Thalmeier K, Meißner P, Reisbach G, Falk M, Brechtel A y Dörmer P (1994) Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. Blood, 83: 1799-1807
- Thomas PS, Pietrangeli CE, Hayashi SI, Schachner M, Goridis C, Low M y Kincade PW (1988) Demonstration of neural cell adhesion molecules on stromal cells that support lymphopoiesis. Leukemia Res., 2: 171-175
- Thorgaard GH (1976) Robertsonian polymorphism and constitutive heterochromatin distribution in chromosomes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Cytogenet. Cell Genet., 17: 174-184
- Thuvander A, Norrgren L y Fossum C (1987) Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. J. Fish Biol., 31: 197-208
- Till JE y McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Rad. Res., 14: 213-222
- Tillit DE, Giesy JP y Fromm PO (1988) *In vitro* mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Comp. Biochem. Physiol., 89A: 25-35
- Timpl R y Oziadek M (1986) Structure, development and molecular pathology of basement membranes. Int. Rev. Exp. Pathol., 29: 1-112
- Torok-Storb B (1988) Cellular interactions. Blood, 72: 373-385
- Touw I y Löwenberg B (1983) No stimulative effect of adipocytes on hematopoiesis in long-term human bone marrow cultures. Blood, 61: 770-774
- Trentin JJ (1970) Influence of hemopoietic organ stroma (hemopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation. En: Regulation of hematopoiesis. AS Gordon (Ed.) Appleton-century-crofts. Vol. 1. Nueva York. pp. 161-186
- Trentin J (1971) Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). Am. J. Pathol., 65: 621-628
- Tripp RA, Maule AG, Schreck CB y Kaattari SL (1987) Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocyte responses *in vitro*. Dev. Comp. Immunol., 11: 565-576

- Tsai S, Patel V, Beaumont E, Lodish HF, Nathan DG y Sieff CA (1987) Differential binding of erythroid and myeloid progenitors to fibroblasts and fibronectin. *Blood*, 69: 1587-1594
- Tung LC, Chen SN y Kou GH (1991) Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). *Gyobyo Kenkyu*, 26: 109-117
- Vallejo AN, Ellsaesser CF, Miller NW y Clem W (1991) Spontaneous development of functionally active long-term monocyte-like cell lines from channel catfish. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27A: 279-286
- Vallejo AN, Miller NW y Clem W (1992) Antigen processing and presentation in teleost immune responses *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 73-89
- Van Den Heuvel R, Mathieu E, Schoeters G, Leppens H, y Vanderborcht O (1991) Stromal cells from murine developing hemopoietic organs: comparison of colony-forming unit of fibroblasts and long-term cultures. *Int. J. Dev. Biol.*, 35: 33-41
- Van Den Heuvel R, Schoeters GER y Vanderborcht OLJ (1988) Haemopoiesis in long-term cultures of liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice: CFU-GM production. *Br. J. Haematol.*, 70: 273-277
- Verburg-van Kemenade BML, Groeneveld A, Van Rens BTTM y Rombout JHWM (1994) Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *J. Exp. Biol.*, 187: 143-158
- Verburg-van Kemenade BML, Weyts FAA, Debets R y Flik G (1995) Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.*, 19: 59-70
- Verfaillie C, Blakolmer K y McGlave P (1990) Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term *in vitro* repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J. Exp. Med.*, 172: 509-520
- Vilcek J y Le J (1991) Immunology of cytokines: an introduction. En: *The cytokine handbook*. A Thomson (Ed.) Academic Press. Londres. pp.1-17
- Visser J, Bauman J, Mulder A, Eliason J y Leeuw A (1984) Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, 59: 1576-1590
- Vries P, Pronk GJ, Visser J (1988) A multiple staining procedure for the flow cytometric screening of monoclonal antibodies directed against murine pluripotent stem cells (CFU-S). *Blood Cells*, 14: 561-574
- Vuillet-Gaugler MH, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Guichard J, Tchernia G y Coulombel L (1990) Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation. *Blood*, 75: 865-873
- Wagner CR, Vetto RM y Burger DR (1985) Expression of I-region-associated antigen (Ia) and interleukin 1 by subcultured human endothelial cells. *Cell. Immunol.*, 93: 91-104
- Wang TY, Brennan JK y Wu JHD (1995) Multilineal hematopoiesis in a three-dimensional murine long-term bone marrow culture. *Exp. Hematol.*, 23: 26-32
- Warr GW y Simon RC (1983) The mitogen response potential of lymphocytes from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) re-examined. *Dev. Comp. Immunol.*, 7: 379-384
- Watanabe Y, Hanada H y Ushiyama (1981) Monolayer cell cultures from marine fishes. *Fish Pathol.*, 15: 201-205
- Watt SM y Vissert JWM (1992) Recent advances in the growth and isolation of primitive human haemopoietic progenitor cells. En: *Cell Proliferation*. C Potten, Z Darzynkiewicz (Eds.). pp: 263-297
- Weiss L (1980) The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: An ultrastructural study of the interactions of blood cells, stroma and blood vessels. En: *Blood cells and Vessels walls: functional interactions*. Ciba Foundation Symposium. Vol. 84. Pitman Medical. Londres. pp. 3-19
- Weiss L (1981) Haemopoiesis in mammalian bone marrow. En: *Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation*. Ciba Foundation Symposium. Vol. 84. Pitman Medical. Londres. pp. 5-21

- Weiss L (1988) Bone marrow. En: Cell and tissue biology: A textbook of histology. 6th Ed. L. Weiss (Ed.). Urban & Schwarzenberg Inc. Baltimore. USA. pp.469-478
- Weiss L y Chen LT (1975) The organization of hemopoietic cords and vascular sinuses in bone marrow. *Blood Cells*, 1: 617-638
- Westen H y Bainton DF (1979) Association of alkaline phosphatase positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. *J. Exp. Med.*, 150: 919-937
- Whitlock CA y Müller-Sieburg CE (1990) Long-term B lymphoid cultures from murine bone marrow: Establishment and cloning by using stromal cell line AC 6.21. En: *Animal Cell Culture. Methods in Molecular Biology*. JW Pollard y JM Walker (Eds.) Humana Press. CLIFTON. Vol. 84. New Jersey. pp. 303-322
- Whitlock CA y Witte N (1987) Long-term culture of murine bone marrow precursors of B lymphocytes En: *Methods in Enzymology*. Di Sabato G (Ed.). Acad. Press Inc.. Vol. 150. Londres. pp. 275-286.
- Whitlock CA, Tidmarsh GF, Müller-Sieburg C y Weissman IL (1987) Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. *Cell*, 48: 1009-1021
- Wight TN, Kinsella MG, Keating A y Singer JW (1986) Proteoglycans in human long-term marrow cultures: biochemical and ultrastructural analyses. *Blood*, 5: 1333-1343
- Wight TN, Kinsella MG, Qwarnström EE (1992) The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Op. Cell Biol.*, 4: 793-801
- Wilson FD, O'Grady L, McNeill CL y Munn SL (1974) The formation of bone marrow derived fibroblastic plaques *in vitro*. Preliminary results contrasting these populations to CFU-C. *Expl. Hemat.*, 2: 343-354
- Wilson FD, Tavassoli M, Greenberg BR, Hinds D y Klein AK (1981) Morphological studies on adherent cells in bone marrow cultures from humans, dogs and mice. *Stem Cells*, 1: 15-29
- William GH y Golde DW (1980) Long-term human bone marrow cultures. *Blood*, 56: 118-124
- Winton JR, Lannan CN, Fryer JL y Kimura T (1981) Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. *Fish. Pathol.*, 15: 155-162
- Witte PL, Kincade PW y Vetvicka V (1986) Interculture variation and evolution of B lineage lymphocytes in long-term bone marrow culture. *Eur. J. Immunol.*, 16: 779-787
- Witte PL, Robinson M, Henley A, Low MG, Stiers DL, Perkins S, Fleischman RA y Kincade PW (1987) Relationships between B-lineage lymphocytes and stromal cells in long-term bone marrow cultures. *Eur. J. Immunol.*, 17: 1473-1484
- Wolf K y Ahne W (1982) Fish cell culture. En: *Advances in cell culture*. Maramorosch, K (Ed). Vol. 2. 95: 455-458
- Wolf K y Quimby MC (1962) Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, 135: 1065-1066
- Wolf K y Quimby MC (1969) Fish cell and tissue culture. En: *Fish Physiology*. W.S. Hoar y D.J. Randall (Eds). Acad. Press. Vol. 3. Nueva York. pp. 253-305
- Wolf K, Darlington RW, Taylor WG, Quimby MC y Nagabayashi T (1978) *Herpesvirus salmonis*: characterization of a new pathogen of rainbow trout. *J. Virol.*, 27: 659-666
- Wolf NS y Trentin J (1968) Effects of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J Exp. Med.*, 127: 205-214
- Wood EM y Yasutake WT (1956) Histopathology of kidney disease in fish. *Am. J. Pathol.*, 32: 845-857
- Worton RG y Duff C (1979) Karyotyping. En: *Methods in Enzymology*. WB Jakoby (Ed.). Academic Press. Vol. 58. Londres. pp. 322-344
- Wright DG y Greenberger JJ (1984) Long-term bone marrow culture. DG Wright y Greenberger JJ (Eds.). Alan R. Liss. Nueva York

- Xu CX, Hendry JH, Testa NG y Allen TD (1983) Stromal colonies from mouse bone marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effect on radiosensitivity. *J. Cell. Sci.*, 61: 453-466
- Yamazaki K, Roberts RA, Spooncer E, Dexter TM y Allen TD (1989) Cellular interactions between 3T3 cells and interleukin-3-dependent multipotent haemopoietic cells: a model system for stromal-cell-mediated haemopoiesis. *J. Cell Physiol.*, 139: 301-312
- Yang YC, Tsai S, Wong GC y Clark SC (1988) Interleukin-1 regulation of hematopoietic growth factor production by human stromal fibroblast. *J. Cell Physiol.*, 134: 292
- Yasutake WT (1978) Histopathology of yearling sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) infected with infectious hematopoietic necrosis (IHN). *Fish Pathol.*, 14: 59-64
- Yasutake WT y Rasmussen CJ (1968) Histopathogenesis of experimentally induced viral hemorrhagic septicemia in fingerling rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 69: 977-984
- Yoshida H y Yumoto T (1987) Alkaline phosphatase-positive reticular cells of chicken bone marrow *in vivo* and *in vitro* studies. *Int. J. Cell Cloning*, 5: 35-54
- 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. *Gyobyō Kenkyū*, 26: 29-33
- Yu ML, Kiley CW, Sarot DA y Pelmutter A (1971) Regulation of haemosiderin to erythropoiesis in the blue gourami *Trichogaster trichopterus*. *J. Fish Res. Board Can.*, 28: 47-48
- Zapata A (1979) Ultrastructural study of the teleosts fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.*, 3: 55-65
- Zapata A (1981) Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.*, 5: 685-690
- Zapata A (1983) Phylogeny of the fish immune system. *Bull. Inst. Pasteur*, 81: 165-186
- Zapata AG y Cooper EL (1990) The immune system: comparative histophysiology. J Willey y Sons Ltd. Chichester. Inglaterra.
- Zapata A, Leceta J y Villena A (1981). Reptilian bone marrow. An ultrastructural study in the spanish lizard, *Lacerta hispanica*. *J. Morphol.*, 168: 137-149.
- Zipori D, Toledo J y Mark K (1985) Phenotypic heterogeneity among stromal cell lines from mouse bone marrow disclosed in their extracellular matrix composition and interactions with normal and leukemic cells. *Blood*, 66: 447-455
- Zsebo KM, Yoschenkoff VN, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello CA, Brown MA, Altrock B y Bagby GC (1988) Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood*, 71: 99-103
- Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L y Weiner RS (1986) Interleukin-1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2. *J. Clin. Invest.*, 77: 1857
- Zuckerman KS (1984) Composition and function of the extracellular matrix in the stroma of long-term bone marrow cultures. En: Long-term bone marrow culture. DG Wright y JS Greenberger (Eds.). Alan R Liss Inc. Nueva York. pp. 157-170
- Zuckerman KS y Wicha MS (1983) Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood*, 61: 540-547
- Zuckerman KS, Prince CW y Gay S (1989) The hemopoietic extracellular matrix. En: The handbook of the hemopoietic microenvironment. M Tavassoli (Ed.) Humana Press Inc. pp. 399-432

## TABLAS Y GRÁFICAS

**Tabla I.-** Cultivos celulares de órganos hematopoyéticos de peces. [CLP: cultivo a largo plazo. CMS: cultivos en medio semisólido. Con A: concanavalina A. CP: cultivo primario. FBS: suero fetal bovino. FCS: suero fetal de ternera. HS: suero de caballo. LC: línea celular. LPS: lipopolisacárido bacteriano. MAF: factor activador de macrófagos. MLR: reacción de linfocitos mixtos. PBLs: leucocitos aislados de sangre periférica. PFC: células formadoras de placas. PHA: fitohemaglutinina].

ESPECIE	ÓRGANO	TIPO DE ENSAYO	MEDIO CULTIVO	SUPLEMENTOS	CITA
<i>A. schlegeli</i>	Bazo y riñón	LC	L-15	FCS	Tung y cols., (1991). Gyobyo Kenkyu, 26: 109-117
<i>B. chrysur</i>	Bazo	LC	L-15	FBS	Ellender y cols., (1979). <i>In vitro.</i> , 15: 112-113
<i>C. carpio</i>	PBLs	CMS	MEM	Plasma homólogo, PHA	Caspi y cols., (1982). Dev. Comp Immunol., 6: 683-692
<i>C. carpio</i>	PBLs	LC	MEM	FBS	Faisal y Ahne. (1990). Dev. Comp. Immunol., 14: 255-260
<i>C. carpio</i>	Riñón, timo, sangre y bazo	Separación de células B y células plasmáticas	RPMI y DMEM	-	Koumans-Van Diepen y cols., (1994). Fish Shellfish Immunol., 4: 19-28
<i>C. carpio</i>	Riñón	CMS	RPMI-1640	FCS, suero alogénico	Moritomo y cols., (1993). Gyobyo Kenkyu, 28: 59-63
<i>C. carpio</i>	Riñón	CMS	RPMI-1640	FCS, suero alogénico	Moritomo y Watanabe (1994). Tech. Fish Immunol., Vol. 3. pp. 35-43
<i>C. carpio</i>	Riñón	CP	E-RDF	FCS, Suero alogénico	Moritomo y cols., (1994). Dev. Comp. Immunol., 18: S136.
<i>C. carpio</i>	Riñón	Obtención de macrófagos	RPMI	PHA	Verburg-van Kemenade y cols., (1995). Dev. Comp. Immunol., 19: 59-70
<i>I. punctatus</i>	PBLs	Proliferación de linfocitos y cultivos MLR	RPMI-1640. Medio sin sueros AIM-V/L-15 (1:1)	Plasma humano y suero alogénico en el medio RPMI-1640. LPS, Con A	Luft y cols., (1991). Fish Shellfish Immunol., 1: 131-139
<i>I. punctatus</i>	PBLs	Proliferación de linfocitos	RPMI-1640	Plasma humano, y suero alogénico, LPS, Con A y éster de forbol A-23187.	Miller y Clem (1988). J. Tiss. Culture Methods, 11: 69-73
<i>I. punctatus</i>	PBLs	LC	KC2000	LPS	Vallejo y cols., (1991). In Vitro Cell Dev. Biol., 27A: 279-286
<i>O. kisutch</i>	Linfocitos de bazo, riñón cefálico y timo	PFC	L-15	FCS	Kaattari e Irwin (1985). Dev. Comp. Immunol., 9: 433-444
<i>O. mykiss</i>	Riñón	CMS	RPMI-1640	FCS, suero alogénico, PHA, Con A, LPS	Estepa y Coll (1993). Fish Shellfish Immunol., 3: 71-75

Tabla I.- cont.

ESPECIE	ÓRGANO	TIPO DE ENSAYO	MEDIO CULTIVO	SUPLEMENTOS	CITA
<i>O. mykiss</i>	PBLs	CMS	MEM	FCS, LPS, PHA	Finegan y Mulcahy (1987). Dev. Comp. Immunol., 11: 419-425
<i>O. mykiss</i>	Bazo	CLP	L-15	FBS ó HS	Ganassin y Bols. (1996). Fish Shellfish Immunol., 6: 17-34
<i>O. mykiss</i>	Leucocitos de pronefros	Producción de MAF	L-15	FCS	Marsden y cols., (1994). Vet. Immunol. Immunopathol., 42: 199-208.
<i>O. mykiss</i>	Bazo	LC	MEM10	FCS	Moritomo y cols., (1990). Fish Pathol., 25: 165-170
<i>O. mykiss</i>	PBLs y leucocitos de pronefros	Ensayos de linfoquinas	L-15	FCS	Secombes (1987). Dev. Comp. Immunol., 11: 513-520
<i>O. mykiss</i>	Riñón y bazo	CLP	L-15	FCS y/o HS	Siegl y cols., (1993). Comp. Haematol. Int., 3: 168-173
<i>O. mykiss</i>	Leucocitos de pronefros	Detección de producción de interferón	Medio Stocker (Stocker & MacPherson, 1961. Virology, 14: 359-370)	FCS	Snegaroff (1993). Fish Shellfish Immunol., 3: 191-198
<i>O. mykiss</i>	Riñón	Obtención de Fagocitos	L-15	FCS	Yoshida y Kitao (1991). Gyoby Kenkyu, 26: 29-33
<i>S. gairdneri</i>	Riñón	Obtención de Macrófagos	L-15	FCS	Braun-Nesje y cols., (1982). Dev. Comp. Immunol., 6: 281-291
<i>S. gairdneri</i>	Riñón y sangre	Obtención de leucocitos	L-15	FCS, Con A	Graham y Secombes (1988). Immunology, 65: 293-297
<i>S. gairdneri</i>	Riñón	Obtención de macrófagos	L-15	FCS	Secombes (1985). J. Fish Dis., 8: 461-464
<i>S. gairdneri</i> y <i>S. salar</i>	Riñón	Obtención de Macrófagos	L-15	FCS	Braun-Nesje y cols., (1981). J. Fish Dis., 4: 141-151
<i>S. namaycush</i>	Riñón	LC	L-15	FBS	Cheng y cols., (1993). J. Aquat. Animal Health., 5: 119-126
<i>S. aurata</i>	Riñón cefálico	Obtención de macrófagos	L-15	FCS, Con A y sobrenadantes recogidos de cultivos linfocitos estimulados con Con A	López-Ruiz y cols., (1994). Dev. Comp. Immunol., 18: S86
<i>Salmo salar</i>	PBLs y leucocitos de pronefros	Producción de MAF	L-15	FCS	Francis y Ellis (1994). Fish Shellfish Immunol., 4: 489-497

**Tabla II.-** Anticuerpos monoclonales (m) y policlonales (p) empleados en la caracterización de la línea celular del estroma. (1) obtenido en conejo, (2) obtenido en cabra, (3) obtenido en ratón.

Anticuerpo primario	Solución de trabajo	Especificidad	Fuente
Anti-queratina P, <sup>1</sup>	Sin diluir	Pan-queratina de bovino	Dakopatts
Anti-S100 P, <sup>1</sup>	20 mg/ml	Proteína S-100 de bovino	Sigma
Anti-colágeno I P, <sup>2</sup>	50 mg/ml	Colágeno I humano y bovino	Southern Biotech. Assoc.
Anti-colágeno III P, <sup>2</sup>	50 mg/ml	Colágeno III humano y bovino	Southern Biotech. Assoc.
Anti-vimentina <sup>m,3</sup> Clon VIM3B4	10 mg/ml	Vimentina bovina	Boehringer Mannheim.
<b>Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa</b>			
Anti-Ig de ratón <sup>1</sup>	1:40	Ig de ratón	Dakopatts
Anti- Ig de conejo <sup>2</sup>	1:200	Ig G de conejo	Sigma
Anti- Ig de cabra <sup>1</sup>	1:60	Ig de cabra	Dakopatts

**Tabla III.-** Perfil citoquímico de la línea celular TPS en los pases 60, 82 y 145. (-) negativo; (+) positivo débil; (++) positivo moderado.

Tipo Celular \Pases	AKPH			ACPH			ANAE		
	60	82	145	60	82	145	60	82	145
Células fibroblásticas	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
Células epitelioides	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
Células gigantes	-	-	-	-	+/-	-	+++	+++	+

**Tabla IV.-** Análisis de isoenzimas para la línea celular TPS en comparación con otras líneas celulares de salmónidos. (1) perfil diferente, (2) perfil idéntico, (3) actividad enzimática detectable en la línea celular TPS pero no en las otras líneas celulares.

Isoenzima	TPS vs RTG-2	TPS vs CHSE-214	TPS vs BF-2
MDH	1	1	1
AK	2	2	1
6-PGDH	2	2	1
LDH	2	2	1
IDH	1	3	1
PGM	1	3	1
CK	1	3	1
HK	2	3	1
FDP	3	2	3
PMI	3	3	2
PGI	2	2	2

**Tabla V.-** Replicación del virus VHS en la línea celular TPS (pase 9), según el método TCID<sub>50</sub> y ELISA. Los resultados están expresados como TCID<sub>50</sub> × 10<sup>-3</sup> ml<sup>-1</sup> después de la titulación en monocapas de EPC y como el inverso de la dilución para obtener una absorbancia de 0,4 por ELISA.

MÉTODO	SOBRENADANTE	TITULO VHSV
MONOCAPAS EPC	CONTROL	100
MONOCAPAS EPC	CULTIVO INFECTADO	2500
ELISA	CONTROL	50
ELISA	CULTIVO INFECTADO	1000

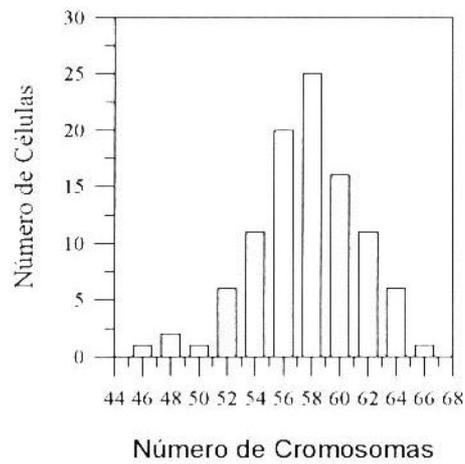
**Tabla VI.-** Duración de la actividad hematopoyética en los cocultivos realizados entre suspensiones celulares de pronefros y las líneas celulares TPS ó RTG-2. \* Tiempo máximo de incubación.

	<b>TPS PASES 40-50</b>	<b>TPS PASES 130-137</b>	<b>RTG-2</b>
<b>MEDIO MCP</b>	10 MESES	3-4 MESES	1,5 MESES
<b>MEDIO D</b>	16 MESES	3-4 MESES	1,5 MESES
<b>MEDIO E</b>	11 MESES	3-4 MESES	1,5 MESES
<b>MEDIO F</b>	4 MESES *	3-4 MESES	1,5 MESES

**Tabla VII.-** Perfil citoquímico de las células recogidas en los sobrenadantes de los cocultivos. (-) negativo; (+) positivo; (+/-) unas células positivas y otras no.

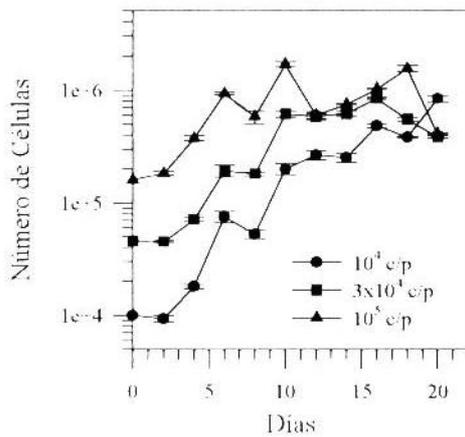
	<b>TPS PASES 42-43</b>			<b>TPS PASES 136-137</b>			<b>RTG-2</b>		
	AKPH	ACPH	ANAE	AKPH	ACPH	ANAE	AKPH	ACPH	ANAE
<b>LINFOCITOS</b>	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
<b>SERIE HETERÓFILA</b>	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-
<b>SERIE ERITROIDE</b>		-	-	-	-	-		-	-
<b>MONOCITOS</b>	-	+	+	-	+	+		+	+
<b>MELANOMACRÓF.</b>	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
<b>ESTROMA</b>	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+

**Gráf. 1.-** Frecuencia de distribución de los cromosomas de la línea celular TPS por 100 células.

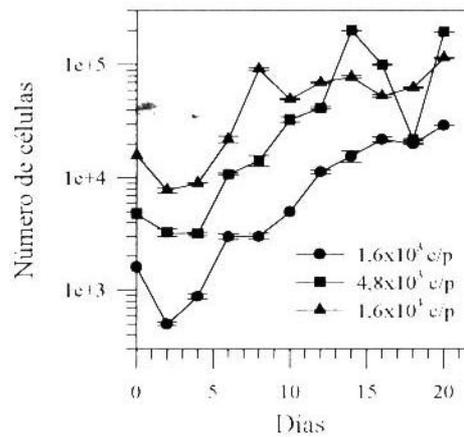


**Gráfs. 2a-c.-** Curva de crecimiento de las células TPS. c/p (células por pocillo indica la densidad de siembra inicial. Cada punto representa la media de tres recuentos ± SD.

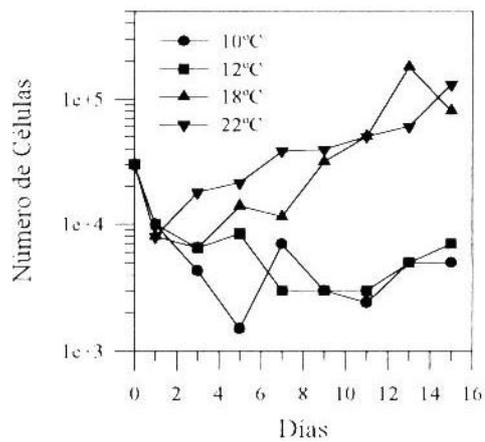
**Gráf 2a.-** Curva de crecimiento de las células TPS en placas de 24 pocillos.



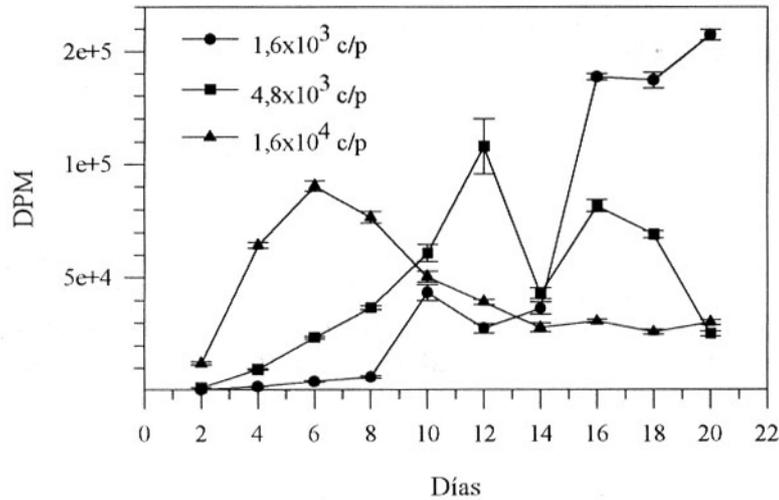
**Gráf. 2b.-** Curva de crecimiento de las células TPS en placas de 96 pocillos.



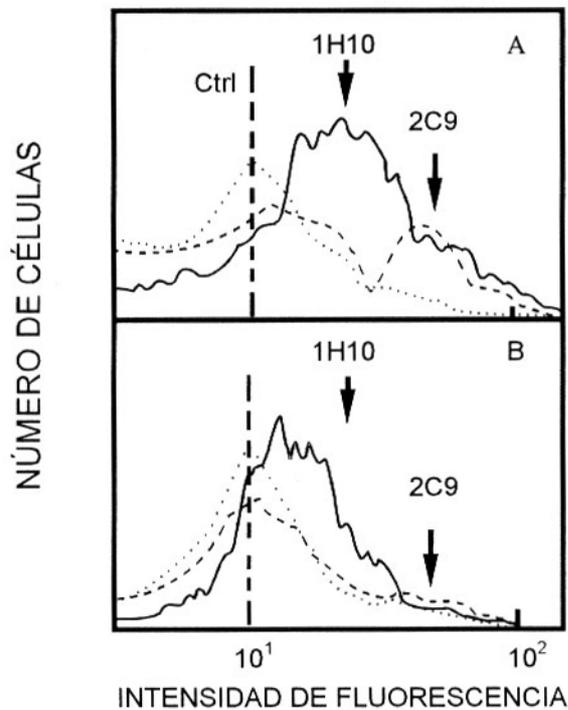
**Gráf. 2c.-** Curva de crecimiento de las células TPS a diferentes temperaturas.

