



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

**ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS DE
TEJIDOS DE TRUCHA ARCO IRIS. ESTUDIO *in vitro* DE LA
INFECCIÓN CON *Renibacterium salmoninarum*.**

Memoria presentada por
D. EMILIO FLAÑO DEL CASTILLO
para optar al Grado de Doctor en Biología.

León, 1995.

Dña. Pilar López Fierro y Dña. Blanca Razquin Peralta, Profesoras Titulares del Departamento de Biología Celular y Anatomía de la Universidad De León.

CERTIFICAN: Que D. Emilio Flaño del Castillo ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Biología Celular y Anatomía de la Universidad de León, el trabajo titulado: **“Establecimiento y caracterización de cultivos de tejidos de trucha arco iris. Estudio *in vitro* de la infección con *Renibacterium salmoninarum*.”**, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Lo que hacemos constar, a petición del interesado, para que surta los efectos oportunos.

León, 28 de Noviembre de 1995.

Fdo.: Pilar López Fierro.

Fdo.: Blanca Razquin Peralta.

Doy las gracias a todos aquellos que me ha ayudado a realizar este trabajo, tanto por su colaboración como por su apoyo moral.

Para Natalia, por su amor y por todo lo que ha tenido que aguantar.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	7
PROPÓSITO	13
MATERIAL Y MÉTODOS	15
1.- Animales	15
2.- Obtención de explantes.....	16
3.- Condiciones de cultivo	16
3.1.- Establecimiento de cultivos primarios	16
3.2.- Establecimiento de subcultivos	17
3.3.- Condiciones de cultivo	17
4.- Medios de cultivo	17
4.1.- Medio de cultivo completo A.....	17
4.2.- Medio de cultivo completo B.....	18
4.3.- Medio de cultivo completo C.....	18
5.- Técnica histológica rutinaria.....	18
5.1.- Microscopía óptica	18
5.2.- Microscopía electrónica de transmisión.....	18
6.- Análisis citoquímico	19
6.1.- Inmunocitoquímica.....	19
6.2.- Citoquímica	20
7.- Actividad fagocítica.....	20
8.- Infecciones experimentales.....	21
8.1.- Bacterias	21
8.2.- Infecciones <i>in vivo</i>	21
8.2.1.- Inoculación.....	21
8.2.2.- Recogida de muestras.....	21
8.3.- Infecciones <i>in vitro</i>	22
8.3.1.- Cultivos primarios.....	22
8.3.2.- Subcultivos.....	22
8.4.- Análisis inmunocitoquímico.....	23
RESULTADOS.....	25
1.- Tegumento.....	26

1.1.- Microscopía óptica.....	26
1.2.- Microscopía electrónica.....	26
1.3.- Análisis citoquímico.....	28
1.3.1.- Inmunocitoquímica.....	28
1.3.2.- Citoquímica.....	29
2.- Branquia.....	30
2.1.- Microscopía óptica.....	30
2.2.- Microscopía electrónica.....	31
2.3.- Análisis citoquímico.....	33
2.3.1.- Inmunocitoquímica.....	33
2.3.2.- Citoquímica.....	34
2.4.- Fagocitosis.....	36
3.- Pronefros.....	36
3.1.- Microscopía óptica.....	36
3.2.- Microscopía electrónica.....	37
3.3.- Análisis citoquímico.....	38
3.3.1.- Inmunocitoquímica.....	38
3.3.2.- Citoquímica.....	39
4.- Bazo.....	40
4.1.- Microscopía óptica.....	40
4.2.- Microscopía electrónica.....	41
4.3.- Análisis citoquímico.....	42
4.3.1.- Inmunocitoquímica.....	42
4.3.2.- Citoquímica.....	43
4.4.- Fagocitosis.....	44
5.- Cultivos infectados.....	44
5.1.- Infecciones <i>in vitro</i>	44
5.1.1.- <i>R. salmoninarum</i> cepa ATCC 33209.....	44
5.1.2.- <i>R. salmoninarum</i> cepa FT10.....	45
5.2.- Infecciones <i>in vivo</i>	48
5.2.1.- <i>R. salmoninarum</i> cepa ATCC 33209.....	49
5.2.2.- <i>R. salmoninarum</i> cepa FT10.....	50
TABLAS DE LOS CULTIVOS INFECTADOS.....	51
DISCUSIÓN.....	57
Tegumento.....	62
Branquia.....	67
Pronefros.....	72
Bazo.....	79
CULTIVOS INFECTADOS.....	84
CONCLUSIONES.....	95
BIBLIOGRAFÍA.....	97
FIGURAS.....	111

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Bacteriana del Riñón, BKD, es una enfermedad sistémica y crónica que afecta a los salmónidos y es causada por la bacteria Gram-positiva *Renibacterium salmoninarum* (Sanders y Fryer, 1980; Fryer y Sanders, 1981). Este microorganismo se ha definido como un patógeno intracelular de células fagocíticas (Young y Chapman, 1978, Bruno, 1986b) y esta localización intracelular no solo contribuye a la dispersión de la bacteria (Evenden y cols., 1993) sino que también la protege de la exposición a agentes quimioterapéuticos (Wolf y Dumbar, 1959; Klontz, 1983; Austin, 1985; Getchell y cols., 1985).

Actualmente la BKD está más ampliamente distribuida de lo que se ha descrito. La infección afecta tanto a poblaciones salvajes como cultivadas de salmónidos (Fryer y Sanders, 1981; Munro y Bruno, 1988; Fryer y Lannan, 1993) y llega a provocar niveles de mortalidad superiores al 80% en el salmón del Pacífico (Bruno, 1986a), habiéndose indicado que su incidencia y mortalidad es aún mayor que la oficialmente reconocida (Fryer y Lannan, 1993). Todo ello cobra especial importancia debido a que no se han desarrollado vacunas efectivas y los tratamientos antimicrobianos son poco eficaces.

La infección con *Renibacterium salmoninarum* produce importantes alteraciones, tanto celulares como fisiológicas en los peces afectados (Wood y Yasutake, 1956; Hunn, 1964; Fryer y Sanders, 1981; Evenden y cols., 1993). La BKD presenta dos estadios bien definidos: una fase crónica o latente en la que los peces no manifiestan alteraciones externas y una fase aguda o activa posiblemente inducida por situaciones estresantes (Trust, 1986; Wedemeyer y McLeay, 1981). Durante la fase crónica la bacteria puede sobrevivir y multiplicarse en las células fagocíticas (Young y Chapman, 1978; Bruno, 1986b) y se ha puesto de manifiesto que

también se localiza en células endoteliales, reticulares y linfoides (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996). Se han sugerido una gran variedad de factores que afectan a la incidencia y progresión de la BKD: variaciones estacionales (Fryer y Sanders, 1981), temperatura (Smith, 1964; Munro y Bruno, 1988; Lall y cols., 1985; Landolt, 1989), dieta (Lall y cols., 1985; Landolt, 1989), composición y salinidad del agua (Bruno, 1986a; Fryer y Sanders, 1981; Banner y cols., 1983), situaciones estresantes (Iwama, 1977; Wedemeyer y McLeay, 1981; Trust, 1986) y cepa bacteriana (Hoffman y cols., 1984).

Las características clínicas y los cambios histopatológicos que produce son similares en los peces infectados de forma natural o experimental (Young y Chapman, 1978; Bruno, 1986b). Histopatológicamente la BKD se caracteriza por la producción de una respuesta inflamatoria (Wood y Yasutake, 1956; Young y Chapman, 1978; Bruno, 1986b), el desarrollo de lesiones granulomatosas crónicas difusas, la presencia de nódulos formados por linfoblastos y macrófagos proliferantes y una gran destrucción de los órganos infectados (Wood y Yasutake, 1956; Smith, 1964). El riñón es el primer órgano afectado (Wood y Yasutake, 1956), pero también se han descrito lesiones en el bazo, hígado, músculo, tejidos branquiales, cerebro, sistemas circulatorio y digestivo y timo (Wood y Yasutake, 1956; Bruno, 1986b; Flaño, 1992).

El tejido linfohematopoyético de los peces infectados se caracteriza por la aparición de células epitelioides y focos de plasmacitopoyesis, incremento en el número de células barrera y la infección de células limitantes sinusoidales, reticulares, barrera y fagocíticas (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996). En los estadios finales de la infección se produce la destrucción de la matriz intercelular, disminución en el número de bacterias y dispersión de gránulos de melanina por todo el tejido hematopoyético (Bruno, 1986b).

Como consecuencia de la infección se alteran numerosos parámetros fisiológicos. Los estudios hematológicos en *Onchorynchus kisutch* y *Salvelinus fontinalis* ponen de manifiesto una disminución del hematocrito (Hunn, 1964) y un descenso en el suero de los niveles de hemoglobina (Suzumoto y cols., 1977; Aldrin y cols. 1978), proteínas totales (Hunn, 1964) y colesterol (Aldrin y cols., 1978). Estas observaciones se corresponden con las obtenidas para *O. mikyss* y *Salmo trutta* (Bruno, 1986a), en los que también se aprecian un incremento en el número de monocitos, trombocitos y neutrófilos circulantes y una temprana y continuada aparición en sangre de eritroblastos inmaduros (Bruno y Munro, 1986).

Como en el caso de las infecciones producidas por otros patógenos intracelulares, la destrucción de los tejidos se debe fundamentalmente a la liberación de enzimas hidrolíticas y catabólicas por las células hospedadoras lisadas, especialmente células fagocíticas, aunque también pueden contribuir a ella la liberación de agentes tóxicos/líticos por la bacteria o la autólisis de bacterias muertas (Evenden y cols., 1993). Además, la patogenia y la resistencia a la degradación intracelular de *R. salmoninarum* también se han relacionado con la elaboración de productos extracelulares (Bruno, 1988; Evenden y cols., 1990), la mayor parte de los cuales está constituida por una proteína de 57 kd denominada antígeno F o p57 (Wiens y Kaattari, 1991). También se ha demostrado que se produce una reacción inflamatoria granulomatosa causada por la deposición de complejos inmunes (Villena y cols., 1989; Flaño, 1992; Sami y cols., 1992).

Las interacciones entre los patógenos y los componentes del sistema defensivo de los peces han sido poco estudiadas y en la mayoría de las experiencias *in vivo* los peces están en situaciones de estrés (Anderson, 1990). Para evitar las interacciones de las respuestas derivadas de las situaciones estresantes y la influencia de parámetros medioambientales los modelos *in vitro* parecen la mejor solución. Estos ensayos permiten un mayor control de las condiciones de los experimentos, reduciendo la variabilidad de las respuestas (Anderson, 1990). Por lo tanto, para intentar analizar las interacciones patógeno-huésped parece necesario utilizar modelos más simples y menos sujetos a variables externas que los peces como primera aproximación y más en el caso de *R. salmoninarum*, ya que como se ha indicado anteriormente, hay una gran variedad de factores externos que afectan al desarrollo de la BKD.

En mamíferos los cultivos celulares y de tejidos han sido ampliamente utilizados como modelos *in vitro* para el estudio de mecanismos patogénicos, especialmente en el caso de patógenos intracelulares. Además, los cultivos de órganos son los modelos más útiles y mejores cuando el agente infeccioso y las alteraciones patológicas que ocurren durante la infección no dependen de las defensas del huésped o de factores séricos, como ocurre en las infecciones en las que el daño es causado por los macrófagos o leucocitos polimorfonucleares del huésped (McGee y Woods, 1987).

El cultivo de bacterias en medios de cultivo bacterianos estandarizados produce cambios en las propiedades de virulencia, inmunogénicas y de susceptibilidad enormemente

diferentes a las obtenidas *in vivo* (Brown y Williams, 1985). Dada la inestabilidad de *R. salmoninarum* en cultivo (Evenden y cols., 1993), con pérdida de la actividad hemolítica y de la hidrofobicidad celular (Bell y cols., 1988; Bruno, 1988; Bandín y cols., 1989), los largos periodos de incubación necesarios para su cultivo y la aparición de forma regular de contaminaciones por microorganismos de crecimiento más rápido, se ha sugerido la necesidad de nuevos sistemas de cultivos celulares *in vitro* que representen mejor las condiciones de crecimiento *in vivo* y los factores producidos por *Renibacterium salmoninarum* (Evenden y cols., 1993).

El primer trabajo *in vitro* con tejidos de peces se debe a Osowski (1914), que mantuvo explantes de embriones y de alevines de trucha en solución de Ringer y en linfa de rana, y las técnicas de cultivo que han permitido el actual desarrollo fueron iniciadas por Wolf y Dumbar (1957), Clem y cols. (1961), Wolf y Quimby (1962) y Fryer y cols. (1965) utilizando principalmente suspensiones celulares obtenidas mediante tratamientos enzimáticos. Posteriormente se han establecido numerosas líneas celulares de peces (Wolf y Quimby, 1969; Wolf y Mann, 1980; Wolf y Ahne, 1982; Hightower y Renfro, 1988; Nicholson, 1988; Fernández y cols., 1993a), partiendo tanto de suspensiones celulares como de explantes.

Actualmente el estudio de los cultivos primarios en peces se centra en el cultivo de leucocitos para analizar respuestas inmunitarias (Reitan y Thuvander, 1991; Bandín y cols., 1993; Carlson y cols., 1993), en el establecimiento de cultivos hematopoyéticos (Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993; Coll, 1994; Moritomo y Watanabe, 1994), en el cultivo de células del epitelio branquial (Pärt y cols., 1993; Avella y cols., 1994) para el análisis de los procesos de intercambio de gases y en la utilización de medios de cultivo específicos (Luft y cols., 1991; DeKoning y Kaattari, 1991, 1992; Mothersill y cols., 1995).

Entre los suplementos del medio de cultivo la utilización de suero de pez como suplemento de los cultivos es un hecho ampliamente discutido, ya que aunque el suero de pez es un suplemento esencial del medio para algunos cultivos (Dickman y Renfro, 1986; Clark y cols., 1989; DeKoning y Kaattari, 1991, 1992; Diago y cols., 1993), el suero fetal bovino se ha utilizado de forma rutinaria como el principal aporte de suero (Nicholson, 1988). Esto se debe en parte a que las técnicas de cultivo en peces se han adaptado partiendo de las de mamíferos con pocas o ninguna modificación (Wolf y Mann, 1980), pero también porque la obtención de suero de peces es cara y tediosa y porque algunos autores han sugerido su

toxicidad o su nulo efecto sobre los cultivos (Clem y cols., 1961; Fryer y cols., 1965; Collodi y Barnes, 1990; Pärt y cols., 1993; Avella y cols., 1994).

A partir de explantes se han establecido cultivos de diversos órganos (Moritomo y cols., 1990; Tung y cols., 1991; Bols y cols., 1994; Diago y cols., 1993; Avella y cols., 1994) pero únicamente han sido empleados como modelos para el estudio de respuestas inmunitarias por Anderson y cols. (1986, 1991) o de infecciones por Stadtländer y Kirchhoff (1989), aun cuando parecen el modelo ideal frente a las suspensiones celulares ya que en ellos se mantienen las interacciones celulares durante cierto tiempo.

Los epitelios del tegumento y de las branquias forman parte de la primera barrera con la que se encuentra un patógeno para penetrar en el pez. Como se ha indicado anteriormente, los cultivos de branquia han sido los más ampliamente desarrollados: se han mantenido *in vitro* filamentos branquiales o fragmentos de la membrana opercular durante cortos periodos de tiempo (McCormick y Bern, 1989; Stadtländer y Kirchhoff, 1989; McCormick, 1990), se han obtenido cultivos a partir de suspensiones celulares (Naito y Ishikawa, 1980; Battram y cols., 1989; Pärt y cols., 1993; Bols y cols., 1994) y de explantes (Avella y cols., 1994) y también se han establecido algunas líneas celulares (Bols y Lee, 1991; Bols y cols., 1994). Por el contrario, las técnicas para el cultivo de tegumento prácticamente no han sido puestas a punto, aun cuando en mamíferos y más concretamente en humanos representan uno de los cultivos celulares más ampliamente desarrollados (Bell y cols., 1981; 1983; Asselineau y cols., 1985; Grinnell y cols., 1987; Lillie y cols., 1988; Regnier y Darmon, 1989; Contard y cols., 1993; Horiguchi y cols., 1994). Aun así, se han establecido líneas celulares de morfología epitelioide a partir de cultivos de aleta y tegumento (Meguro y cols., 1991; Fernández y cols., 1993a; 1993b) y a partir de epitelomas (Jensen, 1963; Fijan y cols., 1983; Fernández y cols., 1993b), pero la naturaleza epitelial de estas células en cultivo no ha sido demostrada. Recientemente, se han establecido cultivos de células epidérmicas de trucha arco iris a partir de explantes de la zona dorsal del tegumento y de las aletas utilizando medios libres de suero diseñados para el cultivo de queratinocitos humanos (Mothersill y cols., 1995).

En el caso de los órganos hematopoyéticos también se han utilizado como modelos los establecidos en mamíferos. Así, para el cultivo de pronefros se han adaptado las técnicas de cultivo de médula ósea de mamíferos (Dexter y Lajtha, 1974; Tavassoli, 1982; Tavassoli y Takahashi, 1982; Whitlock y Witte, 1982; Allen y Dexter, 1984; Spooncer y Dexter, 1984),

existiendo datos acerca de la capacidad inmunológica de secciones de pronefros *in vitro* (Anderson y cols., 1986, 1991), líneas celulares (Watanabe, 1984; Chen y Kou, 1987; Andral y cols., 1990; Tung y cols., 1991; Diago y cols., 1995) y cultivos primarios de estroma (Braun-Nesje y cols., 1981, 1982; Diago, 1990; Diago y cols., 1993; Moritomo y cols., 1993; Siegl y cols., 1993; Moritomo y Watanabe, 1994) que se han establecido para caracterizar las poblaciones celulares y los procesos hematopoyéticos. Igualmente en el caso del bazo, las técnicas de cultivo de explantes (Globerson y Auerbach, 1966) o de suspensiones celulares (Mishell y Dutton, 1967) y sus uso para ensayos de inmunoestimulación en mamíferos, han sido posteriormente adaptadas para peces (Miller y Clem, 1984; Anderson y cols., 1986, 1991), aunque únicamente durante cortos periodos y sin caracterizar las poblaciones celulares presentes en el cultivo. Además, se han establecido líneas celulares (Tung y cols., 1991; Moritomo y cols., 1990), pero sin analizar el explante como modelo *in vitro* funcionalmente comparable al órgano *in vivo*.

PROPÓSITO

El trabajo que ahora presentamos se basa en el uso de técnicas *in vitro*, incluyendo cultivos celulares y tisulares de trucha arco iris, para estudiar el mecanismo patogénico de *Renibacterium salmoninarum*. Para ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1.- Desarrollo y caracterización de cultivos celulares y tisulares a partir de órganos que forman las barreras epiteliales: tegumento y branquia, y de órganos linfoides de la trucha: pronefros y bazo.

2.- Establecimiento de infecciones de dichos cultivos con *Renibacterium salmoninarum*, en los cuales se analizará:

2.1.- La influencia de la virulencia de distintas cepas del patógeno en la progresión de la infección.

2.2.- Las alteraciones histopatológicas *in vitro*.

2.3.- Las poblaciones celulares que constituyen reservorios *in vitro* para el patógeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- ANIMALES

En este estudio se emplearon ejemplares de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, procedentes de una piscifactoría comercial. Todos los peces fueron mantenidos bajo condiciones de fotoperiodo constante (12 h. luz y 12 h. oscuridad) y alimentados con pienso comercial (Tetra Pond; Tetrawerke). El resto de las condiciones de mantenimiento y tamaño de los animales varió según el tipo de experimento a realizar.

Para el establecimiento de los cultivos celulares se emplearon ejemplares adultos, los cuales fueron mantenidos en tanques de 300 l. alimentados con agua corriente desclorada y a una temperatura de $14\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Sin embargo, para el establecimiento de infecciones *in vivo* se utilizaron ejemplares de 10-12 cm, que fueron mantenidos en tanques de 150 l. alimentados con agua corriente a una temperatura de $10\pm 1^{\circ}\text{C}$. El agua de salida de los tanques era desinfectada mediante ozonificación.

Los peces fueron sacrificados por sobredosis de anestesia con una dilución 1:15.000 de MS-222 (Sandoz) en agua y exanguinados mediante punción en el seno caudal para la obtención del suero. La sangre se mantuvo 1 h. a temperatura ambiente y 4 h. a 4°C para permitir la completa retracción del coágulo y posteriormente fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. Los sueros obtenidos se mezclaron y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones para una mejor eliminación de los eritrocitos. Una vez recogido el suero, fue desfibrinado, alicuotado y conservado a -20°C hasta su posterior utilización como suplemento del medio de cultivo.

2.- OBTENCION DE EXPLANTES

En este trabajo hemos establecido cultivos primarios de tegumento, branquia, pronefros y bazo a partir de explantes. En todos los casos, dichos órganos fueron diseccionados en condiciones estériles y mantenidos en placas de Petri con RPMI-1640 (BioWhittaker) a 4°C hasta su procesamiento.

Tegumento. Se obtuvo de la zona situada entre la aleta dorsal y la línea lateral, eliminando con el bisturí los restos de músculo que quedaban en contacto con la dermis. El fragmento de piel fue lavado varias veces en PBS a 4°C y se le aplicaban chorros de PBS a presión con una jeringuilla para eliminar la mayor cantidad posible de mucus. Posteriormente se troceaba en tiras de 1 mm de ancho que eran de nuevo lavadas y agitadas varias veces en RPMI-1640. Finalmente, cada tira se cortó en explantes de 1 mm³.

Branquia. Se seccionó una porción del arco branquial que, como en el caso del tegumento, fue lavada varias veces en PBS a 4°C para conseguir la eliminación de la mayor parte del mucus. A continuación se separaban los filamentos branquiales y cada uno de ellos era lavado de nuevo en RPMI-1640.

Pronefros. El órgano fue troceado en porciones de 1 mm³, las cuales se lavaron varias veces en RPMI-1640 a 4°C para eliminar el mayor número posible de eritrocitos y células libres.

Bazo. Se procesó igual que el pronefros, pero evitando que los explantes contuviesen porciones de la cápsula del órgano.

3.- CONDICIONES DE CULTIVO

3.1.- Establecimiento de cultivos primarios

Los explantes eran escurridos sobre una placa de Petri para eliminar los restos de RPMI-1640. A continuación, se dispusieron en placas de 24 pocillos (Costar) o en portaobjetos cámara de 8 pocillos (Nunc) y se dejaron unos minutos en el pocillo sin medio de cultivo para favorecer su adherencia al plástico. El medio de cultivo completo era añadido gota a gota (1 ml por pocillo de placa y 0,4 ml por pocillo de portaobjetos) y los explantes se mantuvieron en un incubador (Sanyo) a 19°C en atmósfera de aire.

3.2.- Establecimiento de subcultivos

Una vez obtenida una monocapa confluyente las células de los pocillos eran transferidas a frascos de 25 mm² (Costar) con 4 ml de medio de cultivo completo. Para ello, se procedía a la separación de la monocapa utilizando tripsina-EDTA (Boehringer) al 0,05-0,02% respectivamente en PBS.

Cada vez que se obtenía una monocapa confluyente en los frascos de cultivo las células eran subcultivadas de nuevo.

3.3.- Condiciones de cultivo

Para el establecimiento y mantenimiento de los cultivos se utilizaron tres medios de cultivo distintos que denominaremos A, B y C y que describimos en el apartado 4.

El medio completo A se empleó para el establecimiento de cultivos primarios y para el mantenimiento de estos cultivos y de los subcultivos durante las cuatro primeras semanas. El medio completo B se utilizó para el mantenimiento rutinario de los cultivos a partir de las cuatro semanas de cultivo. El medio completo C se empleó para el establecimiento de cultivos primarios y en algunos casos en sustitución del medio completo A una vez transcurrida una semana de cultivo.

Los medios de cultivo fueron renovados semanalmente en los pocillos de las placas y en los frascos y cada tres días en las cámaras de los portaobjetos.

Los cultivos se observaron cada 48 h. en un microscopio invertido (Nikon-Olympus).

4.- MEDIOS DE CULTIVO

4.1.- Medio de cultivo completo A

Se preparó según el protocolo de Diago y cols. (1993) y contenía RPMI-1640 (BioWhittaker) con tampón Hepes 25 mM y L-glutamina 5 mM. Fue suplementado con piruvato sódico (Merck) 2,5 mM, nucleósidos (ACGT) (Sigma) 25 mM, aminoácidos no esenciales (Seromed) al 1%, 2-mercaptoetanol (Merck) 5 mM, 100 µg/ml de gentamicina (Flow), 2 µg/ml de anfotericina (Seromed), 10% de suero fetal bovino (Boehringer) y 10% de suero de trucha.

4.2.- Medio de cultivo completo B

Su composición era la misma que la del medio completo A, aunque la concentración de suero de trucha se redujo al 5%.

4.3.- Medio de cultivo completo C

Su composición era igual que la del medio completo A, en el que se sustituyó el suero de trucha por un 10% de suero de caballo (Gibco) y además se suplementó con hidrocortisona (Sigma) 2×10^{-2} mM.

El pH de todos los medios se ajustó a 7,4 y fueron esterilizados por filtración.

5.- TÉCNICA HISTOLÓGICA RUTINARIA

5.1.- Microscopía óptica

Se recogieron explantes de todos los órganos a diferentes tiempos de cultivo (4, 8, 12, 16, 20, 27 y 34 días), se congelaron por inmersión en isopentano enfriado en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras se seccionaron en un criostato (Leitz) en cortes de 7μ y fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

5.2.- Microscopía electrónica de transmisión

Cultivos primarios. Se recogieron muestras de los cultivos de tegumento, branquia, pronefros y bazo al cabo de 20 días en cultivo. Como fijador se empleó glutaraldehído al 10% en tampón cacodilato 0,2M a pH 7,2. Las muestras fueron fijadas durante 4 h. a 4°C , postfijadas 2 h. en tetróxido de osmio al 1%, incluidas en agar al 2%, deshidratadas en acetona, contrastadas con acetato de uranilo e incluidas en Araldita ACM Durcupan (Fluka).

Subcultivos. Las monocapas de los cultivos de branquia (pase 4) y bazo (pase 10) fueron despegadas con ayuda de un rascador (Costar) y se procesaron utilizando la técnica descrita para los cultivos primarios.

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% y sobre ellos se realizó la selección de las áreas más adecuadas para el estudio ultraestructural. Los cortes ultrafinos fueron recogidos en rejillas de cobre y se

contrastaron con citrato de plomo (Reynolds, 1963) para su observación en un microscopio electrónico JEOL 1010 a 60 kv. Las electronografías se obtuvieron sobre placas de 6x9 cm (Agfa-Gevaert Scientia).

6.- ANÁLISIS CITOQUÍMICO

Para el estudio se utilizaron secciones de los distintos explantes obtenidas como las indicadas en el apartado 5.1 y a los mismos tiempos, monocapas de los cultivos primarios a 12 y 30 días y monocapas de los subcultivos de branquia (pases 4 y 10) y de bazo (pases 4 y 10).

6.1.- Inmunocitoquímica

Se realizó mediante la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta.

ANTICUERPO PRIMARIO	ESPECIFICIDAD	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN
K8.60 (Sigma)	Citoqueratinas 10 y 11	1:20		
K4.62 (Sigma)	Citoqueratina 19	1:20	Anti-ratón IgG (Dako)	1:200
CK5 (Sigma)	Citoqueratina 18	1:25		
KB-37 (Sigma)	*	1:20		
Pan-queratina (Dako)	Queratina	Sin diluir	Anti-conejo IgG	1:200
Anti-S-100 (Sigma)	Proteína S-100	1:6	(Sigma)	
Anti-colágeno I (South. Biot.)	Colágeno tipo I	1:20	Anti-cabra IgG (Dako)	1:200
Anti-colágeno III (South. Biot.)	Colágeno tipo III	1:20		

* Especificidad no determinada. Reacciona con el estrato basal de epitelios estratificados.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la caracterización inmunocitoquímica de cultivos.

Las secciones de los explantes se fijaron en acetona durante 10 min. a temperatura ambiente y las monocapas con paraformaldehído al 1% en PBS durante 10 min. a 4°C. Los anticuerpos utilizados y sus correspondientes diluciones se indican en la tabla 1. La actividad peroxidasa endógena se inhibió incubando las secciones en metanol con 0,6% de peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente. Los controles se realizaron omitiendo el anticuerpo primario respectivo en cada caso. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la actividad peroxidasa se puso de manifiesto añadiendo 3,3' diaminobencidina tetrahidroclorídica (Sigma) a una concentración de 0,5 mg/ml en tampón tris-ClH 0,05M a pH 7,6 y con 0,03% de peróxido de hidrógeno.

6.2.- Citoquímica

Las muestras de los explantes se procesaron sin fijar y las de las células cultivadas fueron fijadas en formol neutro al 10% durante 30 min. a 4°C. Sobre ellas se ensayaron las actividades enzimáticas: fosfatasa ácida (ACPH), fosfatasa alcalina (AKPH) y -naftil acetato esterasa inespecífica (ANAE), como se indica en la tabla 2. Para determinar la especificidad de cada reacción enzimática se realizaron controles simultáneos en los que se suprimió el substrato del medio de incubación.

Para detectar la presencia de lípidos en los subcultivos de branquia (pase 12) y de bazo (pase 4) se emplearon las técnicas del rojo al aceite O y del sudan IV (Pearse, 1972).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	SUBSTRATO	DOSIS (mg/ml)	pH MEDIO DE INCUBACIÓN	REFERENCIA
ACPH	Naftol <i>AS-BI</i> fosfato*	0,5	5	Barka y Anderson, 1962
AKPH	Naftol <i>AS-BI</i> fosfato*	0,1	8	Burstone, 1958
ANAE	-naftil acetato*	0,25	6,5	Pearse, 1972

* (Sigma)

Tabla 2. Actividades enzimáticas ensayadas.

7.- ACTIVIDAD FAGOCÍTICA

El ensayo se realizó por duplicado sobre subcultivos de branquia (pase 4) y de bazo (pase 10) en placas de 24 pocillos mediante la técnica de fagocitosis de partículas de carbón. Para ello se empleó tinta china 523 (Pelikan) diluida 1:10 en PBS, la cual fue lavada 3 veces en PBS mediante centrifugación a 1.200 rpm durante 10 min. a 18°C. Se resuspendió en el volumen original de PBS y se añadió en una proporción 1:300 a 1 ml de medio completo. Una vez añadido el medio de cultivo con carbón las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min. a 18°C para evitar que se despegasen y facilitar la toma de contacto de las partículas de carbón con la superficie celular y se incubaron durante 1 h. a 18°C. Posteriormente las células fueron lavadas con agitación 3 veces con PBS y 3 veces con RPMI-1640.

8.- INFECCIONES EXPERIMENTALES

8.1.- Bacterias

Se utilizaron las cepas de *R. salmoninarum* ATCC 33209 y FT10 (cedida por el Dr. Austin, Universidad Heriot-Watt, Edimburgo). Después de un pase *in vivo* mediante inoculación intraperitoneal en truchas arco iris, según el protocolo indicado en el apartado siguiente, las bacterias fueron reaisladas en SKDM (Austin y cols., 1983) y caracterizadas inmunocitoquímicamente como se indica en el apartado 8.4. Las bacterias fueron subcultivadas en SKDM a 15°C para su posterior utilización.

8.2.- Infecciones *in vivo*

8.2.1.- Inoculación

Se emplearon cien peces, los cuales fueron anestesiados con una dilución 1:5.000 de MS-222 en agua y a ochenta de ellos se les inyectaron intraperitonealmente 100 µl de PBS conteniendo una concentración de *R. salmoninarum* de 10⁸ bacterias/ml de la cepa ATCC 33209 o de 10⁵ bacterias/ml de la cepa FT10, concentraciones que representan la LD₅₀ de las respectivas cepas (comunicación personal del Dr. McIntosh). Como controles se utilizaron veinte peces que fueron inoculados intraperitonealmente con 100 µl de PBS estéril.

8.2.2.- Recogida de muestras

Se recogieron muestras a 15 y 42 días post-inoculación (d.p.i.). Los peces fueron anestesiados con una dilución 1:15.000 de MS-222 en agua y exanguinados mediante punción en el seno caudal. Se procesaron y cultivaron en medio completo A explantes de tegumento, branquia, pronefros y bazo siguiendo el protocolo indicado en los apartados 2 y 3. Los explantes fueron incubados a 15°C en atmósfera de aire y el medio fue renovado semanalmente.

Se recogieron muestras a 1, 2, 3 y 4 semanas de cultivo de explantes y monocapas de cada órgano, por cuadruplicado y de distintos animales en el caso de peces infectados y por duplicado en el caso de los peces control. Tanto los explantes como las monocapas se procesaron para su análisis inmunocitoquímico como se indica en el apartado 8.4.

8.3.- Infecciones *in vitro*

8.3.1.- Cultivos primarios

Siguiendo el protocolo descrito en los apartados 2 y 3 se cultivaron en medio completo A cincuenta explantes de cada órgano (diez para cada fecha de muestreo) obtenidos de distintos ejemplares adultos de trucha arco iris y tras una semana de cultivo se procedió a su infección. Para ello los pocillos fueron lavados con RPMI-1640 mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 min. a 15 °C. Posteriormente se añadieron a cada pocillo 300 µl de RPMI-1640 conteniendo una concentración de *R. salmoninarum* de 10^7 bacterias/ml. Veinte de los explantes de cada órgano se infectaron con la cepa ATCC 33209 y otros veinte con la cepa FT10. Los diez explantes restantes se utilizaron como controles y se les añadió únicamente RPMI-1640. Las placas se volvieron a centrifugar y fueron incubadas durante 1 h. a 15°C. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces con RPMI-1640 mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 min. a 15°C, se les añadió medio de cultivo completo A y se incubaron a 15°C en atmósfera de aire. El medio fue renovado semanalmente y se recogieron muestras de los explantes a 1 y 24 horas post-infección (h.p.i.) y a 1, 2 y 3 semanas post-infección (s.p.i.) y de las monocapas a 3 s.p.i. y se procesaron para su análisis inmunocitoquímico como se indica en el apartado 9.4. Además, se recogieron muestras tanto de los explantes como de las monocapas a las 2 s.p.i., que se procesaron para su estudio a microscopía electrónica según el protocolo indicado en el apartado 5.2.