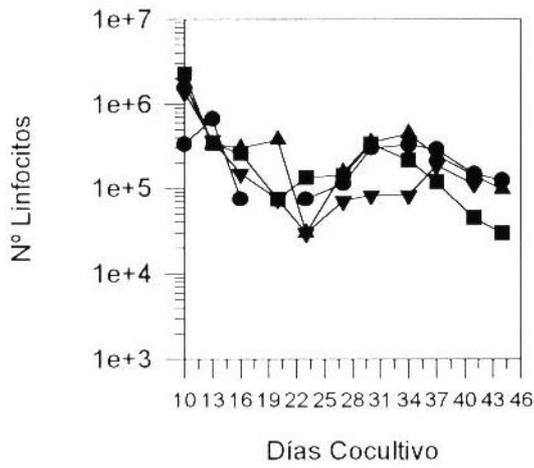


**Gráf. 3.-** Cinética de incorporación de timidina tritiada en la línea celular TPS cultivada a 18°C. c/p (células por pocillo) indica las densidades de siembra iniciales. Cada punto representa la media de 2 filas (n=24) ± SD.

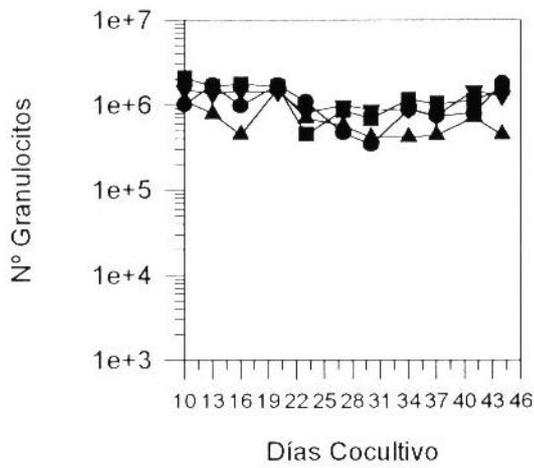
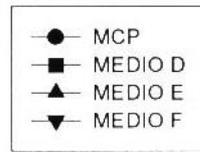


**Gráfica 4.-** Fluorescencia de la línea celular de estroma del pronefros medida a 515-545 nm en un citómetro de flujo. (A) Células infectadas con el virus VHSV y teñidas con los anticuerpos monoclonales anti-proteína G del virus (1H10) (—), anti-proteína N (2C9) (---) y anti-IgM de trucha (· · ·). (B) Células no infectadas. La barra vertical muestra la fluorescencia de fondo en las células teñidas con el anticuerpo monoclonal anti-IgM de trucha.

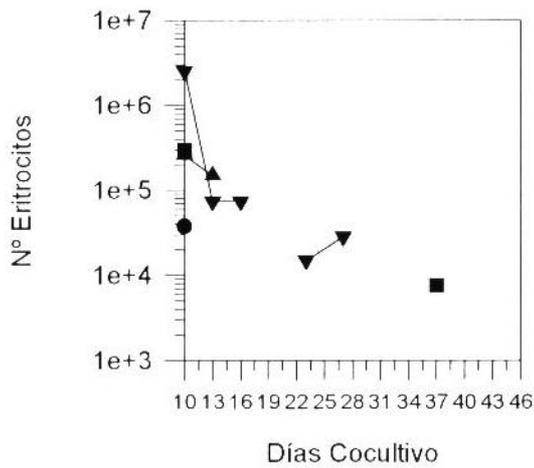
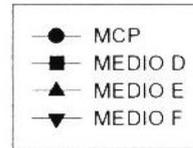




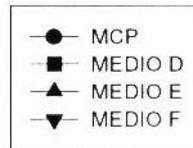
**Gráfica 5a: COCULTIVO TPS (Pase 42)-PRONEFROS.**

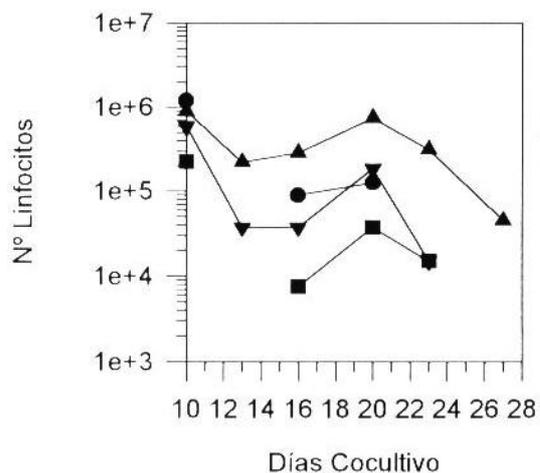


**Gráfica 5b: COCULTIVO TPS (Pase 42)-PRONEFROS.**

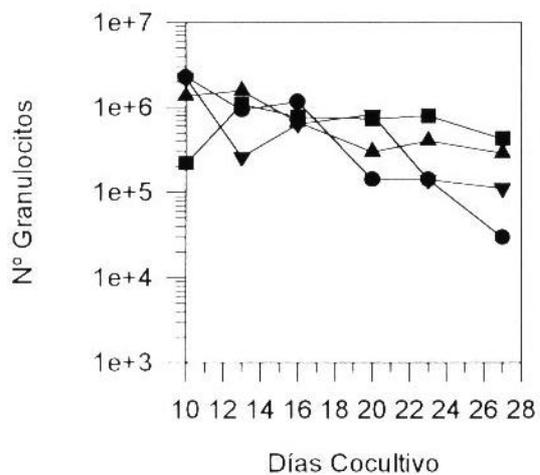
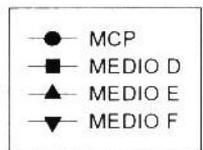


**Gráfica 5c: COCULTIVO TPS (Pase 42)-PRONEFROS.**

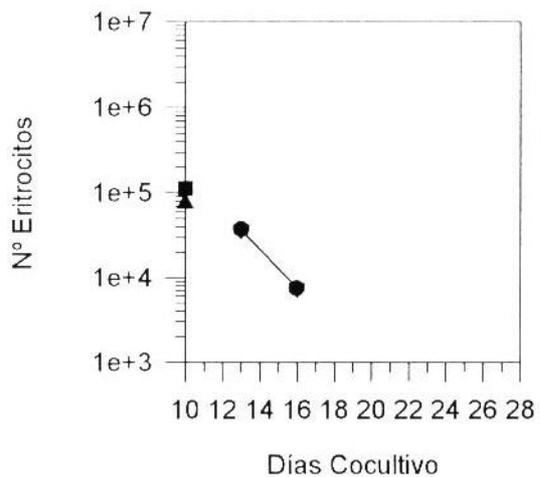
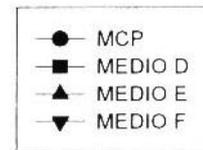




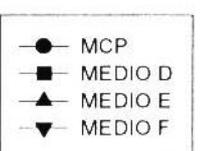
**Gráfica 5d: COCULTIVO  
TPS (Pase 43)-PRONEFROS**

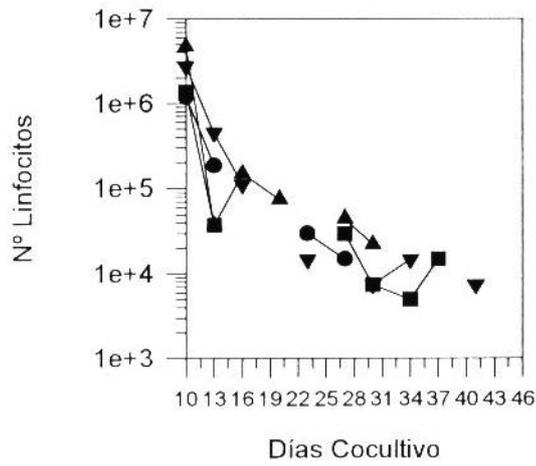


**Gráfica 5e: COCULTIVO  
TPS (Pase 43)-PRONEFROS**

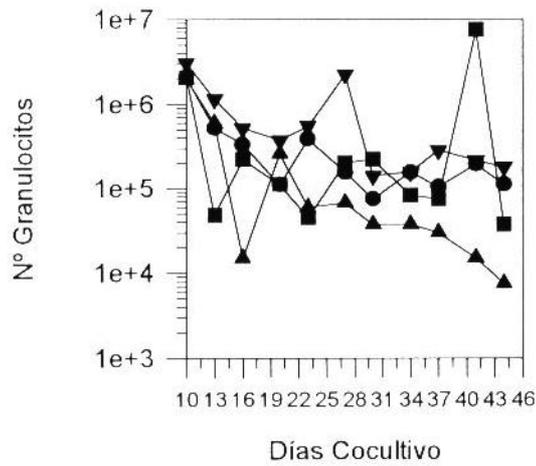
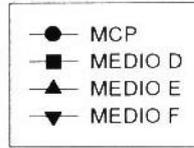


**Gráfica 5f: COCULTIVO  
TPS (Pase 43)-PRONEFROS**

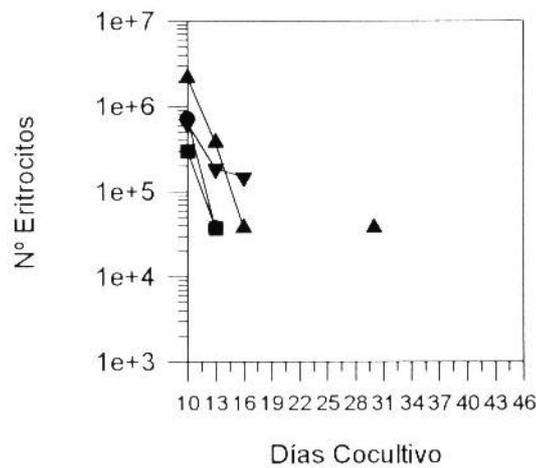
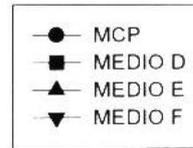




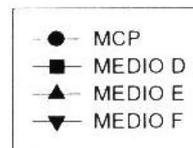
**Gráfica 6a: COCULTIVO  
TPS (Pase 136)-PRONEFROS**

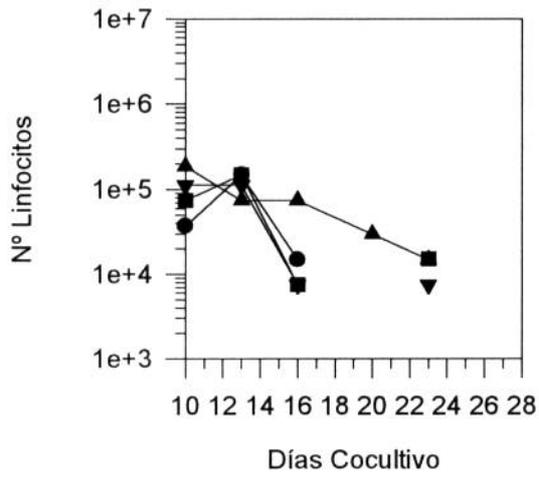


**Gráfica 6b: COCULTIVO  
TPS(Pase 136)-PRONEFROS**

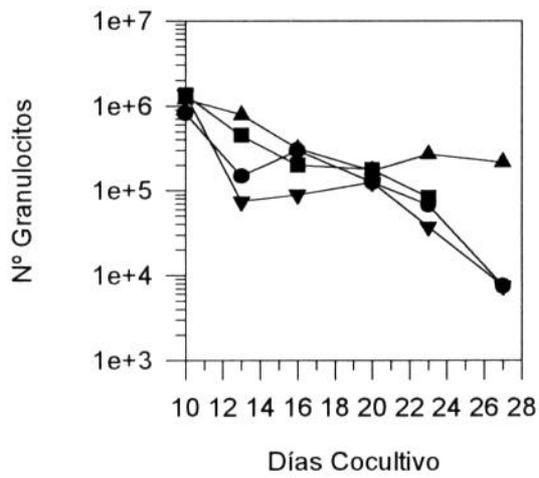
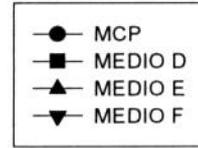


**Gráfica 6c: COCULTIVO  
TPS (Pase 136)-PRONEFROS**

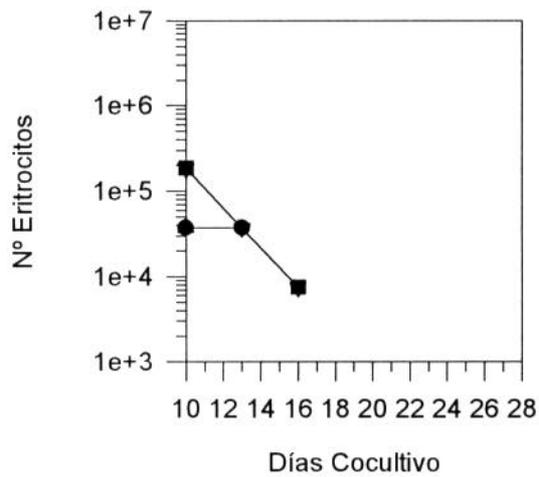
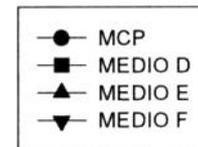




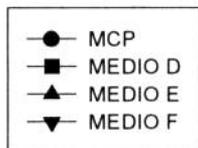
**Gráfica 6d: COCULTIVO  
TPS (Pase 137)-PRONEFROS**

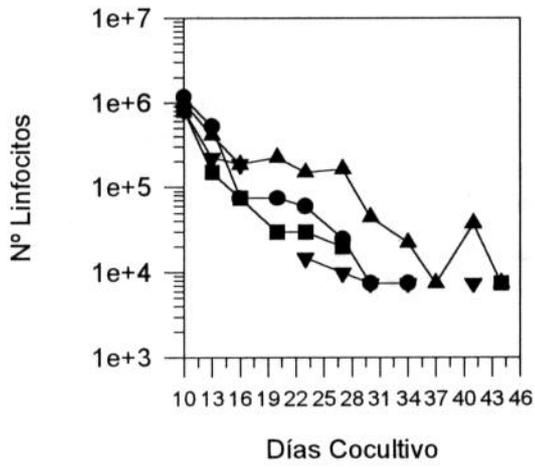


**Gráfica 6e: COCULTIVO  
TPS (Pase 137)-PRONEFROS**

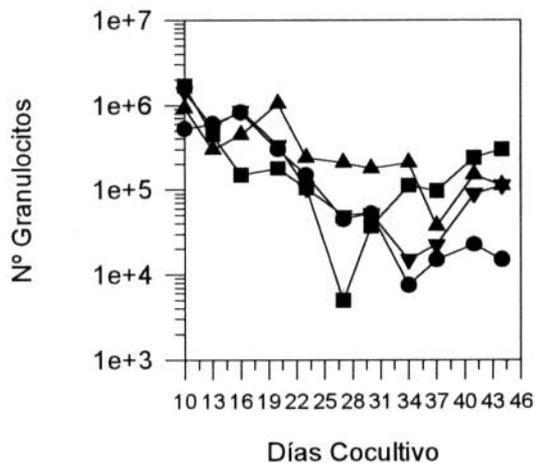
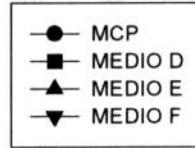


**Gráfica 6f: COCULTIVO  
TPS (Pase 137)-PRONEFROS**

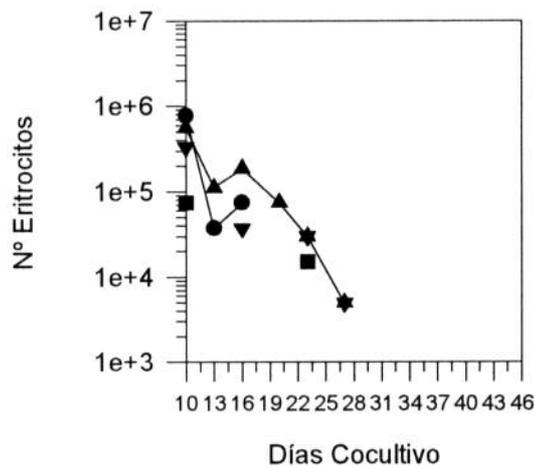
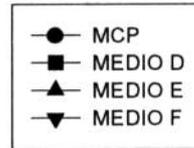




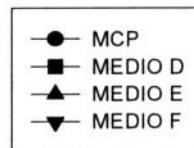
**Gráfica 7a: COCULTIVO RTG-2-PRONEFROS**

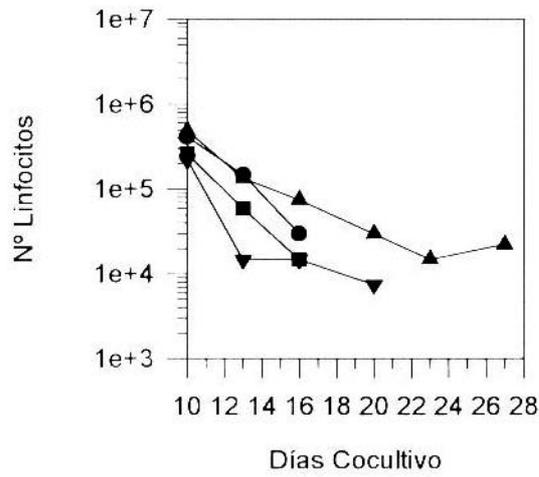


**Gráfica 7b: COCULTIVO RTG-2-PRONEFROS**

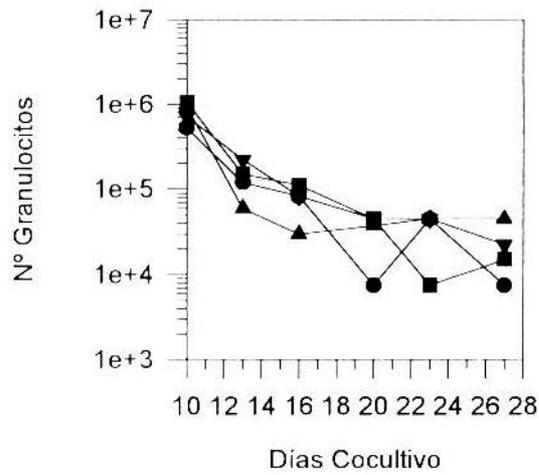
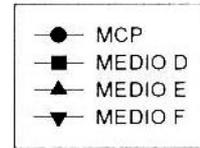


**Gráfica 7c: COCULTIVO RTG-2-PRONEFROS**

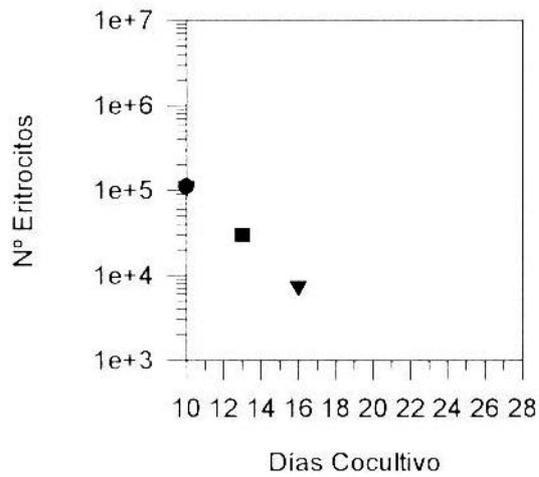
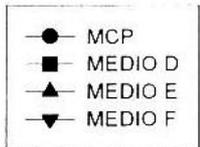




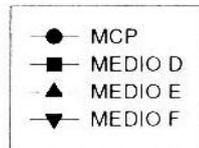
**Gráfica 7d: COCULTIVO RTG-2-PRONEFROS**



**Gráfica 7e: COCULTIVO RTG-2-PRONEFROS**



**Gráfica 7f: COCULTIVO RTG-2-PRONEFROS**





# **FIGURAS**

**Acceso a Figuras 1**

**Acceso a Figuras 2**

**Acceso a Figuras 3**

## Acceso a Tesis

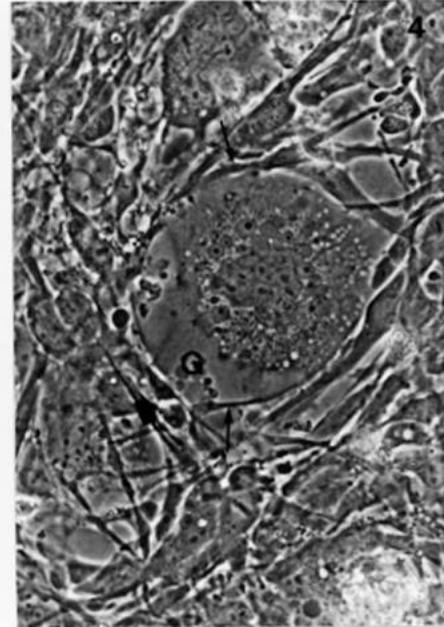
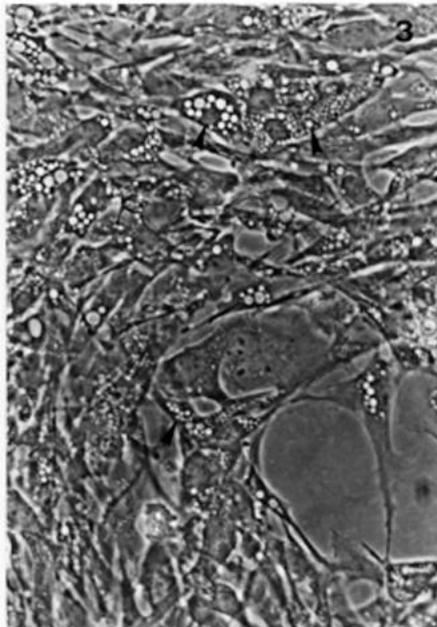
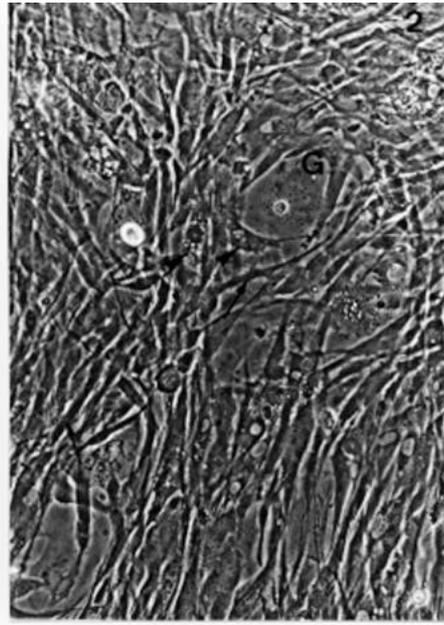
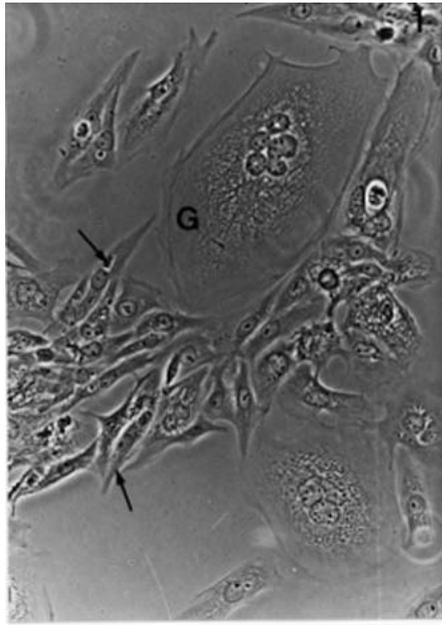
### Micrografías de contraste de fase de la línea celular TPS incubada con el medio de cultivo MCP.

Fig. 1. Cultivo (pase 86) de 3 días en el que se observa una célula gigante (G) y células fibroblásticas (P). 180x.

Fig. 2. Aspecto general de un cultivo (pase 86) de 1 semana formado por un entramado de células fibroblásticas (P) y células epitelioides (ä). Notar una célula gigante (G). 230x.

Fig. 3. Detalle de un cultivo (pase 43) de 1 semana en el que se muestran las células epitelioides (ä). 590x.

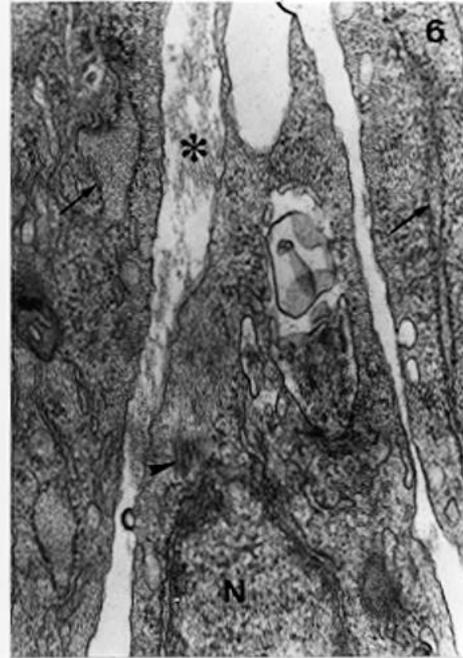
Fig. 4. Detalle de un cultivo (pase 95) de 1 semana donde se observa una célula gigante (G) rodeada por células fibroblásticas (P). Célula en mitosis (ç). 780x.



**Ultraestructura de la línea celular TPS (pase 58) incubada durante 3 semanas con el medio de cultivo MCP.**

Fig. 5. Células fibroblásticas dispuestas en multicapa. Núcleo (N), retículo endoplásmico rugoso (R), cuerpo multivesicular (M), notar el material extracelular filamentoso (F) y los contactos intercelulares (C). 64.800x.

Fig. 6. Detalle del citoplasma de las células fibroblásticas donde se observan cisternas dilatadas y alargadas (R) de retículo endoplásmico rugoso y microfilamentos (M). Notar la matriz extracelular (F), núcleo (N). 63.330x.



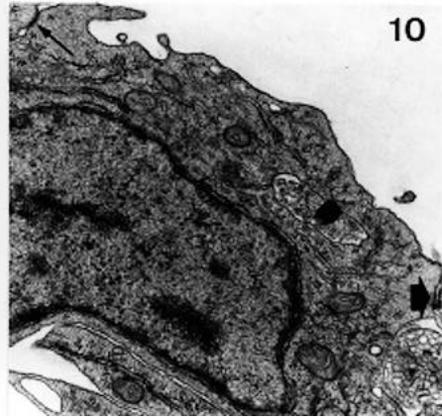
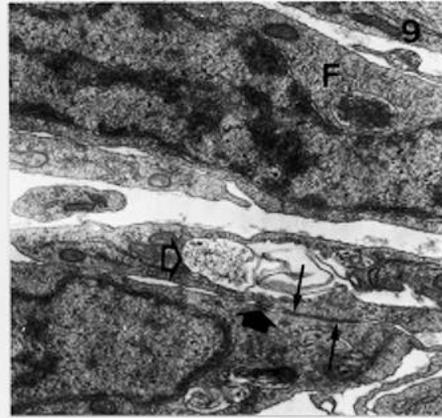
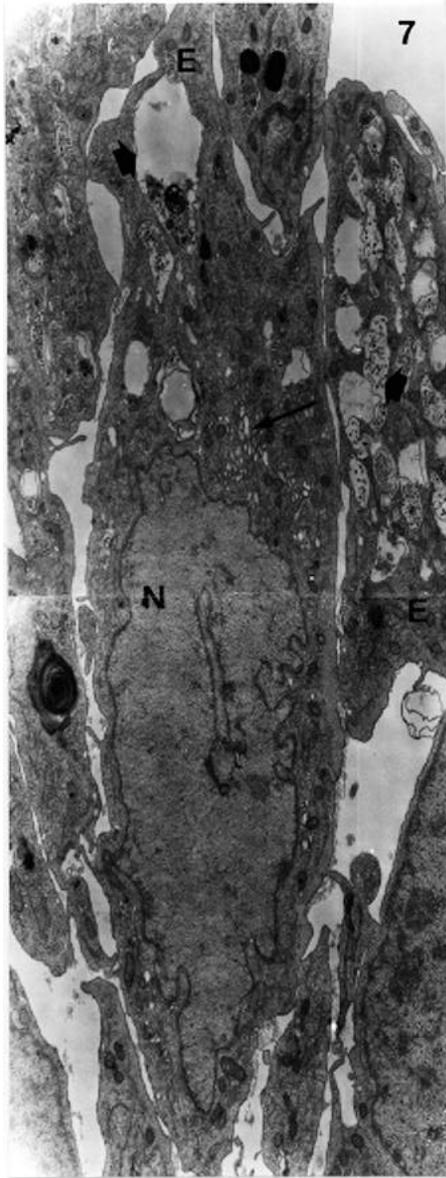
**Ultraestructura de la línea celular TPS (pase 58) incubada durante 3 semanas con el medio de cultivo MCP.**

Fig. 7. Micrografía que muestra dos células epitelioides (E). Núcleo (N), aparato de Golgi (P) y las características vesículas (Q). 12.120x.

Fig. 8. Detalle del citoplasma de una célula epitelioides donde se observan microfilamentos (ã) y un desmosoma (Q). 37.500x.

Fig. 9. Electronografía de células epitelioides en la que se observan vesículas electroclaras, que contienen material heterogéneo (Q), un desmosoma (Q) y uniones gap (P). Célula fibroblástica (F). 19.900x.

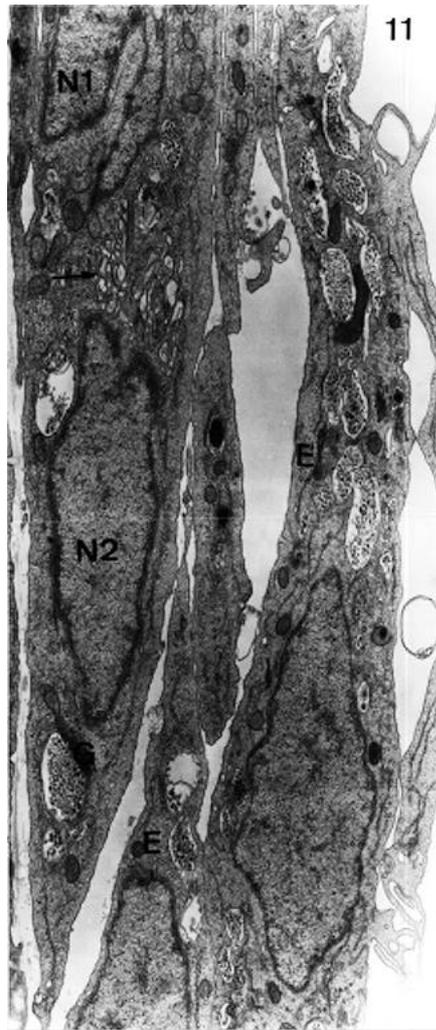
Fig. 10. Electronografía de una célula epitelioides que presenta un desmosoma (Q) y uniones gap (P) con otras células epitelioides. 22.380x.



**Ultraestructura de la línea celular TPS (pase 58) incubada durante 3 semanas con el medio de cultivo MCP.**

Fig. 11. Micrografía que muestra parte de una célula gigante (G) y dos células epitelioides (E). Notar dos núcleos (N1-N2) en la célula gigante. Aparato de Golgi (P). 16.280x.

Fig. 12. Detalle del material fibrilar presente en los espacios extracelulares. Célula fibroblástica (F). 67.590x.



**Tinción de lípidos con Rojo al aceite O.**

Fig. 13. Cultivo a largo plazo de pronefros mantenido durante 10 semanas. Notar las gotas lipídicas en las células fibroblásticas (P) y en las células epitelioides (ä). 620x.

Fig. 14. Aspecto general de un cultivo de la línea celular TPS (pase 38) mantenido a 4°C durante 3 años y 5 meses donde todos los tipos celulares presentan gotas lipídicas. 230x.

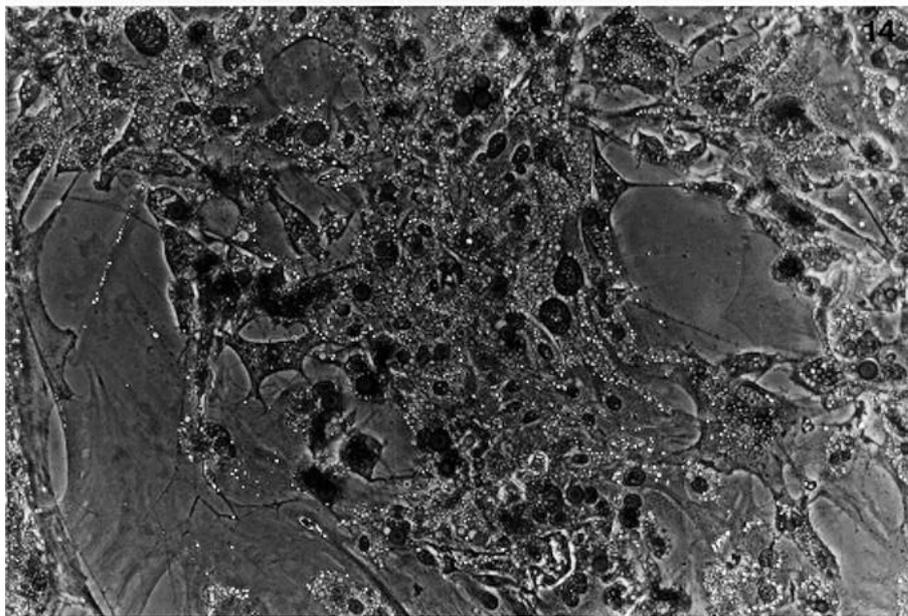
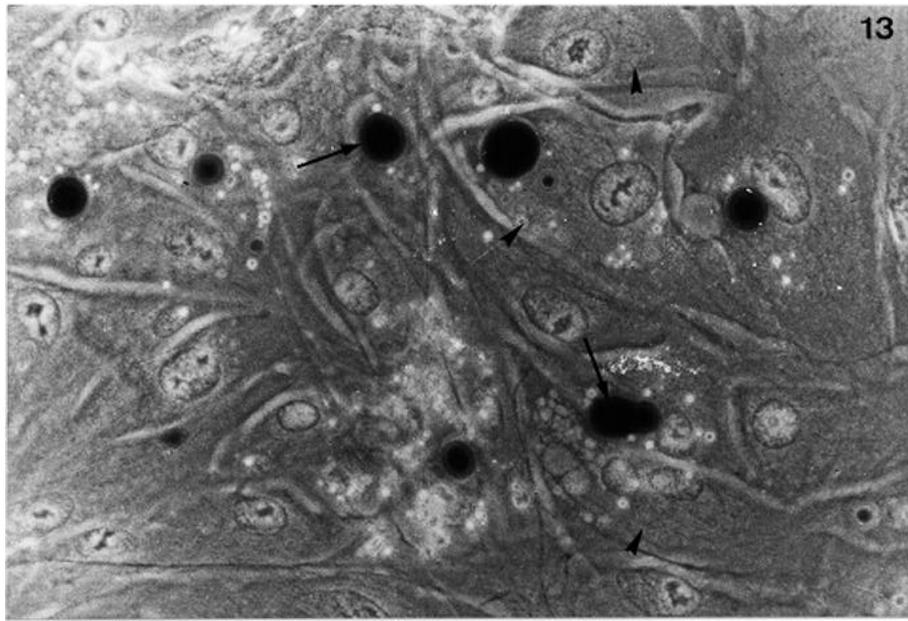


Fig. 15. Placa metafásica de las células TPS (pase 16). Giemsa. 2.000x.

Fig. 16. Cromosomas metafásicos de la línea celular TPS (pase 74) teñidos para la demostración de los NORs (P). 1.860x

Fig. 17. Efecto citopático en la línea celular TPS (pase 86) tras 6 días de infección con el virus VHSV. 115x.

15



16

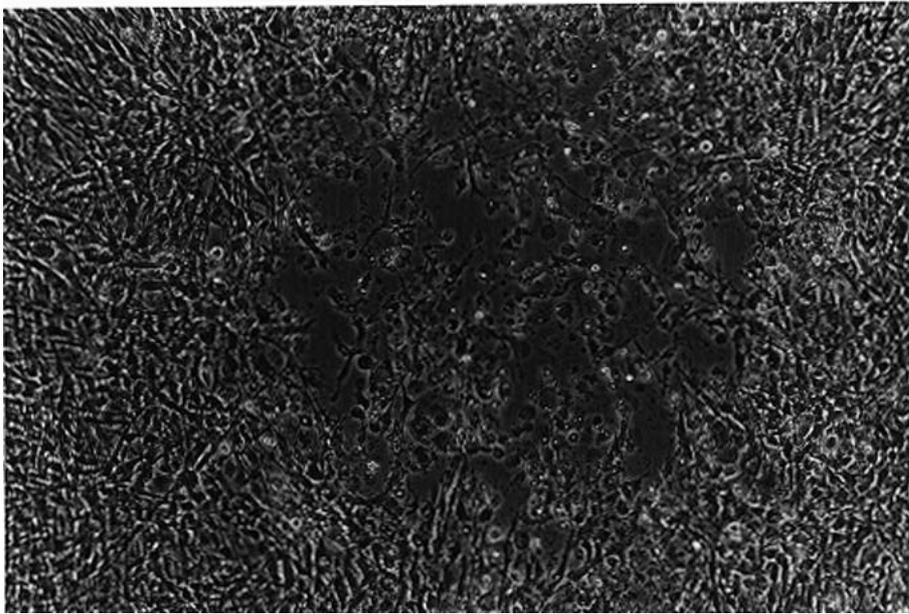
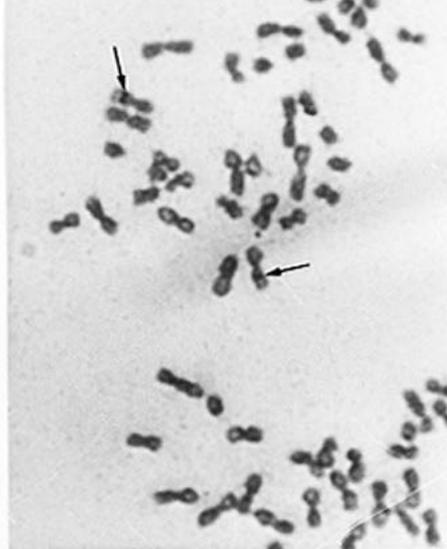
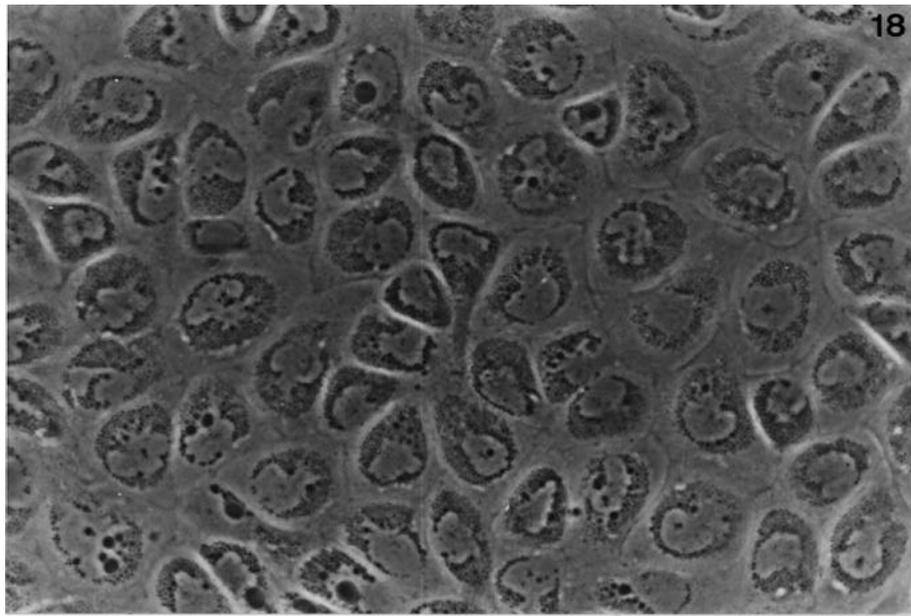


Fig. 18. Aspecto general de la línea celular TPS (pase 57) tras 6 meses de cultivo en el mismo frasco y con el medio de cultivo C (suplementado con suero de caballo e hidrocortisona 21-hemisuccinato). 780x.



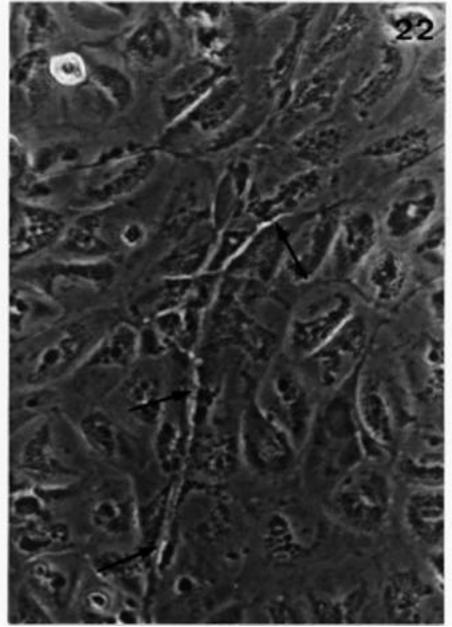
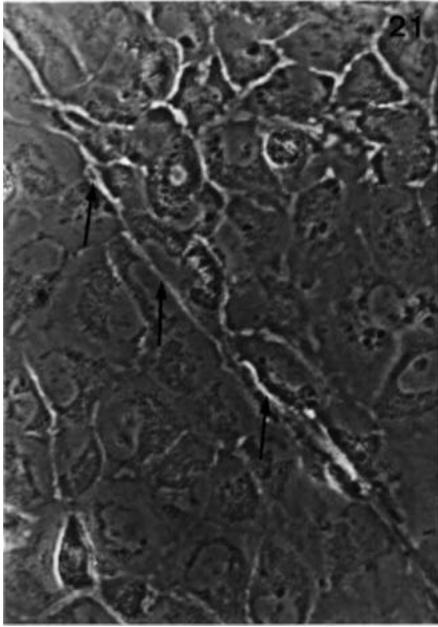
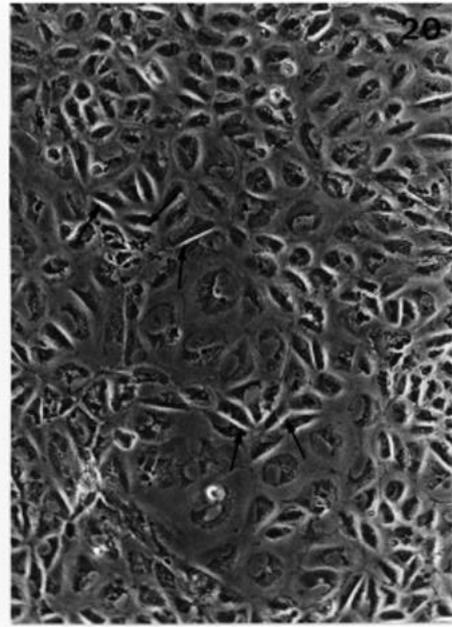
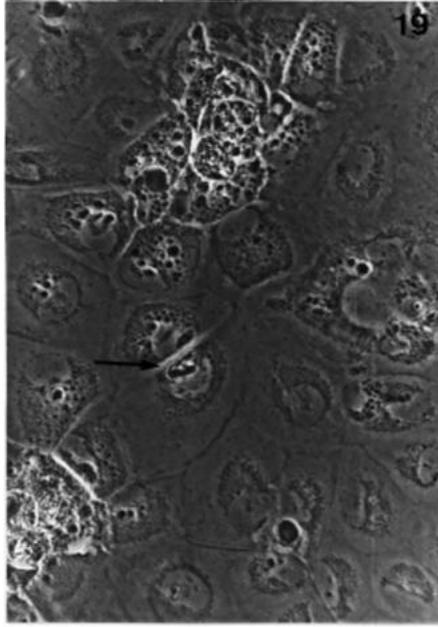
**Formación de estructuras vasculares, semejantes a capilares, en la línea celular TPS (pase 58) tras ser mantenida durante 7 meses en el mismo frasco y con el medio de cultivo C (suplementado con suero de caballo y con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 19. Fase inicial de la angiogénesis, marcada por la aparición de una “vacuola” cilíndrica que atraviesa una célula epitelioide (P). 795x.

Fig. 20. Desarrollo de “vacuolas” cilíndricas en células epitelioides vecinas (P). 440 x.

Fig. 21. Desarrollo de “vacuolas” cilíndricas que atraviesan longitudinalmente las células epitelioides y conectan unas células con otras (P). 865x.

Fig. 22. Desarrollo de “vacuolas” cilíndricas que atraviesan longitudinalmente las células epitelioides y conectan unas células con otras (P). 890x.



**Formación de estructuras vasculares, semejantes a capilares, en la línea celular TPS (pase 58) tras ser mantenida durante 7 meses en el mismo frasco y con el medio de cultivo C (suplementado con suero de caballo y con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 23. Red de estructuras vasculares. 520x.

Fig. 24. Estructuras vasculares localizadas en el plano situado por encima de la monocapa de células TPS. 730x.

Fig. 25. Elongación y ramificación de las estructuras vasculares siguiendo el plano localizado por encima de la monocapa de células originales. 345x.

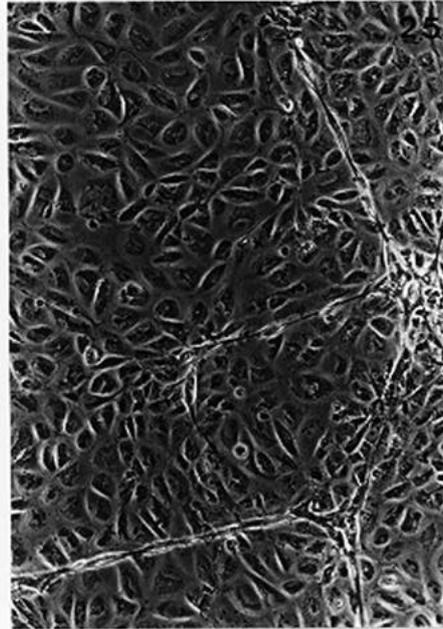
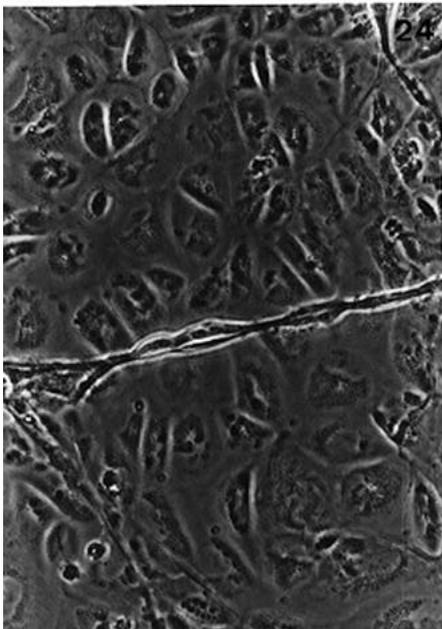
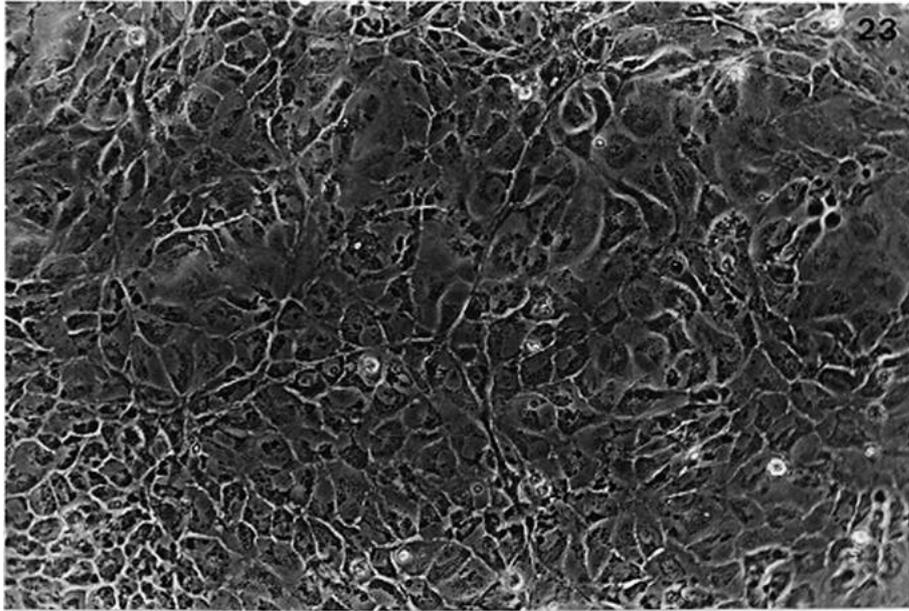
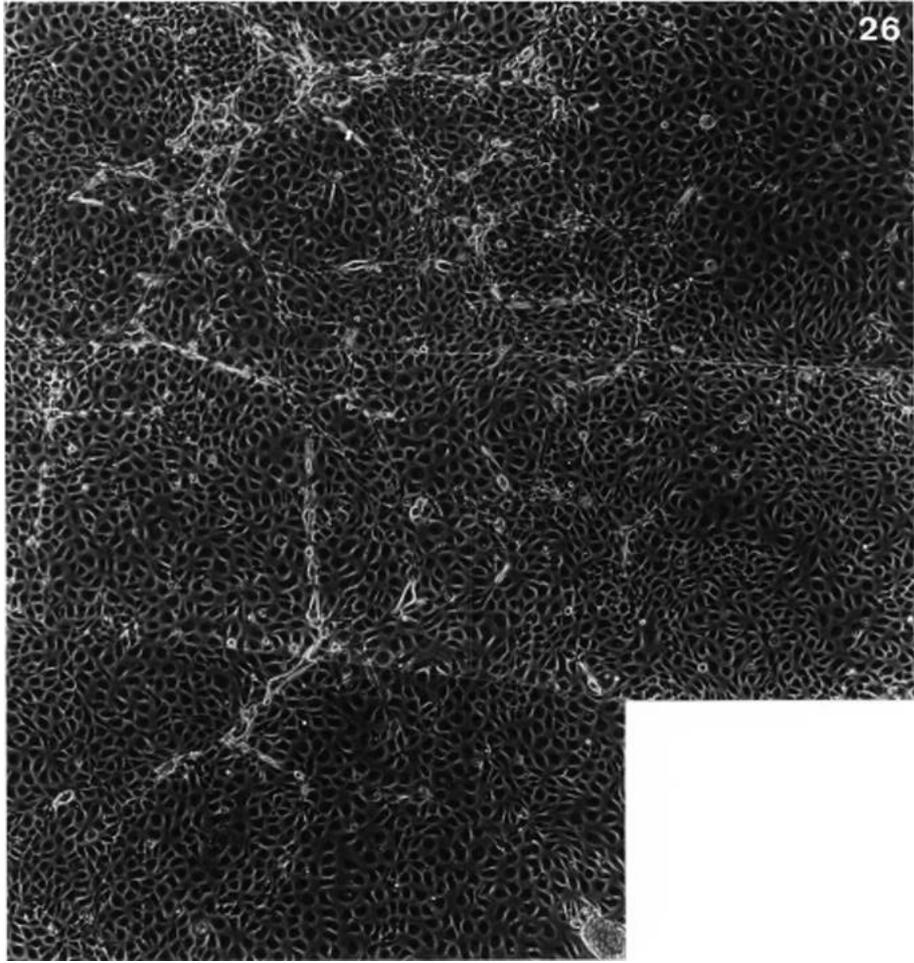


Fig. 26. Micrografía que muestra la elongación y ramificación de las estructuras vasculares, que siguen el plano localizado por encima de la monocapa de células originales. 75x.



**Tipos celulares liberados al sobrenadante de cocultivos TPS-pronefros.**

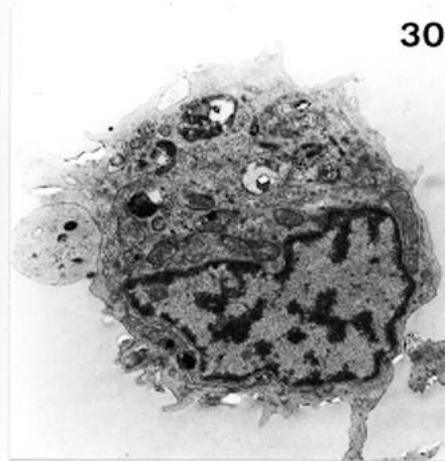
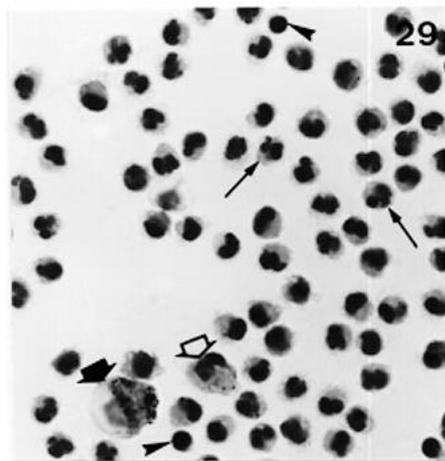
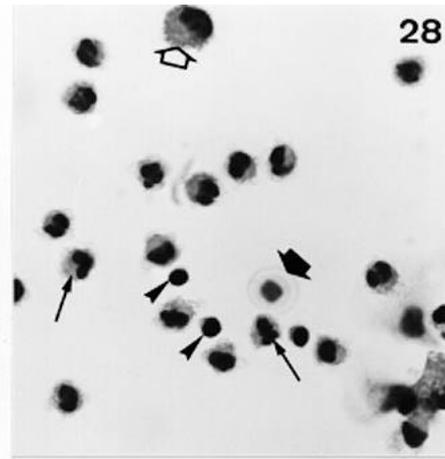
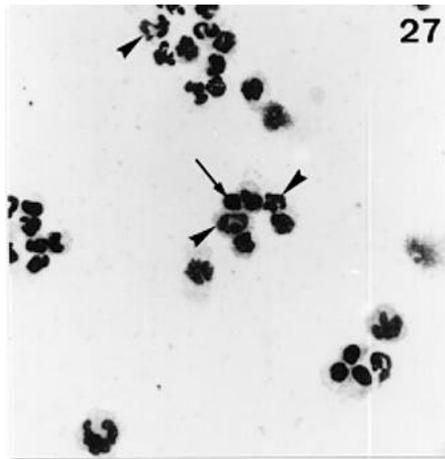
Fig. 27. Cocultivo incubado durante 16 días con el medio E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato). Heterófilos (ä ) y linfocito (P ). Giemsa. 390x.

Fig. 28. Cocultivo incubado durante 1 mes con el medio MCP. Linfocitos (ä ), heterófilos (P ), monocitos (©) y eritrocitos (ç). Hematoxilina-Eosina. 880x.

Fig. 29. Cocultivo incubado durante 1 mes con el medio MCP. Linfocitos (ä ), heterófilos (P ), monocitos (©) y melanomacrófago (ç). Hematoxilina-Eosina. 875x.

Fig. 30. Macrófago liberado al sobrenadante de un cocultivo incubado durante 52 días con el medio MCP. 6.780x.

Fig. 31. Mielocito recogido en el sobrenadante de un cocultivo incubado durante 52 días con el medio MCP. 12.390x.



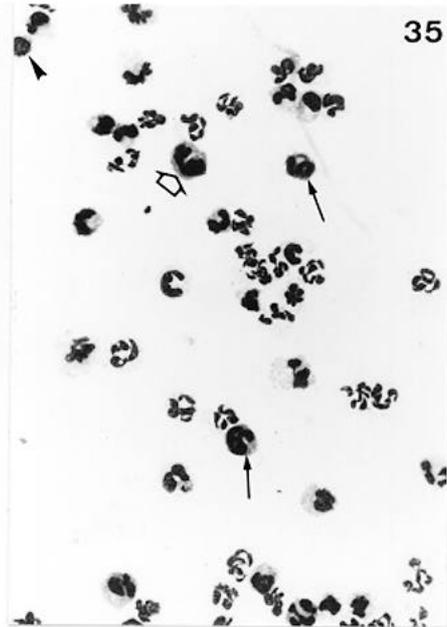
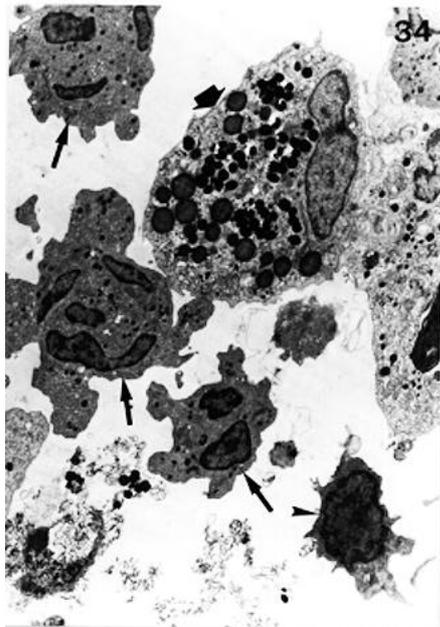
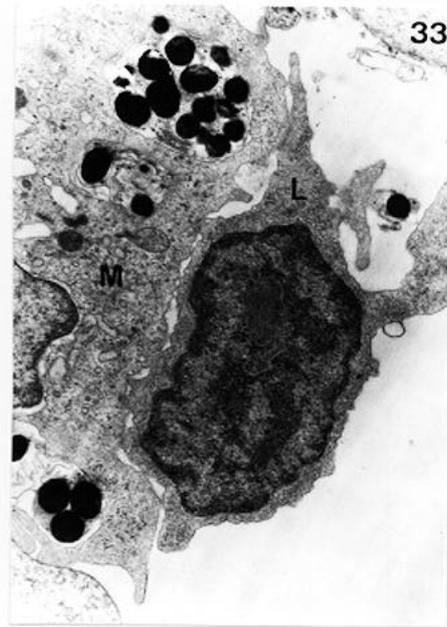
**Tipos celulares liberados al sobrenadante de cocultivos TPS-pronefros.**

Fig. 32. Colonia hematopoyética liberada al sobrenadante de un cocultivo tras 3 meses de incubación con el medio D (suplementado con suero de truchas estresadas). Monocitos (☉), heterófilos (♣) y linfocitos (ä) dispuestos sobre células del estroma. 350x. Detalle de otra colonia: Monocitos (☉), heterófilo (♣) y células del estroma (☉). 595x.

Fig. 33. Ultraestructura de un linfocito (L) y un melanomacrófago (M) liberados al sobrenadante de un cocultivo incubado durante 21 días con el medio D (suplementado con suero de truchas estresadas). 13.260x.

Fig. 34. Ultraestructura de un melanomacrófago (☉), granulocitos (♣) y un linfocito (ä) liberados al sobrenadante de un cocultivo incubado durante 21 días con el medio D (suplementado con suero de truchas estresadas). 3.950x.

Fig. 35. Células liberadas al sobrenadante de un cocultivo incubado durante 1 mes con el medio E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato). Heterófilos (♣), linfocito (ä) y monocitos (☉). Giemsa. 890x.