8.3.2.- Subcultivos

Se utilizaron monocapas confluentes de branquia (pase 9) y de bazo (pase 16). Los cultivos fueron lavados con RPMI-1640, se añadieron 4 ml de medio completo B conteniendo 2×10^7 *R. salmoninarum* FT10/ml y se incubaron durante toda la noche a 15°C en atmósfera de aire. Posteriormente fueron lavados dos veces con RPMI-1640 mediante agitación, se les añadieron 4 ml de medio completo B y fueron mantenidos en las condiciones descritas en el apartado anterior. A partir de una semana en cultivo se recogieron muestras de los sobrenadantes y de las células cada vez que las monocapas se hacían confluentes y eran tripsinizadas, hasta un total de diez veces. Tanto las células, previo lavado en PBS por centrifugación a 1.000 rpm durante 10 min. a 4°C, como los sobrenadantes, fueron inoculados en placas de SKDM y mantenidos a 15°C. Las colonias bacterianas obtenidas fueron

caracterizadas siguiendo el protocolo del apartado siguiente. La presencia de *R. salmoninarum* se analizó inmunocitoquímicamente en las células siguiendo el mismo protocolo.

8.4.- Análisis inmunocitoquímico

La presencia de *R. salmoninarum* y/o de sus productos extracelulares se analizó empleando las técnicas fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina (APAAP) o inmunofluorescencia indirecta (IFAT). Los anticuerpos utilizados se indican en la tabla 3. En el caso del APAAP, las secciones de los explantes y las bacterias reaisladas en SKDM fueron fijadas en acetona durante 10 min. a temperatura ambiente, mientras que las monocapas de los cultivos primarios y de los subcultivos se fijaron en paraformaldehído al 1% en PBS durante 10 min. a 4°C. Para el IFAT, tanto las secciones de los explantes como las células subcultivadas, fueron fijadas en paraformaldehído en las condiciones indicadas previamente.

ANTICUERPO	APAAP	IFAT
PRIMARIO	BW3.6 Ig de ratón anti-p57 (Dr. Austin, Universidad Heriot-Watt)	
Dilución	1:4.000	
PUENTE	Z109 Ig de conejo anti-Ig de ratón (Dako)	
Dilución	1:50	
COMPLEJO INMUNE ANTICUERPO- ENZIMA	D651 Complejo soluble de fosfatasa alcalina y anticuerpos monoclonales de ratón anti-fosfatasa alcalina (Dako)	F232 Ig de conejo anti-Ig de ratón (Dako)
Dilución	1:25	1:200

Tabla 3. Anticuerpos empleados para la inmunodetección de *R. salmoninarum*.

La actividad fosfatasa alcalina se puso de manifiesto añadiendo naftol *AS-BI* fosfato (Sigma) a una concentración 0,2 mg/ml en tampón tris-ClH 0,1M a pH 8,2 y con 0,5% de N,N-dimetilformamida (Merck) como disolvente del sustrato. Como inhibidor de la fosfatasa alcalina endógena se empleó levamisol (Sigma) a una concentración 0,24 mg/ml y como sal de diazonio Fast-Red TR (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml.

Los controles de las técnicas se realizaron omitiendo el anticuerpo primario.

Para la observación de las preparaciones se utilizó un microscopio Nikon Optiphot, en el caso de las de fluorescencia equipándolo con un sistema de epifluorescencia iluminado con una lámpara halógena de 100W y provisto de un filtro B.

RESULTADOS

Los cultivos de todos los órganos estudiados únicamente se consiguieron iniciar utilizando el medio completo A, el cual estaba suplementado con 10% de suero de trucha, no obstante a las cuatro semanas de cultivo, la proporción de suero de trucha en el medio se redujo al 5% (medio completo B) sin que se hayan apreciado efectos negativos sobre su evolución. Por otra parte, en los cultivos iniciados con el medio completo A, tras una semana de cultivo este podía ser sustituido por el medio completo C, que contenía suero de caballo e hidrocortisona, sin que esto afectase aparentemente al crecimiento celular ni a la morfología de los tipos celulares que constituían las monocapas.

Para todos los órganos se establecieron cultivos de forma continuada durante dos años, sin que hayamos observado diferencias en el éxito de los mismos relacionadas con la época del año.

En el caso del tegumento y del pronefros los cultivos se mantenían hasta los 2-3 meses y a partir de este momento tanto los mantenidos en los pocillos como los transferidos a frascos involucionaban. Por el contrario, en el caso de los cultivos de branquia y de bazo se obtuvieron subcultivos, los cuales se siguen manteniendo.

En todos los casos se observó que los cultivos primarios estaban constituidos por dos partes: 1) el explante y 2) la monocapa que se forma a partir de dicho explante, las cuales serán consideradas por separado para su descripción.

1.- TEGUMENTO

1.1.- Microscopía óptica

Explante. Los explantes de tegumento presentaban una evolución continua en la cual no es posible clasificar los cambios por fechas, de ahí que estas no se indiquen. Durante el periodo estudiado los explantes mantenían la regionalización entre epidermis y dermis, aunque en ambas zonas podían apreciarse algunas alteraciones, que se hacían más pronunciadas a medida que avanzaba el tiempo de cultivo. En la epidermis las alteraciones más importantes fueron la pérdida de la mayor parte de las células mucosas (Fig. 1) y no se observaron diferencias en la morfología entre las células de los diferentes estratos, si bien en la capa más externa algunas células conservaban los micropliegues característicos. Estas alteraciones se iban haciendo progresivamente más evidentes e iban acompañadas de una reducción en el número de estratos, a lo largo del tiempo de cultivo. En la dermis se observaba la reducción del estrato laxo y los melanóforos se retraían y a veces se desgranulaban, mientras que el estrato compacto mantenía un aspecto similar al que presenta en el tegumento *in vivo*, con las fibras de colágeno dispuestas en haces compactos entre los que se encontraban los fibroblastos.

Monocapa. A los 3 d. ya se observaban grandes grupos de células epitelioides formando una monocapa incipiente y a la semana de cultivo el pocillo estaba prácticamente tapizado. Las células que mayoritariamente constituían la monocapa eran células epitelioides (Fig. 2) de forma poligonal con uno o varios núcleos en los que podían distinguirse los nucléolos. En el citoplasma de estas células, en algunos casos se presentaban gránulos y/o vesículas dispuestos en la región perinuclear y era frecuente observarlas en mitosis. Dispuestas entre las células epitelioides se identificaban algunas células mucosas de forma redondeada y un pequeño número de células fibroblastoides con largas prolongaciones en sus extremos.

1.2.- Microscopía electrónica

Explante. La epidermis aparecía muy reducida en comparación con la epidermis *in vivo*, estando formada únicamente por dos capas de células, las cuales mostraban un aspecto electroclaro y signos de degeneración (Fig. 3), aun así en algunas de ellas todavía podían distinguirse algunos perfiles de retículo endoplásmico rugoso, numerosos ribosomas libres,

vesículas electroclaras con contenido heterogéneo, gotas lipídicas y haces de filamentos dispuestos paralelamente a la membrana plasmática. Estas células estaban unidas entre sí por interdigitaciones muy desarrolladas (Fig. 4).

En el límite entre la epidermis y la dermis no se observaba una membrana basal ni los característicos repliegues basales y en esa zona se disponían células pigmentarias: melanóforos, iridóforos y xantóforos (Fig. 3). Estas células, junto con algunos fibroblastos, eran los tipos celulares que se observaban en el estrato laxo de la dermis, dispuestos entre pequeños haces de fibras de colágeno y gránulos de melanina dispersos.

Los melanóforos presentaban forma ovoide y contenían uno o dos núcleos que eran heterocromáticos e irregulares con numerosas lobulaciones y que se encontraban desplazados hacia la periferia. Su citoplasma se caracterizaba por presentar gran cantidad de gránulos de melanina (Fig. 5)

Los iridóforos eran células alargadas con un núcleo irregular y heterocromático, su citoplasma presentaba una elevada electrodensidad y contenía grupos de cisternas apiladas dispuestas paralelamente en las que no se observaba el cristaloide, numerosos ribosomas libres, perfiles de retículo endoplásmico rugoso, vesículas de tamaño variable y contenido heterogéneo y gránulos electrodensos (Fig. 6).

Los xantóforos poseían uno o dos núcleos lobulados y heterocromáticos situados en la periferia. Su citoplasma contenía numerosas vesículas con un halo electroclaro y un contenido finamente granular o filamentoso situado en posición central, algunos gránulos electrodensos y pequeñas vesículas electroclaras de contenido homogéneo similares a gotas de grasa (Figs. 7 y 8).

Los fibroblastos del estrato laxo presentaban forma ovalada o fusiforme con pequeños filopodios (Fig. 9). Su núcleo era ovalado con una fina banda de heterocromatina periférica y algunos acúmulos dispersos. El citoplasma se caracterizaba por presentar abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso, un desarrollado y dilatado aparato de Golgi, numerosas mitocondrias, vesículas con contenido muy heterogéneo y vesículas de exo/endocitosis.

El estrato compacto estaba formado por haces de fibras colágenas dispuestos perpendicularmente unos respecto a otros y entre ellos se disponían vasos sanguíneos y fibroblastos (Figs. 10 y 11). Estas células, de forma alargada y núcleo con un patente

nucléolo, presentaban las mismas características ultraestructurales que en el estrato laxo (Fig. 11). Los vasos sanguíneos de la dermis mantenían su integridad y las células endoteliales conservaban las uniones y presentaban numerosas vesículas de endo/exocitosis (Figs. 11 y 12).

Monocapa. Estaba formada fundamentalmente por células epitelioides, pudiendo distinguirse dos tipos en función de su densidad electrónica:

1.- Células epitelioides electroclaras, de forma redondeada y núcleo indentado y eucromático con pequeños acúmulos de cromatina condensada (Fig. 13). Su citoplasma se caracterizaba por la presencia de pequeños haces de filamentos, numerosas vesículas electroclaras de contenido heterogéneo, algunas gotas lipídicas, polirribosomas, algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias y pequeñas vesículas próximas a la membrana.

2.- Células epitelioides electrodensas, más abundantes que las anteriores y de forma redondeada o alargada (Figs. 14 y 15). Su núcleo era moderadamente electrodenso y el citoplasma contenía pequeños haces de filamentos, numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, polirribosomas, mitocondrias, un desarrollado aparato de Golgi, cuerpos residuales y a veces gránulos de melanina. Estas células se encontraban unidas entre sí por desmosomas y las que presentaban una posición más externa en la monocapa mostraban pequeños micropliegues y su citoplasma contenía estructuras membranosas (Fig. 15).

Entre las células epitelioides de la monocapa se observaron algunos monocitos (Fig. 16) y macrófagos (Fig. 17).

1.3.- Análisis citoquímico

1.3.1.- Inmunocitoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 4.

El marcaje para el anticuerpo anti-S-100 era fuertemente positivo tanto para las células epiteliales y los fibroblastos del explante como para las células epitelioides y fibroblastoides de la monocapa.

Las células epiteliales del explante presentaban marcaje positivo para todos los

anticuerpos anti-queratina utilizados (Fig. 18), excepto para el CK-5 y en la monocapa las células epiteloides sólo se teñían con los anticuerpos pan-queratina y K-8.60. Los fibroblastos del explante presentaban una débil tinción para los anticuerpos KB-37 y pan-queratina, que no aparecía en las células fibroblastoides de la monocapa.

Los fibroblastos y las fibras de colágeno de la dermis presentaban un marcaje moderadamente positivo para los anticuerpos anti-colágeno I y III.

EXPLANTE	Pan-K	K-8.60	CK-5	K-4.62	KB-37	S-100	Col. I	Col. III
Células epiteliales	+++	++	-	+	+	+++	-	-
Fibroblastos	+	-	-	-	+	+++	++	++
Melanóforos	-	-	-	-	-	-	-	-
MONOCAPA							n.d.	n.d.
Células epiteloides	+++	++	-	-	-	+++	n.d.	n.d.
Células fibroblastoides	-	-	-	-	-	+++	n.d.	n.d.

Grado de tinción: -: negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fuertemente positivo. n.d.: no determinado.

Tabla 4. Perfil inmunocitoquímico de los cultivos de tegumento.

1.3.2.- Citoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 5.

En las células epiteliales del explante la actividad AKPH evolucionaba desde negativa a los 4 d. de cultivo a moderadamente positiva a los 30 d. (Fig. 19), mientras que durante todo el tiempo de cultivo presentaban actividad ACPH negativa y ANAE débilmente positiva (Fig. 20).

EXPLANTE	ACPH	AKPH	ANAE
Células epiteliales	-	- ++	+
Fibroblastos	-	+ / +++	++
Melanóforos	-	?	?
MONOCAPA			
Células epiteloides	-	-	-
Células fibroblastoides	-	-	-

Grado de tinción: -: negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fuertemente positivo. : evolución durante el cultivo.

Tabla 5. Análisis enzimático de los cultivos de tegumento.

Los fibroblastos de la dermis no presentaban actividad ACPH, eran ANAE moderadamente positivos (Fig. 20) y la actividad AKPH variaba desde débil a fuertemente

positiva independientemente del tiempo de cultivo (Fig. 19).

Las células de la monocapa, tanto las epitelioideas como las fibroblastoides, fueron negativas para todas las actividades enzimáticas.

2.- BRANQUIA

2.1.- Microscopía óptica

Explante. Inicialmente, entre 4 y 8 d. de cultivo en los tejidos del filamento no se observaron cambios apreciables. En las laminillas, por el contrario, se pudo apreciar una desorganización progresiva, con pérdida del epitelio respiratorio y quedando constituidas únicamente por las células pilares que mantenían su disposición y delimitaban los senos sanguíneos, una parte de los cuales estaban obliterados.

Los filamentos branquiales conservaban su estructura hasta los 12-16 d., aunque el epitelio del filamento presentaba algunas discontinuidades. En las laminillas eran más evidentes las modificaciones iniciadas en los primeros días de cultivo.

A partir de los 20 d. se apreciaban alteraciones estructurales en el interior del filamento. El cartílago estaba en proliferación y los condrocitos presentaban en su mayoría un aspecto normal y algunos de ellos se encontraban en mitosis, sin embargo otros mostraban un aspecto degenerado. La banda de tejido conjuntivo adyacente al pericondrio estaba engrosada (Fig. 21). Los fibroblastos presentaban hipertrofia y su citoplasma contenía gran cantidad de restos y vesículas. Junto con los fibroblastos se podían observar otros tipos celulares: células linfoides, macrófagos, melanomacrófagos, células granulares eosinófilas (EGCs) y heterófilos. Todavía resultaban reconocibles los vasos sanguíneos, aunque algunos de ellos se encontraban llenos de restos celulares. En las zonas donde el epitelio del filamento todavía mantenía su continuidad podía observarse alguna célula mucosa y las células epiteliales superficiales mantenían los micropliegues en la superficie apical.

En las laminillas las células pilares presentaban una disposición muy apretada causando la desaparición de los senos sanguíneos y destacaba el capilar del extremo apical que permanecía dilatado; estas células se mantenían recubiertas por la membrana basal engrosada (Fig. 22). Entre las laminillas se disponían gran cantidad de restos y algunas células aisladas.

En la mayoría de los explantes el extremo distal de las laminillas y los espacios interlaminillares estaban rodeados por una capa de epitelio.

Monocapa. Durante la primera semana en cultivo se observaban células epitelioides en proliferación constituyendo una incipiente monocapa (Fig. 23), entre ellas se disponían células fibroblastoides, células mucosas y células redondeadas, algunas de las cuales contenían melanina. Tras una semana en cultivo aumentaba el tamaño del tapiz de células epitelioides, en cuyo citoplasma se apreciaban gránulos y vesículas de tamaño muy variable.

A partir de los 12-16 d. las células epitelioides podían formar islotes y/o una monocapa confluyente. Entre ellas se disponían algunas células fibroblastoides y células redondeadas.

Células subcultivadas. Tras los subcultivos las células crecían formando multicapas constituidas fundamentalmente por células epitelioides (Fig. 24) pudiendo observarse entre ellas algunas células fibroblastoides. Los demás tipos celulares que formaban parte de las monocapas de los cultivos primarios no se encontraron en los subcultivos.

Las células epitelioides presentaban forma ovoide o poliédrica con uno o varios núcleos en posición central, su citoplasma contenía numerosos gránulos de pequeño tamaño y en algunos casos un gran número de vesículas claras dispuestas en la región perinuclear.

Las células fibroblastoides estaban dispersas entre las células epitelioides y se caracterizaban por su morfología fusiforme con cortas ramificaciones en los extremos, el núcleo se situaba en posición central y su citoplasma presentaba pequeños gránulos.

2.2.- Microscopía electrónica

Explante. Los condrocitos eran de forma ovoide, el núcleo contenía pequeños acúmulos de cromatina condensada y su citoplasma presentaba grandes mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, numerosos ribosomas libres, vesículas electroclaras de tamaño variable y contenido heterogéneo, cuerpos residuales electrodensos semejantes a figuras de mielina y numerosos haces de filamentos (Figs. 25 y 26). Las células de la capa condrógena y los fibroblastos del pericondrio presentaban un aspecto activado, con gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi (Figs. 27, 28 y 29).

En el conjuntivo se veían fibroblastos rodeados por haces de fibras de colágeno. El núcleo de estas células presentaba una fina banda de heterocromatina periférica y acúmulos

dispersos y un nucléolo muy desarrollado. Su citoplasma se caracterizaba por la presencia de numerosos cuerpos residuales (Fig. 30). También se observaron macrófagos, melanomacrófagos, blastos y células de aspecto degenerado. El endotelio de los vasos sanguíneos presentaba una morfología alterada y frecuentemente aparecían llenos de restos celulares (Fig. 30).

En la zona más externa del conjuntivo los fibroblastos se disponían formando una lámina y bordeando estas células se observaba gran cantidad de haces de fibras de colágeno junto con una membrana basal, que separaba el tejido conjuntivo del epitelio del filamento (Fig. 31).

Las células del epitelio del filamento presentaban aspecto aplanado y un núcleo eucromático, su citoplasma contenía retículo endoplásmico rugoso, ribosomas, grandes mitocondrias, gotas lipídicas, cuerpos residuales y gran cantidad de filamentos (Figs. 32 y 33). En ocasiones, la superficie apical presentaba pequeños micropliegues (Fig. 32) y vesículas de exocitosis. Estas células se encontraban unidas entre sí por complejos de unión e interdigitaciones (Figs. 32 y 33). Entre el epitelio del filamento y la membrana basal se podían observar células de aspecto linfóide (Fig. 31).

Las laminillas estaban formadas únicamente por células pilares, de aspecto electrodenso, apuestas unas a otras y recubiertas por una desarrollada membrana basal (Figs. 34 y 35). Estas células eran de forma irregular, con un núcleo ovoide con acúmulos de heterocromatina y su citoplasma contenía gran número de vesículas de tamaño y contenido heterogéneo, abundantes ribosomas, aparato de Golgi muy desarrollado, mitocondrias y filamentos (Fig. 35). En ocasiones entre las células pilares todavía eran reconocibles restos de senos sanguíneos (Fig. 36). Los vasos del extremo apical de las laminillas permanecían dilatados, aunque el endotelio estaba alterado y en el interior del vaso se observaban restos membranosos (Fig. 36).

En algunos casos, los extremos de las laminillas estaban rodeados por una capa de células de aspecto epitelial (Figs. 36 y 37). En esta capa, algunas células presentaban un núcleo muy lobulado y se asemejaban a las células del cloro por la gran cantidad de mitocondrias y el desarrollado sistema de canales que poseían (Figs. 37 y 38).

Monocapa. Las células que proliferaban en el pocillo lo hacían en pequeños grupos de

células libres (Fig. 39) o como una monocapa continua (Fig. 40). Los primeros estaban formados por células de aspecto heterogéneo entre las que se diferenciaban células fibroblastoides, epitelioides, linfoides y macrófagos (Fig. 39), junto con numerosos restos celulares.

La monocapa estaba formada por células epitelioides cuyo núcleo presentaba pequeños acúmulos dispersos de cromatina condensada y en su citoplasma contenían ribosomas, abundante retículo endoplásmico rugoso, un prominente aparato de Golgi, mitocondrias, vesículas de contenido heterogéneo y filamentos dispuestos en pequeños haces (Figs. 40 y 41). La superficie externa de las células que constituían el borde de crecimiento de la monocapa o de las que delimitaban espacios libres en ella estaba recubierta por una capa continua de material extracelular amorfo (Fig. 40).

Células subcultivadas. Las monocapas de las células subcultivadas estaban constituidas por células epitelioides (Fig. 42). Estas células se caracterizaban por presentar un núcleo eucromático y su citoplasma contenía algunos perfiles de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, vesículas de tamaño muy variable y contenido heterogéneo, numerosos gránulos electrodensos y haces de filamentos muy desarrollados (Figs. 42 y 43) y se encontraban unidas entre sí por numerosos desmosomas (Fig. 43).

En algunas zonas se formaban multicapas, en las cuales algunas de las células del interior presentaban elevada electrodensidad y signos claros de degeneración.

2.3.- Análisis citoquímico

2.3.1.- Inmunocitoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 6.

El marcaje para el anticuerpo anti-S-100 era negativo o débilmente positivo para todos los tipos celulares tanto en el explante como en la monocapa, haciéndose moderado o fuertemente positivo en las células subcultivadas (Fig. 44).

El anticuerpo pan-queratina presentaba un marcaje fuertemente positivo en el epitelio del filamento, moderadamente positivo en las células endoteliales y pilares y muy débilmente positivo en el cartílago y el tejido conjuntivo. En la monocapa de los cultivos primarios únicamente las células epitelioides presentaban un marcaje fuertemente positivo. En los

subcultivos este marcaje se mantenía en las células epitelioides y era moderadamente positivo en las fibroblastoides.

EXPLANTE	Pan-K	K-8.60	CK-5	K-4.62	KB-37	S-100	Col. I	Col. III
Cartílago	±	-	-	-	-	-	+	++
Fibroblastos	±	-	-	-	±	-	±	±
Células endoteliales	++	-	-	-	-	-	-	-
C. epiteliales filamento	+++	+	-	+	±	-	-	-
Células pilares	++	-	-	-	-	-	-	-
MONOCAPA							n.d.	n.d.
Células epitelioides	+++	++	-	+	++	+	n.d.	n.d.
Células fibroblastoides	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Células redondeadas	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
SUBCULTIVOS							n.d.	n.d.
Células epitelioides	++/+++	+++	-	++/+++	+++	++/+++	n.d.	n.d.
	+			+		+		
Células fibroblastoides	++	+++	-	++/+++	+++	++/+++	n.d.	n.d.
				+		+		

Grado de tinción: -: negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++ fuertemente positivo. n.d.: no determinado.

Tabla 6. Perfil inmunocitoquímico de los cultivos de branquia.

Con respecto a los demás anticuerpos anti-queratinas, el epitelio del filamento era marcado débilmente por los anticuerpos K-8.60 y K-4.62 y muy débilmente por el anticuerpo KB-37, que a su vez también marcaba muy débilmente los fibroblastos y las fibras del tejido conjuntivo del filamento. En las monocapas de los cultivos primarios las células epitelioides presentaban un marcaje moderadamente positivo para los anticuerpos K-8.60 y KB-37, y débilmente positivo para el K-4.62. En los subcultivos todos los tipos celulares presentaban marcaje fuertemente positivo con los anticuerpos K-8.60 y KB-37 (Fig. 45) y de moderada a fuertemente positivo para el K-4.62.

Los anticuerpos anti-colágeno I y III presentaban un patrón de marcaje moderadamente positivo en el cartílago y muy débilmente positivo en el conjuntivo del filamento.

2.3.2.- Citoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 7.

Explante. A los 4 d. prácticamente todas las células eran negativas para la actividad ACPH, la cual aumentaba progresivamente en los fibroblastos, condrocitos y células pilares a lo largo del tiempo de cultivo.

La actividad AKPH a los 4 d. era muy elevada en los endotelios y los fibroblastos

presentaban una actividad variable durante todo el tiempo de cultivo. En el caso de los condrocitos esta actividad, negativa en un principio, aumentaba a lo largo del tiempo de cultivo (Fig. 46).

EXPLANTE	ACPH	AKPH	ANAE
Condrocitos	- +	- ++	++ +++
Fibroblastos	- +	+ / ++	++ +++
Células endoteliales	- ?	+++ ?	± +
Células epiteliales del filamento	-	-	±
Células mucosas	-	-	-
Células pilares	± +++	++	++
MONOCAPA			
Células epitelioides	- - / +++	-	-
Células fibroblastoides	- ±	-	-
Células mucosas	-	-	-
Células redondeadas	+	-	++
SUBCULTIVOS			
Células epitelioides	-	-	±
Células fibroblastoides	-	-	-

Grado de tinción: -: negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fuertemente positivo. : evolución durante el cultivo.

Tabla 7. Análisis enzimático de los cultivos de branquia.

En los primeros días de cultivo la actividad ANAE era moderadamente positiva en los fibroblastos, los condrocitos y las células pilares de las laminillas y se observaba una actividad muy débil en los endotelios. Tanto en las células endoteliales como en los fibroblastos y los condrocitos esta actividad aumentaba a lo largo del tiempo de cultivo.

Monocapa. A los 12 d. la actividad ACPH era negativa en todos los tipos celulares excepto en las células redondeadas, que presentaban una actividad débil. En el caso de algunas células epitelioides y de las células fibroblastoides esta actividad aumentaba a lo largo del tiempo de cultivo, aumento que era mucho más evidente en las primeras.

En cuanto a las actividades AKPH y ANAE, durante todo el tiempo de cultivo fueron negativas en todos los tipos celulares, excepto en el caso de las células redondeadas, que presentaban una actividad ANAE moderadamente positiva.

Células subcultivadas. Todas estas células perdieron las actividades enzimáticas ensayadas, con la excepción de las células epitelioides que presentaban una leve actividad ANAE.

Mediante la técnicas del rojo al aceite O y del sudan IV se demostró la presencia de pequeñas gotas lipídicas en las células subcultivadas, tanto fibroblastoides como epitelioides (Fig. 47).

2.4.- Fagocitosis

No se observó actividad fagocítica en las células subcultivadas de branquia.

3.- PRONEFROS

3.1.- Microscopía óptica

Explante. Tras 4 d. en cultivo la zona interna del explante aún mantenía parcialmente las características histológicas del pronefros, aunque los sinusoides comenzaban a dilatarse, los endotelios se desorganizaban y se observaban células de aspecto linfoide con núcleos picnóticos. En la periferia del explante comenzaba a diferenciarse un borde de crecimiento formado por células epitelioideas, macrófagos y melanomacrófagos.

Entre 8-12 d. era evidente la necrosis de la zona interna del explante, pudiendo observarse gran cantidad de células degeneradas entre células reticulares; la mayor parte de los melanomacrófagos estaban desgranulados y la melanina se dispersaba ocupando grandes zonas. Los vasos sanguíneos, en especial los sinusoides, aparecían desorganizados pudiendo apreciarse núcleos picnóticos en algunas células limitantes sinusoidales. La zona interna estaba rodeada por un entramado laxo de células reticulares, células linfoides, blastos, núcleos picnóticos y sinusoides conteniendo eritrocitos y trombocitos. Alrededor de todo el explante se observaba el borde de crecimiento, que aunque había aumentado de grosor estaba formado por los mismos tipos celulares que a 4 d.

A partir de los 20 d. de cultivo (Fig. 48) la necrosis de la zona interna del explante era mayor, observándose numerosos núcleos picnóticos, melanomacrófagos y algún blasto dispuestos entre un entramado de células reticulares, algunas de las cuales acumulaban grasa. Esta zona estaba rodeada por células reticulares y algunas fibras de colágeno, entre las cuales además de los tipos celulares descritos a los 12 d. se disponían granulocitos, monocitos y macrófagos. El borde de crecimiento era mayor y además de las células indicadas anteriormente presentaba células fibroblastoides y algunas células linfoides y monocitos.

Monocapa. Durante los primeros 12 d. en cultivo el fondo del pocillo se tapizaba con células epitelioideas que contenían vesículas y/o gránulos dispuestos en la periferia de su citoplasma, algunas células fibroblastoides que también contenían vesículas y/o gránulos,

células redondeadas y melanomacrófagos (Fig. 49). A partir de este momento el aspecto del cultivo era el mismo, aunque se apreciaba un aumento en el número de células epitelioides y se identificaron células gigantes multinucleadas. A partir de 20 d. las monocapas estaban formadas por células epitelioides y algunas células fibroblastoides, que podían contener gran cantidad de vesículas claras y/o gránulos, células gigantes multinucleadas y células redondeadas, algunas de las cuales contenían melanina.

3.2.- Microscopía electrónica

Explante. La zona interna aparecía necrótica y presentaba un entramado de células reticulares, entre las cuales se disponía una gran cantidad de restos celulares y fibras colágenas (Fig. 50). El núcleo de las células reticulares presentaba una fina capa de heterocromatina periférica y en su citoplasma destacaba la presencia de grandes cuerpos residuales y abundante retículo endoplásmico rugoso (Fig. 51). Además contenían gotas lipídicas y vesículas electroclaras con contenido heterogéneo (Fig. 50). Dispersos en esta zona se observaban melanomacrófagos con gotas lipídicas, melanina y cuerpos residuales en su citoplasma y células degeneradas (Fig. 52).

La zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento estaba formada por un entramado de células reticulares entre las que se podían observar algunos sinusoides. Las células reticulares tenían electrodensidad y forma variable y en el límite con la zona interna se disponían paralelamente y de forma más compacta (Fig. 53). Su núcleo presentaba escasa heterocromatina condensada y a veces un patente nucléolo y su citoplasma se caracterizaba por contener gran cantidad de cuerpos electrodensos y membranosos, abundante retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres, aparato de Golgi a veces muy prominente, vesículas electroclaras o con contenido heterogéneo, gotas lipídicas y haces de filamentos (Figs. 54 y 55). Las células reticulares se encontraban unidas por desmosomas (Fig. 56) y entre ellas había gran cantidad de fibras colágenas (Fig. 55), células inmaduras y en mitosis (Fig. 56) y también células degeneradas y restos celulares.

Entre las células reticulares se observaban espacios libres delimitados por prolongaciones citoplasmáticas de varias células, que se interdigitaban (Fig. 57) o por células llenas de vesículas, sinusoides (Fig. 58) y diversos tipos celulares: células granulares eosinófilas, linfocitos (Fig. 58), blastos (Fig. 59), melanomacrófagos (Fig. 59) y macrófagos.

Los sinusoides contenían eritrocitos y trombocitos y las células limitantes sinusoidales presentaban el citoplasma con aspecto degenerado, aunque mantenían uniones estrechas entre sí (Fig. 58).

Monocapa. El borde de crecimiento y la monocapa de los cultivos primarios estaban constituidos en su mayor parte por células ultraestructuralmente similares a las células reticulares del explante, y según lo compacta que fuese la monocapa adoptaban una morfología epitelioides o fibroblastoide (Figs. 60 y 61). El núcleo, de forma muy variable, ocupaba generalmente una posición central y contenía pequeños acúmulos de cromatina condensada y a veces uno o más nucléolos (Fig. 61). En su citoplasma destacaba la presencia de cuerpos residuales electrodensos, vesículas electroclaras de contenido heterogéneo pero generalmente membranoso llegando a asemejarse a figuras de mielina y grandes haces de filamentos (Figs. 61 y 62). Además contenían gran cantidad de perfiles de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, aparato de Golgi en ocasiones dilatado y a veces alguna gota lipídica (Figs. 60, 61 y 62). Algunas de estas células eran inmaduras o estaban en mitosis (Fig. 63). Entre estas células podían observarse fibras de colágeno (Fig. 62).

En la monocapa se localizaban melanomacrófagos (Fig. 64) y células gigantes multinucleadas (Fig. 65). El citoplasma de las células gigantes multinucleadas presentaba grandes vesículas de contenido granular, figuras de mielina, cuerpos residuales, perfiles de retículo endoplásmico rugoso, retículo endoplásmico liso muy desarrollado y numerosos ribosomas.

3.3.- Análisis citoquímico

3.3.1.- Inmunocitoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 8.

EXPLANTE	Pan-K	K-8.60	CK-5	K-4.62	KB-37	S-100	Col. I	Col. III
Células reticulares	++	+	++	++	-	+++	+	++
Melanomacrófagos	-	-	-	-	-	-	-	-
MONOCAPA							n.d.	n.d.
Células epitelioides	+++	+	++	+	+	+++	n.d.	n.d.
Células fibroblastoides	+++	+	++	+	+	+++	n.d.	n.d.
Células redondeadas	-	-	-	-	-	?	n.d.	n.d.

Grado de tinción: -: negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fuertemente positivo. n.d.: no determinado.

Tabla 8. Perfil inmunocitoquímico de los cultivos de pronefros.

Las células reticulares del explante, fundamentalmente las de la zona de transición, presentaban un marcaje fuertemente positivo para el anticuerpo anti-S-100 y moderadamente positivo para los anticuerpos anti-queratina (Fig. 66), excepto para el KB-37.

En el caso de la monocapa, tanto las células epitelioides como las fibroblastoides eran fuertemente positivas para el anticuerpo anti-S-100 y de débil a fuertemente positivas para todos los anticuerpos anti-queratina empleados.

3.3.2.- Citoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 9.

En el explante las células reticulares presentaban una actividad ACPH negativa o muy débilmente positiva (Fig. 67), mientras que la actividad AKPH era moderadamente positiva (Fig. 68) y el patrón de actividad ANAE era variable desde negativo a fuertemente positivo en todas las fechas estudiadas (Fig. 69). Los melanomacrófagos presentaban moderada actividad ACPH, mientras que su actividad ANAE era fuertemente positiva.

EXPLANTE	ACPH	AKPH	ANAE
Células reticulares	±	++	- / +++
Melanomacrófagos	++	-	+++
MONOCAPA			
Células epitelioides	- / ++	-	- / ++
Células fibroblastoides	- / +	-	- / ++
Células redondeadas	++	-	++
Células gigantes multinucleadas	+ / ++	-	+ / ++

Grado de tinción: -: negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fuertemente positivo.

Tabla 9. Análisis enzimático de los cultivos de pronefros.

En la monocapa el tapiz de células epitelioides y fibroblastoides presentaba un patrón citoenzimático AKPH negativo y ACPH y ANAE variable desde negativo a moderadamente positivo (Fig. 70). Las células redondeadas mostraban moderadas actividades ACPH y ANAE y las células gigantes multinucleadas eran AKPH negativas y presentaban unas actividades ACPH y ANAE variables entre débil y moderadamente positivas.

4.- BAZO

4.1.- Microscopía óptica

Explante. A los 4 d. en cultivo la parte interna de los explantes mantenía sus características histológicas generales observándose trabéculas y entre ellas zonas de tejido hematopoyético. El estroma de estas regiones estaba formado por células reticulares y entre ellas se diferenciaban sinusoides dilatados, grupos de células sanguíneas y melanomacrófagos. En la periferia del explante se observaba un reborde de células epitelioides.

A partir de 8 d. de cultivo en la zona interna del explante se apreciaba una disminución en el número de células y la aparición de zonas necrosadas en las que se diferenciaban sinusoides con el endotelio desorganizado, células reticulares que a veces contenían gotas lipídicas y melanomacrófagos junto con una gran cantidad de núcleos picnóticos. Rodeando al explante se disponía un borde de crecimiento formado por células epitelioides, monocito/macrófagos y melanomacrófagos.

Transcurridos 20 d. de cultivo el centro del explante presentaba un avanzado estado de necrosis, si bien se podían observar algunas células reticulares que acumulaban grasa y un pequeño número de melanomacrófagos. Entre esta zona y el borde de crecimiento se disponía una franja de tejido que mantenía relativamente la organización esplénica estando formada por un entramado laxo de células reticulares, matriz extracelular y sinusoides conteniendo eritrocitos (Fig. 71). El borde de crecimiento estaba formado por células epitelioides, células fibroblastoides, macrófagos y melanomacrófagos.

Monocapa. Durante la primera semana en cultivo comenzaban a aparecer células epitelioides, fibroblastoides y algunos melanomacrófagos (Fig. 72) y el número de células aumentaba a partir de los 12 d. para constituir una monocapa. Las células epitelioides presentaban forma esférica o poligonal, con el núcleo en posición central rodeado por vesículas claras y/o gránulos. Las células fibroblastoides presentaban forma fusiforme, con el núcleo en posición central y a veces contenían gránulos. Entre los tipos celulares anteriores aparecían células gigantes multinucleadas aisladas y células redondeadas que a veces contenían melanina.

En los cultivos a largo plazo (2-3 meses), tanto en los suplementados con medio B

como con medio C, la monocapa estaba formada por un entramado de células fibroblastoides y epitelioides. En la monocapa se apreciaba la existencia de colonias hematopoyéticas, melanomacrófagos, células de aspecto monocítico o linfoide y eritrocitos maduros (Fig. 73).

Células subcultivadas. La monocapa de los subcultivos de células de bazo estaba formada por un entramado de células fibroblastoides y epitelioides (Fig. 74). Ambos tipos celulares presentaban un núcleo en posición central y contenían en su citoplasma gránulos y/o vesículas claras.

4.2.- Microscopía electrónica

Explante. La zona interna del explante estaba necrosada, aun así entre gran cantidad de restos celulares se observaba un entramado de células reticulares y otros tipos celulares. Las células reticulares presentaban un núcleo indentado en el que a veces se diferenciaba un nucléolo prominente (Fig. 75), su citoplasma contenía gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso, un desarrollado aparato de Golgi (Fig. 76), vesículas heterogéneas tanto en su contenido como en su tamaño, gránulos de melanina, restos celulares y gotas lipídicas que a veces podían ocupar la casi totalidad de la célula (Fig. 77). Los melanomacrófagos, además de los melanosomas, contenían fagosomas, gotas lipídicas, cuerpos membranosos y multivesiculares. Además se observaron algunas EGCs (Fig. 78) de núcleo heterocromático y cuyo citoplasma presentaba un aspecto degenerado en el que solo se distinguía alguna mitocondria, gotas lipídicas y grandes gránulos electrodensos rodeados por un halo claro, algunos de los cuales se encontraban en proceso de desintegración.

La zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento estaba formada por un entramado de células reticulares que presentaban un núcleo indentado con un halo de heterocromatina periférica y algunos acúmulos dispersos (Fig. 79). En algunas de estas células se observaba un nucléolo prominente. Su citoplasma contenía un aparato de Golgi muy desarrollado, abundante retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, ribosomas libres, cuerpos multivesiculares y membranosos, cuerpos residuales y haces de filamentos, que en algunos casos estaban muy desarrollados (Fig. 80). Estas células presentaban estrechas aposiciones y estaban unidas entre sí por desmosomas y uniones gap (Fig. 79). Entre estas células se disponía gran cantidad de matriz extracelular en la que se distinguían algunos haces de fibras de colágeno (Figs. 79, 80 y 81).

En los espacios libres del entramado reticular aparecían acúmulos de melanomacrófagos (Fig. 81), linfocitos (Fig. 82), EGCs inmaduras y maduras que parecían estar desgranulándose (Figs. 83 y 84), monocitos y macrófagos (Fig. 85). Los sinusoides en esta zona conservaban parte del endotelio y contenían eritrocitos y trombocitos (Figs. 86 y 87).

Monocapa. El borde de crecimiento y la monocapa de los cultivos primarios estaban constituidos principalmente por una población de células epitelioides que podían disponerse formando un entramado laxo (Fig. 88) o una multicapa compacta (Fig. 89). Estas células presentaban forma ovoide o poligonal con cortas ramificaciones, según lo densa que fuera la monocapa. El núcleo era de forma irregular y el citoplasma contenía gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, ribosomas libres, aparato de Golgi y pequeñas vesículas electroclaras, gotas lipídicas y grandes haces de filamentos (Figs. 88, 89 y 90). Estas células se encontraban unidas entre sí por desmosomas (Fig. 91) y uniones gap (Fig. 92).

En los espacios libres entre el entramado de células podían distinguirse algunas fibrillas y macrófagos y melanomacrófagos que contenían gran cantidad de fagosomas y de gotas lipídicas (Fig. 93).

Células subcultivadas. Estas células se caracterizaban por presentar núcleo irregular y eucromático, a veces con un nucléolo, y su citoplasma presentaba abundante retículo endoplásmico rugoso a veces muy dilatado, algunas vesículas electroclaras, numerosos cuerpos residuales y haces de filamentos (Figs. 94 y 95). Estas células se encontraban unidas entre sí por desmosomas (Fig. 95).

4.3.- Análisis citoquímico

4.3.1.- Inmunocitoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 10.

En el explante no se localizó marcaje para el anticuerpo anti-S-100 mientras que en la monocapa de los cultivos primarios y de los subcultivos, tanto las células epitelioides como las fibroblastoides presentaban un grado de tinción moderadamente positivo.

Sin embargo en la monocapa, tanto las células epitelioides como las fibroblastoides eran positivas para el anticuerpo pan-queratina y además, las primeras eran también débilmente positivas para los anticuerpo KB-37 y K-8.60. En los subcultivos todas las células eran

moderada o fuertemente positivas para los anticuerpos anti-queratina anteriores (Fig. 96) y aparecía en todas ellas marcaje positivo para los anticuerpos CK-5 y K-4.62, más fuerte en el caso de este último.

El marcaje con los anticuerpos anti-colágeno fue siempre negativo.

EXPLANTE	Pan-K	K-8.60	CK-5	K-4.62	KB-37	S-100	Col. I	Col. III
Células reticulares	-	-	-	-	-	-	-	-
Melanomacrófagos	-	-	-	-	-	-	-	-
MONOCAPA							n.d.	n.d.
Células epitelioides	++	±	-	-	±	++	n.d.	n.d.
Células fibroblastoides	+	-	-	-	-	++	n.d.	n.d.
Células redondeadas	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
SUBCULTIVOS							n.d.	n.d.
Células epitelioides	++/+++	+++	+	++/+++	+++	++	n.d.	n.d.
Células fibroblastoides	++/+++	+++	+	++/+++	+++	++	n.d.	n.d.

Grado de tinción: -: negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fuertemente positivo. n.d.: no determinado.

Tabla 10. Perfil inmunocitoquímico de los cultivos de bazo.

4.3.2.- Citoquímica

Los resultados se muestran resumidos en la tabla 11.

Explante. Las células reticulares eran positivas para las tres actividades enzimáticas ensayadas (Figs. 97, 98 y 99), mientras que los melanomacrófagos presentaban las actividades ACPH y ANAE positivas y la AKPH negativa.

Monocapa. Todas las células eran negativas para las actividades ACPH y AKPH y positivas para la actividad ANAE (Fig. 100). Aun así, esta última actividad enzimática presentaba variaciones a lo largo del tiempo de cultivo, disminuyendo tanto en las células epitelioides como en las fibroblastoides. Las células gigantes multinucleadas y las células redondeadas presentaban un patrón de tinción ANAE fuertemente positivo durante todo el tiempo de cultivo.

Células subcultivadas. Estas células eran negativas para la ACPH y la AKPH y únicamente presentaban, en algunos casos, una moderada actividad ANAE (Fig. 101).

EXPLANTE	ACPH	AKPH	ANAE
Células de aspecto reticular	+	+++	++
Melanomacrófagos	++	-	+++
MONOCAPA			
Células epitelioides	-	-	+++ ++
Células fibroblastoides	-	-	+ / ++ +
Células redondeadas	-	-	+++
Células gigantes multinucleadas	-	-	+++
SUBCULTIVOS			
Células epitelioides	-	-	- / ++
Células fibroblastoides	-	-	- / ++

Grado de tinción: -; negativo; ±: negativo o muy débilmente positivo; +: débilmente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fuertemente positivo. : evolución durante el cultivo.

Tabla 11. Análisis enzimático de los cultivos de bazo

En el caso de las células subcultivadas aplicamos también las técnicas del sudán IV y del rojo al aceite O que demostraron la presencia de gotas lipídicas en algunas de las células epitelioides de los subcultivos.

4.4.- Fagocitosis

El ensayo para demostrar la capacidad de fagocitosis se realizó únicamente sobre los subcultivos, observándose que un pequeño número de células presentaban actividad fagocítica (Fig. 102).

5.- CULTIVOS INFECTADOS

5.1.- Infecciones *in vitro*

En el caso de las infecciones *in vitro* consideramos importante resaltar que los resultados obtenidos en cada uno de los órganos estudiados fueron siempre homogéneos, ya que no se observaron diferencias ni en la intensidad ni en el patrón de distribución de marcaje entre los distintos cultivos del mismo órgano dentro de cada fecha de recogida de muestras (1 h., 24 h. y 1 a 3 s.p.i.).

5.1.1.- *Renibacterium salmoninarum* cepa ATCC 33209

Tegumento. En los cultivos de este órgano no se localizó marcaje en ninguna de las fechas analizadas ni en los explantes ni en las monocapas.

Branquia. A 1 h.p.i. el marcaje era escaso y granular y se localizaba en el epitelio del

filamento, tanto en algunas células epiteliales como en otras células, probablemente macrófagos (Fig. 103). A partir de las 24 h.p.i. y en todas las fechas posteriores el marcaje era difuso y se encontraba en las porciones que quedaban del epitelio del filamento. Las monocapas de estos cultivos no presentaban marcaje en ninguna de las fechas analizadas.

Pronefros. Durante todo el estudio el marcaje era granular y se localizaba únicamente en algunas células del explante tanto de la zona interna como del borde de crecimiento (Fig. 104).

Bazo. En todas las fechas estudiadas los cultivos de este órgano presentaban marcaje difuso en la zona interna y en el borde de crecimiento del explante y abundante marcaje granular en las células epitelioideas de la monocapa (Fig. 105).

Estos resultados se muestran en la tabla 12.

5.1.2.- *Renibacterium salmoninarum* cepa FT10

Los resultados de las inmunodetecciones se muestran en la tabla 13.

Tegumento. A 2 y 3 s.p.i. se observó marcaje granular y difuso en los melanóforos del estrato laxo y en el estrato compacto de la dermis (Fig. 106) y además en algunas células de la epidermis (Fig. 107).

En los cortes semifinos la única diferencia observada con respecto a los cultivos no infectados fue que las células del estrato laxo de las dermis presentaban gran cantidad de gránulos basófilos (Fig. 108).

Microscopía electrónica. Los fibroblastos presentaban un núcleo electroclaro y gran número de gránulos electrodensos en su citoplasma (Fig. 109). Además, era frecuente la presencia en ellos de estructuras multilamelares que contenían bacterias (Fig. 110).

Branquia. Durante todo el estudio se observó un marcaje débil pero abundante, tanto granular como difuso en el conjuntivo del filamento, en las células pilares de las laminillas y en algunas células libres próximas al explante (Fig. 111).

En los cortes semifinos del explante la mayoría de los condrocitos presentaban aspecto degenerado y numerosos gránulos en su citoplasma. El tejido conjuntivo del filamento mostraba una gran desorganización (Fig. 112) y un notable incremento en la cantidad de EGCs (Fig. 113) En las laminillas las células pilares contenían gran cantidad de gránulos basófilos.

Microscopía electrónica. En el cartilago del filamento branquial los condrocitos aparecían más electroclaros que en los cultivos sin infectar y el núcleo presentaba un patrón de cromatina alterado. Su citoplasma presentaba claros signos de degeneración y contenía numerosos cuerpos electrodensos (Fig. 114).

El pericondrio estaba reducido y no presentaba la activación observada en los controles (Fig. 115) y en el conjuntivo del filamento los fibroblastos presentaban un núcleo eucromático y su citoplasma contenía numerosos cuerpos residuales electrodensos (Fig. 116). Además, en el citoplasma de estas células se observó la presencia de bacterias rodeadas por estructuras multilamelares (Fig. 117). Entre los fibroblastos se localizaban gran cantidad de EGCs en distintos estadios de maduración (Fig. 118).

Las EGCs de aspecto inmaduro se caracterizaban por presentar forma ovoide o redondeada, escaso citoplasma y algunos gránulos con distintos grados de electrodensidad, en algunos de los cuales se apreciaba material granular rodeándolos (Figs. 118 y 119) Su citoplasma contenía numerosos ribosomas, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y vesículas de contenido finamente granular.

En estadios más avanzados de maduración las EGCs aumentaban de tamaño, su citoplasma era mayor y el núcleo estaba desplazado (Fig. 120). El citoplasma se caracterizaba por el gran desarrollo del aparato de Golgi, que aparecía situado en la región perinuclear y rodeado por gran cantidad de vesículas, algunas de las cuales eran de pequeño tamaño y contenían un núcleo electrodenso (Fig. 121). El resto de gránulos eran de mayor tamaño y presentaban una electrodensidad variable (Figs. 120 y 121).

Las EGCs maduras presentaban una estructura similar a la que acabamos de describir aunque en este caso se caracterizaban por presentar los gránulos con electrodensidad homogénea (Fig. 122). Además, en algunos casos aparecían los gránulos en proceso de desintegración (Figs. 122 y 123). Las EGCs se encontraban próximas a fibroblastos, con los que presentaban estrechas aposiciones (Fig. 120).

En las laminillas destacaba la presencia de grandes cuerpos residuales en las células pilares (Fig. 124), que a veces aparecían degeneradas (Fig. 125). Además, la membrana basal que las rodeaba presentaba un aspecto heterogéneo con numerosos gránulos electrodensos de pequeño tamaño (Fig. 125).

Las células de la monocapa se diferenciaban de las de los cultivos no infectados por contener en su citoplasma gran cantidad de vesículas heterogéneas y de cuerpos residuales (Fig. 126).

En los restos celulares que quedaban entre las laminillas a veces se observaban bacterias rodeadas de membranas (Fig. 127).

Pronefros. En el explante y durante todo el tiempo de estudio se observó gran cantidad de marcaje granular localizado únicamente en las células que formaban el borde de crecimiento (Fig. 128). Tras la infección las células de la monocapa se despegaron y esta degeneró.

El estudio de cortes semifinos del explante demostró que la zona interna se encontraba totalmente degenerada, mientras que en la periferia se mantenían algunos sinusoides y un entramado de células reticulares entre las cuales se disponían melanomacrófagos, blastos y eritrocitos (Fig. 129). El borde de crecimiento estaba formado por células epitelioides, células fibroblastoides y algunos macrófagos/melanomacrófagos y en ellas se observaba la presencia de numerosas bacterias (Fig. 130).

Microscopía electrónica. La zona interna del explante estaba ocupada fundamentalmente por restos de células degeneradas entre los que aún se mantenían algunas células reticulares (Fig. 131). Entre los restos celulares se observaba alguna bacteria (Fig. 132).

En la zona de transición se observó la presencia de bacterias en las células reticulares y de eritrocitos entre la matriz extracelular (Fig. 133).

En el borde de crecimiento tanto las células epitelioides como las fibroblastoides contenían gran cantidad de bacterias dentro de cuerpos residuales o en vesículas (Fig. 134). Algunas de estas bacterias se encontraban en proceso de división (Fig. 135).

Bazo. A 1 y 24 h.p.i. se observó marcaje granular localizado en macrófagos/melanomacrófagos del borde de crecimiento. A 1 s.p.i. se observó marcaje difuso y débil extendido por todo el explante y marcaje granular abundante principalmente localizado en macrófagos/melanomacrófagos del borde de crecimiento. A las 2 y 3 s.p.i el marcaje era granular y se encontraba en la mayoría de las células de la zona de transición entre la parte interna del explante y el borde de crecimiento y en esta última zona (Fig. 136), aunque también se observaba marcaje difuso y muy débil en la zona interna degenerada del explante.

La monocapa degeneró tras la infección.

En los cortes semifinos la zona interna del explante presentaba características similares a la de los cultivos no infectados, aunque las células reticulares contenían numerosos gránulos basófilos. La zona de transición, entre la zona interna degenerada y el borde de crecimiento, presentaba una trama de células reticulares que contenían gran cantidad de cuerpos residuales y en ella se observaban restos de sinusoides conteniendo grandes acúmulos de eritrocitos y focos eritropoyéticos (Fig. 137). En el borde de crecimiento se observaban células fibroblastoides, células epitelioides y macrófagos/melanomacrófagos conteniendo bacterias.

Microscopía electrónica. La zona interna del explante estaba formada fundamentalmente por restos celulares entre los cuales se observaban estructuras multilamelares que contenían bacterias (Fig. 138).

En la zona interna y en la zona de transición entre esta y el borde de crecimiento las células reticulares se caracterizaban por la gran cantidad de cuerpos residuales electrodensos que presentaban en su citoplasma (Figs. 139 y 140). Entre estas células se conservaban sinusoides sanguíneos llenos de eritrocitos y eritroblastos (Figs. 141 y 142). Las células limitantes sinusoidales presentaban el citoplasma totalmente degenerado y con gran cantidad de gránulos de aspecto floculento (Fig. 141).

Las células epitelioides y fibroblastoides del borde de crecimiento presentaban gran cantidad de cuerpos residuales electrodensos y bacterias dentro de vesículas multilamelares (Figs. 143 y 144). Además, en esta zona se localizaban blastos (Fig. 145).

Subcultivos. En los subcultivos de branquia y de bazo se confirmó la presencia de *R. salmoninarum* en el medio de cultivo y en las células, tanto por su crecimiento en SKDM como mediante IFAT (Figs. 146 y 147), hasta 3 meses después de la infección de los cultivos.

5.2.- Infecciones *in vivo*

Para cada fecha de muestreo (15 o 42 d.p.i.) en ningún caso se han observado diferencias entre los explantes del mismo órgano a distinto tiempo de cultivo (1 a 4 semanas). Sin embargo, sí que se observaron diferencias en el grado de infección entre los explantes recogidos a las mismas fechas pero provenientes de peces distintos.

5.2.1.- *Renibacterium salmoninarum* cepa ATCC 33209

Tegumento. En los explantes procedentes de peces a 15 d.p.i. el marcaje era escaso y difuso y aparecía asociado a los melanóforos. Sin embargo, en las monocapas era granular aunque poco abundante y se encontraba localizado en algunas células epitelioides (Fig. 148). En los explantes obtenidos de peces a 42 d.p.i. no se detectó marcaje, mientras que en las monocapas aunque era menor que a 15 d.p.i., presentaba la misma distribución.

Branquia. En los explantes procedentes de peces a 15 d.p.i. solo se observó marcaje granular en algunas células del epitelio del filamento (Fig. 149) y difuso y muy débil en los restos celulares localizados entre las laminillas. En las monocapas obtenidas de estos cultivos el marcaje, tanto granular como difuso, era escaso y aparecía localizado en células epitelioides. En los cultivos procedentes de peces a 42 d.p.i. no se observó marcaje en los explantes, mientras que en las células epitelioides de la monocapa era difuso y muy débil.

Pronefros. En los explantes obtenidos de peces a 15 d.p.i. sólo se observó marcaje difuso y muy débil en células del estroma de la zona interna (Fig. 150). Sin embargo, en las monocapas de estas muestras el marcaje era granular y se encontraba localizado en células epitelioides y redondeadas. En los explantes procedentes de peces a 42 d.p.i. no se observó marcaje, mientras que en las monocapas se mantenía en los mismos tipos celulares que en las monocapas de las muestras anteriores. Además, las células gigantes multinucleadas, que a 15 d.p.i. eran negativas, presentaban ahora marcaje granular (Fig. 151).

Bazo. En los explantes obtenidos de peces a 15 d.p.i. aparecía un marcaje granular en algunas células, posiblemente macrófagos, de la zona de transición entre la zona interna del explante y el borde de crecimiento (Fig. 152). Además, este último presentaba abundante marcaje granular localizado en las células epitelioides (Fig. 153). En las monocapas de estos cultivos se observó marcaje granular tanto en células epitelioides como en células fibroblastoides (Fig. 154). Tanto en los explantes como en las monocapas procedentes de peces a 42 d.p.i. el marcaje era granular y más escaso en general que en los cultivos anteriores, localizándose únicamente en la zona interna de los explantes y en células epitelioides y fibroblastoides de las monocapas.

Estos resultados se muestran en la tabla 14.

5.2.2.- *Renibacterium salmoninarum* cepa FT10

Tegumento. En los cultivos de tegumento procedentes de peces a 15 d.p.i., los explantes presentaban marcaje moderado y difuso en los restos del estrato laxo de la dermis, posiblemente localizado en los fibroblastos (Fig. 155), mientras que en la monocapa se encontró escaso marcaje granular en alguna célula epitelioides. En los cultivos procedentes de peces a 42 d.p.i. ni los explantes ni las monocapas presentaban marcaje.

Branquia. El marcaje era abundante, pero muy débil y difuso en células de las laminillas en los explantes procedentes de peces a los 15 d.p.i. En las monocapas obtenidas a partir de estas muestras el marcaje era igualmente abundante aunque granular y aparecía localizado en células epitelioides. En los explantes obtenidos de peces a 42 d.p.i. el marcaje era abundante y difuso, localizándose en las células pilares de las laminillas (Fig. 156). En las monocapas obtenidas a partir de estos cultivos no se encontró marcaje.

Pronefros. En los explantes procedentes de peces a 15 d.p.i. se observó una moderada cantidad de marcaje granular localizado en el borde de crecimiento (Fig. 157). Por el contrario, en las monocapas de estos cultivos el marcaje era muy escaso y granular, localizándose en las células epitelioides. En los explantes de pronefros obtenidos de peces a 42 d.p.i. el marcaje era muy débil y difuso en la zona interna. Sin embargo, en las monocapas el marcaje era granular y frecuente tanto en las células epitelioides como en las células gigantes multinucleadas.

Bazo. En los cultivos procedentes de peces a 15 d.p.i. el marcaje era moderado tanto en los explantes como en las monocapas. En los primeros era difuso y aparecía localizado en la zona interna, mientras que en las monocapas era granular y aparecía en las células epitelioides. En los cultivos obtenidos de peces a 42 d.p.i. el marcaje seguía presentando el mismo aspecto y localización que en las muestras anteriores, aunque en el caso de los explantes era más intenso (Fig. 158).

Estos resultados se muestran en la tabla 15.

TABLAS DE LOS CULTIVOS INFECTADOS

TIEMPO POST-INFECCIÓN		1 h.	24 h.	1 s.	2 s.	3 s.
TEGUMENTO	dermis densa					
	dermis laxa					
	epidermis					
	monocapa					
BRANQUIA	conjuntivo filamento					
	epitelio filamento	(G)	(D)	(D)	(D)	(D)
	laminillas		(D)	(D)	(D)	(D)
	monocapa					
PRONEFROS	z. interna	(G)	(G)	(G)	(G)	(G)
	z. transición					
	borde crecimiento	(G)	(G)	(G)	(G)	(G)
	monocapa					
BAZO	z. interna	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)
	z. transición					
	borde crecimiento	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)
	monocapa	EPITELIOIDES (G)	EPITELIOIDES (G)	EPITELIOIDES (G)	EPITELIOIDES (G)	EPITELIOIDES (G)

La escala de grises da una idea aproximada de la cantidad de marcaje. (G): distribución granular. (D): distribución difusa.



Tabla 12. Patrón de marcaje en los cultivos infectados *in vitro* con la cepa ATCC 33209.

TIEMPO POST-INFECCIÓN		1 h.	24 h.	1 s.	2 s.	3 s.
TEGUMENTO	dermis densa				(G-D)	(G-D)
	dermis laxa				MELANÓF. (G-D)	MELANÓF. (G-D)
	epidermis				(G-D)	(G-D)
	monocapa					
BRANQUIA	conjuntivo filamento	(G-D)	(G-D)	(G-D)	(G-D)	(G-D)
	epitelio filamento					
	laminillas	PILARES (G-D)	PILARES (G-D)	PILARES (G-D)	PILARES (G-D)	PILARES (G-D)
	monocapa	(G-D)	(G-D)	(G-D)	(G-D)	(G-D)
PRONEFROS	z. interna					
	z. transición					
	borde crecimiento	(G)	(G)	(G)	(G)	(G)
	monocapa	*	*	*	*	*
BAZO	z. interna			(D)	(D)	(D)
	z. transición			(D)	(G)	(G)
	borde crecimiento	MACRÓFAGOS (G)	MACRÓFAGOS (G)	MACRÓFAGOS (G)	(G)	(G)
	monocapa	*	*	*	*	*

La escala de grises da una idea aproximada de la cantidad de marcaje. (G): distribución granular. (D): distribución difusa. *: degeneró tras la infección.



Tabla 13. Patrón de marcaje en los cultivos infectados *in vitro* con la cepa FT10.

PECES		15 d.p.i.				42 d.p.i.			
SEMANAS DE CULTIVO		1	2	3	4	1	2	3	4
TEGUMENTO	dermis densa	MELANÓFOROS (D)				EPITELIOIDES (G)			
	dermis laxa								
	epidermis								
	monocapa								
BRANQUIA	conjuntivo filamento	(G)				EPITELIOIDES (D)			
	epitelio filamento								
	laminillas								
	monocapa								
PRONEFROS	z. interna	ESTROMA (D)				EPITELIOIDES (G) REDONDEADAS (G) EPITELIOIDES (G) REDONDEAD. (G) GIGANTES (G) (D)			
	z. transición								
	borde crecimiento								
	monocapa								
BAZO	z. interna	MACRÓFAGOS (G)				EPITELIOIDES (G) FIBROBLASTOIDES (G)			
	z. transición								
	borde crecimiento								
	monocapa								

La escala de grises da una idea aproximada de la cantidad de marcaje. (G): distribución granular. (D): distribución difusa.



Tabla 14. Patrón de marcaje en los cultivos procedentes de peces infectados con la cepa ATCC 33209.

PECES		15 d.p.i.				42 d.p.i.			
SEMANAS DE CULTIVO		1	2	3	4	1	2	3	4
TEGUMENTO	dermis densa								
	dermis laxa	FIBROBLASTOS (D)							
	epidermis								
	monocapa	EPITELIOIDES (G)							
BRANQUIA	conjuntivo filamento								
	epitelio filamento								
	laminillas	(D)				PILARES (D)			
	monocapa	EPITELIOIDES (G)							
PRONEFROS	z. interna					(D)			
	z. transición								
	borde crecimiento	MELANOMACRÓFAGOS (G)							
	monocapa	EPITELIOIDES (G)				EPITELIOIDES (G) GIGANTES (G)			
BAZO	z. interna	(D)				(D)			
	z. transición								
	borde crecimiento								
	monocapa	EPITELIOIDES (G)				EPITELIOIDES (G)			

La escala de grises da una idea aproximada de la cantidad de marcaje. (G): distribución granular. (D): distribución difusa.



Tabla 15. Patrón de marcaje en los cultivos procedentes de peces infectados con la cepa FT10.

DISCUSIÓN

Los cultivos de todos los órganos estudiados únicamente han podido iniciarse utilizando medio de cultivo suplementado con suero de trucha, aunque su concentración podía ser reducida a las cuatro semanas de cultivo. No obstante, una vez establecidos y tras una semana en cultivo, el suero de trucha podía ser sustituido por suero de caballo e hidrocortisona. Por otra parte, todos los cultivos se realizaron de forma continuada durante dos años y en el caso de la branquia y el bazo además hemos conseguido obtener subcultivos.

La elección de RPMI-1640 como componente básico del medio de cultivo está basada en que ha sido empleado para ensayos de inmunidad *in vitro*, tanto en mamíferos (Mishell y Dutton, 1967), como en peces (Miller y Clem, 1984; Baynes, 1986; Kaattari y Holland, 1990; DeKoning y Kaattari, 1991, 1992). Además, el RPMI-1640 también ha sido empleado como componente principal del medio de cultivo para el mantenimiento de cultivos primarios de médula ósea de mamíferos (Whitlock y Witte, 1982), y de cultivos primarios y líneas celulares de pronefros de peces (Diago, 1990; Diago y cols., 1993, 1995; Moritomo y cols., 1993; Coll, 1994; Moritomo y Watanabe, 1994).

Nuestro estudio pone de manifiesto que el suero de trucha constituye un suplemento esencial para el establecimiento de cultivos primarios de tegumento, branquia, pronefros y bazo de trucha arco iris, ya que estos solo pudieron establecerse utilizando el medio completo A, que contenía 10% de suero de trucha. Aunque algunos autores han sugerido la toxicidad o nulo efecto del suero de pez sobre los cultivos (Clem y cols., 1961; Fryer y cols., 1965; Collodi y Barnes, 1990; Pärt y cols., 1993; Avella y cols., 1994), otros lo han utilizado rutinariamente como suplemento de sus medios de cultivo (Dickman y Renfro, 1986; Clark y cols., 1989; DeKoning y Kaattari, 1991, 1992; Moritomo y cols., 1993; Diago y cols., 1993,

1995; Coll, 1994; Moritomo y Watanabe, 1994).

En el caso de los cultivos de branquia, las diferencias en cuanto a la utilización de suero de pez son muy acusadas, ya que se ha indicado que el suero de trucha no mejora la adherencia de las células, que no estimula el crecimiento o que, tras su congelación a -20°C (procedimiento empleado en nuestros cultivos) tiene efectos tóxicos sobre las monocapas epiteliales de cultivos primarios de branquia de trucha (Pärt y cols., 1993); además se ha descrito que el suero de lubina no es capaz de promover la adhesión y el crecimiento de cultivos primarios de células epiteliales de branquia de lubina (Avella y cols., 1994). Por el contrario, otros autores han indicado que el suero de trucha promueve la adhesividad de los hepatocitos en cultivo de modo dosis dependiente (Kocal y cols., 1988).

En cuanto a los cultivos celulares procedentes de órganos hematopoyéticos, existen datos tanto acerca de la utilización de suero de pez como suplemento junto con suero fetal bovino (Moritomo y cols., 1993; Diago y cols., 1993, 1995; Coll, 1994; Moritomo y Watanabe, 1994), como del uso exclusivo de suero bovino (Anderson y cols., 1986, 1991; Moritomo y cols., 1990; Tung y cols., 1991; Cheng y cols., 1993). En el único estudio en el que se ha comparado la eficiencia del suero de pez junto con suero fetal bovino frente a este último solo, Moritomo y Watanabe (1994) indican que la formación de colonias hematopoyéticas, utilizando cultivos de pronefros de carpa, depende de la concentración de suero de carpa, el cual estimula la formación de colonias granulocíticas en el cultivo. Además, en cultivos de linfocitos de salmónidos se han conseguido mejores respuestas mitogénicas utilizando suero de pez en lugar de suero fetal bovino (Etlinger y cols., 1976; DeKoning y Kaattari, 1991, 1992). Por otra parte, en cultivos hematopoyéticos de pronefros y de bazo de trucha arco iris se han obtenido colonias hematopoyéticas tanto utilizando suero fetal bovino y fitohemaglutinina como suero fetal bovino y suero de caballo, pero ese crecimiento o no existe o está enormemente retardado cuando se utiliza exclusivamente suero fetal bovino (Siegl y cols., 1993).

El hecho de que en nuestro caso el suero de trucha no solo no sea tóxico, sino que sea indispensable para el establecimiento de los cultivos, puede deberse a que la concentración utilizada sea la óptima para su iniciación y también es posible, que al emplear suero procedente de una mezcla de sueros se estén eliminando las variabilidades que los sueros individuales presentan en su composición, lo cual ha sido anteriormente descrito para el

cultivo de linfocitos de salmónidos (DeKoning y Kaattari, 1992).

Al cabo de una semana y una vez establecidos los cultivos, el medio A podía ser sustituido por el C, el cual estaba suplementado con 10% de suero de caballo e hidrocortisona, pero no contenía suero de trucha. Este cambio, no afectaba aparentemente a los cultivos, e incluso en el caso del bazo se obtuvieron colonias hematopoyéticas similares a las conseguidas utilizando el medio A. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Siegl y cols. (1993), anteriormente indicadas. Además, el mantenimiento de los cultivos utilizando suero fetal bovino y de caballo puede implicar la existencia de un efecto estimulador sinérgico y que los factores de crecimiento están relativamente conservados a lo largo de la evolución, lo cual ya ha sido indicado para algunas citoquinas (Secombes, 1991).