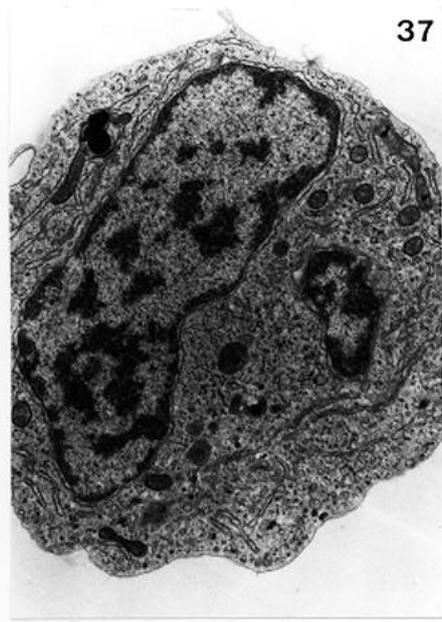
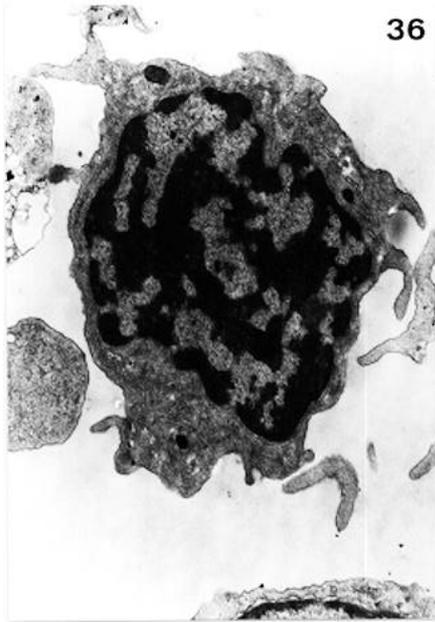
**Ultraestructura de las células liberadas al sobrenadante de un cocultivo TPS-pronefros incubado durante 52 días con el medio F (suplementado con 17-hidro cortisona complejada con  $\alpha$ -ciclodextrinas).**

Fig. 36. Linfocito. 16.620x.

Fig. 37. Mieloblasto. 14.270x.

Fig. 38. Mielocito. 9.500x.

Fig. 39. Metamielocito. 9.130x.

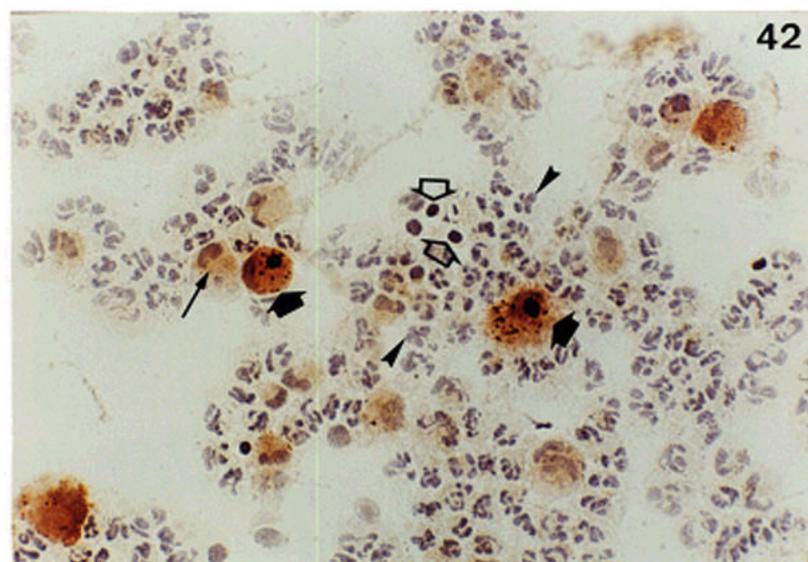
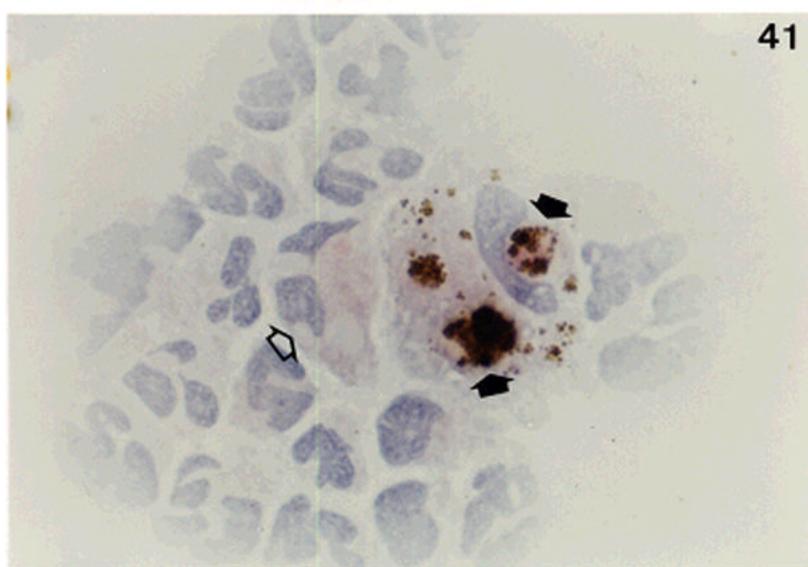
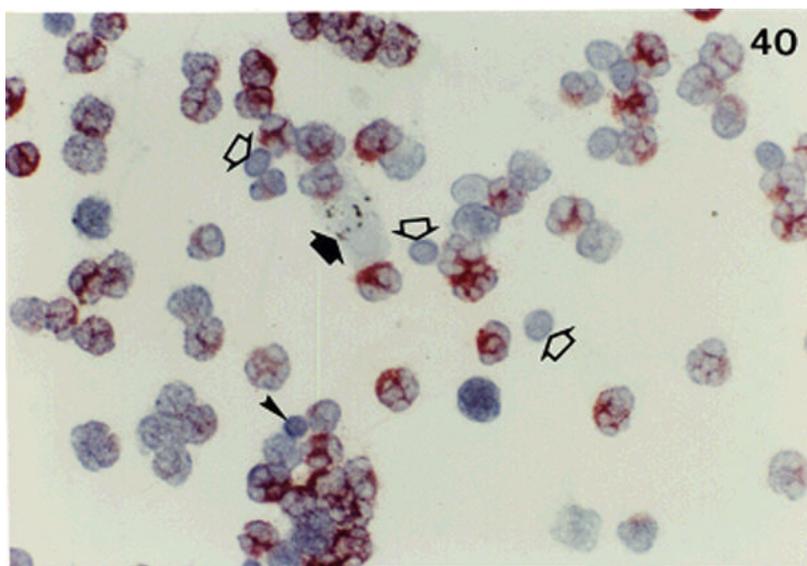


## **Demostración de actividades enzimáticas en las células liberadas al sobrenadante de cocultivos TPS-pronefros**

Fig. 40. Cocultivo incubado durante 1 mes con el medio E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato). Se observan células de la serie heterófila fosfatasa alcalina positivas y eritrocitos (©), linfocito (ä ) y melanomacrófago (ç) negativos. 590x.

Fig. 41. Cocultivo incubado durante 1 mes con el medio E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato). Se observan melanomacrófagos (ç) y células del estroma (©) fosfatasa ácida positivos. 1.225x.

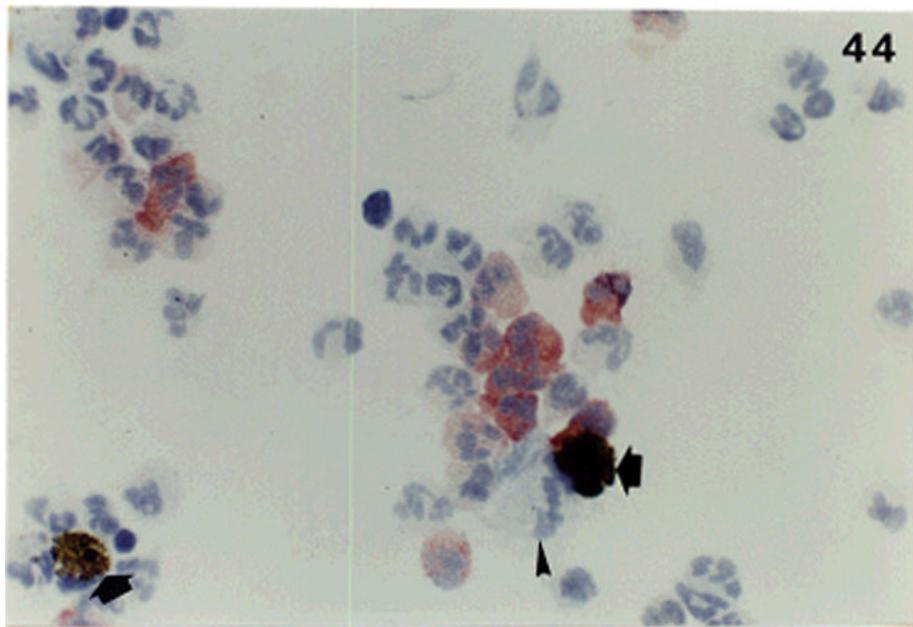
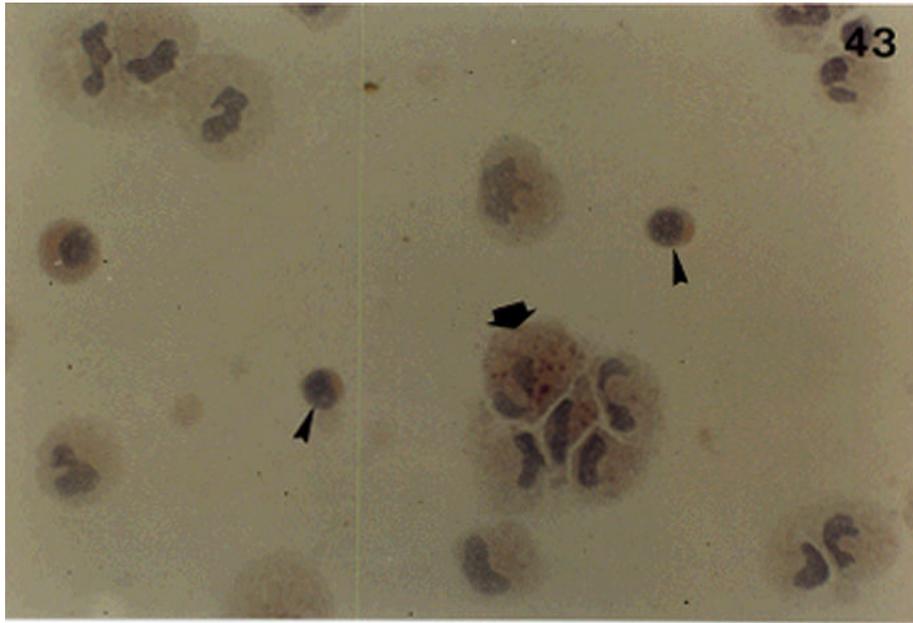
Fig. 42. Cocultivo incubado durante 1 mes con el medio D (suplementado con suero de truchas estresadas). Notar macrófago (P ) y melanomacrófagos (ç) alfa-naftil acetato esterasa inespecífica positivos y eritrocitos (©) y granulocitos (ä ) negativos. 510x.



**Demostración de actividades enzimáticas en las células liberadas al sobrenadante de cocultivos TPS-pronefros y RTG-2-pronefros.**

Fig. 43. Cocultivo TPS-pronefros incubado durante 1 mes con el medio F (suplementado con 17-hidrocortisona complejada con  $\alpha$ -ciclodextrinas). Notar células semejantes a linfocitos fosfatasa ácida positivas ( $\alpha$ ) y melanomacrófagos ( $\zeta$ ) positivos. 480x.

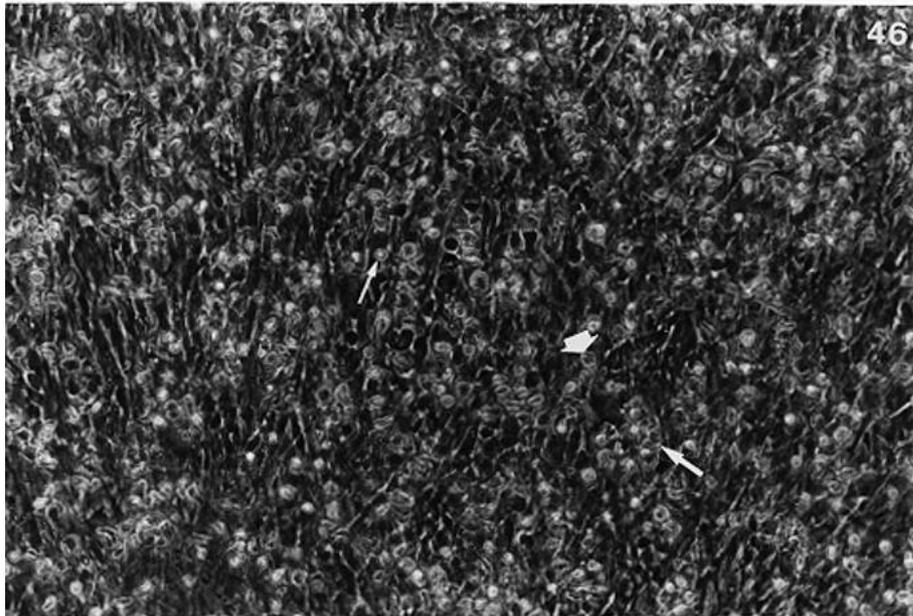
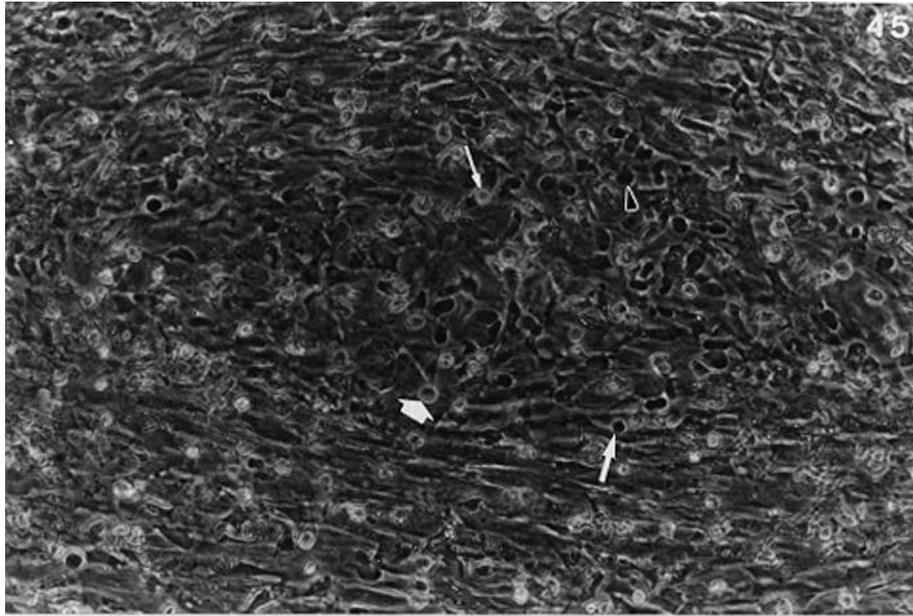
Fig. 44. Cocultivo RTG-2-pronefros incubado durante 1 mes con el medio E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato). Se observan células de la serie heterófila fosfatasa alcalina positivas y melanomacrófagos ( $\zeta$ ) y una célula del estroma ( $\alpha$ ) negativos. 450x.



**Panorámica de cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio MCP.**

Fig. 45. Cocultivo incubado durante 14 días. Notar la presencia células de aspecto linfoide entre (P) y sobre ( ) la multicapa de células del estroma y de células de aspecto mieloide entre (ã) y sobre (ç) la multicapa de células adherentes. 240x.

Fig. 46. Cocultivo incubado durante 21 días. Notar la presencia células de aspecto linfoide ( ) y mieloide (ç) y pequeñas colonias dispuestas sobre la multicapa de células adherentes (P). 220x.



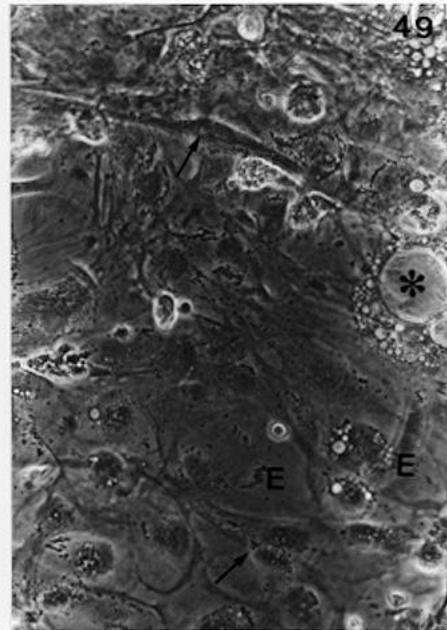
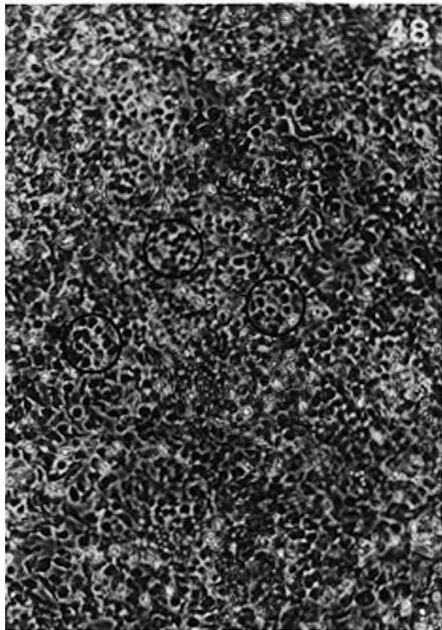
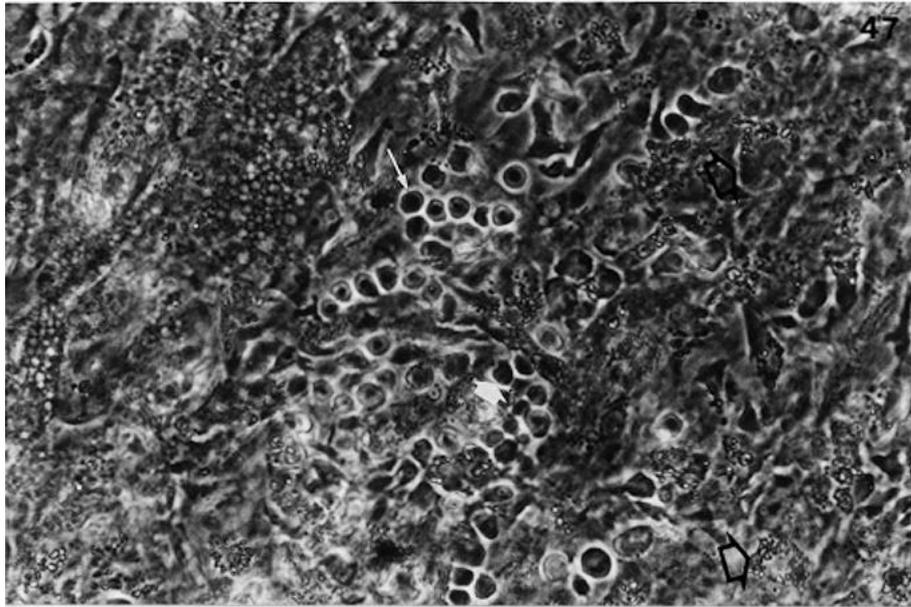
## Acceso a Tesis

### Panorámica de cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio MCP.

Fig. 47. Cocultivo incubado durante 1 mes. Se observan melanomacrófagos (©), células oscuras dispersas (ç) y pequeñas colonias eritrocíticas (P ). 870x.

Fig. 48. Cocultivo incubado durante 2 meses. Notar las colonias con aspecto de empedrado (O). 340x.

Fig. 49. Cocultivo incubado durante 10 meses. El cultivo aparece formado por células fibroblásticas (P ) y epitelioides (E), algunas de ellas cargadas de grasa (I ). 720x.



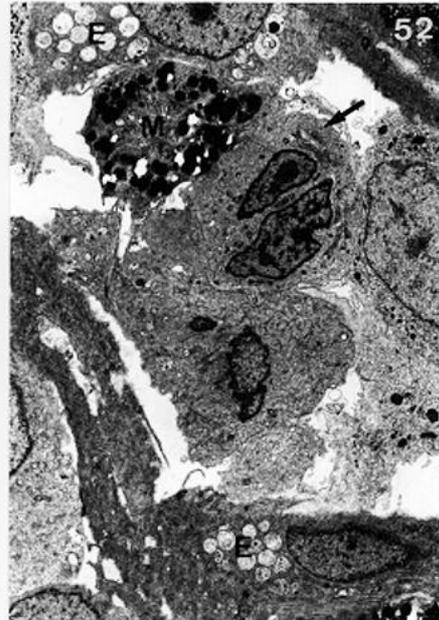
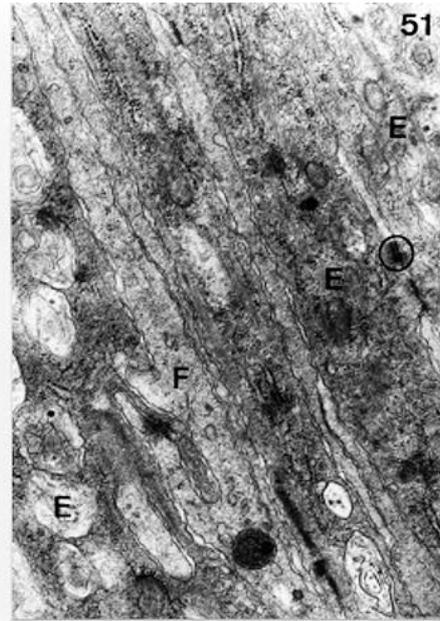
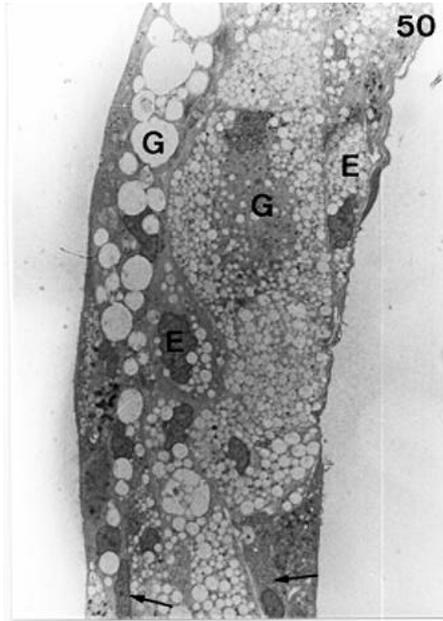
**Cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio MCP.**

Fig. 50. Corte semifino de un cocultivo incubado durante 16 meses. La multicapa contiene células gigantes (G), epitelioides (E) y fibroblásticas (P). 970x.

Fig. 51. Ultraestructura de un cocultivo incubado durante 1 mes. Se observan células fibroblásticas (F) y epitelioides (E) organizadas en multicapa. Notar la presencia un desmosoma entre las células epitelioides (O). 19.000x.

Fig. 52. Electronografía de un cocultivo incubado durante 1 mes, en la que se observan células epitelioides (E), melanomacrófagos (M), y un mielocito heterófilo (P). 3.800x.

Fig. 53. Ultraestructura de un cocultivo incubado durante 1 mes. Notar células fibroblásticas (F), epitelioides (E), melanomacrófago (M), mielocito (C) y matriz extracelular (I). 3.150x.

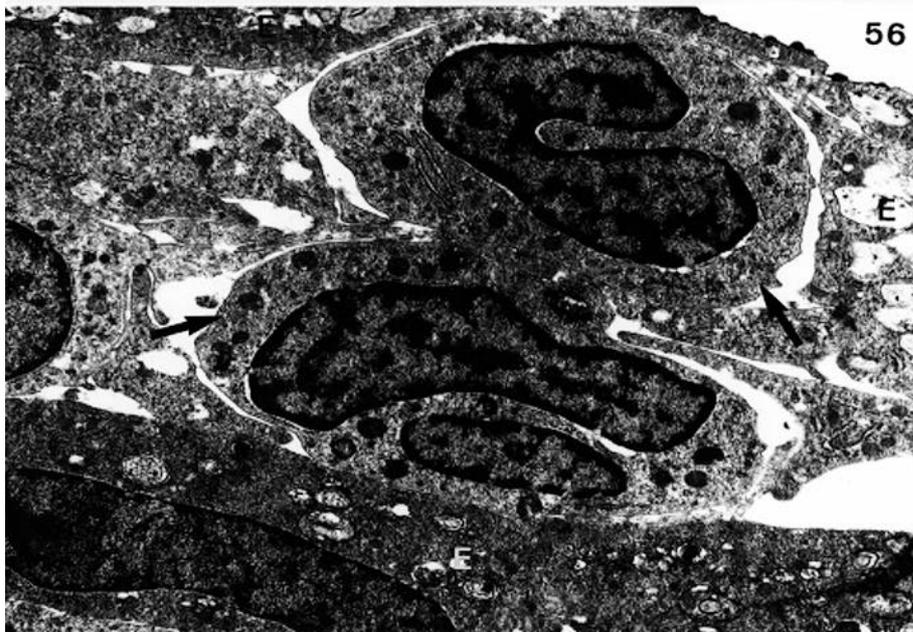
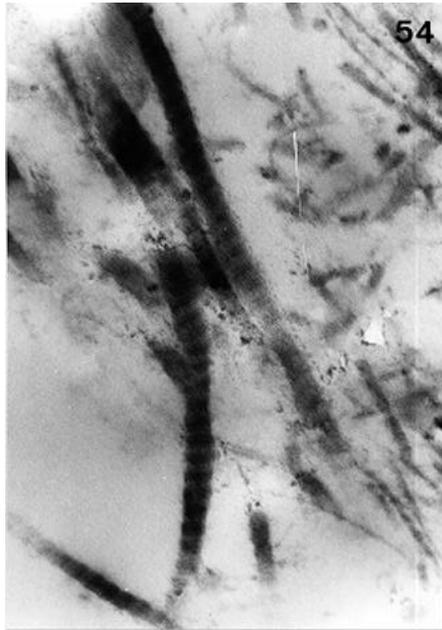


**Cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio MCP.**

Fig. 54. Detalle de los haces de fibras extracelulares presentes en los cocultivos TPS-pronefros. 88.310x.

Fig. 55. Linfocito situado entre una célula fibroblástica (F) y una epitelioide (E) en un cocultivo incubado durante 1 mes. 15.840x.

Fig. 56. Electronografía de un cocultivo incubado durante un mes, que contiene células epitelioides (E) y células de la serie granulopoyética (P). 16.420x.

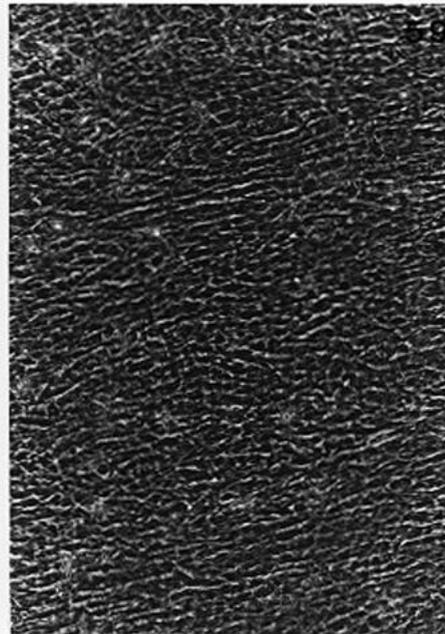
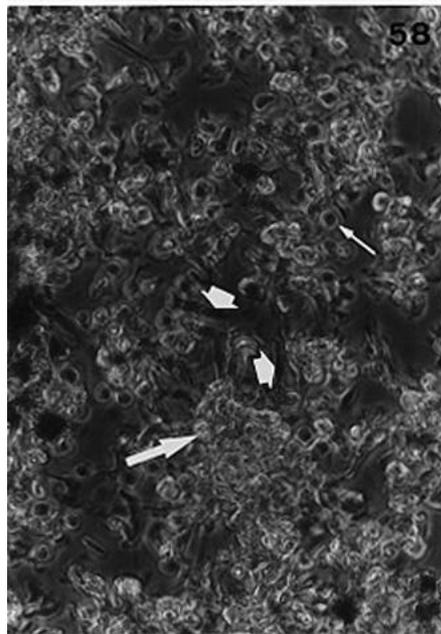
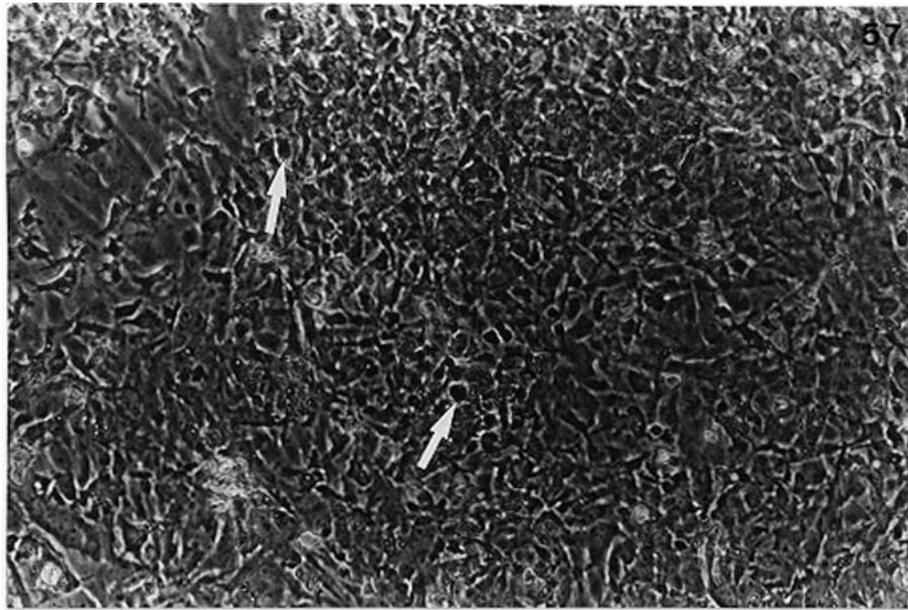


**Cocultivos RTG-2-pronefros incubados con el medio MCP.**

Fig. 57. Panorámica de un cocultivo incubado durante 21. Notar la presencia células de aspecto mieloide dispuestas entre (P) la multicapa de células adherentes. 115x.