La utilización de hidrocortisona como suplemento del medio de cultivo C está basada en que se ha empleado de forma rutinaria junto con el suero de caballo para evitar las variaciones en la concentración de glucocorticoides (Sandstrom y cols., 1994). En mamíferos, se ha descrito que la hidrocortisona actúa en cultivo como factor de crecimiento epitelial (Freshney, 1992) y en cultivos de trucha, se ha utilizado en cultivos primarios de tegumento (Mothersill y cols., 1995) y se ha descrito que mejora la adherencia de la línea RTG-2 (Lee y Bols, 1991). Además, en cultivos a largo plazo de médula ósea se ha indicado que la hidrocortisona estimula la formación de la monocapa, aunque inhibe la producción de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (Coutinho y cols., 1993) y que también modula la aparición de factores inhibidores de las colonias hematopoyéticas (Hirata y cols., 1988; Wang y Sullivan, 1993).

En relación con la utilización de hidrocortisona en los medios de cultivo también hay datos que indican que modifica la morfología de las células haciéndolas más epitelioides (Berliner y Gerschenson, 1975; Maca y cols., 1978), cambio que se ha asociado con un incremento en la síntesis proteica (Maca y cols., 1978).

La utilización de medios de cultivo libres de suero presenta la ventaja de trabajar con una composición definida de factores en el medio, ya que aunque el suero es una fuente de hormonas y nutrientes esenciales su empleo hace que la composición del medio de cultivo no esté definida y sea variable, y altera las propiedades fisiológicas y fisico-químicas del microambiente *in vitro* (Sandstrom y cols., 1994). En el caso de los cultivos de tegumento de

trucha arco iris, se ha indicado que los medios libres de suero son superiores tanto cualitativa como cuantitativamente frente a los medios suplementados con suero (Mothersill y cols., 1995). Aun así, estos autores solo consiguen iniciar los cultivos empleando medio de cultivo basado en RPMI-1640 y suplementado con suero bovino fetal, suero de caballo, insulina e hidrocortisona e indican, que si se transfieren a medios libres de suero antes de que el crecimiento celular haya empezado, los cultivos no se establecen. Por otra parte solo consiguen mantener el crecimiento de sus cultivos durante un periodo de tres semanas y la diferenciación hacia células mucosas se pierde en la población en crecimiento, encontrándolas solo en las cercanías del explante. Estos datos nos permitan afirmar que nuestras condiciones de cultivo permiten un crecimiento más prolongado (hasta tres meses) y que los tipos celulares de la monocapa (epitelioides, fibroblastoides, monocito/macrófagos y mucosas) son más asimilables a los del tegumento *in vivo*.

El sustrato utilizado también es un factor condicionante a la hora de establecer los cultivos. Algunos autores han observado diferencias según el tipo de plástico utilizado como sustrato para cultivos de células epiteliales de branquia de lubina (Avella y cols., 1994). En nuestro caso estas diferencias no han sido observadas, ni tampoco ha sido necesario pretratar las superficies de cultivo para estimular la adherencia celular. Este último procedimiento ha sido empleado en cultivos primarios de células epiteliales de diversos órganos de peces y en el caso del tegumento, se ha indicado que permite el mantenimiento de melanóforos en la monocapa (Mothersill y cols., 1995). Por el contrario, en cultivos de branquia estos pretratamientos tienen poco o ningún efecto (Pärt y cols., 1993; Bols y cols., 1994; Avella y cols., 1994).

Los cultivos han sido establecidos a partir de explantes ya que esta técnica presenta una serie de ventajas frente a la utilización de suspensiones celulares, como son su rapidez (Avella y cols., 1994) y facilidad (Parkinson y Yeudall, 1992), el mantenimiento de las interacciones celulares (Parkinson y Yeudall, 1992) y la ausencia de una digestión enzimática, que puede dañar las células o eliminar proteínas de su superficie (Avella y cols., 1994). Además, al no disgregar las células previamente al cultivo, el explante *in vitro* es estructuralmente más comparable al sistema *in vivo*. Por otra parte, tanto en el caso de cultivos de branquia y tegumento (Pärt y cols., 1993; Bols y cols., 1994; Avella y cols., 1994; Mothersill y cols., 1995), como de pronefros (Diago, 1990), se han obtenido mejores resultados con explantes

que con suspensiones celulares.

En cuanto a la duración y viabilidad de los cultivos, los resultados de nuestro trabajo han demostrado que es posible mantener cultivos de branquia y de bazo durante un periodo mínimo de tres años, sin embargo los cultivos de tegumento y de pronefros solo se pudieron mantener durante un tiempo máximo de 2-3 meses, ya que transcurrido este tiempo involucionaban independientemente de que hubieran sido o no transferidos a frascos. Se han descrito cultivos a largo plazo de pronefros de trucha arco iris (Diago y cols., 1993) y el establecimiento de una línea celular a partir de ellos (Diago y cols., 1995). El hecho de que nuestros cultivos de pronefros involucionen puede deberse a que cuando los cultivos anteriormente indicados se transfieren a frascos se juntan dos o tres pocillos y/o a que la concentración de suero de trucha que se utiliza de forma continuada es el 10% (Diago y cols., 1993), por el contrario en nuestros cultivos cada pocillo era transferido a un frasco y la proporción de suero de trucha se reducía al 5% a las cuatro semanas de cultivo. En cultivos de médula ósea se ha indicado que tanto la concentración celular del inóculo como la proporción de células frente a la superficie de cultivo son importantes para el establecimiento de los mismos (Coutinho y cols., 1993).

Con respecto al tegumento se ha demostrado que los queratinocitos son difícilmente subcultivables (Parkinson y Yeudall, 1992), a no ser que la superficie de cultivo se tapice previamente con fibroblastos 3T3 (Rheinwald y Green, 1975) y aun así el número de replicaciones es limitado, variando de quince a veinte si se utilizan queratinocitos de ratones adultos y alrededor de cincuenta para queratinocitos de ratones o de humanos recién nacidos (Pera y Gorman, 1984; Parkinson y Yeudall, 1992). Además, se ha propuesto que la vida media *in vitro* de los queratinocitos de otras especies puede ser considerablemente más corta que la de los de humanos (Parkinson y Yeudall, 1992).

Por último, no hemos encontrado que las variaciones estacionales del sistema inmunitario de los peces (Álvarez y cols., 1987; Zapata y cols., 1992) influyan en el éxito de los cultivos ya que hemos establecido cultivos primarios a lo largo de dos años. Estos resultados no están de acuerdo con lo descrito por Siegl y cols. (1993) que indican que las variaciones estacionales afectan al éxito de los cultivos de bazo.

TEGUMENTO

En el explante la estructura general del tegumento se mantiene a lo largo de todo el tiempo de cultivo, sin embargo tanto la epidermis como la dermis sufren algunas alteraciones.

En la epidermis los cambios más notables son la pérdida de estratos y de uniones estrechas y desmosomas entre las células epiteliales, la casi total ausencia de células mucosas y la desaparición de la membrana basal. Una parte de estos cambios podrían atribuirse a la manipulación durante la preparación del explante para iniciar el cultivo, ya que durante el proceso de lavado se pierde mucus y se desprenden la mayor parte de las escamas, arrastrando consigo pequeñas porciones de epidermis y al manipular y trocear el tegumento posiblemente se desorganicen los numerosos y profundos pliegues existentes en la membrana basal. Por otra parte, la alteración en cultivo de la polaridad de la nutrición (Simons y Fuller, 1985; Fusening, 1986) al estar sumergida toda la población celular en el medio de cultivo, puede tener como consecuencia la pérdida de parte de las características del órgano *in vivo*.

Además, una parte de las células de la epidermis en cultivo, tanto epiteliales como mucosas, emigran al pocillo para constituir la monocapa, lo cual no solo contribuye al adelgazamiento de la epidermis del explante y a la pérdida de células mucosas, sino también a que se pierdan las uniones entre las células epidérmicas. Esta pérdida de células y de interacciones entre las células adyacentes, puede facilitar no solo la desorganización de la membrana basal sino también cambios en el fenotipo de las células epiteliales.

El incremento de la actividad AKPH en las células epiteliales del explante a lo largo del tiempo de cultivo junto con la presencia de una débil actividad ANAE puede estar indicando un incremento de la actividad metabólica, activación que parece necesaria para posibilitar la migración de las células al pocillo.

Respecto a las células mucosas es posible que se descarguen tanto durante la manipulación de los explantes como durante el cultivo, produciéndose un desgaste bien en la capacidad de renovación del mucus o en la de recambio de nuevas células y/o que el mucus se pierda durante el procesamiento para el análisis microscópico de los cultivos, ya que precisa de técnicas de fijación especiales. También se ha descrito que las células mucosas inmaduras son difícilmente distinguibles de las células epidérmicas (Harris y Hunt, 1975b), todo lo cual podría contribuir a que estas únicamente se hayan identificado a microscopía óptica.

La pérdida de la mayor parte de las uniones intercelulares entre las células epiteliales y de los micropliegues en las células epidérmicas superficiales, junto con el aspecto electroclaro y degenerado que presentan estas últimas células, se asemeja al proceso de descamación *in vivo*. El tamaño de los micropliegues se ha interpretado como un reflejo del estado funcional de la célula (Whitear y Mittal, 1986) y la disminución de su tamaño junto con el aspecto electroclaro y degenerado de las células epidérmicas se han asociado al proceso de descamación (Hawkes, 1974a; Harris y Hunt, 1975a; Baschwitz y cols., 1987).

En la dermis el estrato laxo se encuentra reducido, posiblemente porque se desorganiza rápidamente. Aun así, en él se pueden distinguir fibroblastos y células pigmentarias entre haces de fibras de colágeno y gran cantidad de gránulos de melanina, procedentes de la desgranulación de algunos melanóforos.

Los fibroblastos, no solo del estrato laxo sino también del compacto, presentan un aspecto activado que se caracteriza por el gran desarrollo del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso, la existencia de vesículas de exo/endocitosis y la presencia de las actividades enzimáticas AKPH y ANAE. Este hecho puede ser debido a la presencia en el suero de factores estimuladores producidos por las plaquetas o trombocitos, en el suero bovino o de pez respectivamente, durante la formación del coágulo (Freshney, 1987; Avella y cols., 1994) y que entre otros incluiría factor de crecimiento de fibroblastos (Gospodarowicz, 1974). La activación de los fibroblastos puede implicar que estén liberando al medio factores de crecimiento que estimulen a las células epiteliales, ya que como ha sido demostrado en mamíferos los fibroblastos secretan factores que estimulan el crecimiento de los queratinocitos (Finch y cols., 1989).

Las células pigmentarias presentan un aspecto ultraestructural semejante al descrito *in vivo* (Hawkes, 1974a, 1974b; Turner y cols., 1975; Bagnara y cols., 1979; Fuji, 1993). Estas células se mantienen en los restos del estrato laxo y no se ha detectado su presencia en la monocapa. Esto puede deberse a que al igual que ocurre con los melanóforos de mamíferos (Freshney, 1987), todos los cromatóforos tengan requerimientos especiales para crecer en cultivo, aunque por otra parte ni los melanóforos ni el resto de las células pigmentarias que se observan en el explante presentan signos de degeneración. También es posible que necesiten una superficie de cultivo especialmente tratada, ya que se ha indicado la presencia de melanóforos (Mothersill y cols., 1995) en las monocapas de cultivos de tegumento de

trucha arco iris exclusivamente cuando se utilizan superficies de cultivo recubiertas con colágeno y la línea celular RTG-2, que estos autores asimilan a un sustrato dérmico.

El estrato compacto es la porción del tegumento que mejor mantiene sus características en cultivo, ya que se conservan tanto la disposición y características de las fibras, las cuales son positivas para los anticuerpos anti-colágeno I y III, como la estructura de los vasos sanguíneos y de los fibroblastos.

Con respecto al patrón inmunocitoquímico de las células del explante, las células epidérmicas en cultivo presentan un amplio patrón de expresión de citoqueratinas, que concuerda con el perfil encontrado *in vivo* en la epidermis de la trucha arco iris (Markl y Franke, 1988; Markl y cols., 1989), aunque otros autores (Castillo, 1991) describen que no existe marcaje para el anticuerpo KB-37 *in vivo*, la diferencia de marcaje para este anticuerpo puede ser debida a la utilización de cultivos. Por otra parte, la presencia de citoqueratinas encontrada por nosotros en los fibroblastos de la dermis corrobora resultados previos que describen *in vivo* la presencia de citoqueratinas en fibroblastos, no solo de la trucha arco iris (Markl y Franke, 1988; Markl y cols., 1989) sino también de otros peces (Bunton, 1993). Sin embargo, no podemos descartar que su expresión puede estar, al menos en parte, inducida *in vitro* como se ha demostrado que ocurre espontáneamente en cultivos de células de naturaleza fibroblástica o mesenquimatosa (Von Koskull y Virtanen, 1987; Markl y cols., 1989; Virtanen y cols., 1989).

En cuanto a la monocapa de los cultivos de tegumento, esta está formada fundamentalmente por células epitelioideas, de forma poligonal similar a la observada en otros cultivos de tegumento de trucha arco iris (Mothersill y cols. 1995). Nuestros resultados, tanto morfológicos a microscopía óptica y electrónica como inmunocitoquímicos, han confirmado la naturaleza epitelial de las células de la monocapa, ya que presentan una morfología epitelioide, contienen filamentos y desmosomas y expresan algunas citoqueratinas. Todos ellos son los criterios específicos que se utilizan para identificar a las células epiteliales en cultivo (Freshney, 1992). Sin embargo, el patrón citoenzimático de las células epitelioideas es diferente al observado en las células epiteliales del explante, ya que han perdido las actividades AKPH y ANAE. La disminución o incluso la pérdida de actividades enzimáticas ha sido descrita en cultivos de otros órganos de trucha arco iris (Diago, 1990) y se ha relacionado con etapas de diferenciación o maduración. Además, estas células pierden el

marcaje para los anticuerpos K-4.62 y KB-37, los cuales marcan la capa basal de epitelios estratificados en mamíferos y es en esta zona donde se encuentra el mayor número de células indiferenciadas (Stenn, 1988). Por lo tanto, es posible que la pérdida de actividades enzimáticas y de la expresión de ciertas queratinas esté relacionada con una vía diferente de diferenciación de las células epiteloides de la monocapa. Sin embargo, otros autores han sugerido empleando cultivos de tegumento de trucha arco iris que las células pierden su capacidad de diferenciación conforme aumentan sus divisiones en cultivo, debido a que los "marcadores de diferenciación funcional" (células mucosas y micropliegues) sólo se encuentran en las áreas de la monocapa próximas al explante, donde se localizan las células que se han dividido un menor número de veces (Mothersill y cols., 1995).

Por otra parte, la ausencia de una interacción directa con la dermis produce una alteración en el patrón de diferenciación de las células epiteloides de la monocapa. Durante los procesos de embriogénesis e histogénesis es imprescindible la existencia de interacciones epitelio-mesénquima para un normal desarrollo de los epitelios (Sawyer y Fallon, 1983; Kedinger y cols., 1987; Cunha y cols., 1983; Birchmeier y Birchmeier, 1993) y en estudios *in vitro* empleando suspensiones celulares se ha demostrado que las deficiencias en el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales se deben a la ausencia de la influencia que el mesénquima ejerce *in vivo* (Holbrock y Hennings, 1983; Fusening, 1986; Birchmeier y Birchmeier, 1993).

La ausencia de membrana basal y/o de matriz extracelular podría modificar el fenotipo de las células en nuestros cultivos, ya que está ampliamente demostrado que las interacciones con la membrana basal y en general con toda la matriz extracelular son necesarias para la morfogénesis de los epitelios tanto *in vivo* (Leivo y cols., 1980; Bernfield y cols., 1984; Birchmeier y Birchmeier, 1993) como *in vitro* (Hadley y cols., 1985; Sakakura, 1991; Streuli y cols., 1991; Aggeler y cols., 1991; Kanazawa y Hosick, 1992; Birchmeier y Birchmeier, 1993), que el papel de la membrana basal es crucial en el establecimiento de la polaridad celular (Ekblom, 1981; Vestweber y cols., 1985) y que las interacciones con la matriz extracelular son importantes en el proceso de diferenciación celular (McDonald, 1988).

No obstante hay que tener en cuenta, como se ha indicado anteriormente, que los fibroblastos de la dermis del explante pueden estar liberando al medio factores que estimulen el crecimiento y la diferenciación de las células de naturaleza epitelial de la monocapa. En

mamíferos los factores solubles de origen mesenquimático son esenciales, por ejemplo, durante el desarrollo de las glándulas salivares (Takahasi y Nogawa, 1991) e *in vitro* se ha indicado que participan en la diferenciación histiotípica de distintos órganos (Taub y cols., 1990; Montesano y cols., 1991).

A microscopía electrónica se diferencian en función de su electrodensidad dos tipos de células epitelioides: electroclaras y electrodensas. Las primeras, por sus numerosas vesículas, podrían asimilarse a las células epidérmicas superficiales de teleósteos. Basándose en sus características ultraestructurales Whitear (1986) implica a las células epidérmicas superficiales en la síntesis de una cutícula y en *Salmo trutta* también se les ha atribuido una función secretora (Álvarez, 1993). Sin embargo, la carencia de las actividades enzimáticas ensayadas hace difícilmente posible la existencia de una actividad secretora. Las células epitelioides electrodensas presentan haces de filamentos, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi desarrollados y están unidas por desmosomas, características descritas como propias de células epiteliales en el tegumento de peces (Whitear, 1986; Whitear y Mittal, 1986). Por otra parte, los gránulos de melanina de su citoplasma pueden proceder, al igual que se ha descrito en mamíferos, de la transferencia desde las prolongaciones dendríticas de los melanóforos *in vivo* (Stenn, 1988) o bien por un proceso de fagocitosis de los gránulos de melanina dispersos en el cultivo. Es posible que estos dos tipos celulares representen distintos estadios de diferenciación de las células de naturaleza epitelial en cultivo.

Por otra parte, a microscopía óptica se han identificado en las monocapas algunas células fibroblastoides, que no han podido ser observadas a microscopía electrónica probablemente debido a su escaso número. Es posible que estas sean células de naturaleza epitelial con apariencia fusiforme en las que no se detecta el marcaje para las citoqueratinas debido a su disposición en el cultivo y a procesos de diferenciación, respectivamente. Esta plasticidad de la morfología en cultivo de las células epiteliales ha sido descrita previamente (Freshney, 1992).

La presencia de células mucosas en cultivos de tegumento de trucha arco iris ha sido observada previamente (Mothersill y cols., 1995), pero exclusivamente en las proximidades del explante y estos autores han sugerido que su diferenciación se pierde en la monocapa a medida que esta prolifera. En nuestro caso no se ha observado una diferente distribución en el cultivo, hecho que puede deberse a que las células epidérmicas indiferenciadas son capaces de

diferenciarse tanto a células mucosas como a células pavimentosas (Downing y Novales, 1971; Harris y Hunt, 1975a). El hecho de que estas células no hayan podido ser observadas a microscopía electrónica probablemente se deba a su escaso número, a que descarguen su contenido o a que se desprendan fácilmente al manipular la monocapa, lo cual también explica que no se localicen en los cultivos procesados para las técnicas citoquímicas, siendo solo observables en los cultivos no manipulados utilizando un microscopio invertido.

En la monocapa también se han identificado a microscopía electrónica monocitos y macrófagos, lo cual asemeja la composición de esta estructura en cultivo a las poblaciones celulares de la epidermis *in vivo*, ya que la presencia de leucocitos infiltrados en la epidermis está ampliamente descrita (Mittal y cols., 1980; Whitear, 1986; Whitear y Mittal, 1986).

La existencia de distintos tipos celulares en el cultivo hace posible el establecimiento de interacciones entre ellos, bien sea mediante contactos célula-célula o a través de sustancias secretadas al medio, por ejemplo los macrófagos son una de las mayores fuentes de citoquinas (Cavaillon, 1994). Esta variedad de tipos celulares contribuirían a asemejar el microambiente de la monocapa al de la epidermis de la trucha arco iris *in vivo*.

BRANQUIA

Los explantes de branquia mantienen relativamente su estructura durante todo el tiempo de cultivo, sin embargo desde los cuatro días en cultivo el epitelio respiratorio de las laminillas se pierde. Estos resultados confirman las observaciones previas de Stadtländer y Kirchoff (1989), que utilizando cultivos de filamentos branquiales de trucha arco iris indican que la integridad de los explantes se mantiene, al menos durante dos días, sin que aparezcan cambios degenerativos.

Las observaciones ultraestructurales confirman la activación y, en algunos casos, proliferación de los condrocitos, de los fibroblastos y de las células pilares observada a microscopía óptica. Esta activación general de las células de origen mesenquimatoso se ve corroborada por el análisis citoenzimático, ya que los condrocitos y los fibroblastos presentan un notable incremento de las tres actividades enzimáticas estudiadas y las células pilares, además de mantener unas actividades ANAE y AKPH moderadamente positivas, presentan un marcado incremento de la actividad ACPH, indicando una elevada actividad metabólica.

Por otra parte, el incremento de la actividad AKPH en los condrocitos puede estar

indicando la existencia de un proceso de calcificación, ya que esta actividad se ha considerado un marcador de la mineralización en el cartílago (Nielsen, 1978; Bernard y cols., 1985).

La activación de las células de origen mesenquimatoso puede ser debida a la presencia en el suero bovino de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Helden y cols., 1979; Antoniades y cols., 1979) que estimula a los fibroblastos (Freshney, 1987), factor de crecimiento de los fibroblastos (Gospodarowicz y Moran, 1974) que estimula a estos últimos y a los condrocitos (Gospodarowicz y Mescher, 1977) y de factor de crecimiento epidérmico (Gospodarowicz y Moran, 1974) el cual también estimula a los condrocitos (Gospodarowicz y Mescher, 1977). Además, no se debe descartar la presencia de factores de crecimiento en el suero de pez (Avella y cols., 1994), ni tampoco que las mismas células en cultivo estén produciendo dichas sustancias.

La presencia en el explante de células linfoides, granulares eosinófilas, macrófagos, melanomacrófagos, células endoteliales y del epitelio del filamento, indica que estos tipos celulares son capaces de mantenerse en el microambiente generado *in vitro* en el filamento branquial y es posible que además contribuyan a la secreción de citoquinas.

Los datos anteriormente expuestos pueden explicar que los explantes de branquia se mantengan durante un tiempo relativamente largo de cultivo en buenas condiciones, lo cual hace que se puedan asimilar al órgano *in vivo*.

La presencia de marcaje para las queratinas en los fibroblastos y en los condrocitos de los explantes confirma que la expresión de citoqueratinas en la trucha es muy compleja y que su distribución difiere de la de vertebrados superiores (Markl y Franke, 1988; Markl y cols., 1989). Sin embargo, el marcaje encontrado por nosotros en el conjuntivo es mucho más débil que el descrito *in vivo* por los autores anteriormente citados. Esta diferencia puede atribuirse a que estamos utilizando cultivos y a que los anticuerpos y la técnica empleados son distintos. En las branquias de *Morone saxatilis* y *Oryzas latipes* se ha demostrado, mediante inmunocitoquímica, la expresión de queratinas 1 a 19 (Bunton, 1993) y, en trucha arco iris, Markl y Franke (1988) describen una amplia expresión de queratinas no solo en las células epiteliales, sino también en células endoteliales vasculares y pilares, fibroblastos y en el cartílago. En los explantes, el marcaje para el anticuerpo K-8.60 (queratinas 10 y 11) y la expresión de queratina 19 (anticuerpo K-4.62) coincide con el descrito *in situ* (Markl y

Franke, 1988; Markl y cols., 1989; Castillo, 1991), pero no así la ausencia de marcaje en el explante encontrada por nosotros para la queratina 18 (anticuerpo CK-5), que los dos primeros autores localizan tanto en células del epitelio branquial y endoteliales como en los fibroblastos y el cartílago. Esta falta de marcaje descrita en nuestros resultados y en los de Castillo (1991) puede deberse a que el anticuerpo utilizado sea diferente del empleado por Markl y Franke (1988).

Aunque modificado en su composición celular, debido fundamentalmente al escaso número de células mucosas y a la ausencia de las células del cloro, el epitelio del filamento continúa presente a los veinte días de cultivo. La pérdida de las células del cloro del epitelio puede deberse a que el medio de cultivo carece de algún factor esencial que permita su mantenimiento, aunque hemos observado células similares en la capa de células que recubre a las laminillas. *In vivo* se ha implicado al cortisol como un factor esencial para la proliferación y diferenciación de las células del cloro (Doyle y Epstein, 1972; Laurent y Perry, 1990) y es posible que el suero no contenga la cantidad adecuada o que sean necesarios otros factores para su mantenimiento en el cultivo.

El epitelio respiratorio de las laminillas se desorganiza rápidamente, aunque las células pilares mantienen relativamente su disposición. Los senos sanguíneos formados por las células pilares desaparecen al disponerse estas unas junto a otras, sin embargo el vaso del extremo distal de la laminilla permanece dilatado, posiblemente debido a la gran cantidad de fibras colágenas que lo rodean.

El hecho de que las células pilares de las laminillas y las células mesenquimatosas del filamento permanezcan *in situ* y que el epitelio de las laminillas branquiales se desorganice rápidamente puede apoyar la hipótesis de que el origen de las células que constituyen la monocapa sea el epitelio respiratorio de la laminillas, aunque también es posible que intervengan las células que se desprenden del epitelio del filamento. La presencia de células epiteliales extendiéndose desde el filamento branquial y recubriendo algunas o todas las laminillas branquiales ha sido indicada previamente (Bols y cols., 1994). Además, la presencia de haces de filamentos y el marcaje citoqueratina positivo de las células epitelioideas de la monocapa confirman su naturaleza epitelial y su perfil citoenzimático similar al de las células epiteliales del filamento, por lo menos a cortos periodos de cultivo, las asemeja a las células del epitelio branquial.

Con respecto a la monocapa de los cultivos de branquia, a microscopía óptica hemos descrito la presencia de gran número de células epitelioides y algunas fibroblastoides, las cuales tienen un perfil citoquímico distinto. Sin embargo, la ultraestructura de todas las células observadas en las monocapas era similar, aunque sí se han observado células fibroblastoides formando parte de pequeños grupos de células libres. El que estas células no se identifiquen a microscopía electrónica puede deberse a su escasa cantidad y a que al levantar la monocapa para su procesamiento las células pierdan su forma característica en cultivo y sean más difícilmente diferenciables. La presencia mayoritaria de células epitelioides está de acuerdo con datos previos a microscopía óptica de cultivos primarios de branquia (Pärt y cols., 1993; Avella y cols., 1994; Bols y cols., 1994) y aunque los autores que han utilizado trucha arco iris también han descrito un pequeño número de células de apariencia fibroblástica (Pärt y cols., 1993; Bols y cols., 1994) otros, utilizando lubina, indican que no forman parte de las monocapas (Avella y cols., 1994). La existencia de pequeños grupos de células en los cultivos también concuerda con lo observado por Pärt y cols. (1993).

Ultraestructuralmente, la presencia de aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso bien desarrollados, junto con vesículas y haces de filamentos en las células epitelioides de los cultivos primarios, las asemeja a las células epiteliales descritas en cultivos primarios de branquia de lubina (Avella y cols., 1994) y a la línea celular epitelial de branquia de trucha arco iris RTgill-W1 (Bols y cols., 1994), aunque ambos autores también describen desmosomas y uniones estrechas e incluso micropliegues (Avella y cols., 1994), que no hemos encontrados en nuestros cultivos primarios. La falta de uniones y de estructuras especializadas puede deberse a una vía de diferenciación distinta de las células en cultivo.

La presencia en las células epitelioides de vesículas de contenido heterogéneo junto con un incremento de la actividad ACPH a lo largo del tiempo en cultivo indican la existencia de lisosomas, ya que la actividad ACPH se localiza en compartimentos ácidos (Shnitka y Seligman, 1971), además la presencia de lisosomas también ha sido descrita en células epiteliales de otros cultivos de branquia (Avella y cols., 1994; Bols y cols., 1994). Esta actividad lisosómica de las células epitelioides en cultivo podría relacionarse, dado su origen epitelial, con los procesos de captación antigénica, tanto de antígenos solubles como particulados, descritos en las células epiteliales de la branquia *in vivo* (Smith, 1982; Nelson y

cols., 1985; Zapata y cols., 1987; Torroba y cols., 1993).

Junto con las células epitelioides y fibroblastoides, en los cultivos primarios hemos descrito células mucosas, células linfoides y macrófagos, que no han sido observados por otros autores con la excepción de Bols y cols. (1994), que indican que observan posibles macrófagos debido a su apariencia similar con los descritos *in vitro* por Braun-Nesje y cols. (1982). Además de los datos ultraestructurales, el perfil citoenzimático ACPH y ANAE positivo de las células redondeadas, algunas de las cuales contienen melanina, confirma la existencia de macrófagos/melanomacrófagos.

Por otra parte, a partir de los cultivos primarios hemos conseguido obtener monocapas de células subcultivadas y mantenerlas durante largos periodos en cultivo. Estas células se asemejan ultraestructuralmente a la línea RTgill-W1 (Bols y cols., 1994) y a las descritas en cultivos primarios de filamentos branquiales de lubina (Avella y cols., 1994). La presencia de haces de filamentos bien desarrollados y desmosomas, junto con el marcado patrón de expresión de citoqueratinas, confirman que estas células son de origen epitelial.

Del patrón de marcaje para los anticuerpos anti-queratinas se deduce que la expresión de queratinas aumenta en las células que proliferan en cultivo, tanto en los cultivos primarios como en los subcultivos. Este hecho posiblemente se deba tanto a un proceso de selección de tipos celulares de origen epitelial como a un proceso de inducción de la expresión de queratinas. Esta última idea se basa en la existencia de un marcaje más intenso en las células subcultivadas que en las de los cultivos primarios para los anticuerpos monoclonales empleados.

La evolución de las células en cultivo hacia un perfil de citoqueratinas más intenso puede ser debida a que esté suprimida la inactivación de ciertos genes que participan en la expresión de estas proteínas, explicación que ha sido propuesta por Markl y Franke (1988) para justificar la expresión de citoqueratinas *in situ* en tejidos no epiteliales de la trucha. Se ha descrito que células de naturaleza fibroblástica o mesenquimatosas expresan citoqueratinas en cultivo (Von Koskull y cols., 1987; Virtanen y cols., 1989; Markl y cols., 1989), que varias líneas de fibroblastos humanos transformados espontáneamente o tratados con 5-azacitidina expresan las queratinas 8 y 18 (Markl y Franke, 1988) y también se ha indicado la capacidad de conversión de fibroblastos derivados de células de teratocarcinoma de ratón en células

epiteliales, mediante la utilización de 5-azacitidina, la cual induce la expresión de citoqueratinas en dichas células (Darmon y cols., 1984; Darmon, 1985). Además, se ha demostrado que la línea celular de trucha RTG-2, de origen gonadal y apariencia fibroblástica, coexpresa ocho queratinas diferentes (Markl y cols., 1989). Aunque todos estos datos se refieren a células de origen mesenquimatoso, coinciden con la evolución hacia un patrón queratina positivo de las células de los cultivos de branquia. Además, dado que estas células son de naturaleza epitelial la existencia *in vitro* de un proceso de inducción en la expresión de citoqueratinas parece más factible.

El marcaje débilmente positivo de las células epitelioides de los cultivos primarios y moderada o fuertemente positivo de todas las células subcultivadas para el anticuerpo anti-proteína S-100 indicaría una inducción de la expresión de esta proteína en las células que proliferan en cultivo.

El hecho de que no exista actividad fagocítica en las células subcultivadas se correlaciona con la falta de las actividades metabólicas estudiadas, en especial de ACPH, y de cuerpos residuales e indica que estas células han perdido en cultivo la capacidad de captación antigénica que presentan *in vivo* (Smith, 1982; Nelson y cols., 1985; Zapata y cols., 1987; Torroba y cols., 1993).

PRONEFROS

Los explantes de pronefros mantienen su estructura histológica relativamente conservada hasta 4 días en cultivo, iniciándose entonces la alteración de la zona interna con necrosis de algunos tipos celulares y la migración de otros hacia la periferia del explante, donde comienza a formarse un borde de crecimiento. A los 20 días de cultivo en el explante pueden diferenciarse tres zonas: a) una zona interna, necrosada, formada por células reticulares, melanomacrófagos, matriz extracelular y gran cantidad de restos celulares; b) una zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento donde las células reticulares forman un entramado junto con gran cantidad de matriz extracelular formada por fibras de colágeno. En esta zona se mantiene un microambiente en el que se encuentran células en proliferación, células granulares eosinófilas, células linfoides, melanomacrófagos, células limitantes sinusoidales, trombocitos, blastos y eritrocitos, entre las células reticulares o bien en los sinusoides; c) el borde de crecimiento, que está formado por un entramado de células

epitelioides y fibroblastoides que constituirán la monocapa.

El pronefros se ha considerado, tanto morfológica como funcionalmente, como el órgano homólogo de la médula ósea de vertebrados superiores (Zapata, 1979, 1981; Zapata y Cooper, 1990; Castillo, 1991), por lo cual los resultados de nuestros cultivos se discutirán también con los obtenidos en médula ósea.

Ultraestructuralmente las células reticulares del explante son semejantes a las del pronefros de la trucha *in vivo* (Castillo, 1991), del riñón de otros teleósteos (Zapata, 1979) y de la médula ósea de aves (Yoshida y Yumoto, 1987) y de mamíferos (Westen y Bainton, 1979). Las células reticulares de médula ósea envuelven a las células hematopoyéticas (Shaklai y Tavassoli, 1979) y están íntimamente asociadas con procesos granulopoyéticos tanto *in vivo* (Weiss y Chen, 1975; Westen y Bainton, 1979; Ploemacher y cols., 1984) como *in vitro* (Allen, 1981; Ploemacher y cols., 1984). Además, se ha demostrado en mamíferos que el estroma (número de unidades formadoras de colonias de células fibroblásticas) está directamente relacionado con el curso de la hematopoyesis (Klein y cols., 1983; Van den Heuvel y cols., 1987). Por otra parte, en peces se ha asociado a las células del estroma del pronefros con procesos hematopoyéticos *in vivo* (Esteban y cols., 1989; Castillo, 1991) e *in vitro* (Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993). Por lo tanto, las células reticulares descritas en nuestros cultivos posiblemente estén implicadas en el mantenimiento de las células linfohematopoyéticas observadas en la periferia del explante.

La existencia de gotas lipídicas en las células reticulares del explante se correlaciona con resultados previos tanto de peces como de mamíferos. La presencia de gotas lipídicas en células del estroma en cultivos de médula ósea es un hecho conocido (Bentley y Foidart, 1980; Allen, 1981; Tavassoli y Takahasi, 1982; Liesveld y cols., 1989) y también se han descrito en células reticulares fibroblásticas de cultivos de pronefros (Diago y cols., 1993). Esta presencia de lípidos se ha relacionado con la capacidad hematopoyética (concentración de unidades formadoras de colonias) de los cultivos de médula ósea (Dexter y cols., 1980; Greenberger, 1978; Tavassoli y Takahasi, 1982; Coutinho y cols., 1993; Hangoc y cols., 1993) y, por lo tanto, en el explante puede estar relacionada con la presencia de células linfohematopoyéticas en la zona de transición. Aun cuando en el pronefros *in vivo* no se ha descrito la existencia de grasa, este es un hecho ampliamente conocido en la médula ósea de mamíferos y su aparición en las células reticulares de pronefros en cultivo podría implicar la

expresión de una capacidad que contribuiría a la homología de estos dos órganos.

El patrón colágeno I y III positivo de las células reticulares y de la matriz extracelular en la zona de transición del explante corrobora que las fibras colágenas observadas a microscopía electrónica están constituidas por los tipos I y III. En cultivos de médula ósea, tanto murinos como humanos, las células del estroma son positivas para marcadores de colágenos I y III (Bentley y Foidart, 1980; Liesveld y cols., 1989) y estos constituyen la mayor parte de la matriz extracelular (Bentley y Foidart, 1980), la cual se ha indicado que contribuye al mantenimiento de la hematopoyesis en dichos cultivos (Dexter y cols., 1977; Bentley y Foidart, 1980; Allen, 1981; Dexter y cols., 1990; Hangoc y cols., 1993). Además, en peces también se ha implicado a la matriz extracelular en el mantenimiento del microambiente hematopoyético *in vivo* (Esteban y cols., 1989).

El patrón citoenzimático de las células reticulares presenta muy pocas variaciones con el descrito *in vivo* en la trucha arco iris (Castillo y cols., 1987; Razquin y cols., 1990; Castillo, 1991), el salmón atlántico (Press y cols., 1994) y la médula ósea de ave (Yoshida y Yumoto, 1987) y de mamíferos (Westen y Bainton, 1979). Estas diferencias se deben a que estos autores describen las células reticulares como ACPH y ANAE negativas y en nuestros cultivos las células reticulares son ACPH negativas o muy débilmente positivas y la actividad ANAE varía desde negativa hasta fuertemente positiva. Este relativamente distinto patrón ACPH y ANAE posiblemente esté inducido *in vitro*. La presencia de una actividad ACPH muy débil en las células reticulares del explante se confirma ultraestructuralmente por la observación de cuerpos residuales en estas células y puede estar relacionada con la existencia de cierta capacidad fagocítica o de heterofagia y la actividad ANAE podría estarlo con la acumulación de lípidos, que anteriormente se ha indicado en estas células, al igual que ocurre durante la diferenciación de los preadipocitos en mamíferos (Johnson y Greenwood, 1988). Además, *in vitro* otros autores han encontrado que las células de estroma de médula ósea, tanto de ratón como de humano, pueden presentar actividades fosfatasa ácida y esterasa (Bentley y Foidart, 1980; Liesveld y cols., 1989), lo cual hace que el patrón citoenzimático encontrado por nosotros sea igual al encontrado en cultivos de médula ósea.

Por otra parte, el hecho de que estas células presenten una moderada actividad AKPH, que en el pronefros y en la médula ósea se ha considerado un marcador de las células reticulares (Westen y Bainton, 1979, Castillo y cols., 1987; Yoshida y Yumoto, 1987;

Castillo, 1991; Press y cols., 1994), asemeja estas células a las descritas *in vivo*. Además, algunos autores han asociado esta actividad enzimática con la existencia de actividad granulopoyética (Wilson y cols., 1981; Gualtieri y cols., 1984; Broudy y cols., 1986; Liesveld y cols., 1989), lo cual implica que en nuestro caso esta actividad podría estar relacionada con la presencia de células linfohematopoyéticas en esta región.

Los macrófagos/melanomacrófagos presentes en la zona de transición del explante también pueden estar implicados en el mantenimiento de unas características funcionales similares a las del órgano *in vivo*, ya que los macrófagos se han asociado en la médula ósea con procesos granulopoyéticos (Dexter y cols., 1990), eritropoyéticos (Westen y Bainton, 1979; Allen y Dexter, 1984) y hematopoyéticos (Allen y Dexter, 1984; Rutherford y cols., 1993; Temeles y cols., 1993), tanto *in vivo* como *in vitro*.

En la zona de transición de los explantes también hemos observado la existencia de sinusoides. Las células endoteliales han sido ampliamente implicadas en la regulación de la hematopoyesis en vertebrados superiores tanto *in vivo* como *in vitro* (Quesenberry y Gimbrone, 1980; Allen y Dexter, 1984; Ascensao y cols., 1984; Bagby y cols., 1983; Zuckerman y cols., 1985; Irie y Tavassoli, 1986; Dorshkind, 1990; Shirota y Tavassoli, 1992). Parece posible, por lo tanto, que las células limitantes sinusoidales observadas en el explante, aunque presenten un aspecto degenerado a los 20 días de cultivo, puedan estar o haber estado relacionadas con el mantenimiento de las células linfohematopoyéticas.

La presencia de leucocitos y blastos en los explantes puede apoyar la hipótesis de la existencia de un microambiente que posibilite tanto el mantenimiento de células linfohematopoyéticas como la maduración de células precursoras, que junto con el mantenimiento del entramado reticular AKPH positivo y de los sinusoides, asemeja morfológica y funcionalmente la zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento con el órgano *in vivo*, ya que mantiene las características de éste.

Por otra parte, el borde de crecimiento y la monocapa de nuestros cultivos están formados principalmente por células de aspecto reticular, ultraestructuralmente idénticas a las de la zona de transición, de morfología epiteliode y fibroblastoide y también se han identificado melanomacrófagos y células gigantes multinucleadas.

En las monocapas de cultivos de estroma de médula ósea y de pronefros se ha descrito

la presencia, aparte de macrófagos, fibroblastos y células adiposas, de células epitelioides, "blanket" o endoteliales (Yoshida y Yumoto, 1987; Tavassoli, 1982; Tavassoli y Takahasi, 1982), fibroblásticas (fibroblastoides) y/o reticulares (Bentley, 1982; Bentley y Tralka, 1982; Van den Heuvel y cols., 1991) o de ambas poblaciones (Hocking y Golde, 1980; Bentley y Foidart, 1980; Allen, 1981; Xu y cols., 1983; Diago, 1990; Hasthorpe y cols., 1992; Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993). Cada una de estas poblaciones no es homogénea, ya que la clasificación depende de los criterios propios del autor y en muchos casos comparten características morfológicas, ultraestructurales y citoenzimáticas comunes. Dorshkind (1990) ha concluido que es conveniente referirse a las células de líneas celulares originadas a partir de estroma de médula ósea únicamente como células del estroma, ya que los criterios que se han empleado para clasificarlas son muy variados, y esta es la nomenclatura que otros autores también emplean en cultivos primarios (Coutinho y cols., 1993).

Tampoco hay un acuerdo acerca del origen de las células epitelioides en los cultivos de médula ósea: a) células endoteliales de los sinusoides (Allen, 1981); b) monocitos, de los que derivarían junto con macrófagos y las células gigantes multinucleadas (Weiss y Fawcett, 1953); c) una única célula precursora del estroma (Tavassoli y Takahasi, 1982).

Ultraestructuralmente las células epitelioides y fibroblastoides de nuestros cultivos son semejantes a las células reticulares fibroblásticas descritas en cultivos a largo plazo de pronefros (Diago, 1990; Diago y cols., 1993) y de médula ósea (Allen, 1981; Xu y cols., 1983). Además, su similitud con las células de aspecto reticular del explante apoyaría la hipótesis de la existencia de una única célula precursora del estroma o por lo menos confirmaría la posibilidad de que las células reticulares formen colonias epitelioides en cultivo (Yoshida y Yumoto, 1987). Otros autores (Bentley y Foidart, 1980) también han indicado que en los cultivos de médula ósea la distinción entre células epitelioides y fibroblastoides no está clara, tanto por criterios morfológicos, ya que aparecen estadios intermedios entre ambas formas, como por criterios inmunocitoquímicos, ya que encuentran células epitelioides positivas para los colágenos I y III.

Por otra parte, el hecho de que en nuestros explantes las células limitantes sinusoidales tengan un aspecto degenerado y que no se localicen células endoteliales en las monocapas, apoya la hipótesis de que tanto las células fibroblastoides como las epitelioides sean las mismas, máxime cuando es posible observar células con una morfología intermedia, y por lo

tanto, de origen reticular. Además, las células epitelioides descritas por otros autores en cultivos de pronefros de trucha (Diago, 1990; Diago y cols., 1993) se caracterizan por presentar núcleo eucromático, grandes vesículas asociadas al aparato de Golgi, gránulos y uniones estrechas, que nosotros no hemos encontrado ni en las células del borde de crecimiento ni de la monocapa. También apoya esta hipótesis que las células epitelioides de nuestros cultivos no presentan en su citoplasma gránulos electrodensos o de densidad variable característicos de las células limitantes sinusoidales *in vivo* (Álvarez, 1986; Castillo, 1991).

La ausencia de células de naturaleza endotelial en la monocapa de nuestros cultivos puede contribuir a explicar que no se hayan encontrado colonias hematopoyéticas, porque en mamíferos se ha indicado la necesidad de mantener la heterogeneidad celular de la médula ósea *in vitro* para obtener cultivos hematopoyéticos (Liesveld y cols., 1989), ya que los diferentes tipos de células del estroma tienen distintas funciones (Hangoc y cols., 1993). Además, en estudios previos de cultivo de pronefros de trucha arco iris se ha indicado la presencia de células de naturaleza endotelial en el estroma del cultivo y de colonias de mielopoyesis (Diago y cols., 1993) o hematopoyesis (Siegl y cols., 1993).

El perfil citoquímico de las células epitelioides y fibroblastoides también contribuye a apoyar la idea de que estas células constituyen un único tipo celular en las monocapas. El patrón queratina positivo de estas células, y también de las células reticulares del explante, se explica basándose en una inducción de la expresión de queratinas en cultivo, al igual que se ha discutido anteriormente en otros órganos. Además, se ha descrito la presencia de citoqueratinas en fibroblastos del tejido linfohematopoyético renal de la trucha arco iris (Markl y Franke, 1988). El hecho de que las células reticulares del explante también sean queratina positivas apoya la idea de que estas células son el origen de las epitelioides y fibroblastoides de las monocapas.

La fuerte tinción observada para el anticuerpo anti-S-100, tanto en las células de aspecto reticular del explante como en las epitelioides y fibroblastoides de la monocapa, posiblemente se deba a la inducción de la expresión de esta proteína en cultivo. Aunque se ha descrito reactividad para la proteína S-100 en preadipocitos (Cinti y cols., 1989), células epitelioides de granulomas bovinos (Momotani y cols., 1993) y en células gigantes de tejidos linfoides de cobayas (Atoji y cols., 1991), no podemos explicar la fuerte reactividad que encontramos en los cultivos, a no ser que esté relacionada con la presencia de actividad ANAE y de gotas de

grasa encontrada en las células en cultivo, que pueden asemejarlas a adipocitos.

El perfil citoenzimático de las células epitelioides y fibroblastoides de las monocapas es semejante al descrito para las células reticulares fibroblásticas de pronefros *in vitro* (Diago, 1990). La pérdida de la actividad AKPH en las células epitelioides y fibroblastoides con respecto a las reticulares del explante posiblemente sea consecuencia de su diferenciación en cultivo y contribuye a explicar la ausencia de hematopoyesis en las monocapas de nuestros cultivos, ya que aunque algunos autores no han encontrado una clara correlación de la actividad AKPH con actividad hematopoyética (Van den Heuvel y cols., 1991), la mayoría han asociado esta actividad enzimática con actividad granulopoyética (Wilson y cols., 1981; Gualtieri y cols., 1984; Broudy y cols., 1986; Liesveld y cols., 1989). La pérdida de la actividad AKPH en las células reticulares fibroblásticas de cultivos de pronefros ha sido descrita previamente (Diago, 1990) y se ha relacionado con la ausencia de eritropoyesis. La existencia en estas células de unas actividades ACPH y ANAE muy variables está de acuerdo con lo descrito en cultivos de médula ósea (Bentley y Foidart, 1980; Liesveld y cols., 1989).

El patrón ACPH y ANAE moderadamente positivo de las células redondeadas de la monocapa, junto con la ausencia de citoqueratinas, confirma que se trata de monocito/macrófagos. Aunque no hemos podido demostrar su presencia a microscopía electrónica, el hecho de que estas células estén presentes en los cultivos confirma resultados previos en peces (Diago y cols., 1993; Siegl y cols., 1993).

En nuestros cultivos hemos encontrado células gigantes multinucleadas, las cuales también han sido observadas anteriormente en cultivos primarios (Siegl y cols., 1993) y en líneas celulares (Diago y cols., 1995) de pronefros de trucha arco iris. El origen de estas células estaría en monocitos/macrófagos, habiéndose descrito tanto *in vivo* como *in vitro* en aves y mamíferos (Weiss y Fawcett, 1953; Sutton y Weiss, 1966; Weiss, 1981; Papadimitriou y Van Bruggen, 1986; Kreipe y cols., 1988) y en peces (Richards y cols., 1978; Secombes, 1985). Algunos autores han sugerido que las células epitelioides representan un estadio intermedio de maduración entre monocito y célula gigante multinucleada (Weiss y Fawcett, 1953; Weinberg y cols., 1984; McInnes y Rennick, 1988), y que la presencia *in vitro* de células epitelioides y macrófagos puede ser debida a una modulación de un único tipo celular (Tavassoli, 1982).

Las células gigantes multinucleadas presentan actividades ACPH y ANAE, que aunque son más débiles que las descritas por otros autores en mamíferos (Papadimitriou y Van Brugen, 1986; Kreipe y cols., 1988) pueden apoyar su origen monocítico. Por otra parte, las células gigantes descritas en la línea celular TPS (Diago y cols., 1995), aunque no presentan actividad ACPH sí que conservan la actividad ANAE.

De acuerdo con nuestros resultados, tanto la zona de transición de los explantes como la monocapa de los cultivos presentan características que las asimilan, respectivamente, al órgano *in vivo* y a los cultivos de pronefros de otros autores, por lo que parece que pueden constituir un modelo útil como aproximación *in vitro* al análisis funcional del pronefros.

BAZO

Los explantes de bazo mantienen su estructura histológica general durante los primeros días de cultivo, aunque progresivamente se inicia la aparición de necrosis en la zona interna y disminuye el número de células debido a su emigración hacia la periferia del explante. A los 20 d. de cultivo en el explante se diferencian tres zonas: a) una zona interna degenerada con células reticulares, algunos melanomacrófagos y restos celulares; b) una zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento que conserva los sinusoides con eritrocitos y trombocitos y un entramado de células reticulares y matriz extracelular que aloja diversos tipos celulares: monocitos, macrófagos/melanomacrófagos, linfocitos, células granulares eosinófilas, y c) el borde de crecimiento, formado por células epitelioides, fibroblastoides, macrófagos y melanomacrófagos.

En la zona interna del explante las células reticulares acumulaban gran cantidad de gotas lipídicas, llegando a asemejarse a células adiposas. La presencia de gotas lipídicas, que también hemos descrito en las células fibroblastoides y epitelioides de las monocapas, se ha indicado como una de las características de las células reticulares esplénicas del cobaya (Saito, 1977). En cultivos de médula ósea de mamíferos y de pronefros de peces también se ha descrito acumulación de lípidos en las células del estroma (Allen, 1981; Tavassoli, 1982; Tavassoli y Takahasi, 1982; Diago y cols., 1993) y, como ya se ha indicado en la discusión del pronefros, se ha relacionado con la capacidad hematopoyética de los cultivos. Por lo tanto es posible que en nuestros cultivos este tipo celular esté implicado en el mantenimiento de las células linfohematopoyéticas.

Las células reticulares del explante presentan las mismas características ultraestructurales que en el órgano *in vivo* (Álvarez, 1986; Castillo, 1991) y que las células reticulares esplénicas de mamíferos (Saito, 1977; Saitoh y Kamiyama, 1978; Blue y Weiss, 1981a; Saito y cols., 1988).

La presencia de fibras de colágeno entre el entramado celular también ha sido indicada en mamíferos (Saito, 1977) y en peces (Álvarez, 1986; Castillo, 1991), aunque el hecho de que no se observase reactividad contra los anticuerpos anti-colágeno I y III puede deberse a que la cantidad de colágeno es muy pequeña, lo cual está de acuerdo con la poca cantidad y el pequeño tamaño de los haces de fibras de colágeno observados a microscopía electrónica.

Las células reticulares del explante presentan una gran variedad en su electrodensidad existiendo además transición entre células electroclaras y electrodensas. Las diferencias de electrodensidad se han utilizado por algunos autores como un factor clasificador de las células reticulares esplénicas de elasmobranchios (Zapata, 1980), teleósteos (Álvarez, 1986; Castillo, 1991), anfibios anuros (Barrutia y cols., 1983) y roedores (Galindo e Imaeda, 1962). Otros autores han considerado un único tipo en teleósteos (Zapata, 1982; Fulop y McMillan, 1984), dejando patente la gran variedad de tamaño y forma que presentan en humanos (Saitoh y Kamiyama, 1978) y la existencia de variaciones en su electrodensidad observadas en felinos y atribuidas al distinto contenido en retículo endoplásmico rugoso (Blue y Weiss, 1981b). Por su morfología y características ultraestructurales las células reticulares del bazo de la trucha arco iris se han clasificado en dos tipos: trabeculares o de pulpa blanca y de pulpa roja (Castillo, 1991), pero nosotros no encontramos diferencias en la ultraestructura de las células de los explantes que nos permitan clasificarlas en tipos distintos.

El patrón citoenzimático de las células reticulares del explante es similar al descrito *in vivo* en salmónidos (Castillo y cols., 1987; Razquin y cols., 1990; Castillo, 1991; Press y cols., 1994), aunque no nos permite clasificar a las células reticulares en dos tipos distintos. Castillo (1991) ha utilizado el perfil citoenzimático como criterio diferenciador de las dos poblaciones de células reticulares: las de pulpa roja son ACPH y ANAE positivas y las de pulpa blanca exclusivamente AKPH positivas. En nuestro caso las células reticulares del explante son positivas para las tres actividades enzimáticas estudiadas y ultraestructuralmente similares, lo cual implica cambios inducidos *in vitro* en la electrodensidad y en la expresión de las actividades enzimáticas y nos hace suponer que su diferente fenotipo *in vivo* esta

inducido por el distinto microambiente esplénico -pulpa roja y pulpa blanca- en el que se encuentran. Posiblemente debido a que las diferencias entre pulpa blanca y roja se pierden en cultivo se está modificando el fenotipo de las células reticulares.

En la zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento del explante se mantiene un microambiente que asemeja esta región al órgano *in vivo*, ya que se mantiene una estructura y una variedad de tipos celulares que son parcialmente asimilables a los del bazo de la trucha arco iris.

En el borde de crecimiento y en la monocapa la variedad de tipos celulares presentes en la zona de transición se pierde, observándose únicamente células epitelioides, fibroblastoides, macrófagos/melanomacrófagos y células gigantes multinucleadas, estas últimas exclusivamente en la monocapa. Las células fibroblastoides y las gigantes multinucleadas solo se han identificado a microscopía óptica posiblemente debido a su escaso número. Las células gigantes multinucleadas se originarían a partir de monocitos/macrófagos, como ha sido previamente descrito, tanto *in vivo* como *in vitro*, en aves y mamíferos (Weiss y Fawcett, 1953; Sutton y Weiss, 1966; Papadimitriou y Van Bruggen, 1986; Kreipe y cols., 1988) y en peces (Richards y cols., 1978; Secombes, 1985). Citoenzimáticamente hemos descrito que las células gigantes multinucleadas son ANAE fuertemente positivas, lo cual puede apoyar su origen a partir de la fusión de macrófagos, que también presentan esta actividad.

Por sus características ultraestructurales, aunque no por su forma, las células epitelioides se asemejan a las células reticulares del explante. Por el contrario, creemos que las células epitelioides no pueden asemejarse a las células endoteliales esplénicas porque no presentan gránulos de moderada densidad electrónica ni retículo endoplásmico liso que caracterizan a las células limitantes sinusoidales esplénicas de la trucha arco iris (Álvarez, 1986; Castillo, 1991). Además, en mamíferos se ha descrito que estas células presentan el citoplasma lleno de pequeños haces de filamentos dispuestos al azar (Blue y Weiss, 1981a; Hatae, 1978), vesículas de micropinocitosis (Hatae, 1978; Saitoh y Kamiyama, 1978) y poco desarrollo del aparato de Golgi (Saito y cols., 1988), características que no definen a las células de nuestras monocapas.

Es posible que la morfología epitelioides/fibroblastoides no corresponda a distintos tipos celulares, sino que sea debida a que las células de naturaleza reticular presentan una

morfología variable *in vitro*, al igual que ocurría en los cultivos de pronefros. Esta hipótesis también se ve apoyada por el patrón citoquímico, ya que es igual en las células epitelioides y en las fibroblastoides. Además, la actividad ANAE es característica de las células reticulares de la pulpa roja de la trucha arco iris (Castillo, 1991) y esta autora ha implicado a este tipo celular en el mantenimiento de la hematopoyesis esplénica, lo cual puede explicar que las células epitelioides y fibroblastoides estén relacionadas con el desarrollo de colonias hematopoyética en los cultivos primarios a largo plazo.

El patrón de marcaje para el anticuerpo anti-S-100 indica que en cultivo hay una inducción de la expresión de esta proteína. La proteína S-100 se ha detectado en nódulos linfoides y bazo de mamíferos en células dendríticas foliculares, células interdigitantes, macrófagos gigantes y de cuerpos tingibles, células endoteliales y células reticulares (Takahasi y cols., 1981; Iwanaga y cols., 1982; Cochia y cols., 1983; Carbone y cols., 1985; Haimoto y cols., 1987, Sugimura y cols., 1987). Esta variedad en su expresión y el hecho de que no encontramos marcaje en los explantes no nos permite asimilar las células de las monocapas a ningún tipo celular concreto basándonos en el marcaje de este anticuerpo.

Las células reticulares de los explantes son citoqueratina negativas, aun cuando en el bazo de la trucha arco iris *in vivo* se observa marcaje en algunas células reticulares para todos los anticuerpos anti-queratina empleados en este estudio (resultados no mostrados). La aparición de marcaje para los anticuerpos anti-queratina en las monocapas de los cultivos primarios y de los subcultivos indica una inducción de la síntesis de queratinas en las células en cultivo, al igual que se ha discutido anteriormente para otros órganos, y contribuye, en parte, a asimilarlas a células reticulares esplénicas *in vivo*.

En los cultivos a largo plazo la monocapa es capaz de soportar el desarrollo de colonias hematopoyéticas posiblemente a partir de precursores que se mantienen en el explante y emigran a la monocapa. Esto sugiere que además de la similitud ultraestructural indicada anteriormente de las células epitelioides con las células reticulares esplénicas, también hay una semejanza funcional ya que, *in vivo*, estas células están implicadas en el mantenimiento de la hematopoyesis esplénica (Castillo, 1991).

Siegl y cols. (1993) en cultivos a partir de suspensiones celulares de bazo de trucha obtiene una monocapa multilaminar de estroma -células fibroblastoides- que contiene células

gigantes multinucleadas, adipocitos y macro- y micro-colonias de células redondeadas. Aunque nosotros no hemos apreciado la existencia de adipocitos propiamente dichos, sí que hemos observado gotas lipídicas en las células de las monocapas. Por otra parte, aunque la mayoría de las células del estroma de nuestros cultivos son epitelioides, la presencia de colonias hematopoyéticas contribuye a que el aspecto general de los cultivos sea similar al de los de los autores anteriormente citados.

En los elasmobranchios el bazo es considerado el principal órgano hematopoyético (Zapata, 1980, Fänge y Mattisson, 1981; Fänge y Nilsson, 1985), aunque en los teleósteos se ha indicado que es el pronefros (Fänge y Nilsson, 1985; Castillo, 1991). El tejido linfoide esplénico no está muy desarrollado en los teleósteos y casi la totalidad del bazo está ocupada por pulpa roja (Zapata y Cooper, 1990). Sin embargo, el bazo de la trucha arco iris presenta eritropoyesis, granulopoyesis y posiblemente monocito- y linfopoyesis (Grace y Manning, 1980; Castillo, 1991). La presencia de colonias hematopoyéticas en nuestros cultivos contribuye a asemejarlos funcionalmente al bazo *in vivo*.

En los subcultivos el único tipo celular que se encuentra a microscopía electrónica es el epiteliode, aunque a microscopía óptica también se han identificado células fibroblastoides. Aunque la mayoría de las células presentan forma epiteliode, es posible que las células fibroblastoides no sean un tipo celular distinto, sino que según el estado de diferenciación las células adopten una forma u otra. La existencia de un único tipo celular está apoyada por el hecho de que todas las células de los subcultivos presentan el mismo perfil citoquímico.

La detección citoquímica de gotas lipídicas en las células subcultivadas confirma los resultados ultraestructurales, pudiendo apoyar el origen reticular de estas células, ya que la presencia de lípidos ha sido descrita en las células reticulares esplénicas (Saito, 1977) y nosotros las hemos observado en las células de naturaleza reticular del explante y de las monocapas de los cultivos primarios.

El hecho de que un pequeño número de células presenten actividad fagocítica en cultivo puede relacionarse con su origen reticular, ya que la presencia de fagosomas ha sido descrita en las células reticulares esplénicas (Saito, 1977; Saitoh y Kamiyama, 1978) y en las células de naturaleza reticular de nuestros cultivos primarios, tanto del explante como de la monocapa, es frecuente la presencia de cuerpos residuales.

CULTIVOS INFECTADOS

La importancia que tienen los modelos *in vitro* para el estudio de infecciones, como una forma de aproximación simplificada, pero fácilmente manipulable y exenta de variaciones externas ha sido repetidamente señalada. En este trabajo, tras establecer unos modelos de cultivo *in vitro* de órganos linfoides y epiteliales de trucha y caracterizarlos, hemos abordado el estudio de su infección con *R. salmoninarum* tratando de comprobar su validez para el estudio de los mecanismos patogénicos y de complementar los resultados obtenidos *in vivo* con anterioridad en nuestro laboratorio (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996).

El hecho de que en las infecciones realizadas *in vitro* no hayamos obtenido diferencias ni en la cantidad de marcaje ni en su localización dentro del mismo grupo de muestras (misma cepa bacteriana, órgano y fecha de recogida de los cultivos) indica que la progresión de las infecciones *in vitro* ha sido similar. Estos resultados contrastan con los de las experiencias *in vivo*, ya que existe una gran variabilidad de respuestas que en parte se han atribuido a que los peces se encuentran en situaciones de estrés (Anderson, 1990), a la inexistencia de líneas de peces homogéneas o singénicas y a la falta de unas condiciones estandarizadas de mantenimiento de los peces. En mamíferos los cultivos de órganos se han considerado un modelo útil (McGee y Woods, 1987) y esto también parece aplicable a nuestro caso, ya que las variaciones dependientes de cada pez y de factores externos parecen haberse evitado.

Para analizar la progresión de la infección *in vitro* hemos utilizado el marcaje de la proteína p57, que es el principal producto extracelular y antígeno de superficie de *R. salmoninarum* (Turaga y cols., 1987a; Evenden y cols., 1993). El marcaje detectado en los cultivos infectados *in vitro* con la cepa FT10 es más abundante que en los infectados con la cepa ATCC 33209, lo cual está de acuerdo con la mayor virulencia atribuida a la cepa FT10 *in vivo*. En los explantes infectados con la cepa ATCC 33209, aparte de aparecer una cantidad de marcaje menor, este es generalmente difuso; por el contrario al utilizar la cepa FT10 el marcaje no solo es más abundante sino mayoritariamente granular, aunque en algunas zonas también es difuso. Consideramos que el marcaje difuso está asociado con la presencia de productos extracelulares y que el marcaje granular está indicando la presencia de la bacteria, por lo tanto en los explantes infectados con la cepa FT10 no solo hay una mayor cantidad de bacterias sino también de p57. Estos resultados indican que la infección es más intensa que con la otra cepa, ya que *in vivo* se ha asociado el incremento de p57 en el suero de peces

infectados con la progresión de la infección (Turaga y cols., 1987a y b).

La producción de una infección más aguda por parte de la cepa FT10 se ve apoyada por el hecho de que con la cepa ATCC 33209 no aparece marcaje en el tegumento y en la branquia y en el bazo es casi exclusivamente difuso, lo cual indica que la presencia de p57 es debida a la lisis de las bacterias y no a una liberación continuada de productos extracelulares, ya que no se detecta la presencia de bacterias en ellos. Estos datos, junto con la mayor virulencia *in vivo* de la cepa FT10, han determinado que sea la utilizada para el análisis ultraestructural de la infección en los cultivos, resultados que se discutirán antes de analizar los obtenidos con cultivos procedentes de peces infectados.

El tegumento en las infecciones *in vitro* presenta un grado de infección nulo o muy bajo y además con una progresión muy lenta, ya que solo encontramos bacterias utilizando la cepa FT10 y exclusivamente en los dos últimos estadios estudiados. A microscopía electrónica solo hemos encontrado bacterias en los fibroblastos, lo cual nos hace suponer que el número de células epidérmicas infectadas es muy limitado y/o que estas degeneran muy rápidamente. La ausencia de bacterias y de cambios en las células de la monocapa parece validar la primera hipótesis. En el caso de la branquia, con la cepa ATCC solo encontramos marcaje granular a 1 h.p.i.; por lo tanto la infección *in vitro* no progresa; por el contrario, utilizando la cepa, FT10 la infección es moderada, afectando a las células de naturaleza mesenquimatosa del explante y a las células de la monocapa.

Estos resultados están de acuerdo con datos previos, procedentes de infecciones naturales, que ponen de manifiesto que tanto las branquias como la piel no presentan un elevado grado de infección con *R. salmoninarum*. Wood y Yasutake (1956) describen que únicamente en la fase terminal de la BKD aparece una reacción inflamatoria en las branquias y que la bacteria no llega a penetrar en la epidermis; únicamente en un caso atípico de BKD se ha indicado la existencia de infección vía tegumento (Hoffman y cols., 1984).

Respecto a los órganos linfo-hematopoyéticos estudiados, ambos presentan semejanzas en cuanto a la progresión de las infecciones *in vitro*. El pronefros presenta la mayor parte de las bacterias localizadas en el borde de crecimiento y también en la zona de transición, existiendo un marcaje más abundante con la cepa FT10. En el bazo las bacterias se encuentran más ampliamente distribuidas y además, con la cepa FT10, se observa que la

infección progresa desde la periferia del explante hacia la zona interna a lo largo del tiempo en cultivo. El mayor grado de infección observado en estos cultivos está de acuerdo con los datos histopatológicos, que indican que *in vivo* el riñón y el bazo, junto con el hígado, son los órganos más severamente afectados por la BKD (Wood y Yasutake, 1956; Young y Chapman, 1978; Klontz, 1983; Bruno, 1986b; Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996).

El escaso grado de infección que hemos obtenido *in vitro* con la cepa ATCC 33209, junto con los datos que indican que *R. salmoninarum* sufre alteraciones, durante el subcultivo en medios microbiológicos, tales como la pérdida de actividad hemolítica y de hidrofobicidad (Bell y cols., 1988; Bruno, 1988; Bandín y cols., 1989), nos hacen suponer que esta cepa, que está absolutamente adaptada al cultivo en medios microbiológicos, no parece la más adecuada para estudios patológicos, aunque se realice previamente un pase *in vivo* para mejorar su virulencia.

En cuanto a los tipos celulares susceptibles de ser infectados por *R. salmoninarum*, hemos descrito la presencia de bacterias o de gran cantidad de restos electrodensos que posiblemente correspondan a restos bacterianos en células epiteliales, melanóforos, fibroblastos, células reticulares, células epitelioides y células fibroblastoides. Esto indica que *R. salmoninarum* no solo es capaz de internalizarse, sobrevivir y multiplicarse en las células fagocíticas de huésped (Young y Chapman, 1978; Bruno, 1986b) sino también en otros tipos celulares, en concordancia con resultados previos que demuestran que *in vivo* la bacteria también se localiza en células fagocíticas no profesionales (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996).

Con respecto a los subcultivos, el hecho de que *R. salmoninarum* sea reaislada tanto de los sobrenadantes como de las células y que su localización intracelular haya sido demostrada mediante inmunomarcaje durante sucesivos pases, confirma que la bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse en dichas células. El ambiente *in vivo* influencia los determinantes de patogenicidad (Smith, 1990) y dada la inestabilidad de *R. salmoninarum* en los cultivos microbiológicos, se ha sugerido la necesidad de nuevos sistemas de cultivo (Evensen y cols., 1993). La utilización de cultivos celulares infectados parece ser la solución más simple para obtener modelos que representen mejor los factores producidos por la bacteria *in vivo* y reaislar bacterias con alta capacidad infectiva. También pueden suponer un modelo útil para el estudio de la patogenia de la BKD, tanto desde el punto de vista de la influencia del ambiente celular en la bacteria como del análisis de los mecanismos de fagocitosis, evasión

de los mecanismos de defensa celulares e influencia de múltiples factores en la relación huésped-patógeno; aún más cuando los subcultivos suponen un buen modelo para el establecimiento de infecciones crónicas que siempre se asemejarán más al curso de la BKD.