Fig. 58. Panorámica de un cocultivo incubado durante 21 días, donde se muestran pequeñas colonias formadas por células de aspecto mieloide (P) y eritrocitos ( ) dispuestos sobre células adherentes (ç). 160x.

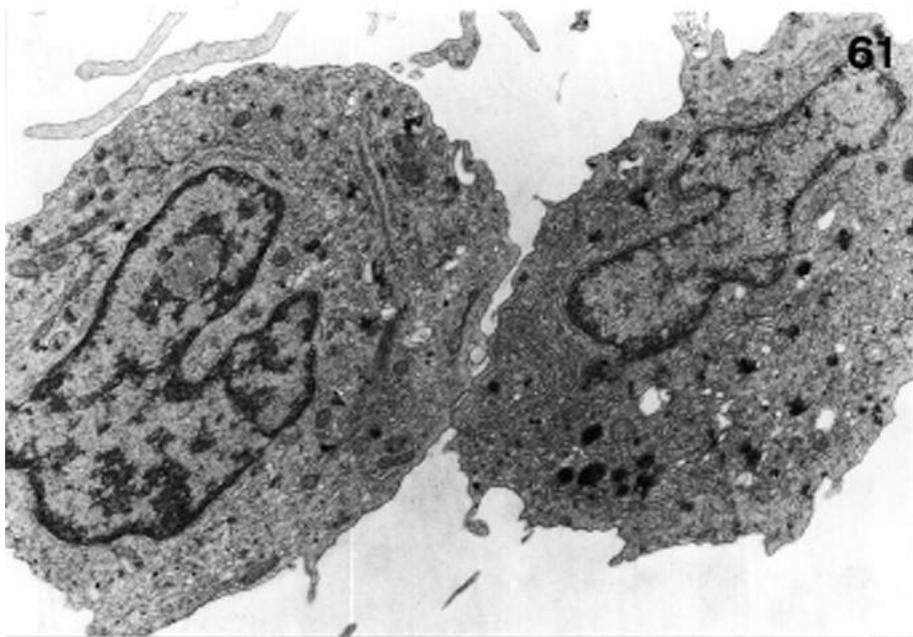
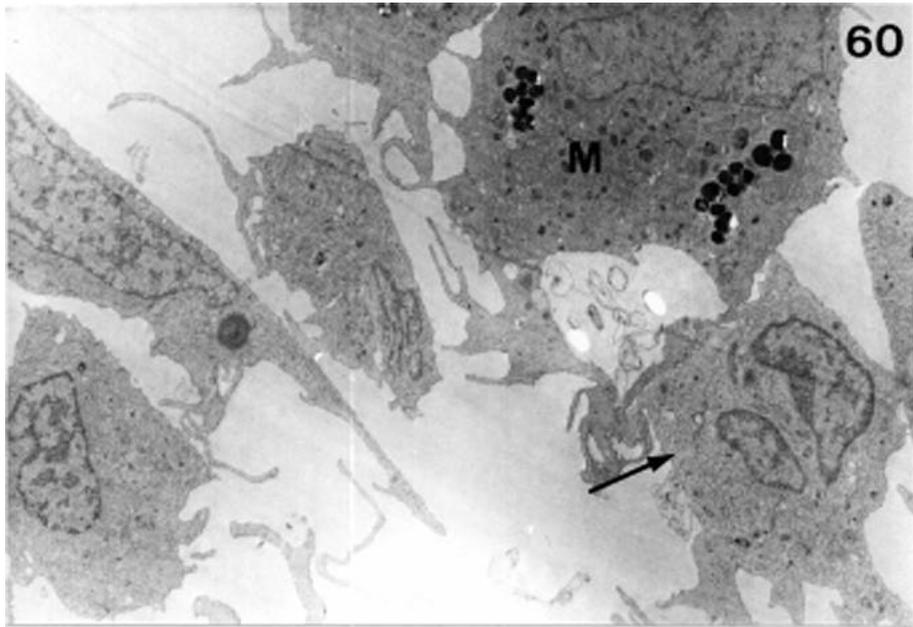
Fig. 59. Panorámica de un cocultivo incubado durante 48 días, que ya no presenta actividad hematopoyética. 170x.



**Cocultivos RTG-2-pronefros incubados con el medio MCP.**

Fig. 60. Electronografía de un cocultivo incubado durante 21 días. Se observan melanomacrófagos (M) y mielocitos (P). 6.530x.

Fig. 61. Ultraestructura de mielocitos presentes en un cocultivo incubado durante 21 días. 12.430x.

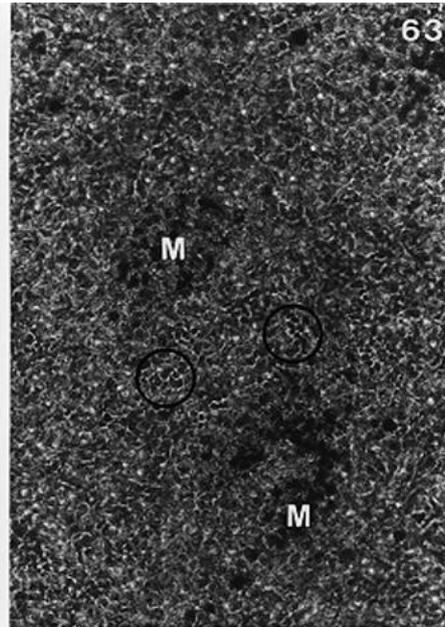
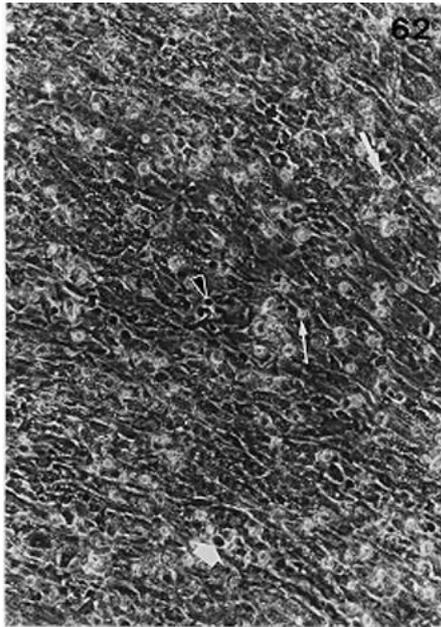


**Cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 62. Panorámica de un cocultivo incubado durante 21 días. Notar la presencia de células de aspecto linfoide entre (ã) y sobre ( ), y de células de aspecto mieloide entre (ç) y sobre (P) la multicapa de células adherentes. 180x.

Fig. 63. Panorámica de un cocultivo incubado durante 48 días. Notar la presencia de colonias con aspecto de empedrado (O) y de acumulaciones de melanomacrófagos (M). 190x.

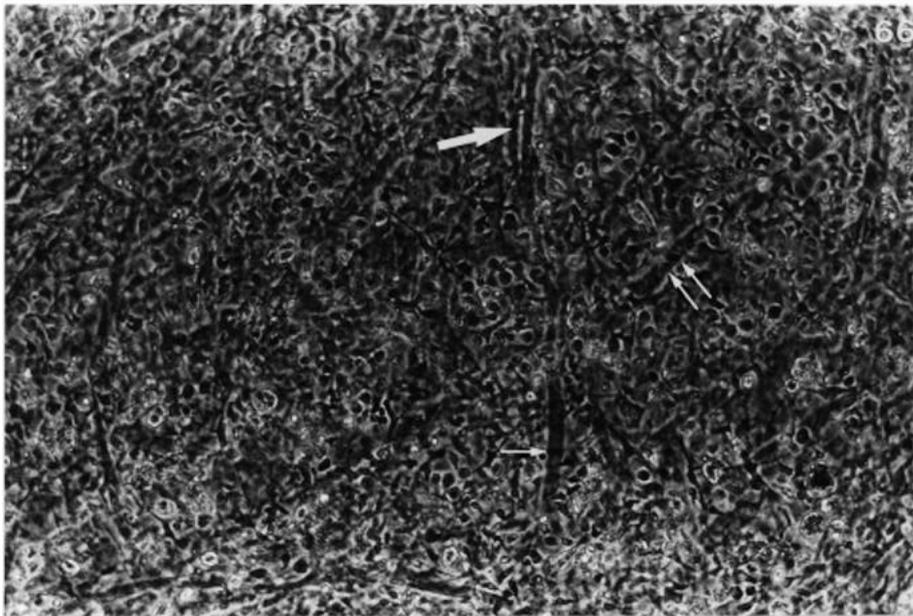
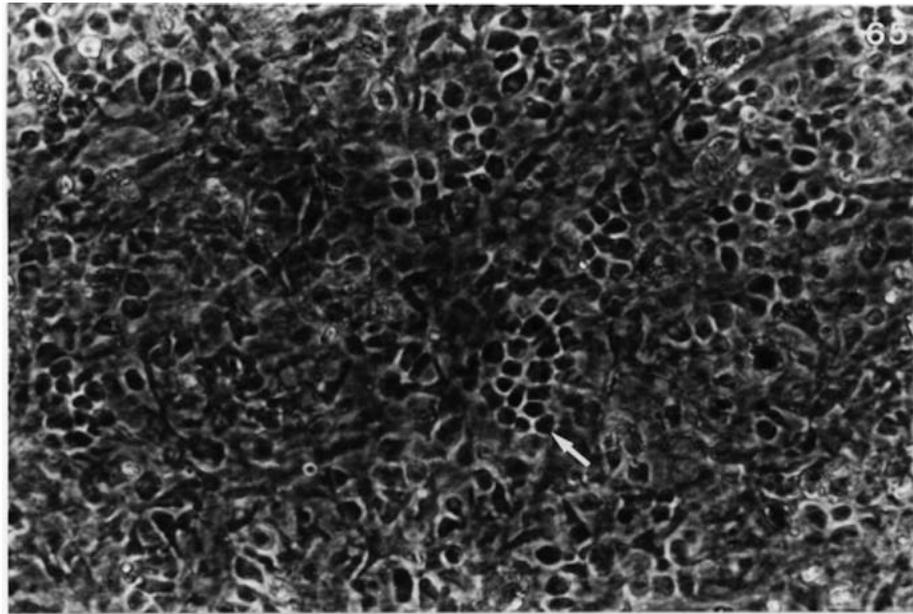
Fig. 64. Panorámica de un cocultivo incubado durante 2 meses, donde se observa la presencia de pequeñas colonias eritropoyéticas (P). 440x.



**Cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 65. Panorámica de un cocultivo incubado durante 10 meses. Notar la presencia de colonias con aspecto de empedrado (P). 1.000x.

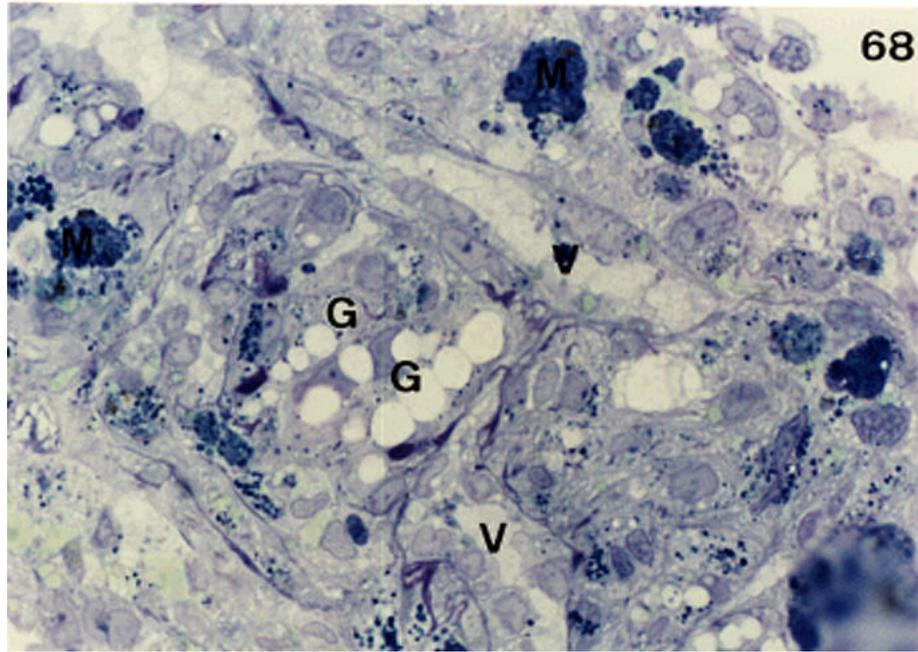
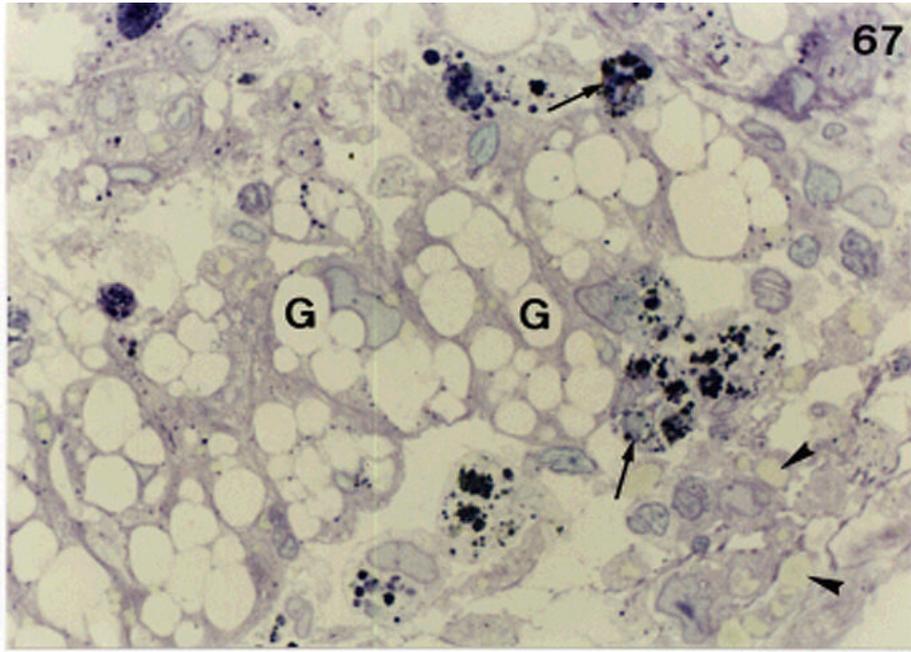
Fig. 66. Panorámica de un cocultivo incubado durante 10 meses. Notar la presencia de estructuras tubulares (P) que contienen células en su interior ( ) y células hematopoyéticas dispersas. 300x.



**Cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 67. Corte semifino de un cocultivo incubado durante 16 meses. Notar células gigantes (G), melanomacrófagos (P) y gotas lipídicas (ä). 1.020x.

Fig. 68. Corte semifino de un cocultivo incubado durante 16 meses. Se observan estructuras vasculares (V), células gigantes (G) y melanomacrófagos (M). 1.210x.



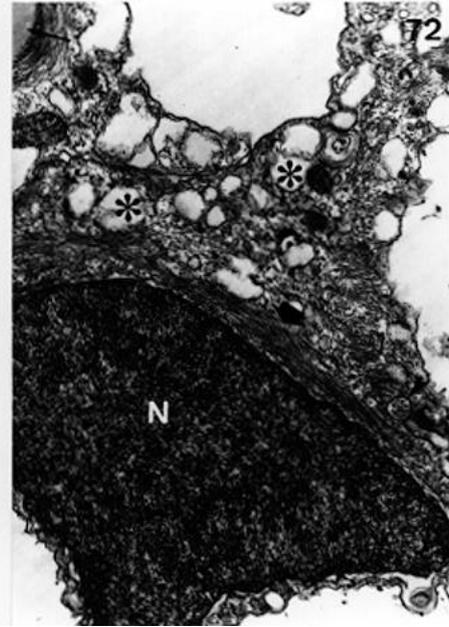
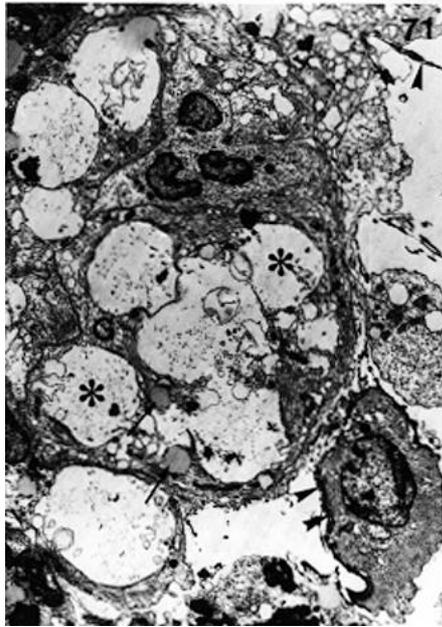
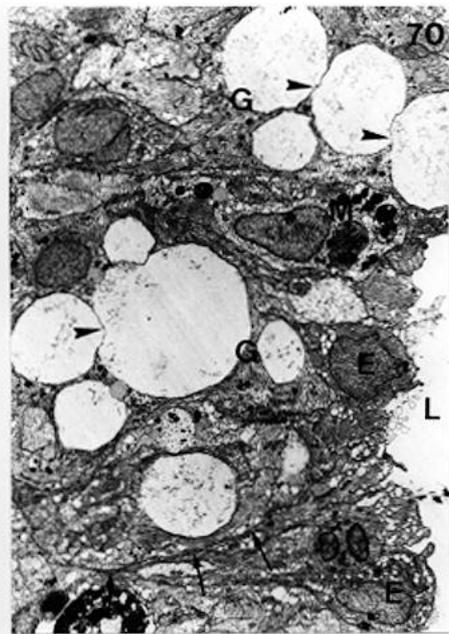
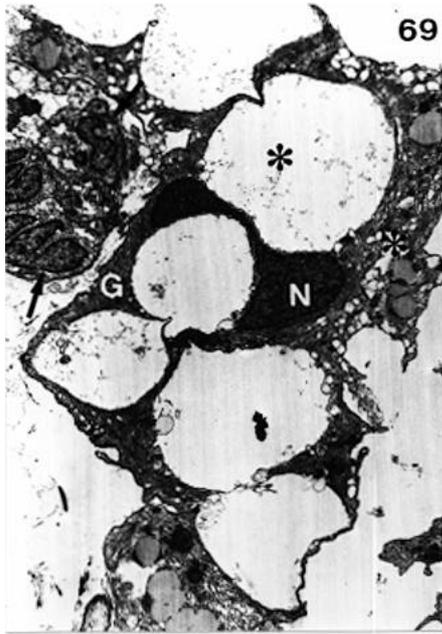
**Cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 69. Electronografía de un cocultivo incubado durante 10 meses, mostrando una célula gigante (G) con numerosas vesículas electrolúcidas ([ ]) y una yema vascular (P). (N) núcleo. 3.190x.

Fig. 70. Electronografía de un cocultivo incubado durante 10 meses. Se muestran dos células gigantes (G) con vesículas electrolúcidas, que parecen fusionarse entre sí (ä). Células epitelioides (E). Melanomacrófago (M), matriz extracelular (P). Luz de una estructura vascular (L). 3.100x.

Fig. 71. Electronografía de un cocultivo incubado durante 10 meses, donde se observan células gigantes (G) con vesículas electrolúcidas ([ ]) y gotas lipídicas (P). Matriz extracelular (ä). 5.430x.

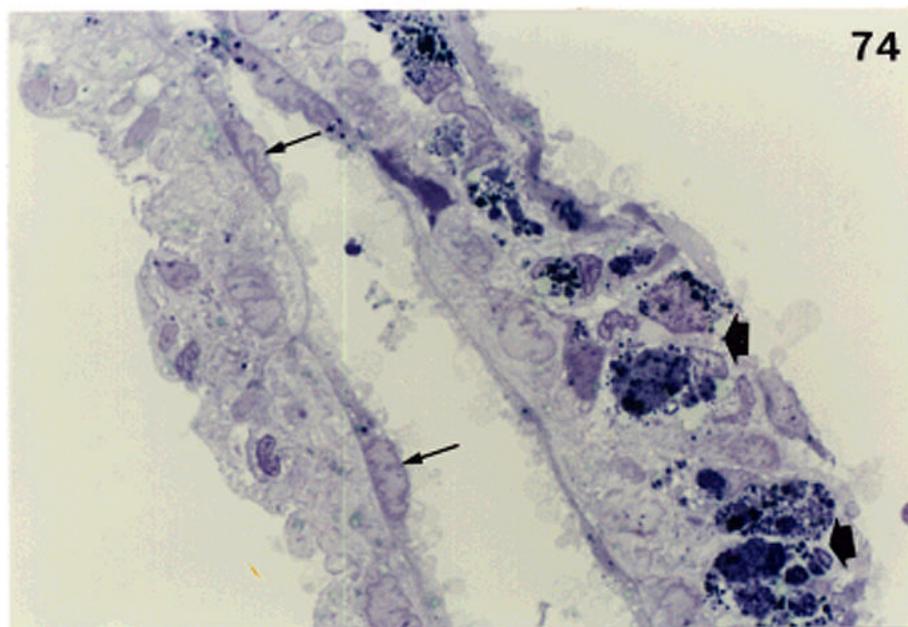
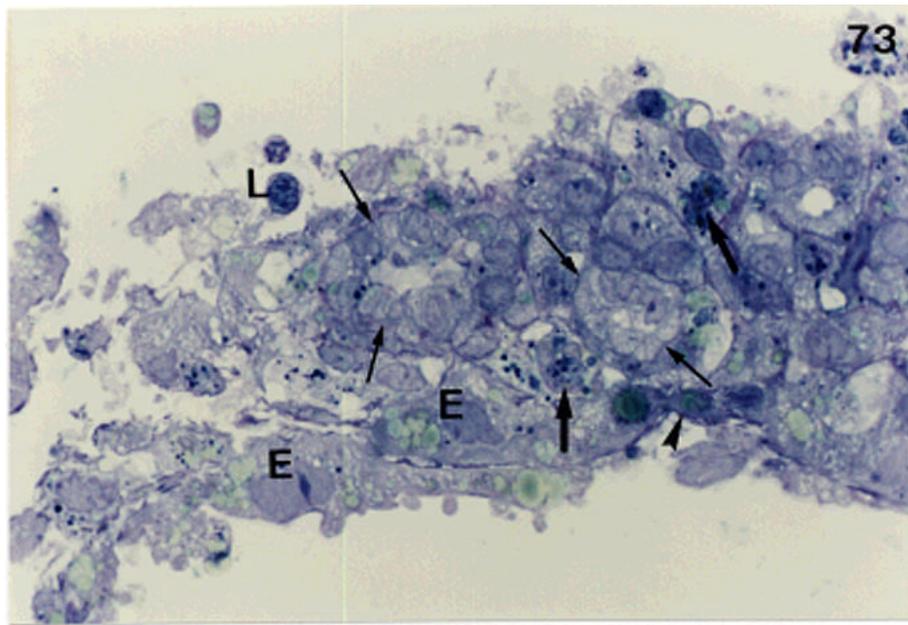
Fig. 72. Detalle de una célula gigante en la que se observan haces compactos de microfilamentos (ç), gotas lipídicas (P), pequeños cuerpos multivesiculares (ä) y vesículas electrolúcidas de distintos tamaños ([ ]). (N) núcleo. 18.760x.



**Cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 73. Corte semifino de un cocultivo incubado durante 16 meses, donde se observan estructuras vasculares (P), células epitelioides que presentan abundantes gotas lipídicas (E), melanomacrófagos (ç), un linfocito (L) y matriz extracelular(ä). 2.080x.

Fig. 74. Corte semifino de un cocultivo incubado durante 16 meses. Se muestra una estructura vascular formada por células epitelioides/endoteliales (P) que limitan la luz central. Notar colonias de melanomacrófagos (ç) dispuestas en la cara que está en contacto con el plástico de cultivo. 1.010x.

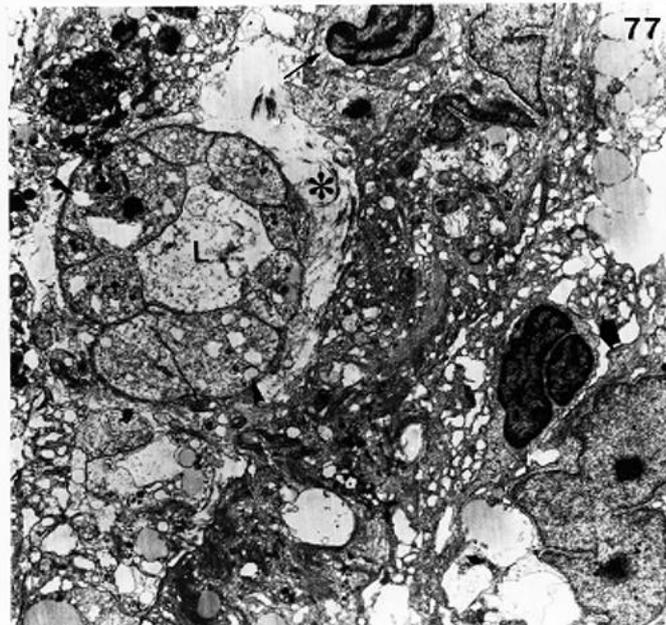
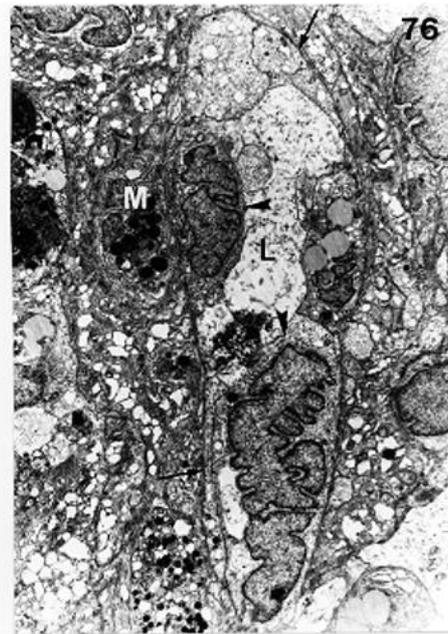
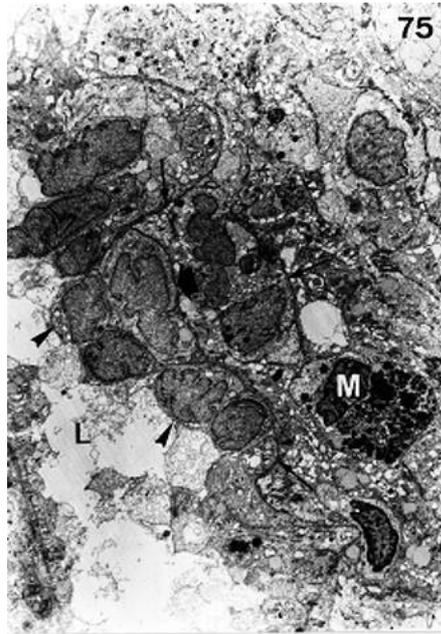


**Ultraestructura de las estructuras vasculares en los cocultivos TPS-pronefros incubados durante 16 meses con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 75. Corte longitudinal de una estructura vascular. Se observa una célula de aspecto epitelioide (ç) dispuesta basalmente a las células epitelioides/endoteliales (ä) que limitan la luz central (L). Melanomacrófago (M) y matriz extracelular (P). 2.140x.

Fig. 76. Corte transversal de una estructura vascular, con células epitelioides/endoteliales (ä) que limitan la luz central (L). Melanomacrófago (M) y matriz extracelular (P). 4.150x.

Fig. 77. Corte transversal de una estructura vascular, con células epitelioides/endoteliales que presentan vesículas electrolúcidas (ä) y limitan la luz central (L). Matriz extracelular (I). Notar células de aspecto linfoide (P) y mieloide (ç). 5.200x.