Aparte de la infección de distintos tipos celulares por *R. salmoninarum*, es importante resaltar la existencia de cambios que afectan a otros componentes celulares de los cultivos infectados, como son las EGCs y las células linfo-hematopoyéticas.

Los explantes de branquia infectados *in vitro* se caracterizan por un incremento en el número de EGCs. Esto se podría correlacionar con que en los peces con BKD se ha descrito la existencia de una respuesta inflamatoria (Wood y Yasutake, 1956; Young y Chapman, 1978; Bruno, 1986b), una inflamación eosinofílica en el tracto digestivo (Wood y Yasutake, 1956) y un proceso inflamatorio con numerosas células con gránulos eosinófilos y núcleo excéntrico (Klontz, 1983). La función de las EGCs es prácticamente desconocida, sin embargo se ha implicado a las EGCs presentes en el intestino de la trucha arco iris en mecanismos de defensa inmunitaria (Ezeasor y Stokoe, 1980) y se ha establecido una cierta homología entre este tipo celular y las células cebadas de mamíferos (Ezeasor y Stokoe, 1980; Ellis, 1977, 1985; Vallejo y Ellis, 1989; Powell y cols., 1990, 1993).

Por otra parte, nuestro estudio revela la utilidad de los cultivos celulares de peces para obtener información adicional acerca de los mecanismos defensivos. En los explantes de branquia infectados *in vitro* hemos observado diversas fases de diferenciación de las EGCs. La fase más inmadura identificada por nosotros se caracteriza por presentar un retículo endoplásmico rugoso poco desarrollado y cuerpos multivesiculares similares a los descritos *in vivo* en peces (Vallejo y Ellis, 1989; Powell y cols., 1993) e *in vitro* en células cebadas cocultivadas con fibroblastos 3T3 (Ishizaka y cols., 1993). Los estadios de diferenciación más avanzados se caracterizan por la presencia de una población heterogénea de gránulos, retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi desarrollado que presenta pequeñas vesículas con gránulos electrodensos apuestas a las cisternas. La estructura de las EGCs maduras, con gran desarrollo de los orgánulos anteriormente citados, y su proceso de desgranulación son similares a los descritos *in vivo* (Roberts y cols., 1971; Ezeasor y Stokoe, 1980; Vallejo y Ellis, 1989; Powell y cols., 1993).

No están claros los mecanismos responsables de la diferenciación y desgranulación de

las EGCs en nuestros cultivos. Aunque *R. salmoninarum* puede posibilitar este proceso, parece ser más bien debido a un mecanismo indirecto o mediado por sus productos extracelulares, ya que a 2 s.p.i. no se han encontrado bacterias, pero sí abundante marcaje difuso debido a la presencia de p57 en los explantes. Aun así, no parece factible una acumulación de p57 en el medio debido a su renovación semanal. Es posible que la diferenciación de las EGCs en los explantes esté bajo el control de interacciones celulares o, de citoquinas y/o de factores de crecimiento, al igual que se ha descrito para las células cebadas de mamíferos (Ishizaka y cols., 1993). La estrecha aposición encontrada entre las EGCs y los fibroblastos del explante se asemeja a la ya descrita *in vivo* (Ezeasor y Stokoe, 1980; Powell y cols., 1990), que ha sido atribuida a interacciones incidentales debidas al denso microambiente conectivo en el que se localizan las EGCs (Vallejo y Ellis, 1989). Este no es el caso en cultivo, ya que se observan grandes espacios en el tejido conjuntivo. Además, se ha descrito una asociación de fibroblastos y EGCs en una extraña proliferación de EGCs encontrada en *Oncorhynchus mykiss* (Kent y cols., 1993) y, esta asociación en cultivo es similar a la que ocurre con los fibroblastos 3T3 durante la diferenciación de las células cebadas *in vitro* (Ishizaka y cols., 1993).

El origen de las EGCs *in vivo* no ha sido demostrado, aunque se ha sugerido que su diferenciación tiene lugar en ciertos órganos no identificados y que por la circulación sanguínea alcanzan los distintos órganos diana (Bergeron y Woodward, 1983; Powell y cols., 1991; Lamas y cols., 1991). Sin embargo las EGCs no se encuentran habitualmente en la circulación (Blaxhall y Daisley, 1973), aunque se han descrito EGCs circulantes tras la inyección intra-peritoneal de *Vibrio anguillarum* (Lamas y cols., 1991). Los explantes en cultivo no pueden ser colonizados por EGCs circulantes, las cuales deben diferenciarse *in vitro* en el tejido conectivo a partir de precursores. *In vivo* estos precursores podrían formarse en el pronefros y el bazo, como han sugerido algunos autores (Campbell y Murru, 1990), y llegarían a los órganos diana por la circulación sanguínea como células inmaduras sin gránulos, al igual que se ha demostrado en las células cebadas de mamíferos (Kirshenbaum y cols., 1991).

Otro de los cambios destacables inducidos por la infección *in vitro* es la existencia de células hematopoyéticas y blastos en los cultivos de bazo infectados con la cepa FT10. Este hecho podría relacionarse con la aparición de células inmaduras en peces infectados

experimentalmente con *R. salmoninarum*, ya que se ha observado una temprana y continuada aparición de eritroblastos y un incremento en el número de monocitos en la circulación sanguínea (Bruno y Munro, 1986) y se ha descrito la aparición de focos plasmacitopoyéticos en el tejido linfohematopoyético esplénico y renal (Flaño, 1992; Flaño y cols, 1996). Aunque se han atribuido *in vitro* a los productos extracelulares de *R. salmoninarum* efecto inmunosupresor (Turaga y cols., 1987b) y actividad hemolítica (Bruno y Munro, 1986; Evenden y cols., 1990), estos efectos son superados posiblemente por la producción de citoquinas y/o factores de crecimiento, que hagan posible la aparición de células sanguíneas inmaduras en los explantes infectados.

La presencia de bacterias intactas y en división, dentro de vesículas en las células en cultivo, hace suponer que *R. salmoninarum* inicialmente no sale al citoplasma, sino que modifica las funciones de estos compartimentos, al igual que ocurre con otros patógenos intracelulares -*Salmonella*, *Mycobacterium*, *Leishmania* y *Toxoplasma*- (Harding, 1995), lo que le permite sobrevivir y multiplicarse al evitar los mecanismos microbicidas.

Con respecto a la internalización de *R. salmoninarum* en las células del huésped, se ha demostrado que esta bacteria es capaz de unirse *in vitro* a la fracción C3b del complemento (Rose y Levine, 1992). *In vivo*, esta unión, seguida por la adhesión al receptor de C3b (C3R) de la membrana de los macrófagos, facilitaría la internalización de la bacteria mediante un mecanismo de fagocitosis mediada por receptores (Evenden y cols., 1993). Sin embargo la fagocitosis mediada por C3R solo ocurre en células activadas por mediadores de la inflamación o proteínas de la matriz extracelular (Greenberg, 1995). Este mecanismo es la ruta principal de internalización de otros patógenos intracelulares, *Legionella pneumophila* (Horwitz, 1988) y *Mycobacterium leprae* (Schlesinger y Horwitz, 1991) y se ha indicado que tiene la ventaja de que evita la exposición de la bacteria a aniones superóxido (Wright y Silverstein, 1983; Kaufmann, 1993). Aunque pueden ocurrir otras formas de internalización durante la infección con *R. salmoninarum*, no han sido estudiadas (Evenden y cols., 1993). Se ha sugerido que la hidrofobicidad de la superficie de *Renibacterium salmoninarum* puede favorecer su unión a los tejidos del hospedador (Daly y Stevenson, 1987; Bruno, 1988; Dubreuil y cols., 1990) y puede ser una de las causas de su adhesividad a macrófagos en ausencia de suero (Rose y Levine, 1992). También se ha sugerido que la actividad leucoaglutinante de p57 puede contribuir a su adherencia a los tejidos del hospedador (Wiens y Kaattari, 1991).

Además de los macrófagos y melanomacrófagos, otras células, que se clasifican como fagocíticas no profesionales, alojan a *R. salmoninarum* en nuestros cultivos. Aunque la fagocitosis en las células fagocíticas no profesionales se produce normalmente por un mecanismo de disparo, no ligado a receptores (Swanson y Baer, 1995), el hecho de que en nuestros cultivos las bacterias fagocitadas se localicen frecuentemente rodeadas de membranas en figuras de mielina, forma de fagocitosis encontrada en monocitos infectados con *Legionella pneumophila* y considerada una variación del modelo de cremallera (Swanson y Baer, 1995), para el cual es necesaria una interacción continuada entre opsoninas y receptores, hace suponer que *Renibacterium salmoninarum* utiliza otros receptores además del C3R para su internalización, ya que este receptor solo se presenta en fagocitos y algunos linfocitos de mamíferos (Brown, 1991). Se ha sugerido que la fagocitosis mediada por receptores en las células fagocíticas no profesionales está mediada por receptores de laminina o fibronectina o por heparán sulfatos dispuestos en la superficie celular (Rabinovitch, 1995), o por invasinas producidas por la bacteria que son reconocidas por integrinas de la superficie celular, como es el caso de *Yersinia* sp., cuya internalización recuerda a la fagocitosis de partículas mediada por el complemento (Isberg y Van Nhiev, 1995), mecanismos que deben ser tenidos en cuenta en futuros estudios de internalización de *R. salmoninarum*.

La infección de células fagocíticas no profesionales por *R. salmoninarum* no debe ser infravalorada, ya que pueden constituir un reservorio del patógeno. Se ha demostrado que esta bacteria primero penetra en las células endoteliales de los sinusoides, como paso previo a su internalización en otras células del estroma (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996). La ruta de infección de este patógeno parece ser similar a la descrita para *Listeria monocytogenes*, que primero penetra en las células endoteliales expuestas a la bacteria y luego es fagocitada por los macrófagos (Gaillard y cols., 1991).

Una vez establecidos unos modelos de infección *in vitro* para *R. salmoninarum* hemos intentado compararlos con cultivos a partir de peces infectados experimentalmente, en un intento de aproximarnos más al modelo *in vivo*. Los cultivos se establecieron a partir de peces a 15 y 42 d.p.i., ya que en estudios histopatológicos en el salmón del Pacífico (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996) estas fechas corresponden a un estadio de la infección inicial y avanzado, y en nuestras truchas infectadas ya eran evidentes síntomas de la BKD a los 42 d.p.i.

La mayor cantidad de marcaje obtenido en los cultivos procedentes de peces infectados con la cepa FT10 corrobora de nuevo su mayor virulencia y, al igual que se ha discutido anteriormente en las infecciones *in vitro*, los cultivos de bazo y de pronefros son los que presentan un grado de infección más elevado. Aun así, en los cultivos de tegumento y de branquia se observa marcaje débil o moderado, tanto granular como difuso. Aunque se ha descrito que las características histopatológicas de los peces infectados natural o experimentalmente son similares (Young y Chapman, 1978; Bruno, 1986b), no hay datos en el caso del tegumento y las branquias y es en estos órganos donde la ruta de la infección puede ser totalmente distinta. En los peces infectados experimentalmente la infección llega a estos órganos por vía sistémica y en el caso de las infecciones naturales existe la posibilidad de una infección direccional a través de las barreras mucosas. Aun así en experimentos de captación de *R. salmoninarum* utilizando *in vitro* porciones del arco branquial y branquias profundadas y de peces vivos no se produce internalización de la bacteria (resultados no mostrados) y está demostrado en infecciones experimentales que *R. salmoninarum* no atraviesa el epitelio tímico (Flaño, 1992) y que en infecciones naturales no penetra en la epidermis (Wood y Yasutake, 1956), por lo que parece difícil que esta bacteria atraviese los epitelios de la branquia y del tegumento si estos se encuentran intactos.

No se conoce el mecanismo de transmisión horizontal de *R. salmoninarum* (Fryer y Lannan, 1993), pero si tanto la branquia como la epidermis parecen difícilmente susceptibles a la infección tanto por los resultados obtenidos de infecciones *in vitro*, discutidos anteriormente, como de cultivos de explantes de peces infectados, la ruta más probable para que la bacteria penetre en el pez es la mucosa digestiva o bien es necesaria la existencia de lesiones en los epitelios del pez.

Existen datos que pueden apoyar estas hipótesis ya que se ha demostrado que existe transmisión directa de la enfermedad al alimentar los peces con carne o vísceras infectadas (Wood y Wallis, 1955; Wedemeyer y Ross, 1973). Además, se ha reaislado *R. salmoninarum* de las heces de peces infectados (Bullock y cols., 1980) y se ha comprobado que la supervivencia de esta bacteria en sedimentos y heces recogidos en agua dulce llega a alcanzar 21 días y sin embargo no se detecta su presencia en el agua que contiene dicha materia orgánica (Austin y Rayment, 1985). Se ha propuesto que *R. salmoninarum* puede formar parte de la flora del tracto digestivo (Austin, 1986), aunque esta hipótesis no ha sido confirmada, y

a partir de ahí internalizarse en el pez (Austin y Austin, 1993). Además, en mamíferos la mucosa intestinal es la vía de entrada de buena parte de las bacterias intracelulares -*L. monocytogenes*, *S. typhi*, *L. pneumophila*- (Kaufmann, 1993).

La necesidad de lesiones epiteliales para el inicio de la infección podría explicar la evolución estacional y la relación con el estrés de la incidencia de la BKD (Paterson y cols., 1981; Richards y Roberts, 1981; Wedemeyer y McLeay, 1981; Munro y Bruno., 1988). Así, numerosas condiciones que producen estrés (esmolificación, maduración sexual, migración, manejo) están acompañadas por una elevación sérica de los niveles de cortisol (Wedemeyer y McLeay, 1981; Donaldson, 1981). En peces, las concentraciones elevadas de esta hormona se han relacionado con estados de inmunosupresión (Ellis, 1981; Pickering y Pottinger, 1985; Maule y cols., 1989; Anderson, 1990) que facilitarían el desarrollo de la enfermedad, pero también con alteraciones histológicas del tracto gastrointestinal (Robertson y Wexler, 1960) y cambios en la flora intestinal (Lessel, 1981), que pueden favorecer la alteración de la barrera que el epitelio gastrointestinal representaría para *R. salmoninarum*.

Por otra parte, que los cultivos procedentes de explantes de peces infectados recogidos en la misma fecha presentasen variaciones en el marcaje, indica que el distinto grado de infección en cada pez se refleja *in vitro*. Además, no se han encontrado diferencias en el marcaje en las muestras recogidas a distintas fechas (1 a 4 semanas) dentro del mismo grupo post-infección, lo cual supone que la infección no progresa *in vitro* a lo largo del tiempo a partir de muestras infectadas *in vivo*. Esto puede ser debido a que la bacteria tiene que volver a adaptarse a unas condiciones adversas *in vitro*, ya que por una parte el medio de cultivo está diseñado para las células del pez y por otra parte, contiene gentamicina, con lo cual es posible que *R. salmoninarum* vuelva a un estado latente similar al que presenta durante la fase crónica de la BKD o que degenera en el medio de cultivo, en el cual su supervivencia es limitada (1 semana, comunicación personal del Dr. McIntosh).

El marcaje en los explantes fue moderado en los procedentes de peces a los 15 d.p.i. y prácticamente nulo en los de 42 d.p.i., observándose sin embargo de forma habitual en las monocapas. El bajo grado de infección en los explantes procedentes de peces altamente infectados podría deberse a que los reservorios celulares de la bacteria estarían muy disminuidos, ya que el estroma de los órganos linfo-hematopoyéticos de los peces con un elevado grado de infección se encuentra degenerado (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996). Estos

datos explicarían que el marcaje se localice básicamente en las monocapas, a donde migrarían las células que no estuvieran dañadas como resultado de la infección *in vivo*, y esta sería la única parte del cultivo en la que se encontraría una amplia población celular susceptible de ser infectada por las bacterias liberadas del explante. En este sentido, se debe tener en cuenta que los macrófagos/melanomacrófagos, que constituyen la localización principal de *R. salmoninarum in vivo* (Young y Chapman, 1978; Bruno, 1986b), en cultivo migran muchos de ellos a la periferia del explante y al pocillo. Además, las células limitantes sinusoidales, que son la primeras en ser infectadas por la bacteria *in vivo* (Flaño, 1992; Flaño y cols., 1996), degeneran rápidamente en los explantes, tal y como se ha indicado en los cultivos sin infectar. Por lo tanto, la mayor parte de las bacterias deben degradarse en el medio o infectar las células que están proliferando en el cultivo.

Parece por lo tanto que el establecimiento de cultivos de órganos procedentes de peces infectados con *R. salmoninarum* podría ser útil bien como una forma de diagnóstico de portadores asintomáticos, ya que *in vitro* se amplifican los reservorios celulares del patógeno, o bien para el estudio de las condiciones que requiere la bacteria para permanecer latente o expresar su virulencia, aunque previamente sería necesario poner a punto medios de cultivo que favorecieran estos procesos.

CONCLUSIONES

1.- Utilizando la metodología desarrollada en este trabajo hemos podido establecer y mantener en cultivo, durante largo tiempo, explantes de tegumento, branquia, pronefros y bazo de trucha arco iris. Además, hemos obtenido subcultivos de branquia y de bazo.

2.- En todos los órganos, los cultivos primarios están constituidos por el explante y por una monocapa derivada del anterior. Utilizando técnicas de fenotipación, hemos demostrado que estos cultivos contienen una heterogeneidad celular que se asemeja a la encontrada en los respectivos órganos. Sin embargo, los subcultivos de branquia están constituidos por una población celular homogénea de células epiteliales, mientras que los de bazo están formados únicamente por células reticulares.

3.- Hemos desarrollado una técnica que permite la infección de los cultivos con *Renibacterium salmoninarum*. La progresión de la infección *in vitro* se correlaciona con el grado de virulencia de las cepas bacterianas empleadas. Esta infección persiste de forma crónica en los subcultivos establecidos a partir de branquia y de bazo.

4.- El análisis estructural e inmunocitoquímico de los cultivos infectados revela que *Renibacterium salmoninarum* infecta fundamentalmente a los tipos celulares que se han implicado en la infección *in vivo* y que progresa por multiplicación intracelular.

5.- En los cultivos infectados se producen cambios que probablemente no están mediados directamente por *Renibacterium salmoninarum*, sino a través de las redes de citoquinas desplegadas en el curso de la respuesta al patógeno. Los más destacables son el incremento del número de células granulares eosinófilas en los explantes de branquia y la aparición en los explantes de bazo de células hematopoyéticas inmaduras.

6.- El modelo de infección *in vitro* nos ha permitido describir el proceso de maduración de las células granulares eosinófilas, demostrando que este tipo celular es capaz de diferenciarse en el tejido conjuntivo. Nuestros datos estructurales sugieren que estas células se diferencian en estrecha correlación con los fibroblastos, como se ha indicado para las células cebadas del tejido conjuntivo en mamíferos.

7.- Teniendo en cuenta la correlación entre la virulencia *in vitro* e *in vivo*, la distribución del patógeno en las poblaciones celulares en cultivo y su multiplicación intracelular, la persistencia de infecciones crónicas en los subcultivos y la posibilidad de analizar mecanismos defensivos órgano-específicos, sin la influencia de variaciones externas tanto ambientales como individuales, consideramos que la infección *in vitro* de los cultivos de trucha arco iris es un modelo útil para el estudio de la patogenia de la BKD.

BIBLIOGRAFÍA

- Aggeler, J., Ward, J., Blackie, L.M., Barcellos-Hoff, M.H., Streuli, C.H., Bissell, M. (1991). Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development *in vivo*. *J. Cell. Sci.* 99:407-417.
- Aldrin, J.F., Mevel, M., Robert, J.Y., Vigneulle, M., Baudin-Laurencin, F. (1978). Incidences metaboliques de la corynébactériose expérimentale chez le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*). *Bull. Soc. Med. Comp. Lyon.* 80:79-90.
- Álvarez, F. (1986). Caracterización de elementos inmunocompetentes en *Salmo trutta fario*. Cambios en los órganos linfoides periféricos en truchas infectadas por *Saprolegnia* sp.. Tesina de Licenciatura, Universidad de León, León.
- Álvarez, F. (1993). Inmunobiología de salmónidos. Análisis morfológico de los mecanismos de defensa de *Salmo trutta* contra la infección por *Saprolegnia* sp. Estudio del tegumento y de los órganos linfoides. Tesis Doctoral, Universidad de León, León.
- Álvarez, F., Razquin, B., Villena, A., López-Fierro, P., Herráez, P., Zapata, A. (1987). Relación entre los cambios estacionales en los órganos linfoides secundarios de la trucha común *Salmo trutta fario* y la incidencia de las infecciones por *Saprolegnia*. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.* 8:183-192.
- Allen, T.D. (1981). Haemopoietic microenvironments *in vitro*: ultrastructural aspects. En: Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation. Porter, R., Whelan, J. (Eds.), Ciba Foundation Symposium 84, Pitman, London. pp. 38-67.
- Allen, T.D., Dexter, T.M. (1984). The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp. Hematol.* 12:517-522.
- Anderson, D.P. (1990). Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8:38-50.
- Anderson, D.P., Dixon, O.W., Lizzio, E.F. (1986). Immunization and culture of rainbow trout organ sections *in vitro*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12:203-211.
- Anderson, D.P., Dixon, O.W., Lizzio, E.F. (1991). *In vivo* to *in vitro* transfer of trout spleen sections for early analysis of the immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 1:99-105.
- Andral, R., Hurad, C., Elziere-Papayanni, P., Vivares, C.P. (1990). Establishment and characterization of a rainbow trout kidney cell-line, RTK Montpellier. En: Pathology in marine science, Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), Academic Press, San Diego, pp. 33-42.
- Antoniades, H.N., Scher, C.D., Stiles, C.D. (1979). Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1809-1812.
- Ascensao, J.L., Vercellotti, G.M., Jacob, H.S., Zanjani, E.D. (1984). Role of endothelial cells in human hemopoiesis: modulation of mixed colony growth *in vitro*. *Blood.* 63:553-558.
- Asselineau, D., Bernhard, B., Bailly, C., Darmon, M. (1985). Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kd keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Exp. Cell. Res.* 159:536-539.
- Atoji, Y., Shirogane, D., Kurono, T., Suzuki, Y., Sugimura, M. (1991). S-100-immunoreactive giant macrophages in lymphoid tissues of guinea pig. *Acta Anat.* 140:17-25.

- Austin, B. (1985). Evaluation of antimicrobial compounds for the control of bacterial kidney disease in *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 8:209-220.
- Austin, B. (1986). Ecology of *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonids. Proceedings of the 4th International Symposium on Microbial Ecology, Ljubljana. pp. 650-654.
- Austin, B., Austin, D.A. (1993). *Bacterial Fish Pathogens. Disease in Farmed and Wild Fish.* Ellis Horwood Ltd., London.
- Austin, B., Rayment, J.N. (1985). Epizootiology of *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 8:505-509.
- Avella, M., Berhaut, J., Payan, P. (1994). Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30:41-49.
- Bagby, G.C., Mc Call, E., Bergstrom, K.A., Burger, D. (1983). A monokine regulates colony stimulating activity production by vascular endothelial cells. *Blood* 62:663-668.
- Bagnara, J.T., Turner, W.A., Rothstein, J., Ferris, W., Taylor, J.D. (1979). Chromatophore organellogenesis. *Pigment Cell.* 4:13-27.
- Bandín, I., Ellis, A.E., Barja, J.L., Secombes, C.J. (1993). Interaction between rainbow trout macrophages and *Renibacterium salmoninarum* *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 3:25-33.
- Bandín, I., Santos, Y., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1989). Influence of the growth conditions on the hydrophobicity of *Renibacterium salmoninarum* evaluated by different methods. *FEMS Microbiol. Lett.* 51:135-140.
- Banner, C.R., Rohovec, J.S., Fryer, J.L. (1983). *Renibacterium salmoninarum* as a cause of mortality among chinook salmon in salt water. *J. World Maricult. Soc.* 14:236-239.
- Barka, T., Anderson, P.J. (1962). Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 10:741-753.
- Barrutia, M.S.G., Leceta, J., Fonfría, J., Garrido, E., Zapata, A. (1983). Non-lymphoid cells of the anuran spleen: an ultrastructural study in the natterjack *Bufo calamita*. *Am. J. Anat.* 167:83-94.
- Baschwitz, G.G., Fernández-B. de Quiros, C., Martínez, J.L., Muñoz, C. (1987). Alteración de la estructura superficial de la epidermis en truchas (*Salmo trutta* L.) infectadas por *Saprolegnia*. *Rev. Biol. Univ. Oviedo.* 5:29-37.
- Batram, J.C., Eddy, F.B., Chang, Y.J., Fidler, J. (1989). Chloride transport by isolated cells of the freshwater adapted rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 94:439-445.
- Baynes, C.J. (1986). Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: isolation, separation and characterization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12:141-151.
- Bell, E., Ehrlich, H.P., Buttle, D.J., Nakatsuji, T. (1981). Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 211:1052-1054.
- Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapiere, C., Nusgens, B., Neveux, Y. (1983). The reconstitution of living skin. *J. Invest. Dermatol.* 81:2-10.
- Bell, G.R., Traxler, G.S., Dworschack, C. (1988). Development *in vitro* and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Dis. Aquat. Org.* 4:19-25.
- Bentley, S.A. (1982). Bone marrow connective tissue and the haematopoietic microenvironment. *Br. J. Hematol.* 50:1-7.
- Bentley, S.A., Foidart, J.M. (1980). Some properties of marrow-derived adherent cells in tissue culture. *Blood.* 56:1006-1012.
- Bentley, S.A., Tralka, T.S. (1982). Characterization of marrow-derived adherent cells: evidence against an endothelial subpopulation. *Scand. J. Haematol.* 28:381-387.
- Benya, P.D., Shaffer, J.D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 30:215-224.
- Bergeron, T.C.M., Woodward, W. (1983). Ultrastructure of the granule cells in the small intestine of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) before and after stratum granulosum formation. *Can. J. Zool.* 61:133-138.
- Berliner, J.A., Gerschenson, L.E. (1975). The effects of a glucocorticoid on the cell surface of RLC-GAI cells. *J. Cell. Physiol.* 86:523-530.

- Bernard, B., Gherardini, M., Lunazzi, G.C., Modriky, Ch., Moro, L., Pantafili, E., Pollesello, P., Stagni, N., Vittur, F. (1985). Alkaline phosphatase of matrix vesicles from preosseous cartilage is a Ca⁺⁺ binding glycoprotein. En: The chemistry and biology of mineralized tissues. Butler, W.T. (Ed.), EBSCO Media, Birmingham. pp. 142-145.
- Bernfield, M., Barnejee, S.D., Koda, J.E., Rapraeger, A.C. (1984). Remodeling of the basement membrane as a mechanisms of morphogenetic tissue interaction. En: Role of Extracellular Matrix in Development. Trelstad, R. (Ed.), Liss, New York. pp. 545-572.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W. (1993). Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. Annu. Rev. Cell Biol. 9:511-540.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5:771-781.
- Blue, J., Weiss, L. (1981a). Periarterial macrophage sheaths (ellipsoids) in cat spleen - an electron microscope study. Am. J. Anat. 161:115-134.
- Blue, J., Weiss, L. (1981b). Vascular pathways in nonsinusoidal red pulp - an electron microscope study of the cat spleen. Am. J. Anat. 161:135-168.
- Bols, N.C., Lee, L.E.J. (1991). Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish. Cytotechnol. 6:163-187.
- Bols, N.C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S.J., Goegan, P., Lee, L.E.J. (1994). Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. J. Fish Dis. 17: 601-611.
- Braun-Nesje, R., Bertheussen, K., Kaplan, G., Seljelid, R. (1981). Salmonid macrophages: separation, *in vitro* culture and characterization. J. Fish Dis. 4:141-151.
- Braun-Nesje, R., Kaplan, G., Seljelid, R. (1982). Rainbow trout macrophages *in vitro*: morphology and phagocytic activity. Dev. Comp. Immunol. 8:51-60.
- Broudy, V.C., Zuckerman, K.S., Jetmalani, S., Pitchen, J.H., Bagby, G.C. (1986). Monocytes stimulate fibroblastoid bone marrow cells to produce multilineage hematopoietic growth factors. Blood. 68:530-534.
- Brown, E.J. (1991). Complement receptors and phagocytosis. Curr. Opin. Immunol. 3:76-82.
- Brown, M.R.W., Williams, P. (1985). The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. Annu. Rev. Microbiol. 39:527-556.
- Bruno, D.W. (1986a). Scottish experience with bacterial kidney disease in farmed salmonids between 1976 and 1985. Aquacult. Fish. Man. 17:185-190.
- Bruno, D.W. (1986b). Histopathology of bacterial kidney disease in laboratory infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with reference to naturally infected fish. J. Fish Dis. 9:523-537.
- Bruno, D.W. (1988). The relationship between auto-agglutination, cell surface hydrophobicity and virulence of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiol. Lett. 51:135-140.
- Bruno, D.W., Munro, A.L.S. (1986). Haematological assessment of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. J. Fish Dis. 9:195-204.
- Bullock, G.L., Griffin, B.R., Stuckey, H.M. (1980). Detection of *Corynebacterium salmoninus* by direct fluorescent antibody test. Can. J. Fish Aquat. Sci. 37:719-721.
- Bunton, T.E. (1993). The immunocytochemistry of cytoqueratin in fish tissues. Vet. Pathol. 30:418-425.
- Burstone, M.S. (1958). Histochemical comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. J. Nat. Cancer Inst. 20:601-615.
- Campbell, T., Murru, F. (1990). An introduction to fish hematology. The Compendium-Small Animal. 12:525-533.
- Carbone, A., Manconi, R., Poletti, A., Volpe, R., Santi, L. (1985). S-100 protein immunostaining in cells of dendritic morphology within reactive germinal centers by ABC immunoperoxidase method. Virchows Arch. Abt. Path. Anat. 406:27-32.
- Carlson, R.E., Anderson, D.P., Bodammer, J.E. (1993). *In vitro* cortisol administration suppresses the *in vitro* primary immune response of winter flounder lymphocytes. Fish Shellfish Immunol. 3:299-312.
- Castillo, A. (1991). Ontogenia del sistema inmunitario de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Análisis estructural, inmunocitoquímico y funcional. Tesis Doctoral, Universidad de León, León.

- Castillo, A., Razquin, B., López-Fierro, P., Álvarez, F., Zapata, A., Villena, A. (1987). Estudio histoenzimático del estroma y vascularización de los órganos linfoides de la trucha arco iris, *Salmo gairdneri*, Rich. Cuad. Marisq. Publ. Téc. 12:167-172.
- Cavaillon, J.M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed. Pharmacoter.* 48:445-453.
- Cinti, S., Cigolini, M., Morroni, M., Zingaretti, C. (1989). S-100 protein in white preadipocytes: an immunoelectronmicroscopic study. *Anat. Rec.* 224:466-472.
- Clark, C.R., Taylor, J.D., Tchen, T.T. (1989). Isolation of melanized cell lines with stable phenotypes from a gold fish erythrophoroma cell line and preservation of these cells by the uses of autologous serum. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:813-820.
- Clem, L.W., Moewus, L., Sigel, M.M. (1961). Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108:762-766.
- Cochia, D., Tiberio, G., Santarelli, R., Michetti, F. (1983). S-100 protein in "follicular dendritic" cells of rat lymphoid organs. *Cell Tissue Res.* 230:95-103.
- Coll, J. (1994). Growth of trout hematopoietic cells in fibrin clots En: *Techniques in fish immunology-3*. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Zelikoff, A.F., Kaattari, S.L., Smith, S.A. (Eds.), SOS Publications, Fair Haven. pp. 45-52.
- Collodi, P., Barnes, D.W. (1990). Mitogenic activity from trout embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3498-3502.
- Contard, P., Bartel, R.L., Jacobs II, L., Perlsh, J.S., MacDonald II, E.D., Handler, L., Cone, D., Fleischmajer, P. (1993). Culturing keratinocytes and fibroblast in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J. Invest. Dermatol.* 100:35-39.
- Coutinho, L.H., Gilleece, M.H., De Wynter, E.A., Will, A., Testa, N.G. (1993). Clonal and long-term cultures using bone marrow. En: *Haemopoiesis: a practical approach*. Testa, N.G., Molineux, G. (Eds.), IRL Press, New York. pp 75-106.
- Cunha, G.R., Chung, L.W.K., Shannon, J.M. (1983). Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ.* 17:137-148.
- Chen, S.N., Kou, G.H. (1987). Establishment, characterization and application of 14 cell lines from warmwater fish. En: *Invertebrate and fish tissue culture*. Kuroda, Y., Kurstak, E., Maramorosch, K. (Eds.). Japan Scientific Society Press, Tokio. pp 218-227.
- Cheng, L-L., Bowser, P.R., Spitsbergen, J.M. (1993). Development of cell cultures derived from lake trout liver and kidney in a hormone-supplemented, serum-reduced medium. *J. Aquat. Animal Sci.* 5:119-126.
- Daly, J.G., Stevenson, R.M.W. (1987). Hydrophobic and haemagglutinating properties of *Renibacterium salmoninarum*. *J. Gen. Microbiol.* 133:3575-3580.
- Daly, J.G., Stevenson, R.M.W. (1987b). Survival of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid macrophages. *Fish Immunology Symposium of the Fisheries Society of the British Isles*. Plymouth.
- Daly, J.G., Stevenson, R.M.W. (1989). Agglutination of salmonid spermatozoa by *Renibacterium salmoninarum*. *J. Aquat. Animal Health.* 1:163-164.
- Darmon, M. (1985). Coexpression of specific acid and basic cytoqueratins in teratocarcinoma-derived fibroblast treated with 5-azacytidine. *Dev. Biol.* 110: 47-52.
- Darmon, M., Nicolas, J-F., Lamblin, D. (1984). 5-azacytidine is able to induce the conversion of teratocarcinoma-derived mesenchymal cells into epithelial cells. *EMBO J.* 3:961-967.
- DeKoning, J., Kaattari, S.L. (1991). Mitogenesis of rainbow trout peripheral blood lymphocytes requires homologous plasma for optimal responsiveness. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:381-386.
- DeKoning, J., Kaattari, S. (1992). An improved salmonid lymphocyte culture medium incorporating plasma for *in vitro* antibody production and mitogenesis. *Fish Shellfish Immunol.* 2:275-285.
- Dexter, T.M. (1981). Self-renewing haematopoietic progenitor cells and the factors controlling proliferation and differentiation. En: *Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation*. Porter, R., Whelan, J. (Eds.), Ciba Foundation Symposium 84, Pitman, London, pp. 22-37.
- Dexter, T.M., Lajtha, T.G. (1974). Proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *Br. J. Haematol.* 28:525-532.
- Dexter, T.M., Allen, T.D., Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J. Cell Physiol.* 91:335-344.

- Dexter, T.M., Coutinho, L.H., Spooncer, E., Heywoth, C.M., Daniel, C.P., Schiro, R., Chang, J., Allen, T.D. (1990). Stromal cells in haemopoiesis. En: Molecular control of haemopoiesis. Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester. pp. 76-95.
- Dexter, T.M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E., Metcalf, D. (1980). Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *J. Exp. Med.* 152:1036-1047.
- Diago, M.L. (1990). Estudio de los micrambientes linfo-hematopoyéticos de la trucha arco-iris, *Oncorhynchus mykiss*: cultivo y caracterización *in vitro* de las células del estroma tímico y del pronefros. Tesina de Licenciatura, Universidad de León, León.
- Diago, M.L., López-Fierro, P., Razquin, B., 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.
- Diago, M.L., López-Fierro, P., Razquin, B., Villena, A. (1995). Establishment and characterization of a pronephric stromal cell line (TPS) from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W. *Fish Shellfish Immunol.* 5:441-457.
- Dickman, K.G., Renfro, J.L. (1986). Primary culture of flounder renal tubule cells: transepithelial transport. *Am. J. Physiol.* 251:424-432.
- Donaldson, E.M. (1981). The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. En: Stress and fish. Pickering, A.D. (Ed.), Academic Press, London. pp. 11-47.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu. Rev. Immunol.* 8:111-137.
- Downing, S.W., Novales, R.R. (1971). The fine structure of lamprey epidermis. I. Introduction and mucous cells. *J. Ultrastruct. Res.* 35:282-294.
- Doyle, W.L., Epstein, F.H. (1972). Effects of cortisol treatment and osmotic adaptation on the chloride cells in the eel *Anguilla rostrata*. *Cytobiol.* 6:58-73.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Graham, L., Lallier, R. (1990). Purification, and biochemical and structural characterization of a fimbrial haemagglutinin of *Renibacterium salmoninarum*. *J. Gen. Microbiol.* 136:2443-2448.
- Eklom, P. (1981). Formation of basement membranes in embryonic kidney: An immunohistological study. *J. Cell Biol.* 92:1-10.
- Ellis, A.E. (1977). Leucocytes in fish: A review. *J. Fish Biol.* 11:453-491.
- Ellis, A.E. (1981). Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. En: Stress and fish. Pickering, A.D. (Ed.), Academic Press, London. pp. 147-169.
- Ellis, A.E. (1985). Eosinophilic granule cells (EGC) and histamine responses to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 9:251-260.
- Esteban, M.A., Meseguer, J., Ayala, A.G., Agulleiro, B. (1989). Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 52:407-419.
- Etlinger, H.M., Hodgins, H.O., Chiller, J.M. (1976). Rainbow trout leukocyte culture: a simplified method. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 12:599-601.
- Evenden A.J., Gilpin, M.L., Munn, C.B. (1990). The cloning and expresion of a gene encoding haemolytic activity from the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 71:31-34.
- Evenden A.J., Grayson, T.H., Gilpin, M.L., Munn, C.B. (1993). *Renibacterium salmoninarum* and Bacterial Kidney Disease - The unfinished jigsaw. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3:87-104.
- Ezeasor, D.N. & Stokoe, W.M. (1980). A cytochemical, light and electron microscopic study of eosinophilic granule cells in the gut of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 17:619-634.
- Fänge, R., Mattisson, A.G.M. (1981). The lymphomyeloid (hemopoietic) system of the Atlantic nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Biol. Bull.* 160:240-249.
- Fänge, R., Nilsson, S. (1985). The fish spleen: structure and function. *Experientia.* 41:152-158.
- Fernández, R.D., Yoshimizu, M., Kimura, T., Ezura, Y., Inouye, K., Takami, I. (1993a). Characterization of three continuous cell lines from marine fish. *J. Aquat. Animal Health.* 5:127-136.
- Fernández, R.D., Yoshimizu, M., Kimura, T., Ezura, Y. (1993b). Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish. *J. Aquat. Animal Health.* 5:137-147.

- Fijan, N., Sulimanovic, D., Bearzotti, M., Muzinic, D., Zwillenberg, L.O., Vautherot, J.F., De Kinkelin, P. (1983). Some properties of the epithelioma papillosum cyprini (EPC cell line) from carp, *Cyprinus carpio*. Ann. Virol. (Inst. Pasteur). 134:207-220.
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D., Aaronson, S.A. (1989). Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. Science. 245: 752-755.
- Flaño, E. (1992). Histopatología de la infección experimental con *Renibacterium salmoninarum* en el salmón del Pacífico, *Oncorhynchus kisutch* W. Tesina de Licenciatura, Universidad de León, León.
- Flaño, E., López-Fierro, P., Razquin, B., Kaattari, S.L., Villena, A. (1996). Histopathology of the renal and splenic haemopoietic tissues of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. Dis. Aquat. Org. En prensa.
- Freshney, R.I. (1987). Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Alan R. Liss Inc., New York.
- Freshney, R.I. (1992). Introduction. En: Culture of Epithelial Cells, Freshney, R.I. (Ed.), Wiley-Liss, Inc., New York. pp. 1-24.
- Fryer, J.L., Lannan, C.N. (1993). The history and current status of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in Pacific salmon. Fish. Res. 17:15-33.
- Fryer, J.L., Sanders, J.E. (1981). Bacterial kidney disease of salmonid fish. Annu. Rev. Microbiol. 35:273-298.
- Fryer, J.L., Yusha, A., Pilcher, S. (1965). The *in vitro* cultivation of tissues and cells of Pacific salmon and steelhead trout. Ann. N.Y. Acad. Sci. 126:566-586.
- Fuji, R. (1993). Cytophysiology of fish chromatophores. Int. Rev. Cytol. 143:191-255.
- Fulop, G.M.I., McMillan, D.B. (1984). Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. J. Morphol. 179:175-195.
- Fusening, N.E. (1986). Mammalian epidermal cells in culture. En: Biology of the Integument. Bereither-Hann, J., Maltosy, A.G., Richards, K.S. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 409-442.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. Cell. 65:1127-1141.
- Galindo, B., Imaeda, T. (1962). Electron microscope study of the white pulp of the mouse spleen. Anat. Rec. 143:399-404.
- Getchel, R.G., Rohovec, J.S., Fryer, J.L. (1985). Comparison of *Renibacterium salmoninarum* isolates by antigenic analysis. Fish Pathol. 20:149-150.
- Globerson, A., Auerbach, R. (1966). Primary antibody response in organ cultures. J. Exp. Med. 124:1001-1016.
- Gospodarowicz, D. (1974). Localization of fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. Nature. 249:123-127.
- Gospodarowicz, D., Mescher, A.L. (1977). A comparison of the responses of cultured myoblasts and chondrocytes to fibroblast and epidermal growth factors. J. Cell. Physiol. 93:117-128.
- Gospodarowicz, D., Moran, J. (1974). Growth factors in mammalian cell cultures. Annu. Rev. Biochem. 45:531-558.
- Grace, M.F., Manning, M.J. (1980). Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. 1836. Dev. Comp. Immunol. 4:255-264.
- Greenberg, S. (1995). Signal transduction of phagocytosis. Trends Cell Biol. 5:93-99.
- Greenberger, J.S. (1978). Sensitivity of corticosteroid-dependent insulin lipogenesis in marrow preadipocytes of mutation diabetic obese mice. Nature. 255:752.
- Grinnell, F., Toda, K.I., Lamke-Seymour, C. (1987). Reconstitution of human epidermis *in vitro* is accompanied by transient activation of basal keratinocyte spreading. Exp. Cell Res. 172:439-449.
- Gualtieri, R.J., Shaddock, R.K., Baker, D.G., Quesenberry, P.J. (1984). Hematopoietic regulatory factors produced in long term murine bone marrow cultures and the effect of *in vitro* irradiation. Blood. 64:516-525.
- Hadley, M.A., Byers, S.W., Suarez-Quian, C.A., Kleinman, H.K., Dym, M. (1985). Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development *in vitro*. J. Cell. Biol. 101:1511-1522.
- Hangoc, G., Daub, R., Maze, R.G., Falkenburg, J.H.F., Broxmeyer, H.E., Harrington, M.A. (1993). Regulation of mielopoiesis by murine fibroblastic and adipogenic cell lines. Exp. Hematol. 21:502-507.

- Harding, C.V. (1995). Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules. *Trends Cell Biol.* 5:105-109.
- Harris, J.E., Hunt, S. (1975a). The fine structure of the epidermis of two species of salmonid fish, the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the brown trout (*Salmo trutta* L.). I. General organization and filament containing cells. *Cell Tissue Res.* 157:553-565.
- Harris, J.E., Hunt, S. (1975b). The fine structure of the epidermis of two species of salmonid fish, the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the brown trout (*Salmo trutta* L.). II. Mucous cells. *Cell Tissue Res.* 157:535-543.
- Hasthorpe, S., Bogganovski, M., Rogerson, J., Radley, J.M. (1992). Characterization of endothelial cells in murine long-term marrow cultures. Implication for hemopoietic regulation. *Exp. Hematol.* 20:476-481.
- Hatae, T. (1978). Electron microscope studies on the ellipsoid of the cat spleen with special reference to the filaments in the endothelial cell. *Arch. Histol. Jap.* 11:177-186.
- Hawkes, J.W. (1974a). The structure of fish skin. I. General organization. *Cell Tissue Res.* 149:147-158.
- Hawkes, J.W. (1974b). The structure of fish skin. II. The Chromatophore unit. *Cell Tissue Res.* 149:159-172.
- Helden, C.H., Westermarck, B., Wasteson, A. (1979). Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3722-3726.
- Hightower, L.E., Renfro, J.L. (1988). Recent applications of fish cell culture to biochemical research. *J. Exp. Zool.* 248:290-302.
- Hirata, J., Kanako, S., Nishimura, J., Motomura, S., Ibayasi, H. (1988). Hydrocortisone modulates colony stimulating activity produced by human bone marrow-derived adherent cells. *Eur. J. Hematol.* 40:215-221.
- Hocking, W.G., Golde, D.W. (1980). Long-term bone marrow cultures. *Blood.* 56:118-124.
- Hoffman, R., Popp, W., Van der Graaf, S. (1984). Atypical BKD predominantly causing ocular and skin lesions. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 4:7-9.
- Holbrook, K.A., Hennings, H. (1983). Phenotypic expression of epidermal cells *in vitro*. A review. *J. Invest. Dermatol.* 81:11-24.
- Horiguchi, Y., Maruguchi, T, Maruguchi, Y., Suzuki, S., Fine, J.D., Leigh, I.M., Yoshiki, T., Ueda, M., Toda, K.I., Isshiki, N., Imamura, S. (1994). Ultrastructural and immunohistochemical characterization of basal cells in three-dimensional culture models of the skin. *Arch. Dermatol. Res.* 286:53-61.
- Horwitz, M.A. (1988). Phagocytosis and intracellular biology of *Legionella pneumophila*. En: *Bacteria-host cell interaction*. Horwitz, M.A. (Ed.), Alan R. Liss, New York.
- Hunn, J.B. (1964). Some patho-physiologic effects of kidney disease in brook trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117:383-386.
- Irie, S., Tavassoli, M. (1986). Purification and characterization of rat bone marrow endothelial cells. *Exp. Hematol.* 14:912-918.
- Isberg, R.R., Van Nieu, G.T. (1995). The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol.* 5:120-124.
- Ishizaka, T., Mitsui, H., Yanagida, M., Miura, T., Dvorak, A.M. (1993). Development of human mast cells from their progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* 5:937-943.
- Iwama, G. (1977). Some aspects of the interrelationship of bacterial kidney disease infection and sodium pentachlorophenate exposure in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Tesis Doctoral, British Columbia University, Vancouver.
- Iwanaga, T., Fujita, T., Masuda, Takahasi, Y. (1982). S-100 protein-immunoreactive cells in the lymph node and spleen of the rat. *Arch. Histol. Jap.* 45:393-397.
- Jensen, M.H. (1963). Preparation of fish tissue cultures for virus research. *Bull. Off. Int. Epiz.* 59:131-134.
- Johnson, P.R., Greenwood, M.R.C. (1988). The adipose tissue. En: *Cell and Tissue Biology. A Textbook of Histology*. Weiss, L. (Ed.), Urban & Schwarzenberg, Munich. pp. 189-209.
- Kaattari, S.L., Holland, N. (1990). The one way mixed lymphocyte reaction. En: *Techniques in fish immunology-3*. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Zelikoff, A.F., Kaattari, S.L., Smith, S.A. (Eds.), SOS Publications, Fair Haven. pp. 165-172.
- Kanazawa, T., Hosick, H.L. (1992). Transformed growth phenotype of mouse mammary epithelium in primary culture induced by specific fetal mesenchymes. *J. Cell. Physiol.* 153:381-391.

- Kaufmann, S.H.E. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11:129-163.
- Keating, A., Singer, J.W. (1983). Further characterisation on the *in vitro* microenvironment. *Exp. Hematol.* 11:144-150.
- Kedinger, M., Simon-Assman, P., Alexandre, E., Haffen, K. (1987). Importance of a fibroblastic support for *in vitro* differentiation for intestinal endodermal cells and for their response to glucocorticoids. *Cell Differ.* 20:171-182.
- Kent, M.L., Powell, M.D., Kieser, D., Hoskins, G.E., Speare, D.J., Burka, J.F., Bagshaw, J., Fournie, J.W. (1993). Unusual eosinophilic granule cell proliferation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Comp. Pathol.* 109:129-140.
- Kirshenbaum, A.S., Kessler, S.W., Goff, J.P., Metcalfe, D.D. (1991). Demonstration of the origin of human mast cells from CD34⁺ bone marrow progenitor cells. *J. Immunol.* 146:1410-1415.
- Klein, A.K., Dyck, J.A., Stitzel, K.A., Shimizu, J., Fox, L.A., Taylor, N. (1983). Characterization of canine fetal lymphohematopoiesis studies of CFU-GM, CFU-L and CFU-F. *Exp. Hematol.* 11:263-274.
- Klontz, G.W. (1983). Bacterial kidney disease in salmonids. An overview. En: *Antigens of fish pathogens. Development and production for vaccines and serodiagnostics.* Anderson, D.P., Dorson, M. Dubourget, Ph. (Eds.), Collection Foundation Marcel Mérieux. pp.177-183.
- Kocal, T., Quinn, B.A., Smith, I.R., Ferguson, H.W., Hayes, M.A. (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.
- Kreipe, H., Razdun, H.J., Rudolph, P., Barth, J., Hansmann, M.L., Heidorn, K., Parwaresch, M.R. (1988). Multinucleated giant cells generated *in vitro*. *Am. J. Pathol.* 130:232-243.
- Lall, S.P., Paterson, W.D., Hines, J.A., Adams, N.J. (1985). Control of bacterial kidney disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by dietary modification. *J. Fish Dis.* 8:113-124.
- Lamas, J., Bruno, D.W., Santos, Y., Anadón, R., Ellis, A.E. (1991). Eosinophilic granular cell response to intraperitoneal injection with *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 1:187-194.
- Landolt, M.L. (1989). The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquacult.* 79:193-206.
- Laurent, P., Perry, S.F. (1990). Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 259:429-442.
- Lee, L.E.J., Bols, N.C. (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.
- Leivo, Y., Vaheri, A., Timpl, R., Wartiovaara, J. (1980). Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 76:100-114.
- Lessel, R. (1981). The influence of stress on the microflora of the digestive tract in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. En: *Stress and fish.* Pickering, A. D. (Ed.), Academic Press, London. p. 354.
- Liesveld, J.L., Abboud, C.N., Duerst, R.E., Ryan, D.H., Brennan, J.K., Lichtmann, M.A. (1989). Characterization of human marrow stromal cells: role in progenitor cell binding and granulopoiesis. *Blood.* 73:1749-1800.
- Lillie, J.H., MacCallum, D.K., Jepsen, A. (1988) Growth of stratified squamous epithelium on reconstituted extracellular matrices: long-term culture. *J. Invest. Dermatol.* 90:100-109.
- Luft, J.C., Clem, L.W., Bly, J.E. (1991). A serum-free culture medium for channel catfish *in vitro* immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 1:131-139.
- Maca, R.D., Fry, G.L., Hoak, J.C. (1978). The effects of glucocorticoids on cultured human endothelial cells. *Br. J. Haematol.* 38:501-509.
- Markl, J., Franke, W.W. (1988). Localization of cytokeratins in tissues of the rainbow trout: Fundamental differences in expression pattern between fish and higher vertebrates. *Differentiation.* 39:97-122.
- Markl, J., Winter, S., Franke, W.W. (1989). The catalog and the expression complexity of cytokeratins in a lower vertebrate: biochemical identification of cytokeratins in a teleost fish, the rainbow trout. *Eur. J. Cell Biol.* 50:1-16.
- Maule, A.G., Tripp, R.A., Kaattari, S.L., Schreck, C.B. (1989). Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.* 120:135-142.
- McCormick, S.D. (1990). Cortisol directly stimulate differentiation of chloride cells in tilapia opercular membranes. *Am. J. Physiol.* 259:857-863.

- McCormick, S.D., Bern, H. (1989). *In vitro* stimulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill. *Am. J. Physiol.* 256:707-715.
- McDonald, J.A. (1988). Extracellular matrix assembly. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:183-207.
- McGee, Z.A., Woods, M.L.Jr. (1987). Use of organ cultures in microbiological research. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:291-300.
- McInnes, A., Rennick, D.M. (1988). Interleukin-4 induces cultured monocyte/macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.* 167:598-611.
- Meguro, Y., Nakai, T., Muroga, K., Sorimachi, M. (1991). A cell line derived from the fin of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gyobyo Kenyu* 26:69-75.
- Miller, N.W., Clem, L.W. (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.
- Mishell, R.I., Dutton, R.W. (1967). Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.* 126:423-442.
- Mittal, A.K., Whitear, M., Agarwal, S.K. (1980). Fine structure and histochemistry of the epidermis of the fish *Monopterus albus*. *J. Zool. Lond.* 191:107-125.
- Momotani, E., Kubo, M., Ishikawa, Y., Matsubara, Y., Nakajima, Y., Yoshino, T. (1993). Immunohistochemical distribution of S-100 -positive cells in bovine mycobacterial and non-mycobacterial granulomas. *J. Comp. Pathol.* 108:291-301.
- Montesano, R., Schaller, G., Orci, L. (1991). Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Cell.* 66:697-711.
- Moritomo, T., Anderson, D.P., Schill, W.B. (1990). Establishment of a cell line with reticulo-endothelial characteristics from a rainbow trout spleen explant. *Fish Pathol.* 25:165-170.
- Moritomo, T., Itou, A., Yamaguchi, Y., Watanabe, T. (1993). *In vitro* colony formation of carp granulocytes in a semi-solid agar culture system. *Fish Pathol.* 28:59-63.
- Moritomo, T., Watanabe, T. (1994). Colony growth of carp hematopoietic cells *in vitro*. En: *Techniques in fish immunology-3*. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Zelikoff, A.F., Kaattari, S.L., Smith, S.A. (Eds.), SOS Publications, Fair Haven. pp. 35-44.
- Mothersill, C., Lyng, F., Lyons, M., 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.
- Munro, A.L.S., Bruno, D.W. (1988). Vaccination against Bacterial Kidney Disease. En: *Fish Vaccination*. Ellis, A.E. (Ed.). Academic Press, London. pp. 124-134.
- Naito, N., Ishikawa, H. (1980). Reconstruction of the gill from single cell suspension of the eel, *Anguilla japonica*. *Am. J. Physiol.* 238:165-170.
- Nelson, J.S., Rohovec, J.S., Garrison, R.L. (1985). Tissue localization of *Vibrio* bacterin delivered by intraperitoneal injection, immersion and oral routes to *Salmo gairdneri*. *Fish Pathol.* 19:263-269.
- Nicholson, B.L. (1988). Fish cell cultures: an overview. En: *Invertebrate and fish tissue culture*. Kuroda, Y., Kurstak, E., Maramorosch, K. (Eds.). Japan Scientific Society Press, Tokyo. pp. 191-194.
- Nielsen, E.H. (1978). Ultrahistochemistry of matrix vesicles in elastic cartilage. *Acta Anat.* 100:268-272.
- Osowski, H. (1914). Über aktive Zellbewegung im explantat von Wirbeltierembryonen. *Arch. Entwicklungsmech. Organ.* 38:547-583.
- Papadimitriou, J.M., Van Brugen, I. (1986). Evidence that multinucleate giant cells are examples of mononuclear phagocytic differentiation. *J. Pathol.* 148:149-157.
- Parkinson, E.K., Yeudall, W.A. (1992). The epidermis. En: *Culture of epithelial cells*. Freshney, R.I. (Ed.), Wiley-Liss, New York. pp. 59-80.
- Paterson, W.D., Desautels, D., Weber, J.M. (1981). The immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to the causative agent of bacterial kidney disease, *Renibacterium salmoninarum*. *J. Fish. Dis.* 4:99-111.
- Pärt, P., Norrgren, L., Bergstrom, E., Sjöberg, P. (1993). Primary cultures of epithelial cells from rainbow trout gills. *J. Exp. Biol.* 175: 219-232.
- Pearse, A.G.E. (1972). *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 2, Churchill Livingstone, Edinburgh.

- Pera, M.F., Gorman, P.A. (1984). *In vitro* analysis of multistage carcinogenesis. Development of indefinite renewal capacity and reduced growth factor requirements in colony forming keratinocytes precedes malignant transformation. *Carcinogenesis*. 5:671-682
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G. (1985). Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta* L., to disease without reducing the white blood cell count. *J. Fish Biol.* 27:611-619.
- Ploemacher, R.E., Piersma, A.H., Brockbank, G.M. (1984). The nature and function of granulopoietic microenvironments. *Blood Cells*. 10:341-367.
- Powell, M.D., Wright, G.M., Burka, J.F. (1991). Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Cell Tissue Res*. 266:469-474.
- Powell, M.D., Briand, H.A., Wright, G.M., Burka, J.F. (1993). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) intestinal eosinophilic granule cell (EGC) response to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* extracellular products. *Fish Shellfish Immunol.* 3:279-289.
- Powell, M.D., Wright, G.M., Burka, J.F. (1990). Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of migration? *J. Fish Biol.* 37:495-497.
- Press, C.McL., Dannevig, B.H., 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.* 4:79-83.
- Quesenberry, P.J., Gimbrone, M.A., (1980). Vascular endothelium as a regulator of granulopoiesis: production of colony stimulating activity by cultures of human endothelial cells. *Blood*. 56:1060-1067.
- Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 5:85-87.
- Razquin, B.E., Castillo, A., López-Fierro, P., Álvarez, F., Zapata, A., Villena, A.J. (1990). Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.* 36:159-173.
- Regnier, M., Darmon, M. (1989). Human epidermis reconstructed *in vitro*: a model to study keratinocyte differentiation and its modulation by retinoic acid. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:1000-1008.
- Reitan, L.J., Thuvander, A. (1991). *In vitro* stimulation of salmonid leukocytes with mitogens and with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 1:297-308.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17:208-212.
- Rheinwald, J.G., Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-344.
- Richards, R.H., Roberts, R.J. (1981). Bacteriología de los teleosteos. En: Patología de los peces. Roberts, R.J. (Ed.), Mundi-Prensa, Madrid. pp. 209-233.
- Richards, R.H., Holliman, A., Helgason, S. (1978). *Exophiala salmonis* infection in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 1:357-368.
- Roberts, R.J., Young, H., Milne, J.A. (1971). Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) I. The structure and ultrastructure of normal plaice skin. *J. Fish Biol.* 4:87-98.
- Robertson, O.H., Wexler, B.C. (1960). Histological changes in the organs and tissues of migrating and spawning Pacific salmon (Genus *Oncorhynchus*). *Endocrinology*. 66:222-239.
- Rose, A.S., Levine, R.P. (1992). Complement-mediated opsonisation and phagocytosis of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 2:223-240.
- Rutherford, M.S., Witsell, A., Schook, L.B. (1993). Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J. Leukoc. Biol.* 53:602-618.
- Saito, H. (1977). Fine structure of the reticular cells in the rat spleen, with special reference to their fibromuscular features. *Arch. Histol. Jap.* 40:333-345.
- Saito, H., Yokoi, Y., Watanabe, S., Tajima, J., Kuroda, H., Namihisa, T. (1988). Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *Am. J. Anat.* 181:235-252.
- Saitoh, K., Kamiyama, R. (1978). An electron microscopic and enzyme histochemical study of the boundary zone between the white and red pulp of the human spleen. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 25:45-49.
- Sakakura, T. (1991). New aspects on stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 125:165-202.

- Sanders, J.E., Fryer, J.L. (1980). *Renibacterium salmoninarum* gen. nov., the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 30:496-502.
- Sandstrom, C.E., Miller, W.M., Papoutsakis, T. (1994). Review: Serum-free media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells. *Biotech. Bioeng.* 43:706-733.
- Sami, S., Fischer-Scherl, T., Hoffmann, R.W., Pfeil-Putzien, C. (1992). Immune complex-mediated glomerulonephritis associated with bacterial kidney disease in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Pathol.* 29:169-174.
- Sawyer, R.H., Fallon, J.F. (1983). *Epithelia-Mesenchymal Interactions in Development*. Praeger, New York.
- Schlesinger, L.S., Horwitz, M.A. (1991). Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-*gamma* activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J. Immunol.* 147:1983-1994.
- Secombes, C.J. (1985). The *in vitro* formation of teleost multinucleated giant cells. *J. Fish Dis.* 8:461-464.
- Secombes, C.J. (1991). The phylogeny of cytokines. En: *The cytokine handbook*. Thomson, A (Ed.), Academic Press Ltd., London. pp. 387-412.
- Shaklai, M., Tavassoli, M. (1979). Cellular relationships in rat bone marrow studied by freeze fracture and lanthanum impregnation thin-sectioning microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 69:343-361.
- Shirota, T., Tavassoli, M. (1992). Alterations of bone marrow sinus endothelium induced by ionizing irradiation: implications in the homing of intravenously transplanted marrow cells. *Blood Cells.* 18:197-214.
- Shnitka, T.K., Seligman, A.M. (1971). Ultrastructural localization of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 375-396.
- Siegl, E., Albrecht, S., Lüdtkke, B. (1993). Long-term liquid culture of haemopoietic precursor cells from the head kidney and spleen of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Haematol. Int.* 3:168-173.
- Simons, K., Fuller, S.D. (1985). Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:243-288.
- Smith, H. (1990). Pathogenicity and the microbe *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* 136:377-383.
- Smith, J.W. (1964). The occurrence and pathology of Dee disease. Department of Agriculture and Fisheries for Scotland, Freshwater Salmon. *Fish Res.* 34:1-12.
- Smith, P.D. (1982). Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination. Comparison of uptake of particulate and non particulate antigens. *Dev. Comp. Immunol.* 6:181-186.
- Spooncer, E., Dexter, T.M. (1984). Long-term bone marrow cultures. *Biblthca. Haematol.* 48:366-383.
- Stadländer, C., Kirchoff, H. (1989). Gill organ culture of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an experimental model for the study of pathogenicity of *Micoplasma mobile* 163 K. *J. Fish Dis.* 12:79-86.
- Stenn, K.S. (1988). The skin. En: *Cell and Tissue Biology. A Textbook of Histology*. Weiss, L. (Ed.), Urban & Schwarzenberg, Munich. pp. 539-572.
- Streuli, C.H., Bailey, D., Bissell, M.J. (1991). Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interactions and morphological polarity. *J. Cell Biol.* 115:1383-1395.
- Sugimura, M., Ishimaru, H., Atoji, Y., Suzuki, Y. (1987). S-100 protein subunit immunoreactivity of follicular dendritic cells in germinal centers of canine and caprine lymph nodes. *Jap. J. Vet. Sci.* 49:1183-1185.
- Sutton, J.S., Weiss, L. (1966). Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells and multinucleated giant cells. *J. Cell Biol.* 28:303-332.
- Suzumoto, B.K., Schreck, C.B., McIntyre, J.D. (1977). Relative resistance of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their haematological responses to bacterial kidney disease. *J. Fish. Res. Board Can.* 34:1-4.
- Swanson, J.A., Baer, S.C. (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5:89-93.
- Takahashi, K., Yamaguchi, H., Ishizeki, J., Nakajima, T., Nakazato, Y. (1981). Immunohistochemical and immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in the interdigitant reticulum cells of the human lymph node. *Virchows Arch. Abt. Zellpath.* 37:125-135.
- Takahashi, Y., Nogawa, H. (1991). Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum separated from mesenchyme by the membrane filter. *Development.* 111:327-335.

- Taub, M., Wang, Y., Szczesny, T.M., Kleinman, H.K. (1990). Epidermal growth factor or transforming growth factor is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4002-4006.
- Tavassoli, M. (1982). Ultrastructural and radiobiological characterization of stromal cells in continuous, long-term marrow cultures. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1:349-357.
- Tavassoli, M., Takahashi, K. (1982). Morphological studies on long-term cultures 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.
- Temeles, D.S., McGrath, H.E., Kittler, E.L.W., Shaddock, R.K., Kister, V.K., Crittenden, R.B., Turner, B.L., Quesenberry, P.J. (1993). Cytokine expression from bone marrow derived macrophages. *Exp. Hematol.* 21:388-393.
- Torroba, M., Anderson, D.P., Dixon, O.W., Casares, F., Varas, A., Alonso, L., Gómez del Moral, M., Zapata, A.G. (1993). *In vitro* antigen trapping by gill cells of the rainbow trout: an immunohistochemical study. *Histol. Histopath.* 8:363-367.
- Trust, J.T. (1986). Pathogenesis of infectious diseases of fish. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:479-502.
- Tung, L.-C., Chen, S.-N., Kou, G.-H. (1991). Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy (*Acanthopagurus schlegelii*). *Gyobyo Kenyu.* 26:109-117.
- Turaga, P.S.T., Wiens, G.D., Kaattari, S.L. (1987a). Analysis of *Renibacterium salmoninarum* antigen production *in situ*. *Fish Pathol.* 22:209-214.
- Turaga, P.S.T., Wiens, G.D., Kaattari, S. L. (1987b). Bacterial kidney disease: the potential role of soluble protein antigen(s). *J. Fish Biol.* 31:191-194.
- Turner, W.A., Taylor, J.D., Tchen, T.T. (1975). Melanosome formation in the goldfish: the role of multivesicular bodies. *J. Ultrastruc. Res.* 51:16-31.
- Vallejo, A.N., Ellis, A.E. (1989). Ultrastructural study of the response of eosinophil granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol.* 13:133-148.
- Van den Heuvel, R., Mathieu, E., Schoeters, G., Leppens, H., Vanderborght, 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.L., Versele, S.R.M., Schoeters, G.E.R., Vanderborght, O.L.J. (1987). Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. *Br. J. Haematol.* 66:15-20.
- Vestweber, D., Kemler, R., Ekblom, P. (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin during kidney development. *Dev. Biol.* 112:213-221.
- Villena, A., Razquin, B., Turaga, P., Kaattari, S. (1989). Role of specific immune complexes in bacterial kidney disease: An immuno- and enzyme-histochemical study on *Renibacterium salmoninarum*-infected coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. En: Conference handbook. IV EAFP Diseases of Fish and Shellfish Conference, Santiago de Compostela. p. 180.
- Virtanen, I., Heikinheimo, K., Hormia, M., Kivela, T., Laitinen, L., Thornell, L.-E. (1989). Expression of intermediate filaments (IF) in tissues and cultured cells. *Int. J. Dev. Biol.* 33:55-61.
- Von Koskull, H., Virtanen, I. (1987). Induction of cytokeratin expression in human mesenchymal cells. *J. Cell Physiol.* 133:321-329.
- Wang, H., Sullivan, A.K. (1993). Inhibitors of hematopoietic colonies are produced by certain rat fibroblastoid cell lines and are modulated by corticosteroids. *Exp. Hematol.* 21:675-682.
- Watanabe, T. (1984). Continuous cell line derived from the kidney of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Tokyo Vet. Animal Sci.* 32:65-69.
- Wedemeyer, G.A., McLeay, D.J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. En: *Stress and Fish*. Pickering, A.D. (Ed.). Academic Press, London. pp. 247-275.
- Wedemeyer, G.W., Ross, A.J. (1973). Nutritional factors in the biochemical pathology of corynebacterial kidney disease in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board. Can.* 30:296-298.
- Weinberg, J.B., Hobbs, M.M., Misukonis, M.A. (1984). Recombinant human γ -interferon induces human monocyte polykaryon formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 4554-4557.
- Weiss, L. (1981). Haemopoiesis in mammalian bone marrow. En: *Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation*. Porter, R., Whelan, J. (Eds.). Ciba Foundation Symposium 84, Pitman, London. pp. 5-21

- Weiss, L., Chen, L.-T. (1975). The organization of hematopoietic cords and vascular sinuses in bone marrow. *Blood Cells*. 1:617-638.
- Weiss, L., Fawcett, D.V. (1953). Cytochemical observations on chicken monocytes, macrophages and giant cells in tissue culture. *J. Histochem. Cytochem.* 1:47-65.
- Westen, H., Bainton, D.F. (1979). Association of alkaline phosphatase reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. *J. Exp. Med.* 150:919-937.
- Whitear, M. (1986). The skin of fishes including cyclostomes. En: *Biology of the integument*. Vol. II. Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. (Eds.), Springer, Berlin. pp. 8-64.
- Whitear, M., Mittal, A.K. (1986). Structure of the skin of *Agonus cataphractus* (Teleostei). *J. Zool. Lond.* 210:551-574.
- Whitlock, C.A., Witte, O.N. (1982). Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:3608-3612.
- Wiens, G.D., Kataari, S.L. (1991). Monoclonal antibody characterization of leukoagglutinin produced by *Renibacterium salmoninarum*. *Infect. Immun.* 59:631-637.
- Wilson, F.D., Tavassoli, M., Greenberg, B.R., Hinds, D., Klein, A.K. (1981). Morphological studies on adherent cells in bone marrow cultures from humans, dogs and mice. *Stem Cells* 1:15-29.
- Wolf, K., Anhe, W. (1982). Fish cell culture. En: *Advances in cell culture*, Vol. 2. Maramorosch, K. (Ed.), Academic Press, London. pp. 305-327
- Wolf, K., Dumbar, C.E. (1957). Cultivation of adult teleost tissues *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95:455-458.
- Wolf, K., Dumbar, C.E. (1959). Test of 34 therapeutic agents for control of kidney disease in trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 88:117-124.
- Wolf, K., Mann, J.A. (1980). Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro.* 16:168-179.
- Wolf, K., Quimby, M.C. (1962). Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science.* 135:1065-1066.
- Wolf, K., Quimby, M.C. (1969). Fish cell and tissue culture. En: *Fish Physiology*. Vol. IIIB. Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 253-303.
- Wood, E.M., Yasutake, W.T. (1956). Histopathology of kidney disease in fish. *Am. J. Pathol.* 32:845-857.
- Wood, J.W., Wallis, J. (1955). Kidney disease in adult chinook salmon and its transmission by feeding to young chinook salmon. *Res. Briefs, Fish. Commission of Oregon.* 6:32-40.
- Wright, S.D., Silverstein, S.C. (1983). Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic O₂ from human phagocytes. *J. Exp. Med.* 158:2016-2023.
- Xu, C.X., Hendry, J.H., Testa, N.G., Allen, T.D. (1983). Stromal colonies from mouse bone marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effects on radiosensitivity. *J. Cell. Sci.* 61:453-466.
- Yoshida, H., 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.
- Young, C.L., Chapman, G.B. (1978). Ultrastructural aspects of the causative agent and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish Res. Board Can.* 35:1234-1248.
- Zapata, A. (1979). Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* 3:55-65.
- Zapata, A. (1980). Splenic erythropoiesis and thrombopoiesis in elasmobranchs: an ultrastructural study. *Acta Zool.* 61:59-64.
- Zapata, A. (1981). Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* y *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 5:685-690.
- Zapata, A. (1982). Lymphoid organs of teleost fish. III. Splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 6:87-94.
- Zapata, A., Cooper, E.L. (1990). *The Immune system: Comparative Histophysiology*. John Wiley and Sons. Ltd. (Eds.), Chichester.
- Zapata, A.G., Torroba, M., Álvarez, F., Anderson, D.P., Dixon, O.W., Wisniewski, M. (1987). Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *J. Fish Biol.* 31:209-217.