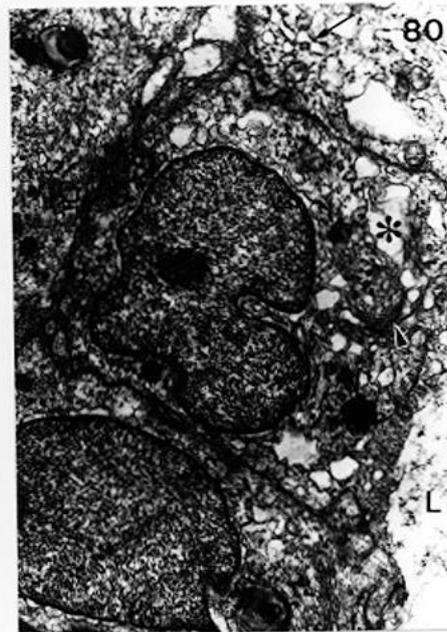
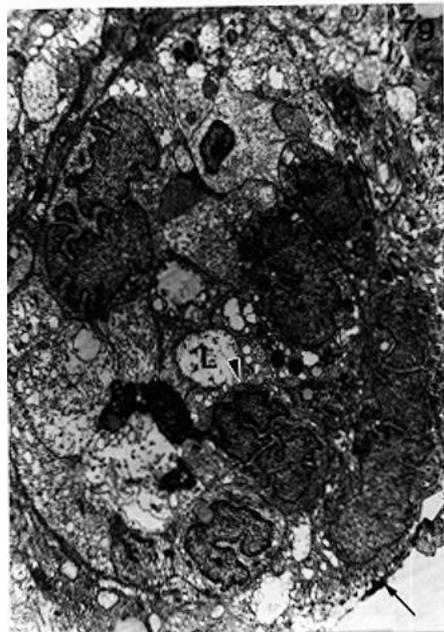
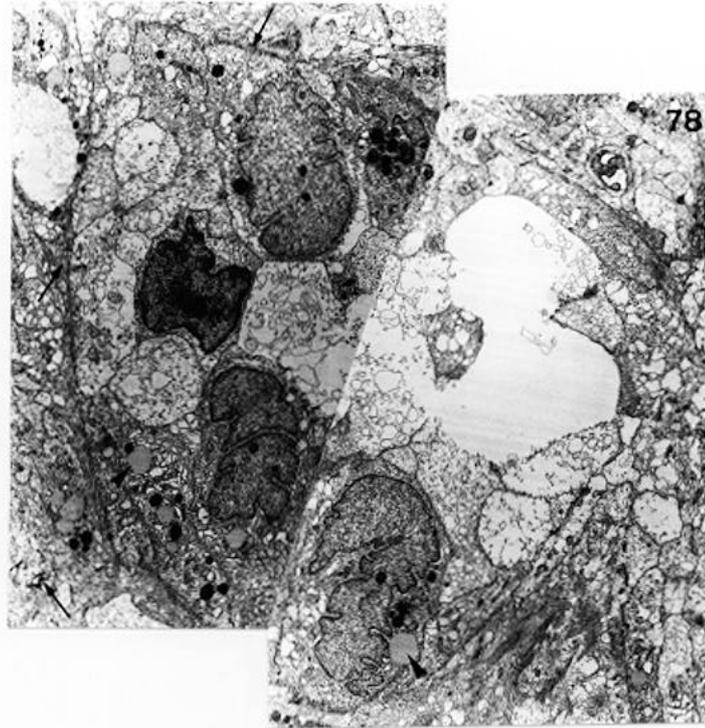


**Ultraestructura de las estructuras vasculares en los cocultivos TPS-pronefros incubados durante 16 meses con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 78. Corte tangencial de una estructura vascular. Notar que las células epitelioides/endoteliales presentan gotas lipídicas (ä ). Matriz extracelular (P ). 4.400x.

Fig. 79. Corte transversal de una estructura vascular cuya luz (L) contiene restos celulares. Célula de aspecto epitelioide (ç) dispuesta basalmente a las células epitelioides/endoteliales (ä ). Matriz extracelular (P ). 4.500x.

Fig. 80. Detalle de las células epitelioides/endoteliales que forman las estructuras vasculares. Notar aparato de Golgi (ä ), retículo endoplásmico rugoso (P ) y vesículas electrolúcidas (I ). Luz central (L). 17.500x.

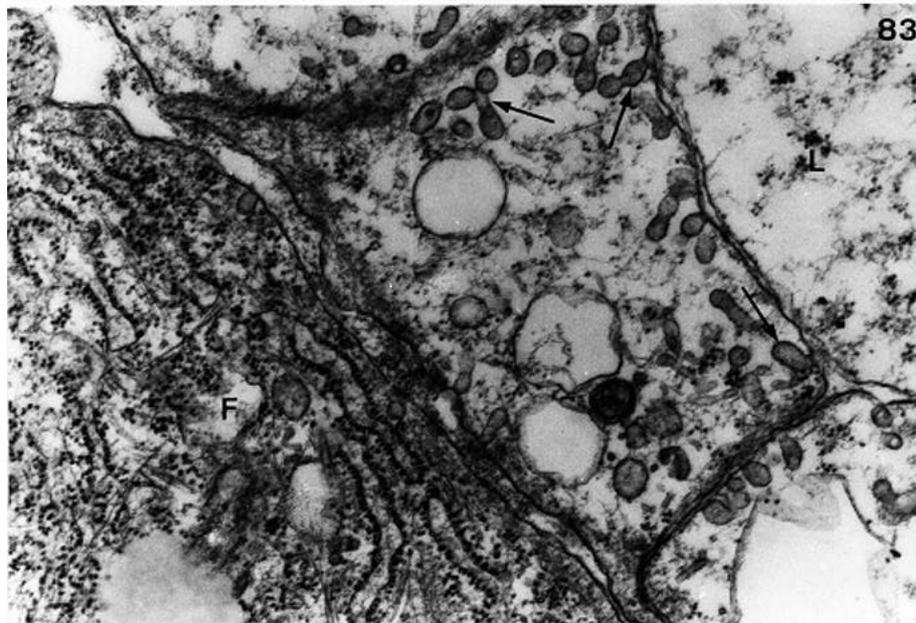
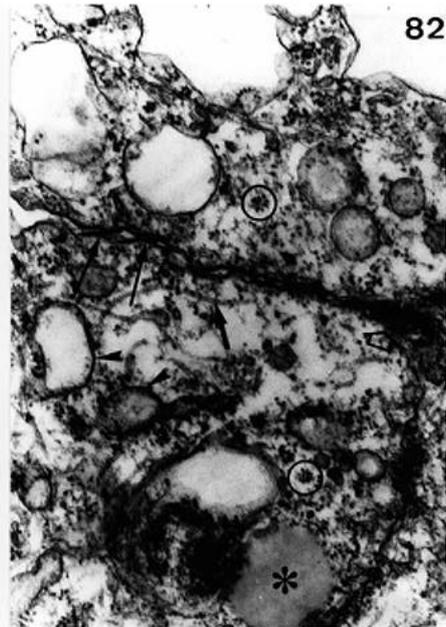
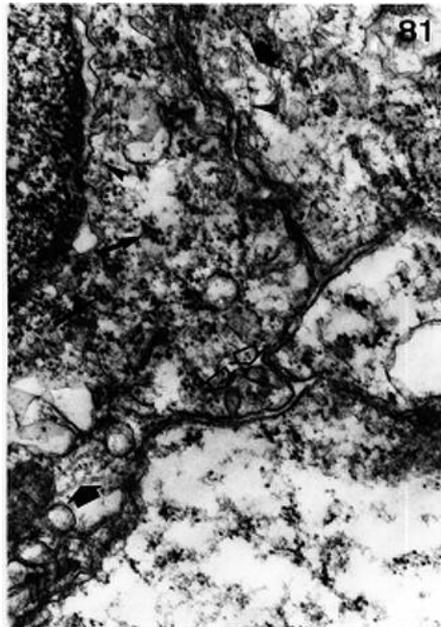


**Ultraestructura de las células epitelioides/endoteliales de las estructuras vasculares presentes en los cocultivos TPS-pronefros incubados durante 16 meses con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 81. Detalle del citoplasma de las células epitelioides/endoteliales donde se observan polirribosomas (P), algunos microfilamentos (ä) y microtúbulos (ç). Notar la presencia de vesículas fusionadas con la membrana plasmática (ç). 44.290x.

Fig. 82. Detalle del citoplasma de las células epitelioides/endoteliales, donde se observan retículo endoplásmico rugoso (ä), polirribosomas (O), algunos microtúbulos (ç) y una gota lipídica (I). Notar la presencia de uniones gap en las porciones laterobasales (ç) y aposiciones de las membranas plasmáticas en las porciones apicales (P). 40.890x.

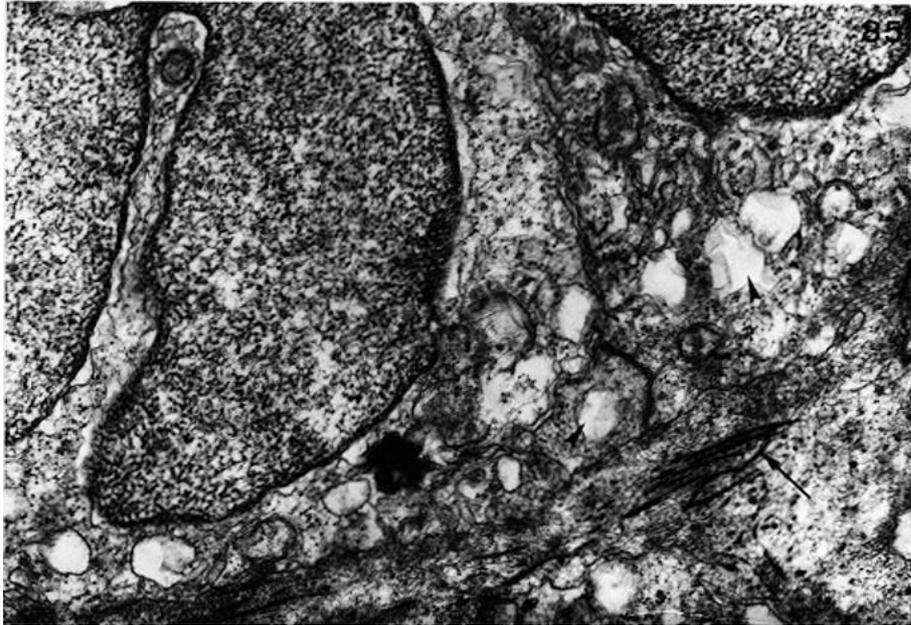
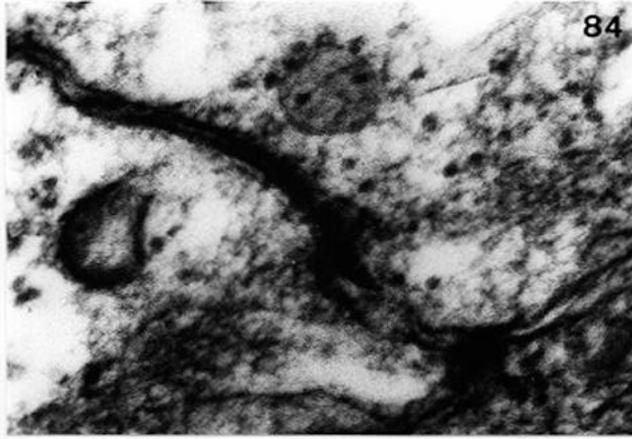
Fig. 83. Detalle del citoplasma de las células epitelioides/endoteliales, en el que se observan vesículas electrolúcidas fusionadas con la membrana plasmática y entre sí (P). Luz (L). Célula fibroblástica (F). 35.760x.



**Ultraestructura de las células epitelioides/endoteliales de las estructuras vasculares presentes en los cocultivos TPS-pronefros incubados durante 16 meses con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 84. Detalle de una unión de tipo gap (**P**) entre las porciones laterobasales de dos células epitelioides/endoteliales. 149.700x.

Fig. 85 Electronografía que muestra la zona basal de dos células epitelioides/endoteliales. Notar fibras extracelulares semejantes a colágeno (**P**) y vesículas electrolúcidas (**ä**). 51.160x.

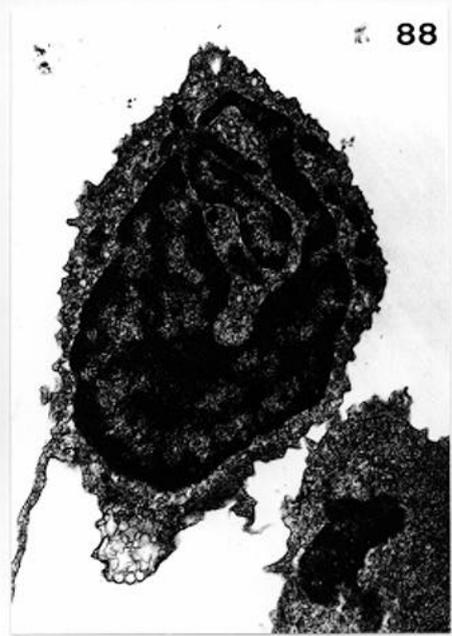
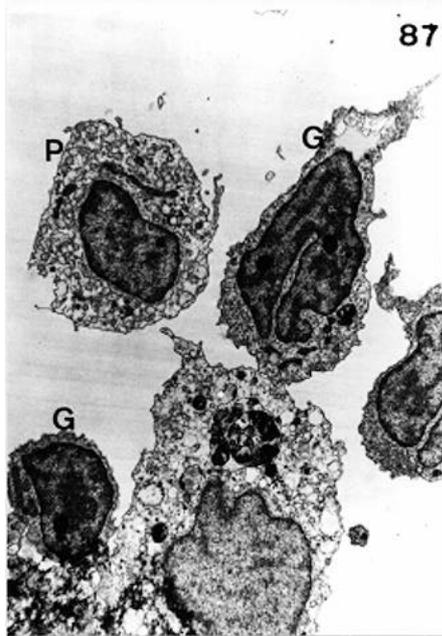
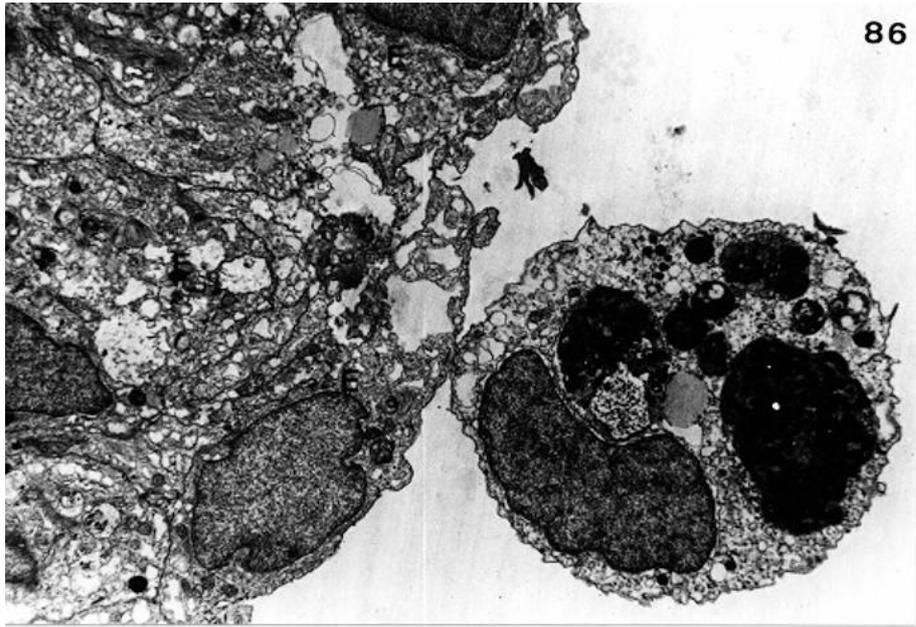


**Células presentes en la luz de las estructuras vasculares. Cocultivos TPS-pronefros incubados durante 16 meses con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 86. Melanomacrófago. Células epitelioides/endoteliales (E). 6.455x.

Fig. 87. Granulocitos (G). Célula plasmática (P). 4.895x.

Fig. 88. Linfocito. 14.960x.

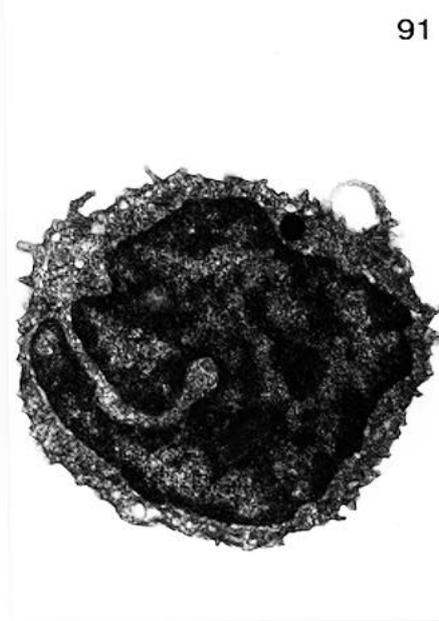
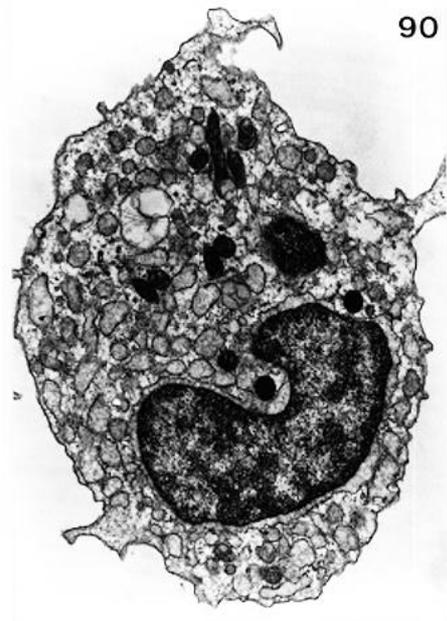
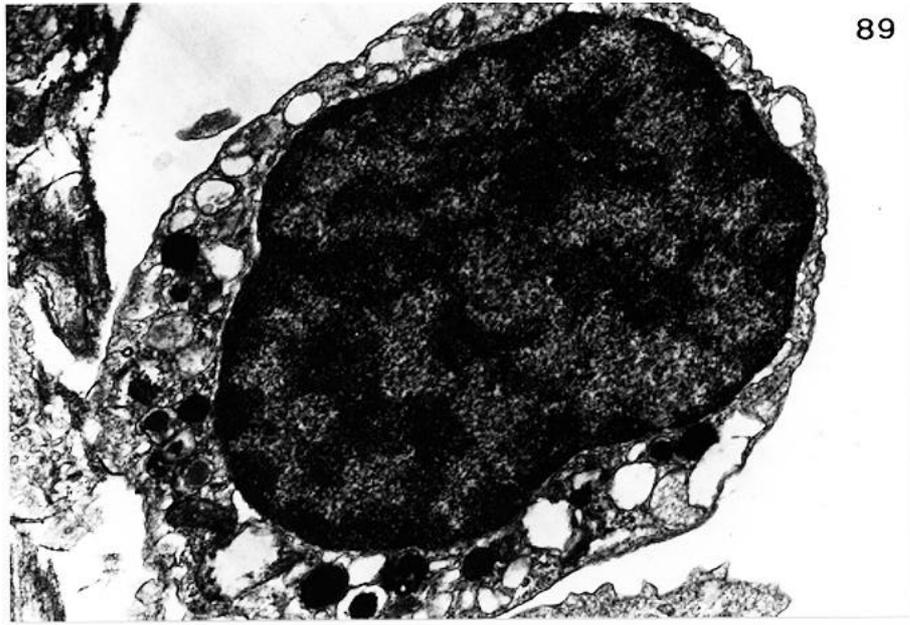


**Células presentes en la luz de las estructuras vasculares. Cocultivos TPS-pronefros incubados durante 16 meses con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 89. Granulocito acidófilo. 30.830x.

Fig. 90. Célula plasmática. 13.875x.

Fig. 91. Linfocito. 21.000x.

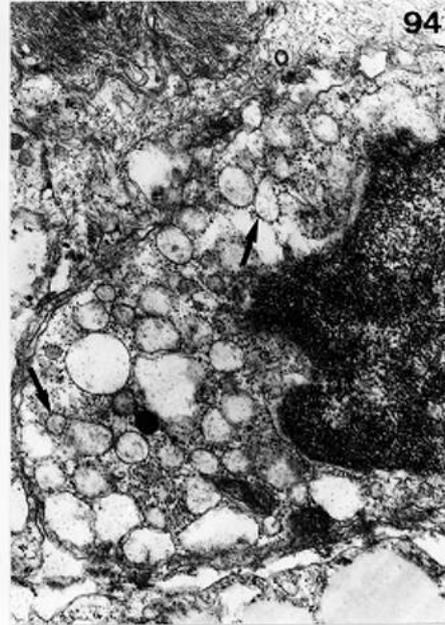
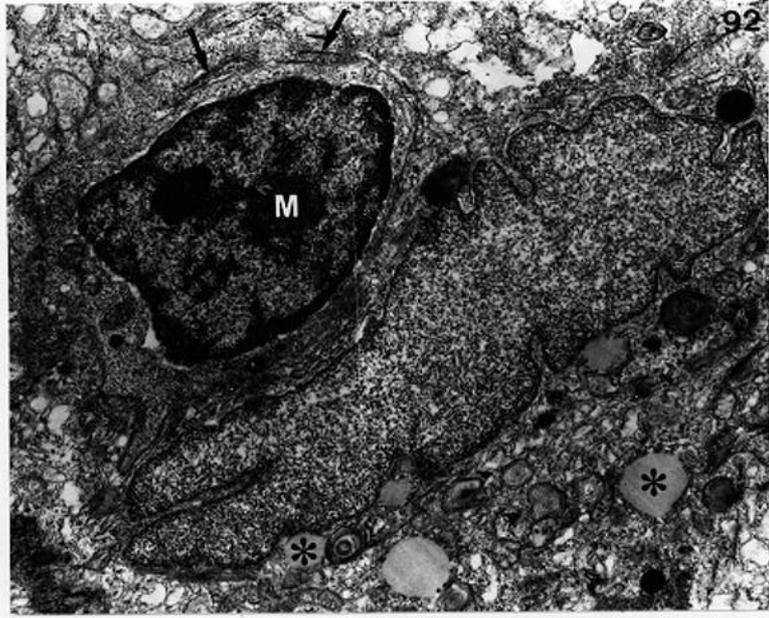


**Cocultivo TPS-pronefros incubado con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 92. Mieloblasto (M) apuesto a una célula epitelióide en la trama de células del estroma que constituyen la multicapa de un cocultivo incubado durante 16 meses. Matriz extracelular (P) y gotas lipídicas (L). 13.500x.

Fig. 93. Célula plasmática (P) localizada entre las células epitelioides (E) de un cocultivo incubado durante 16 meses. 11.100x.

Fig. 94. Detalle del citoplasma de una célula plasmática de un cocultivo incubado durante 16 meses. Retículo endoplásmico rugoso (R). 23.200x.

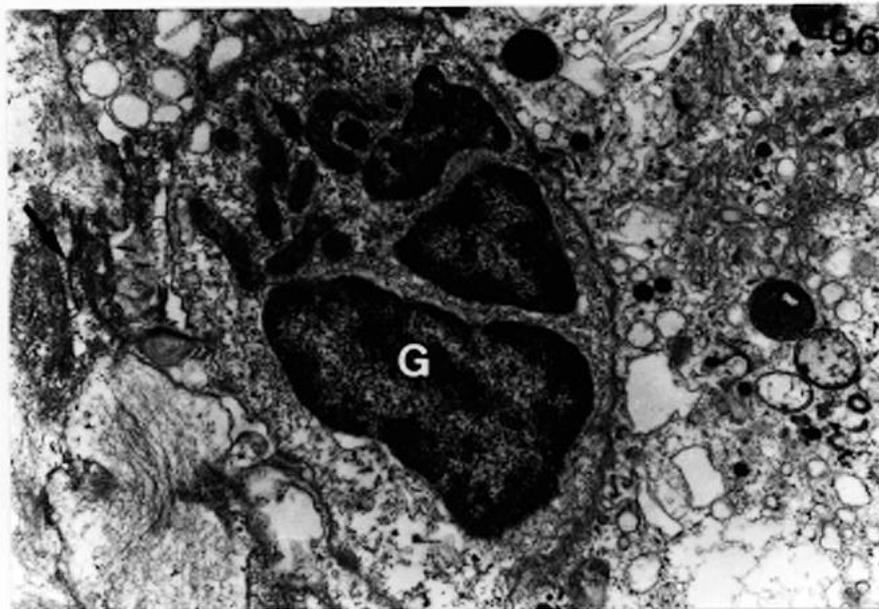
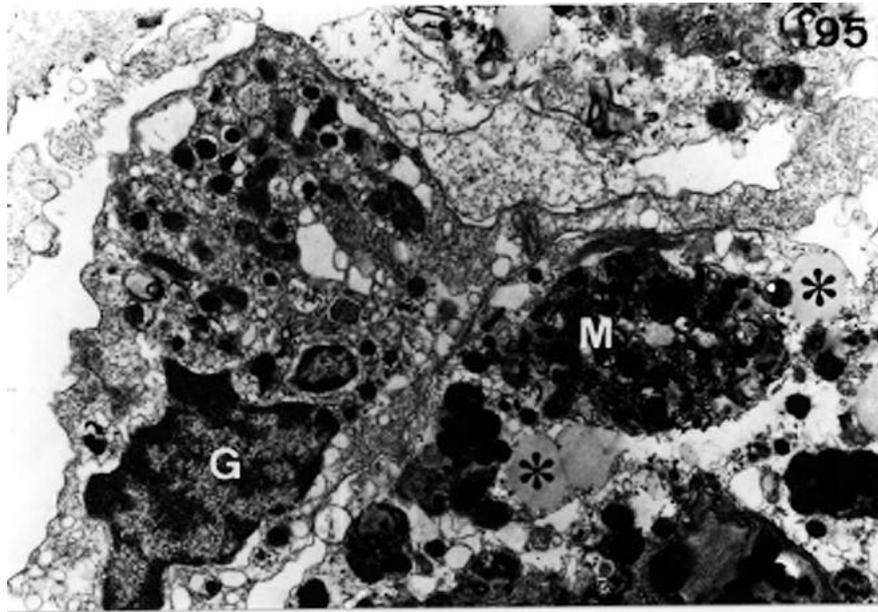


## Acceso a Tesis

**Cocultivo TPS-pronefros incubado con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 95. Granulocito heterófilo (G) y melanomacrófago (M) dispuestos entre la trama de células del estroma de un cocultivo incubado durante 16 meses. Notar la presencia de gotas lipídicas (L) en el melanomacrófago. 9550x.

Fig. 96. Granulocito (G) dispuesto entre la multicapa de células del estroma de un cocultivo incubado durante 16 meses. Matriz extracelular (E). 10.000x.



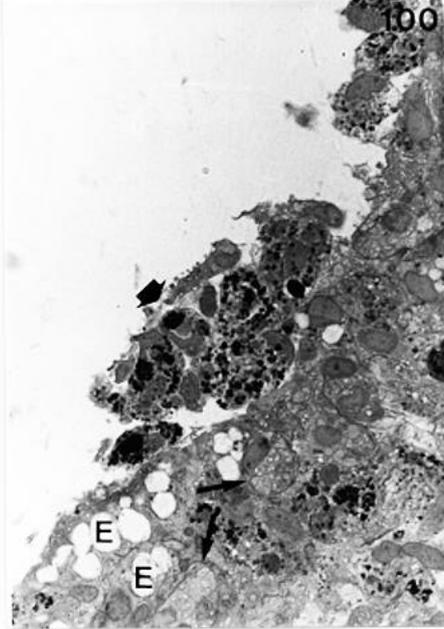
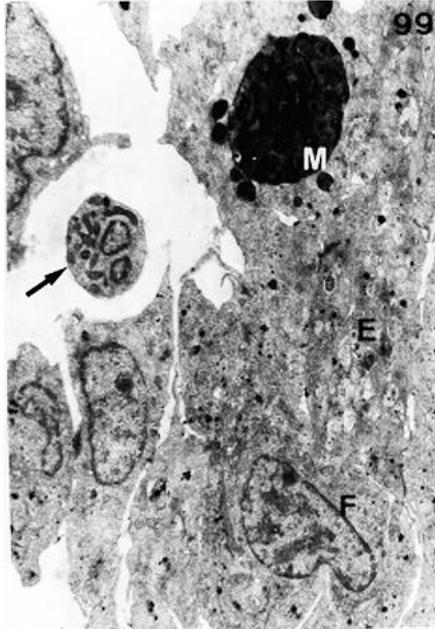
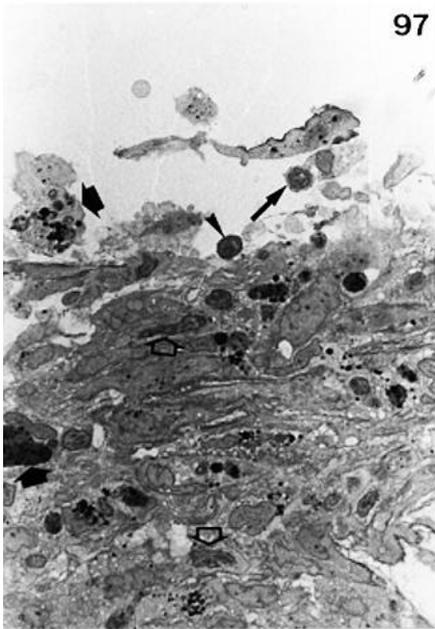
**Cocultivo TPS-pronefros incubado con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 97. Corte semifino de un cocultivo incubado durante 16 meses. Se observan granulocito (P), linfocito (ä) y melanomacrófagos (ç). Células fibroblásticas (ç). 890x.

Fig. 98. Linfocito libre dispuesto cercano al borde de la multicapa de un cocultivo incubado durante 16 meses. Célula epitelioides (E). 7.000x.

Fig. 99. Ultraestructura de un cocultivo incubado durante 16 meses, donde se observa un granulocito libre (P) cercano al borde de la multicapa. Célula fibroblástica (F), célula epitelioides (E) y melanomacrófago (M). 860x.

Fig. 100. Corte semifino de un cocultivo incubado durante 16 meses, en el que se muestra una colonia de melanomacrófagos (ç), células epitelioides (E) y parte de dos estructuras vasculares (P). 7.700x.



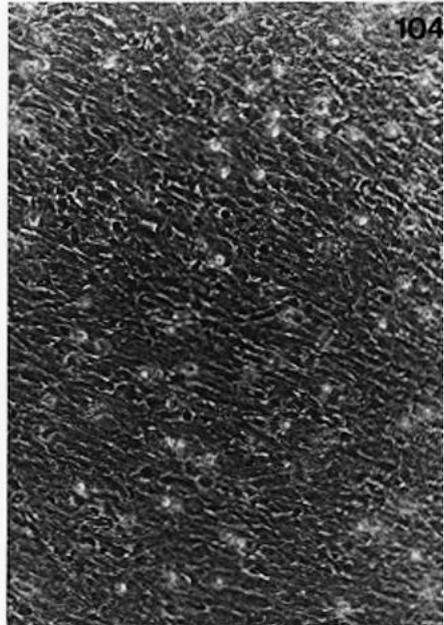
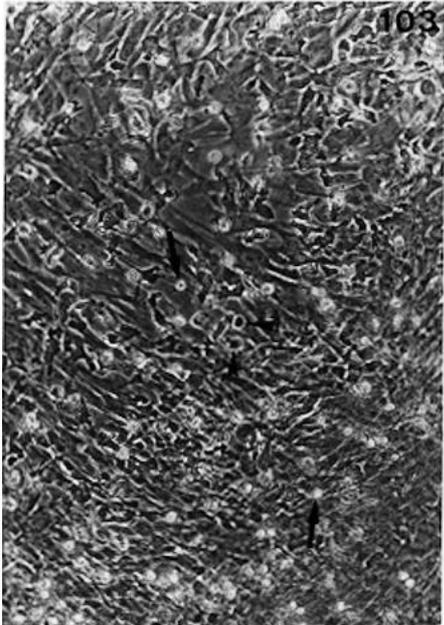
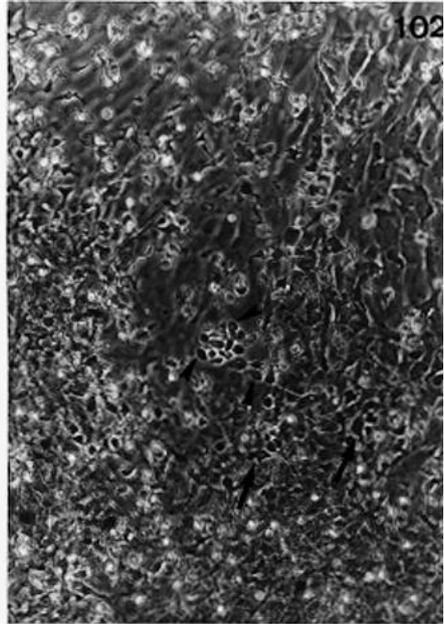
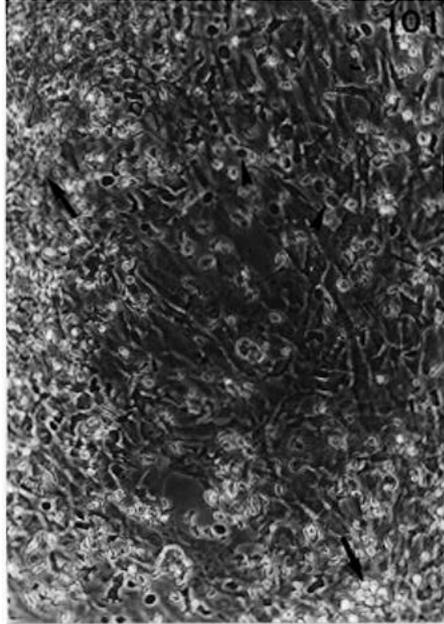
**Cocultivo RTG-2-pronefros incubado durante 14 días con el medio de cultivo D (suplementado con suero de truchas estresadas).**

Fig. 101. Micrografía de un cocultivo incubado durante 14 días. Se observan colonias hematopoyéticas (P) y eritrocitos libres (ä). 180x.

Fig. 102. Cocultivo incubado durante 14 días. Notar células oscuras dispersas entre las células del estroma (P) y eritrocitos libres (ä). 160x.

Fig. 103. Cocultivo incubado durante 21 días, que contiene células hematopoyéticas dispersas (P) sobre las células adherentes y eritrocitos libres (ä). 190x.

Fig. 104. Aspecto general de un cocultivo incubado durante 48 días, en el que prácticamente ha cesado las actividad hematopoyética. 170x.

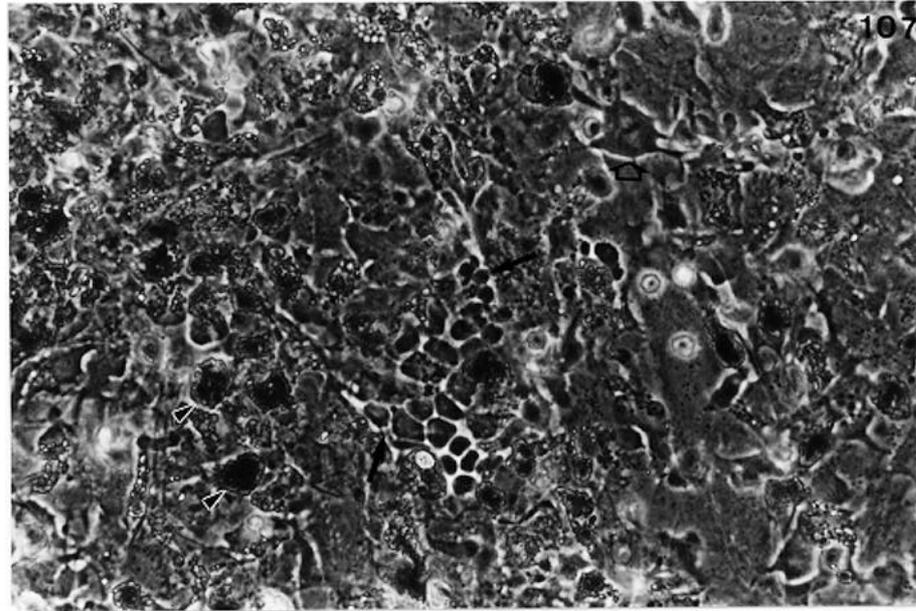
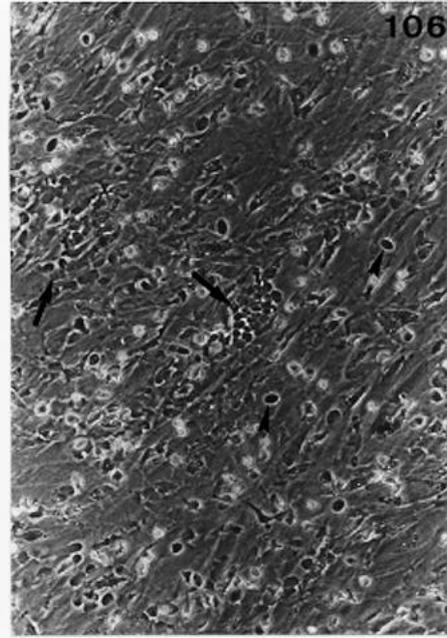
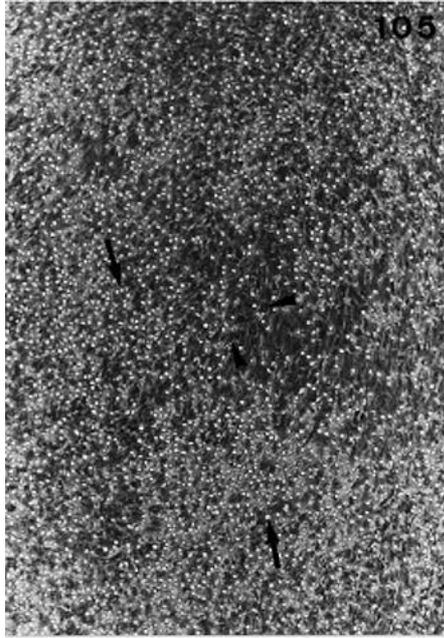


**Cocultivo TPS-pronefros incubado durante 14 días con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 105. Cocultivo incubado durante 14 días, donde se encuentran numerosas células hematopoyéticas dispuestas sobre (P) y entre (ä) las células del estroma. 85x.

Fig. 106. Cocultivo incubado durante 14 días donde se muestran pequeñas colonias con aspecto de empedrado (P) y eritrocitos libres (ä). 180x.

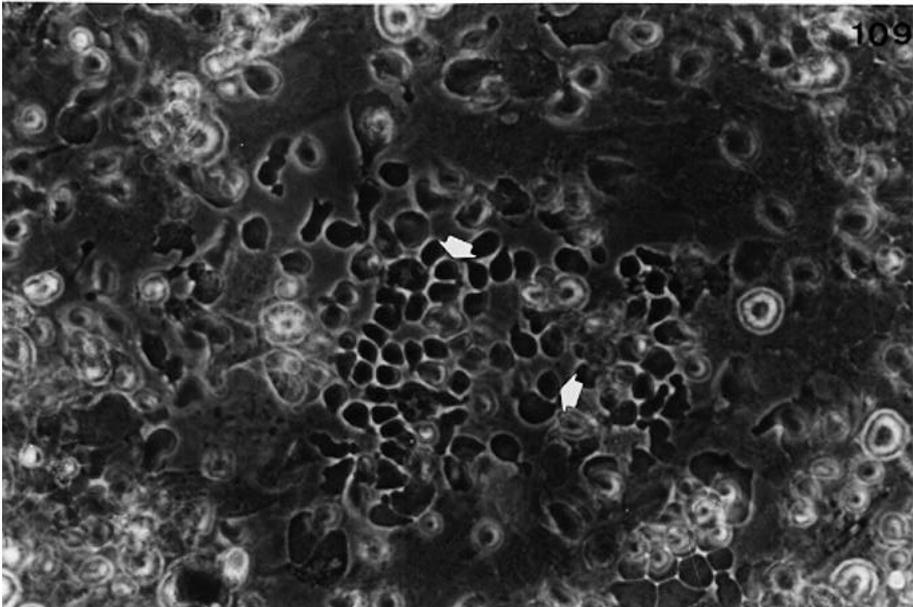
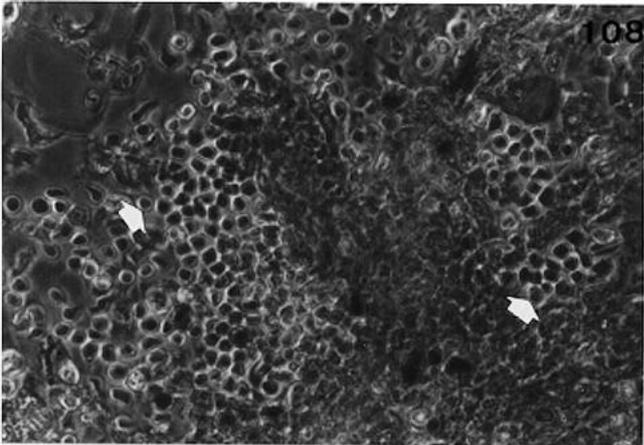
Fig. 107. Cocultivo incubado durante 1 mes. Notar la presencia de colonias con aspecto de empedrado (P) y numerosos melanomacrófagos (ä). Célula en mitosis (©). 1.070x.



**Cocultivo TPS-pronefros incubado durante 14 días con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 108. Cocultivo incubado durante 48 días. Notar la presencia de colonias que contienen eritrocitos (P). 300x.

Fig. 109. Cocultivo incubado durante 3 meses, donde se muestran colonias que contienen eritrocitos (Q). 930x.

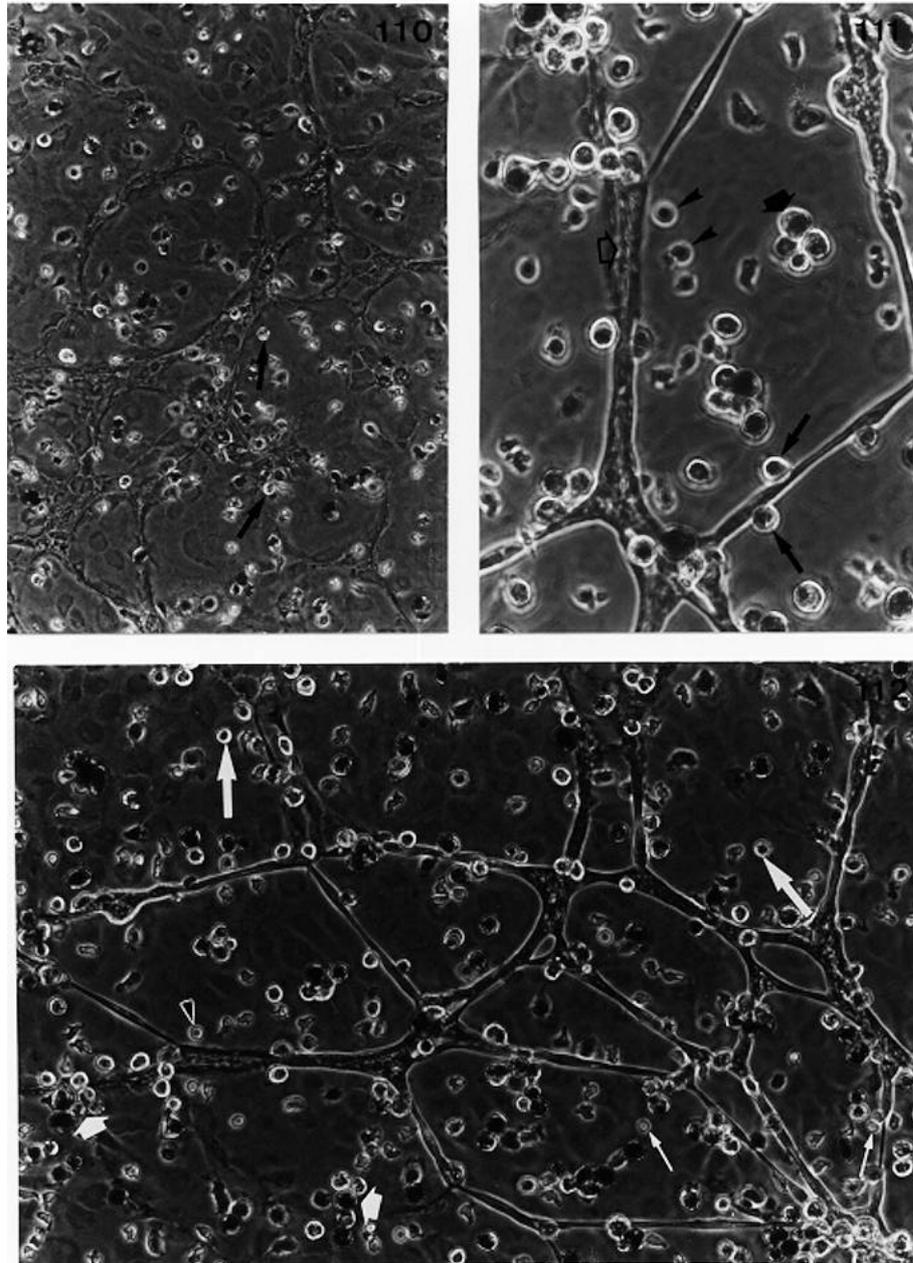


**Formación de estructuras vasculares en cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 110. Cocultivo incubado durante 5 meses, en el que se han desarrollado estructuras vasculares dispuestas entre la multicapa de células del estroma. Células de aspecto mieloide (P). 190x.

Fig. 111. Cocultivo incubado durante 5 meses. Se observan eritrocitos libres (ä), células de aspecto mieloide asociadas a las estructuras vasculares (P), y colonias formadas por melanomacrófagos, células de aspecto mieloide y eritrocitos (ç). Luz de la estructura vascular (ç). 360x.

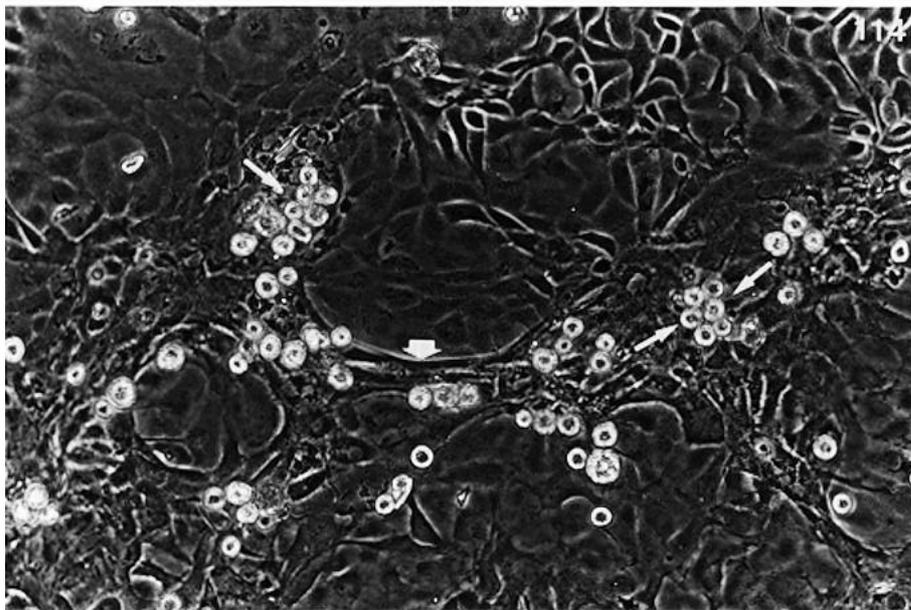
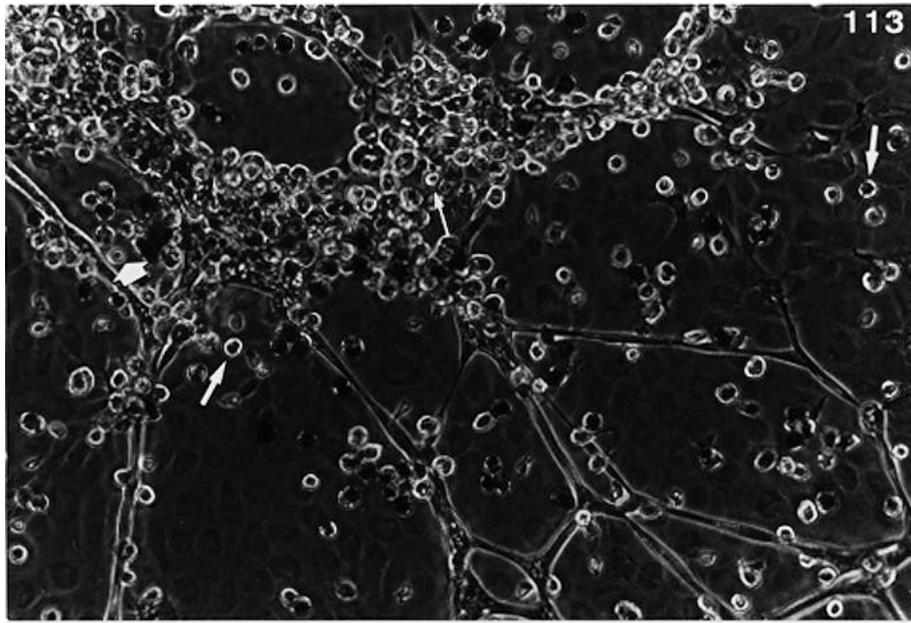
Fig. 112. Cocultivo incubado durante 5 meses. Notar la presencia de estructuras vasculares dispuestas en el plano situado por encima de la multicapa de células del estroma. Células de aspecto mieloide (P) y linfoide libres ( ), eritrocitos (ç) y colonias formadas por melanomacrófagos, y células de aspecto mieloide (ç). 245x.



**Formación de estructuras vasculares en cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 113. Cocultivo incubado durante 5 meses. Células de aspecto mieloide libres (P) y colonia formada por células de aspecto mieloide, melanomacrófagos y eritrocitos ( ) asociada a la estructura vascular. Eritrocito libre (C). 240x.

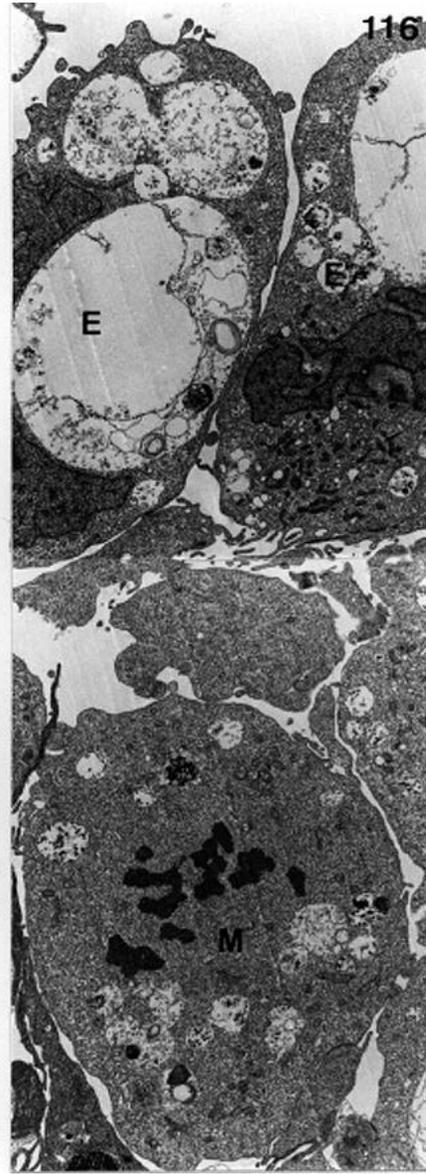
Fig. 114. Cocultivo incubado durante 11 meses. Notar la presencia de pequeñas colonias que contienen eritrocitos (P) dispuestas sobre estructuras vasculares (C). 540x.



**Ultraestructura de cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 115. Electronografía de un cocultivo incubado durante 1 mes, que muestra células fibroblásticas (F), melanomacrófago (M) y matriz extracelular ([ ]). 8.930x.

Fig. 116. Electronografía de un cocultivo incubado durante 11 meses, en la que se observan células epitelioides (E). Mitosis (M). 4.580x.

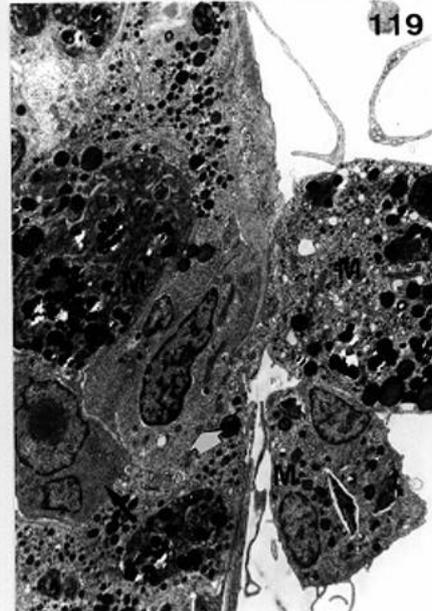
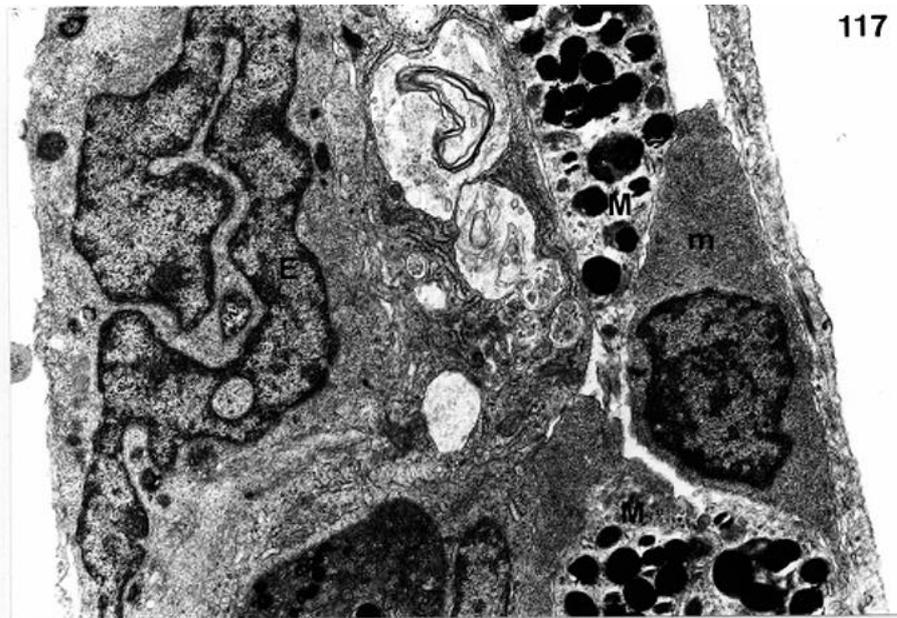


**Ultraestructura de cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 117. Electronografía de un cocultivo incubado durante 1 mes. Célula epitelioide (E), melanomacrófagos (M) y mieloblasto (m). 13.120x.

Fig. 118. Detalle de las fibras presentes en la matriz extracelular de un cocultivo incubado durante 11 meses. 77.670x.

Fig. 119. Electronografía de un cocultivo incubado durante 1 mes. Melanomacrófagos (M), mieloblasto (P) y células fibroblásticas (C). 4.970x.



**Ultraestructura de cocultivos TPS-pronefros incubados con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 120. Mieloblasto dispuesto entre la multicapa de células del estroma en un cocultivo incubado durante 1 mes. 21.400x.

Fig. 121. Linfocito dispuesto entre la multicapa de células del estroma en un cocultivo incubado durante 1 mes. 17.500x.

Fig. 122. Mielocito (P) y macrófago (M) dispuestos entre la multicapa de células del estroma en un cocultivo incubado durante 1 mes. 9.940x.

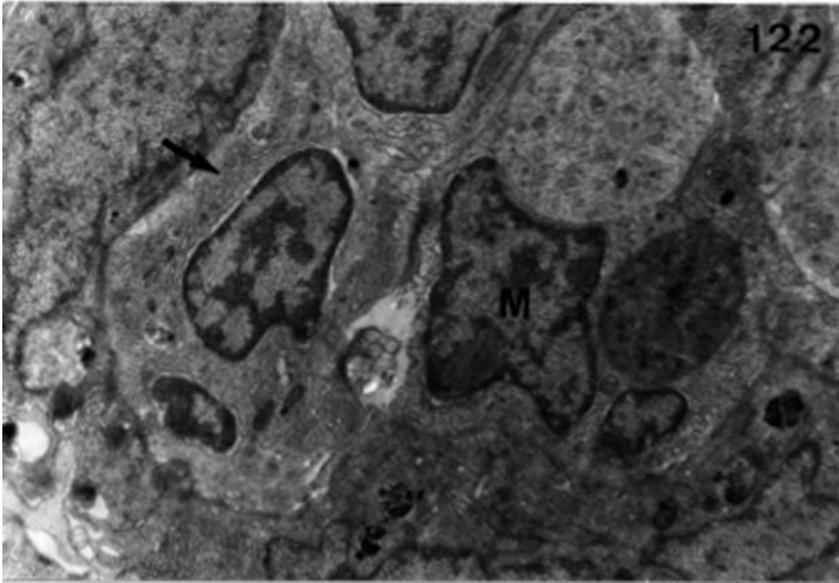
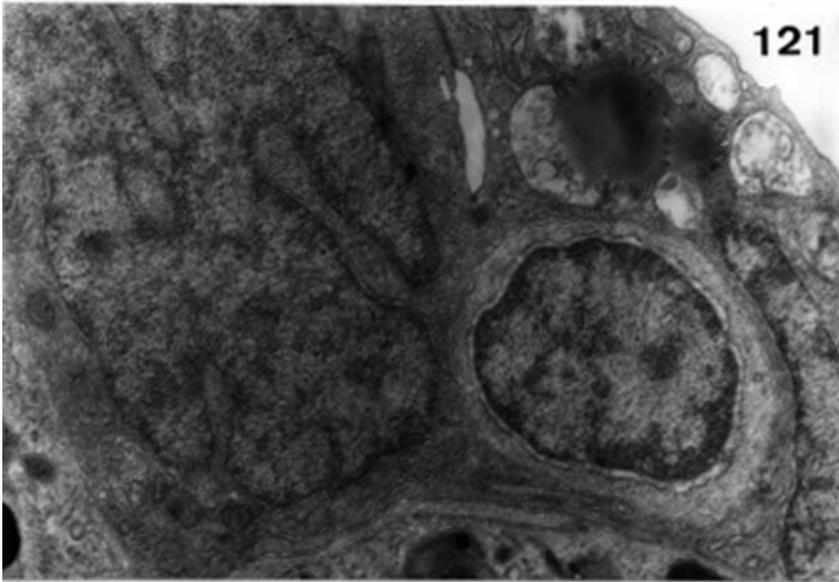
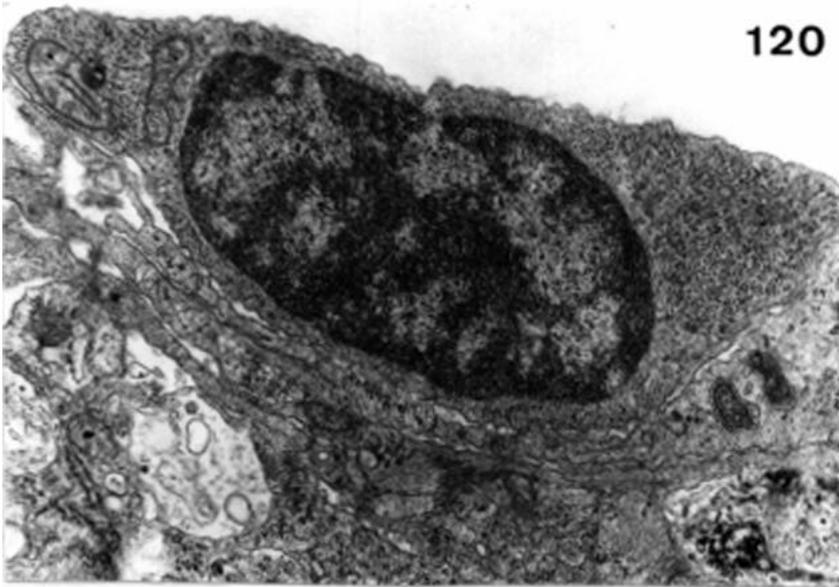
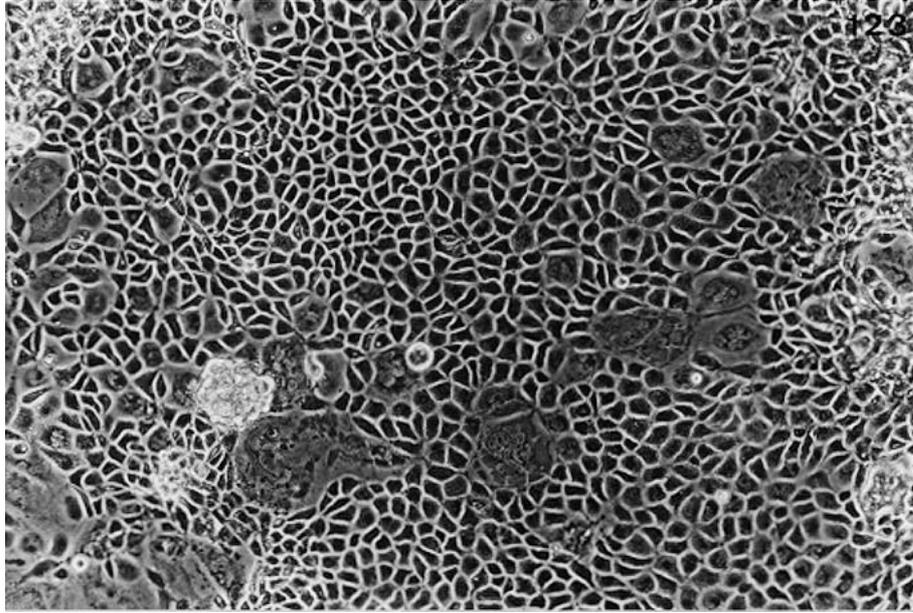


Fig. 123. Cocultivo TPS-pronefros tras 16 meses de incubación con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato). 140x.

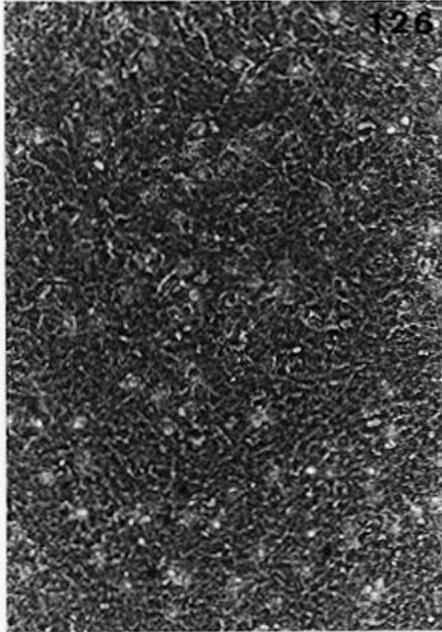
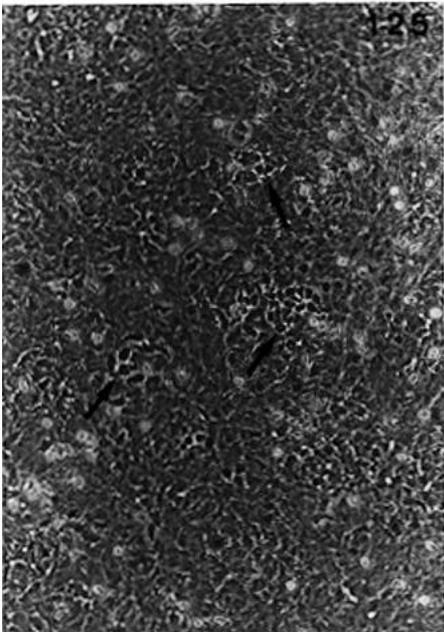
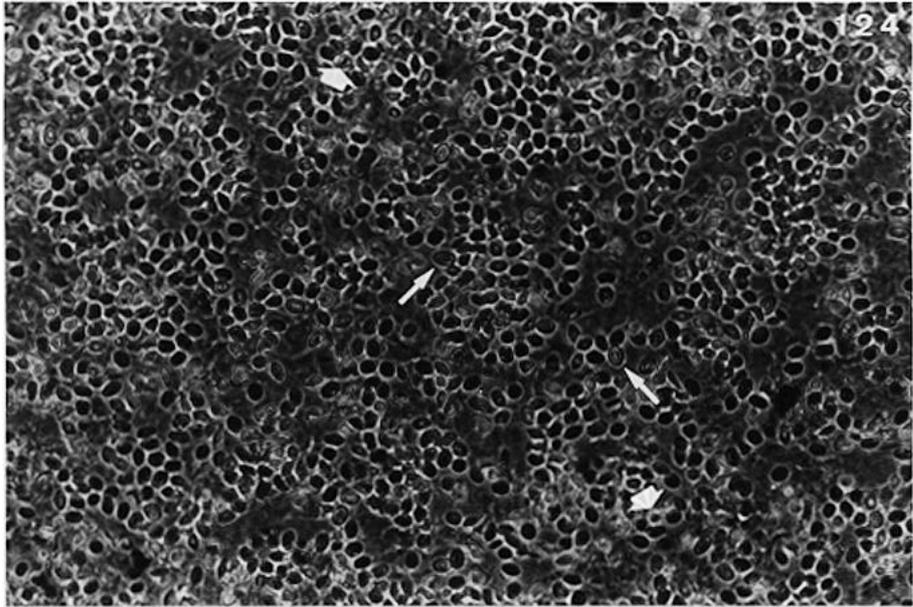


**Cocultivos RTG-2-pronefros incubados con el medio de cultivo E (suplementado con hidrocortisona 21-hemisuccinato).**

Fig. 124. Cocultivo incubado durante 14 días, donde se observan eritrocitos (P) y células de aspecto mieloide (C) dispuestas sobre las células adherentes. 510x.

Fig. 125. Cocultivo incubado durante 21 días, en el que se observan colonias hematopoyéticas con aspecto de empedrado (P). 210x.

Fig. 126. Cocultivo incubado durante 48 días. Notar el cese de la actividad hematopoyética. 130x.

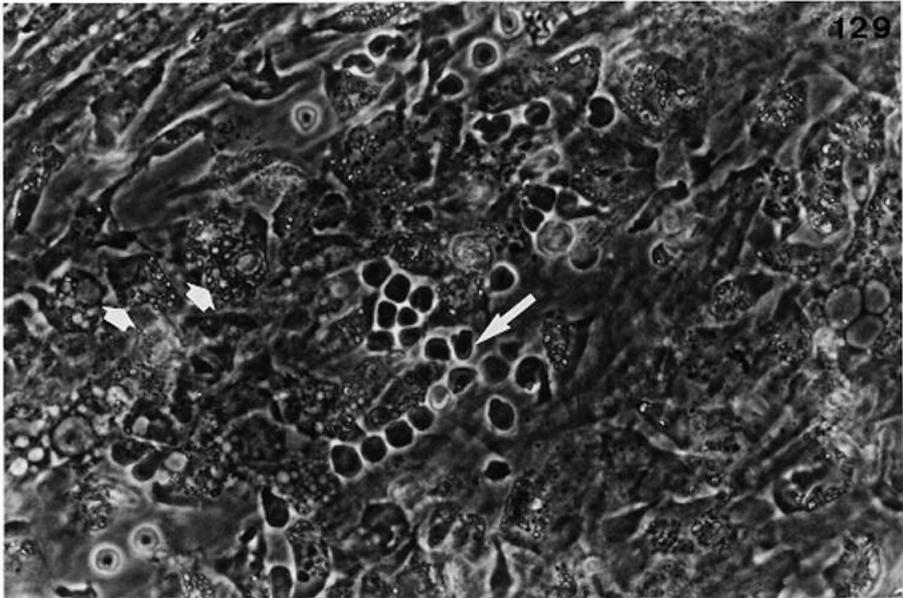
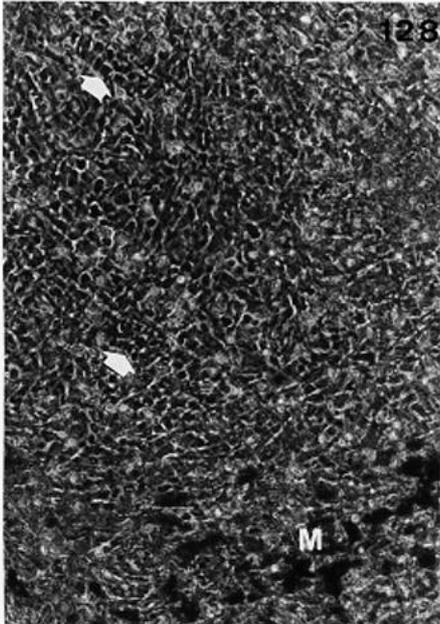
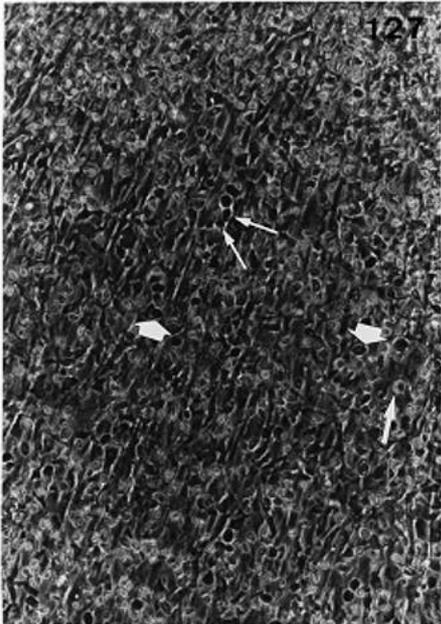


**Cocultivo TPS-pronefros incubado con el medio de cultivo F (suplementado con 17-hidro cortisona complejada con  $\beta$ -ciclodextrinas).**

Fig. 127. Cocultivo incubado durante 14 días. Se observan células hematopoyéticas dispuestas sobre (P) o entre ( ) las células del estroma. Eritrocitos (C). 165x.

Fig. 128. Cocultivo incubado durante 21 días. Notar áreas en empedrado (C) y acumulaciones de melanomacrófagos (M). 86x.

Fig. 129. Cocultivo incubado durante 1 mes. Se observan áreas en empedrado que contienen eritrocitos (P). Melanomacrófagos (C). 1.000x.

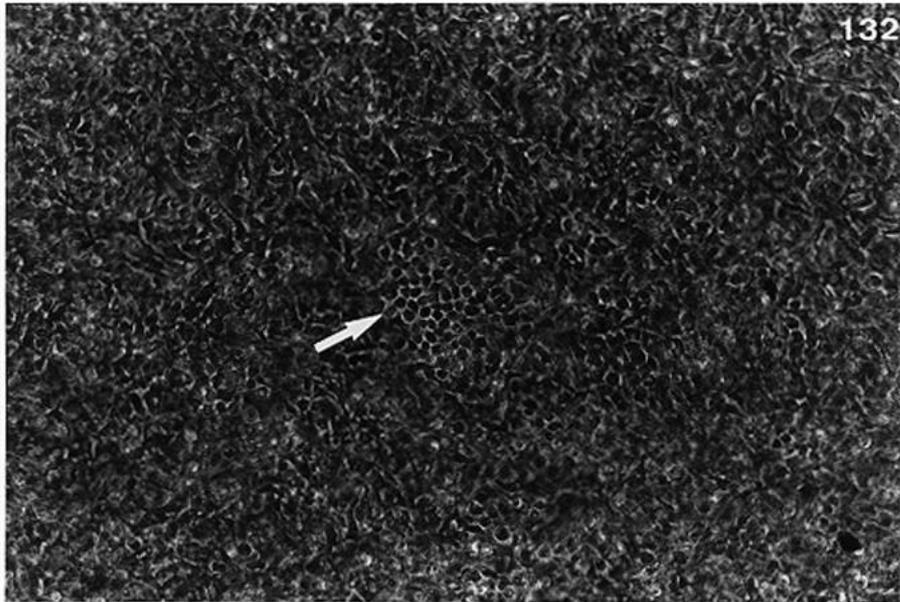
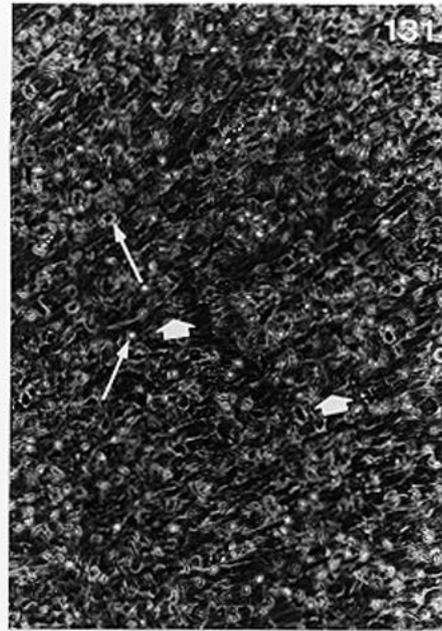
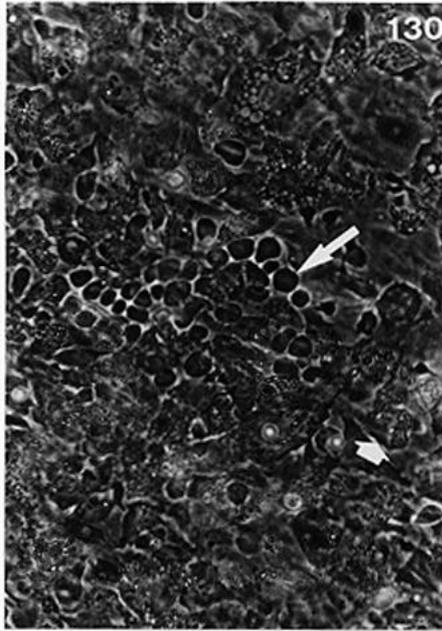


**Cocultivo TPS-pronefros incubado con el medio de cultivo F (suplementado con 17-hidro cortisona complejada con  $\alpha$ -ciclodextrinas).**

Fig. 130. Cocultivo incubado durante 1 mes. Se observan áreas en empedrado (P) y melanomacrófagos (Q). 900x.

Fig. 131. Cocultivo incubado durante 1 mes. Se observan células hematopoyéticas dispuestas sobre las células del estroma (P) y melanomacrófagos (Q). 240x.

Fig. 132. Cocultivo incubado durante 2 meses, que contiene un área en empedrado (P). 260x.



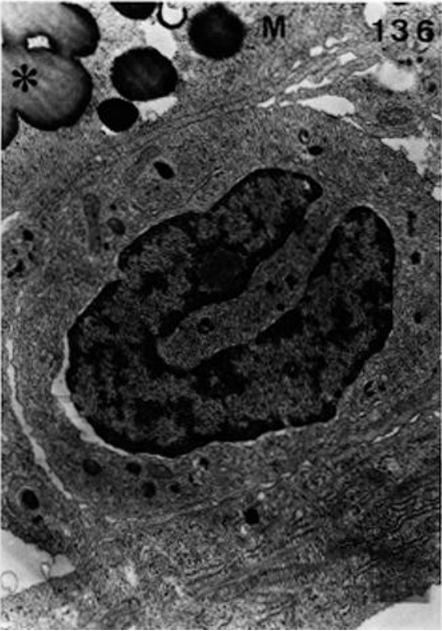
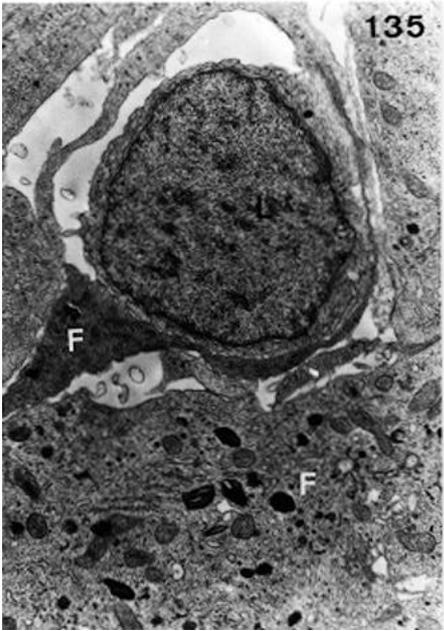
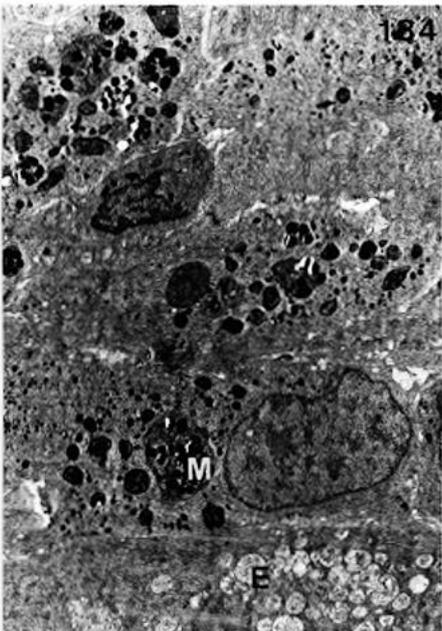
**Cocultivo TPS-pronefros incubado con el medio de cultivo F (suplementado con 17-hidro cortisona complejada con  $\alpha$ -ciclodextrinas).**

Fig. 133. Electronografía de la multicapa de un cocultivo incubado durante 1 mes, en la que aparecen células fibroblásticas (F) y epitelioides (E). Melanomacrófago (M). Desmosoma (P). 9.020x.

Fig. 134. Electronografía de un cocultivo incubado durante 1 mes, mostrando una célula epitelioide (E) y una colonia de melanomacrófagos (M). 4.410x.

Fig. 135. Electronografía de un cocultivo incubado durante 1 mes, en el que se observa un linfoblasto (L) asociado a células fibroblásticas (F). 10.850x.

Fig. 136. Granulocito de un cocultivo incubado durante 1 mes. Melanomacrófago (M). Gotas lipídicas (L). 15.810x.

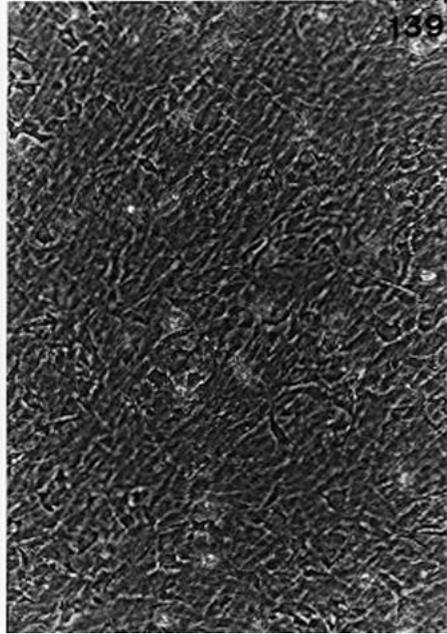
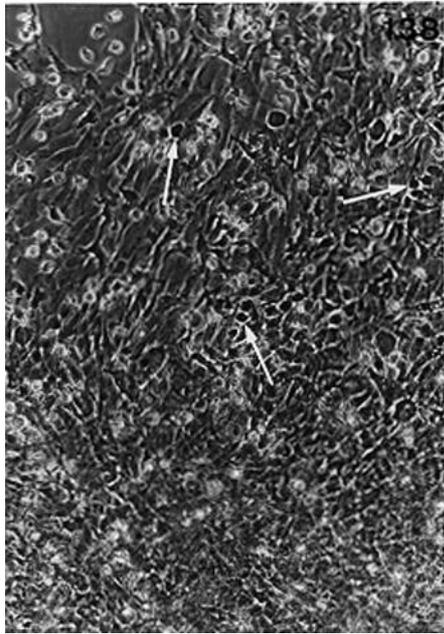
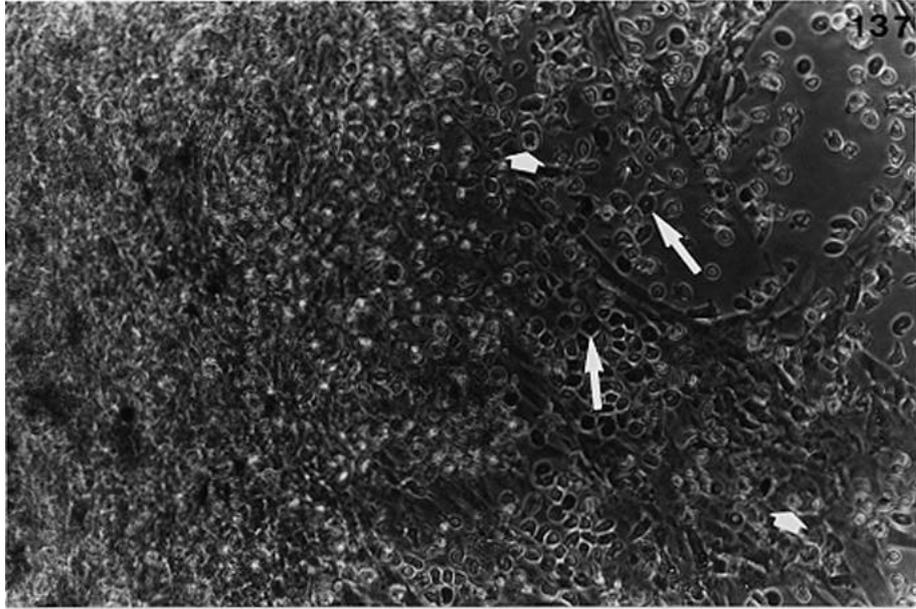


**Cocultivo RTG-2-pronefros incubado con el medio de cultivo F (suplementado con 17-hidro cortisona complejada con  $\alpha$ -ciclodextrinas).**

Fig. 137. Micrografía de un cocultivo incubado durante 14 días. Eritrocitos (P), células de aspecto mieloide (P). 250x.

Fig. 138. Micrografía de un cocultivo incubado durante 21 días. Notar abundantes células hematopoyéticas dispuestas entre la multicapa de células adherentes (P). 180x.

Fig. 139. Micrografía de un cocultivo incubado durante 33 días, en el que ha cesado la actividad hematopoyética. 175x.



**Cocultivos TPS-PBLs realizados en coágulos de fibrinógeno-trombina y suplementados con el medio de cultivo G (con suero de truchas anémicas).**

Fig. 140. Cocultivo tras 8 días de incubación. Se observan células del estroma (P) y pequeñas colonias hematopoyéticas (C). 190x.

Fig. 141. Cocultivo tras 8 días de incubación. Notar colonia hematopoyética (P). Eritrocito (C). 430x.

Fig. 142. Cocultivo tras 13 días de incubación. Se observan células de aspecto linfoide (C) y células del estroma. 180x.

Fig. 143. Cocultivo tras 13 días de incubación, que contiene células de aspecto linfoide (C). 190x.

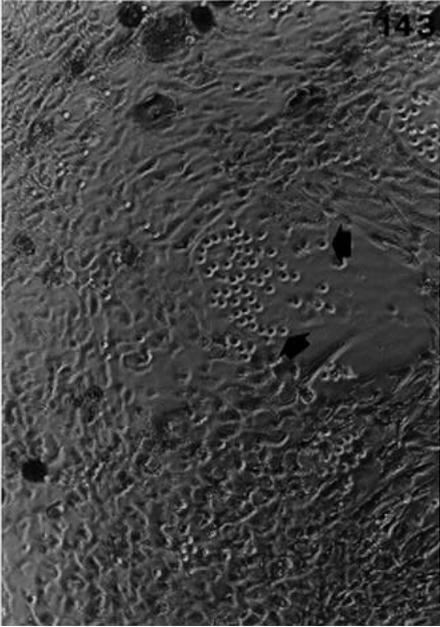
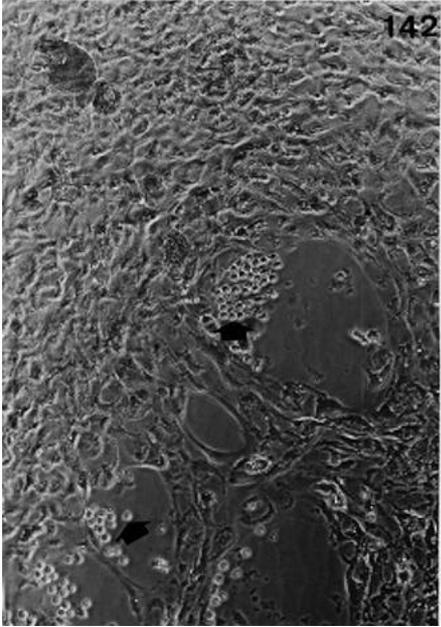
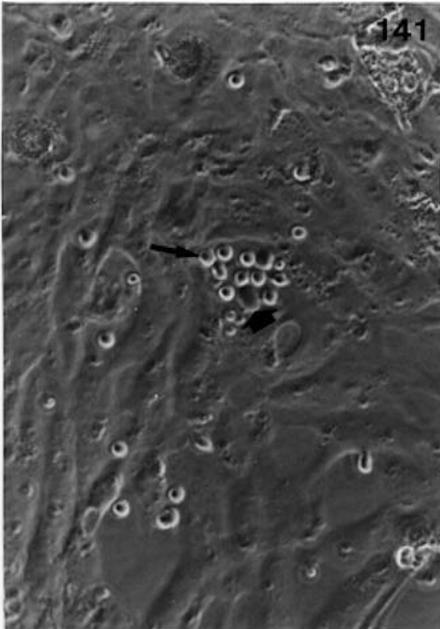
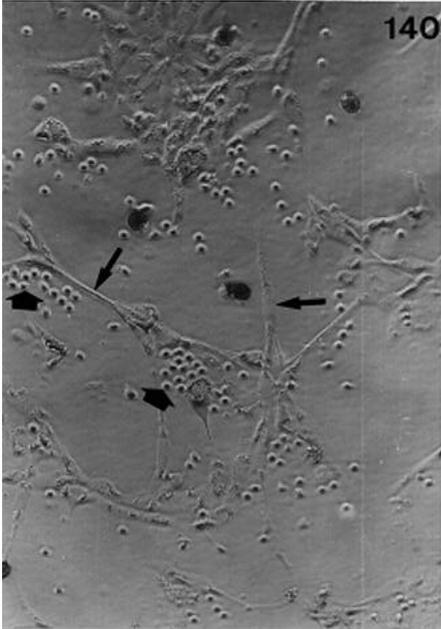


Fig. 144. Micrografía de un cocultivo TPS-PBLs realizado en coágulos de fibrinógeno-trombina y suplementado con el medio de cultivo G (con suero de truchas anémicas) tras 20 días de incubación. Notar células de aspecto linfoide (ϕ). 190x.

Fig. 145. Micrografía de un cultivo de PBLs realizado en coágulos de fibrinógeno-trombina y suplementado con el medio de cultivo H (con medio condicionado de macrófagos de trucha) tras 8 días de incubación. Células de aspecto linfoide (ϕ). 240x.

Fig. 146. Micrografía de un cocultivo TPS-PBLs realizado en coágulos de fibrinógeno-trombina y suplementado con el medio de cultivo H (con medio condicionado de macrófagos de trucha) tras 13 días de incubación, que presenta células de aspecto linfoide (ϕ). 130x.

Fig. 147. Micrografía de un cocultivo TPS-PBLs realizado en coágulos de fibrinógeno-trombina y suplementado con el medio de cultivo H (con medio condicionado de macrófagos de trucha) tras 20 días de incubación. Células de aspecto linfoide (ϕ). 180x.