- Zapata, A.G., Varas, A., Torroba, M. (1992). Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol. Today*. 13:142-147.
- Zuckerman, K.S., Bagby, G.C., McCall, E., Sparks, B., Wells, J., Patel, V., Goodrum, D. (1985). A monokine stimulates production of human erythroid burst-promoting activity by endothelial cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 75:722-725.

FIGURAS

Acceso a Figuras 1

Acceso a Figuras 2

Acceso a Figuras 3

Acceso a Tesis

Fig. 1.- Panorámica de un explante de tegumento transcurridos 12 d. en cultivo. Epidermis (E), dermis (D). H&E. x 335.

Fig. 2.- Monocapa de un cultivo primario de tegumento a 7 d. constituida por células epitelioideas (Λ), fibroblastoides (P) y mucosas (ç). Mitosis (ä). x 164.

Fig. 3.- Imagen ultraestructural de un explante de tegumento. Células epiteliales (E), fibroblastos (F) y melanóforo (M). x 6.000.

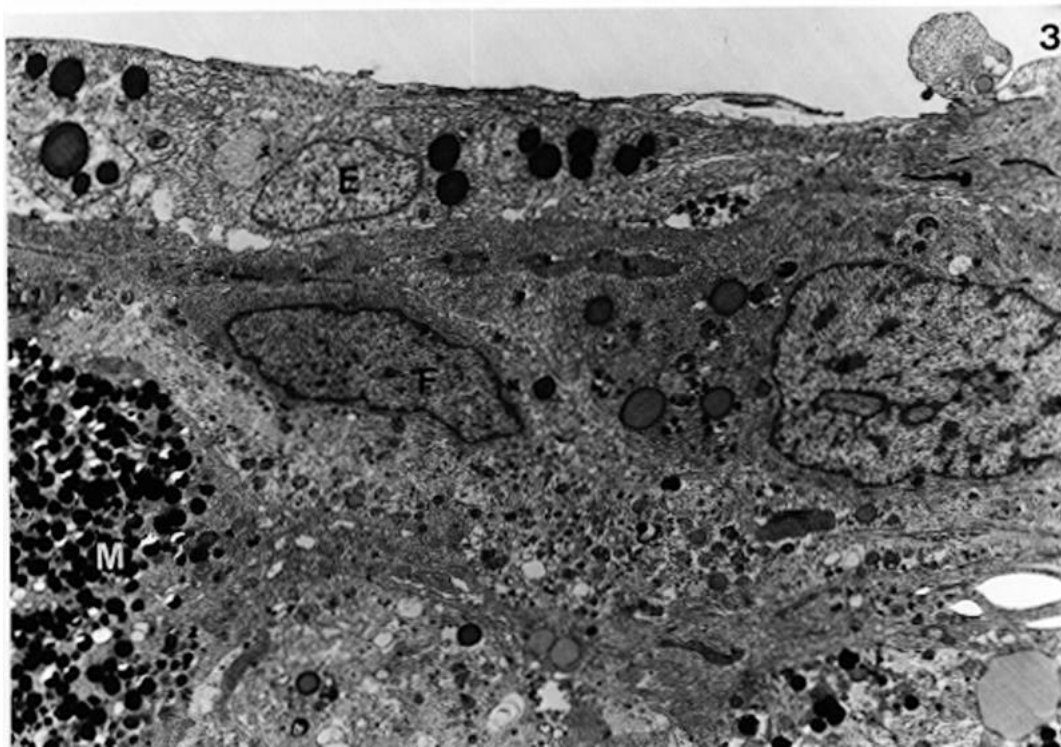
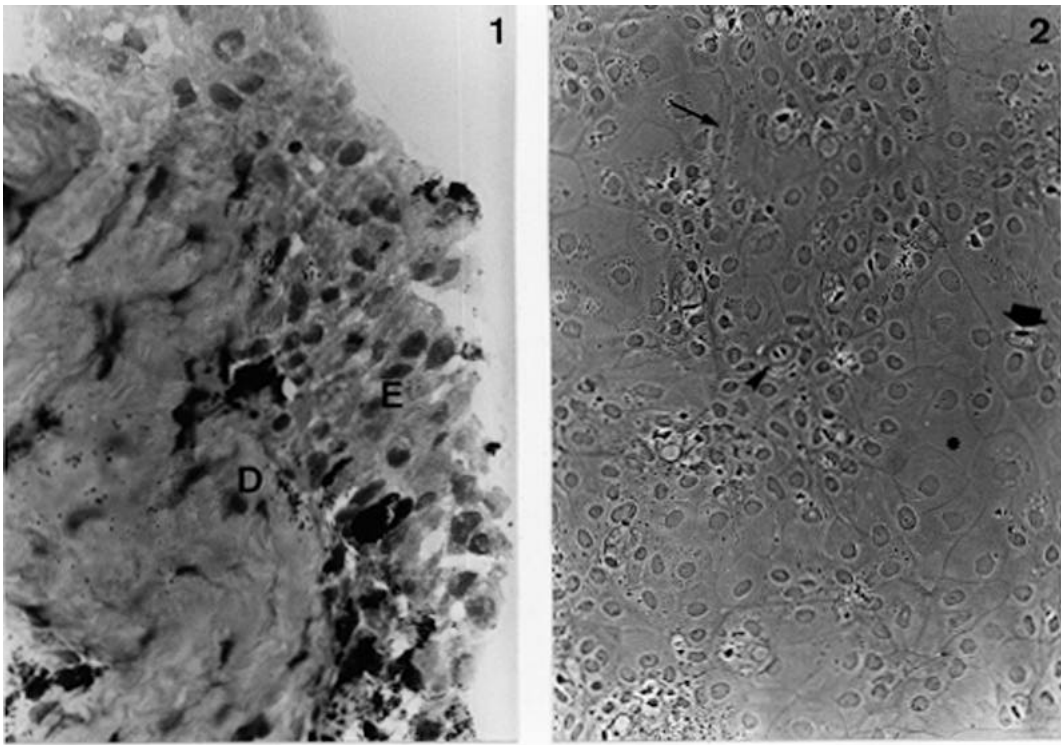


Fig. 4.- Detalle ultraestructural de las interdigitaciones entre dos células epiteliales de un explante de tegumento. x 49.200.

Fig. 5.- Electronografía de un melanóforo en un explante de tegumento. x 9.600.

Fig. 6.- Detalle de dos iridóforos donde destacan las cisternas dispuestas paralelamente (\backslash), vesículas de contenido heterogéneo (\mathcal{P}) y gránulos electrodensos (\mathcal{H}). x 34.800.

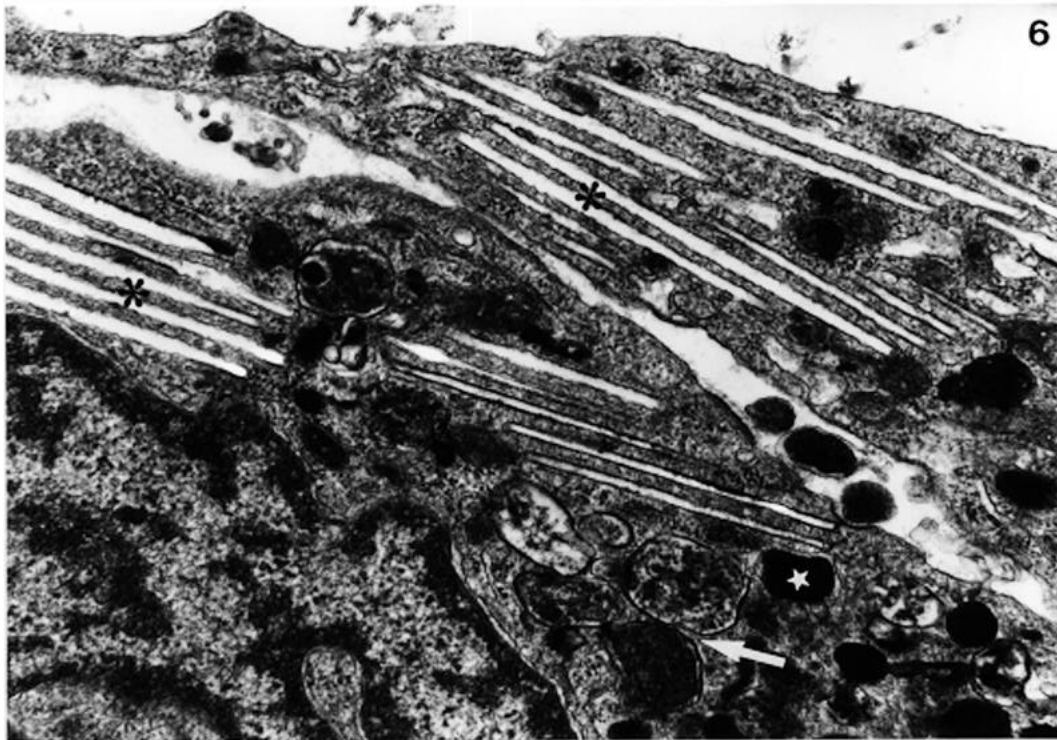
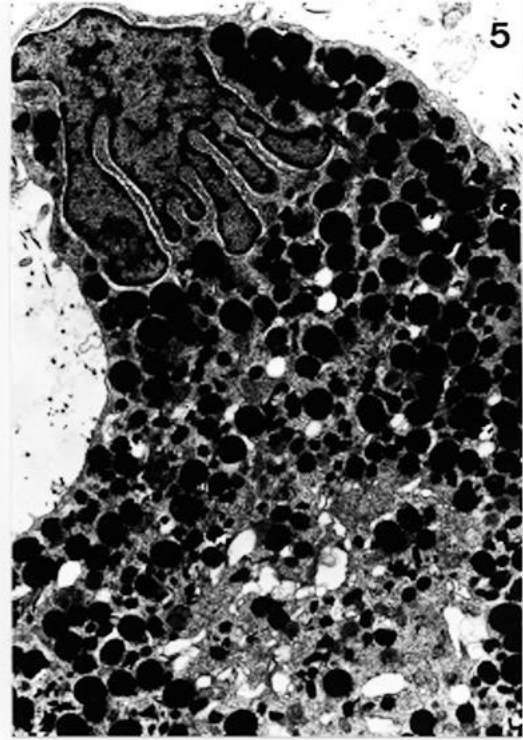


Fig. 7.- Micrografía del estrato laxo de la dermis de un explante de tegumento. Xantóforos (X), iridóforo (I). x 7.000.

Fig. 8.- Detalle del citoplasma de un xantóforo en cultivo donde se muestran los dos tipos de pterinosomas, unos con contenido filamentoso (Λ) y otros homogéneo (H). x 26.000.

Fig. 9.- Estrato laxo de la dermis. Fibroblasto (F). Notar la presencia de pequeños haces de fibras de colágeno (H), gránulos de melanina dispersos (P) y restos celulares. x 15.000.

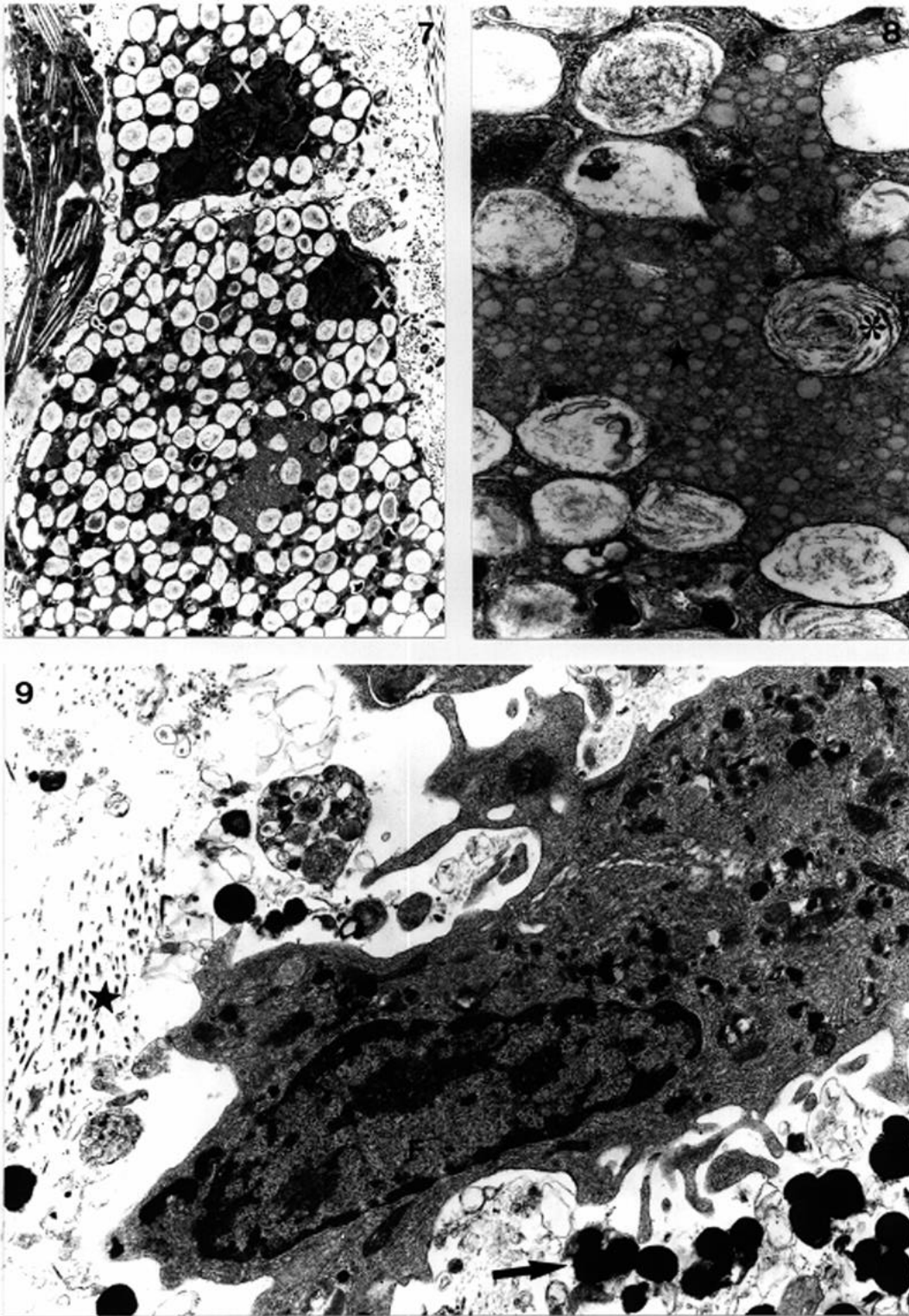


Fig. 10.- Fibroblasto localizado entre haces de fibras colágenas en el estrato compacto de la dermis. x 13.000.

Fig. 11.- Vaso sanguíneo en un explante de tegumento. Células endoteliales (P), fibroblastos (C). x 5.000.

Fig. 12.- Detalle de la figura anterior mostrando una unión estrecha (P) y vesículas de exocitosis (ä) en las células endoteliales. x 88.900.

Fig. 13.- Células epitelioides electroclaras en la monocapa de un cultivo primario de tegumento. Notar el gran número de vesículas. x 19.100.

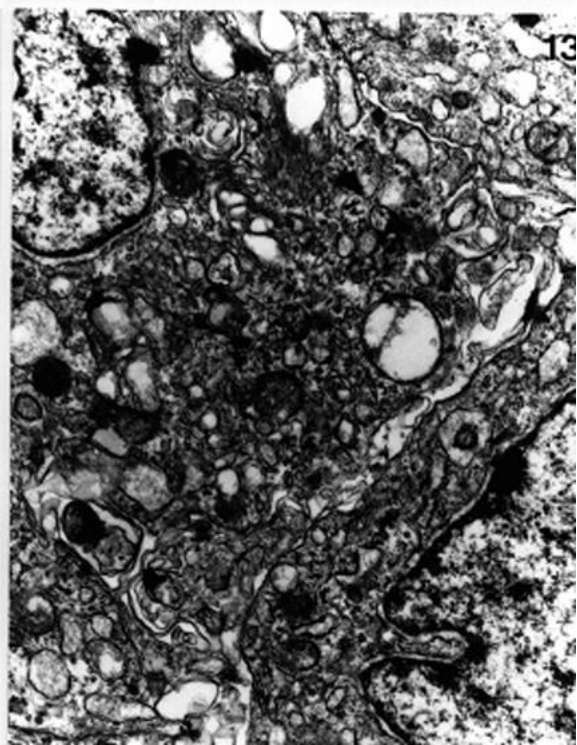
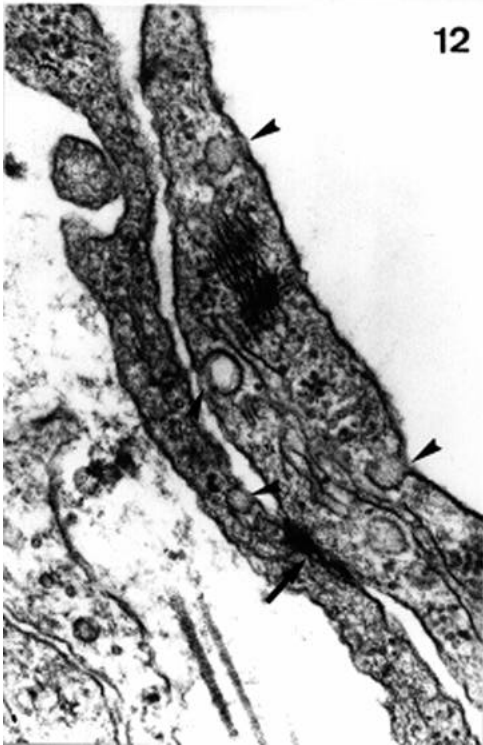
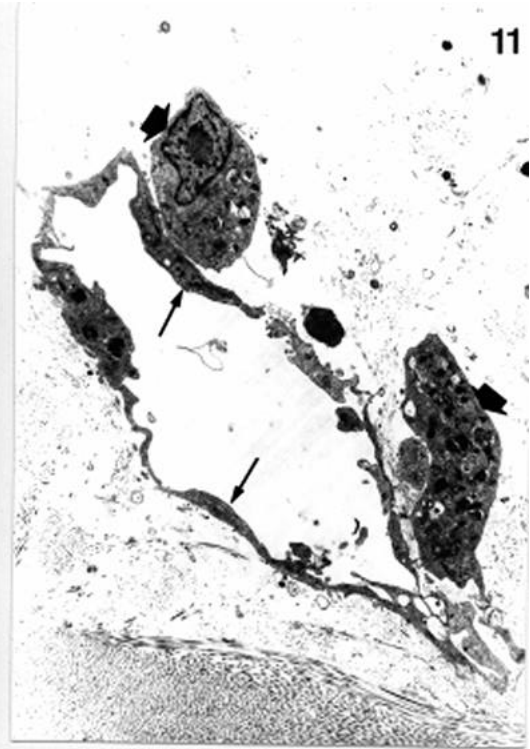
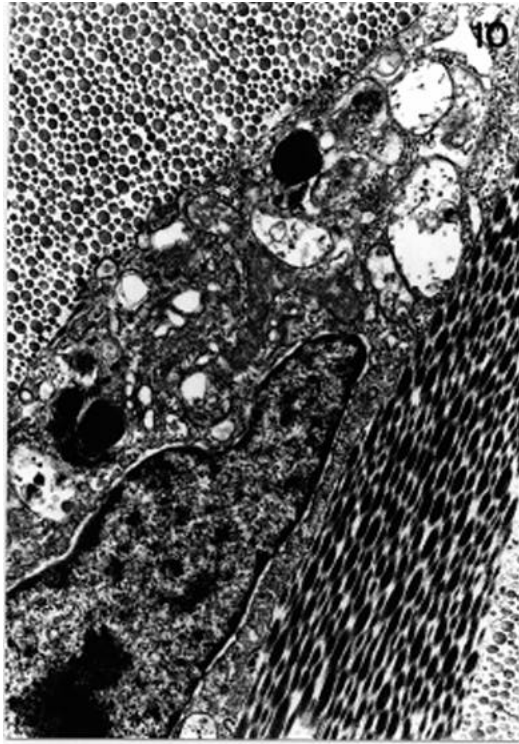


Fig. 14.- Células epitelioides electrodensas en la monocapa de un cultivo primario de tegumento. Desmosoma (Ç). x 12.800.

Fig. 15.- Células epitelioides electrodensas, la más externa presenta el citoplasma degenerado con estructuras membranosas (H). x 13.500.

Fig. 16.- Monocito en un cultivo primario de tegumento. x 22.000.

Fig. 17.- Macrófago en un cultivo primario de tegumento. x 16.000.

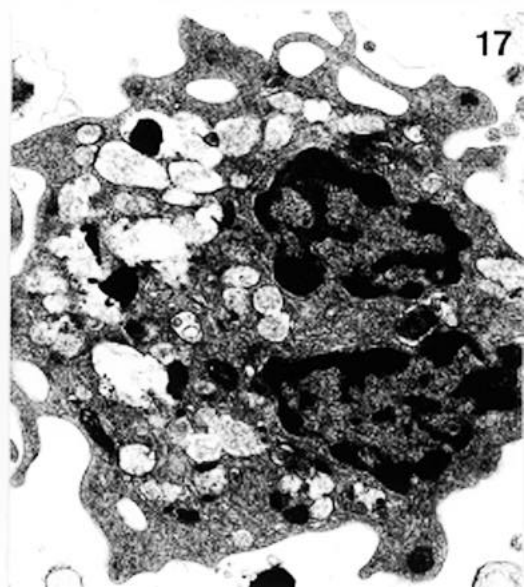
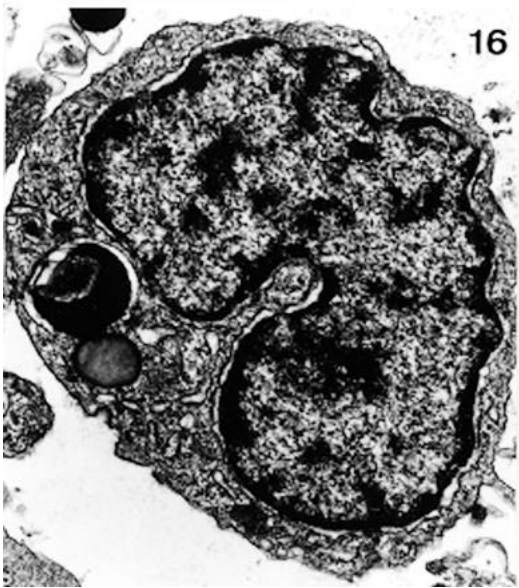
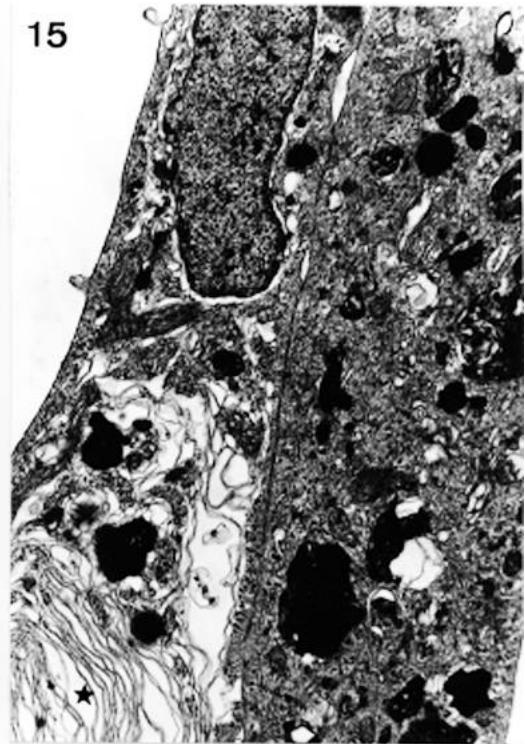
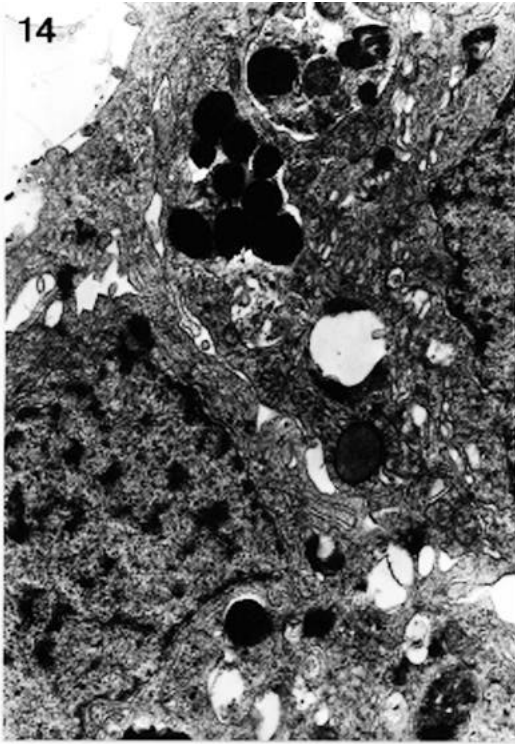


Fig. 18.- Marcaje para el anticuerpo anti-queratina KB-37 en un explante de tegumento a los 20 d. de cultivo. x 750.

Fig. 19.- Actividad AKPH en una sección de un explante de tegumento transcurridos 27 d. en cultivo. x 300.

Fig. 20.- Actividad ANAE en una sección de un explante de tegumento tras 8 d. de cultivo. x 300.

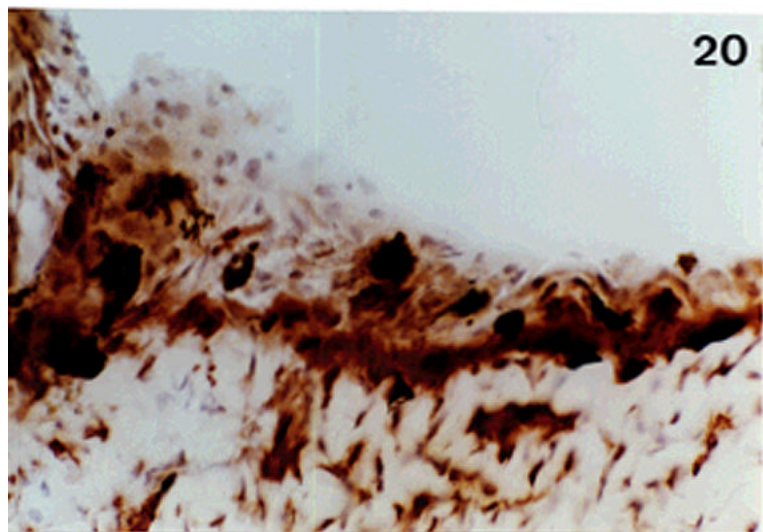
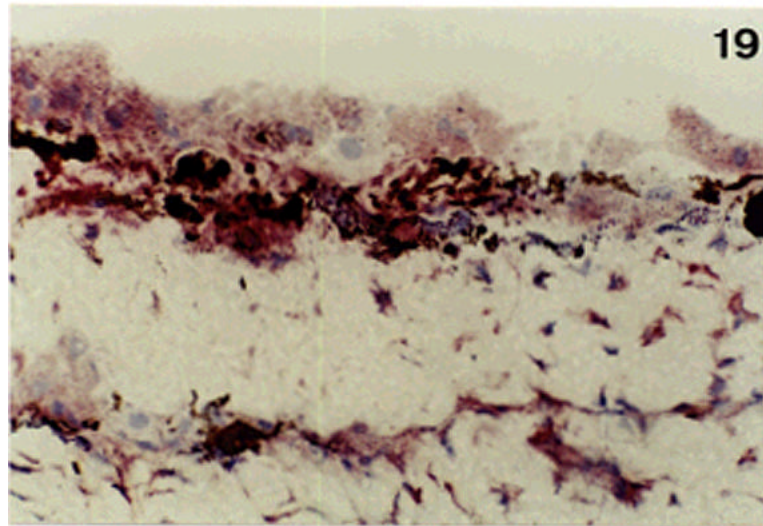
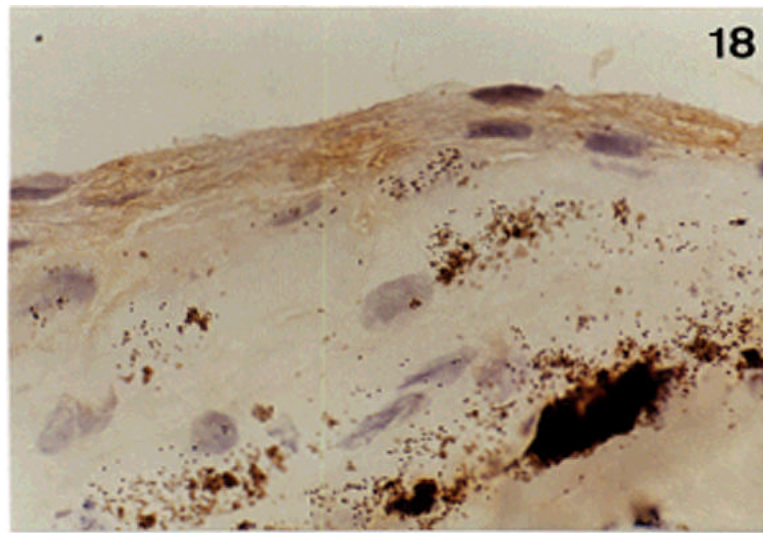


Fig. 21.- Corte semifino del tejido conjuntivo de un filamento branquial transcurridos 20 d. en cultivo. Observar la gran cantidad de vesículas en los fibroblastos. Azul de toluidina. x 750.

Fig. 22.- Micrografía que muestra las laminillas en un explante de branquia a los 20 d. de cultivo. Notar la falta del epitelio de las laminillas. Azul de toluidina. x 750.

Fig. 23.- Monocapa de un cultivo de branquia transcurridos 5 d. Explante (E), células epitelioides (∧) y fibroblastoides (ä). x 175.

Fig. 24.- Células subcultivadas de branquia en el pase 10. Mitosis (ä). x 300.

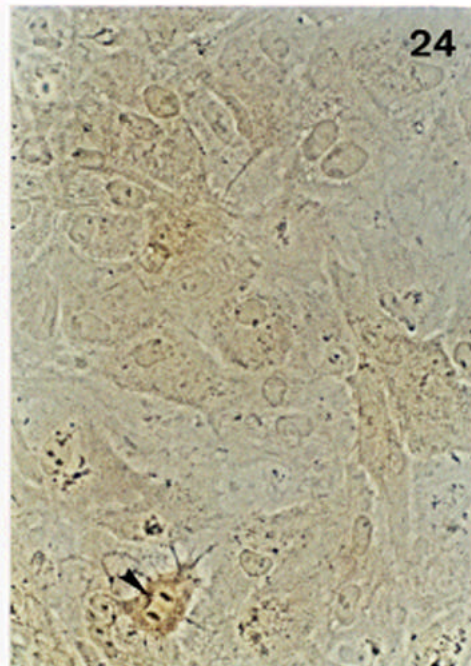
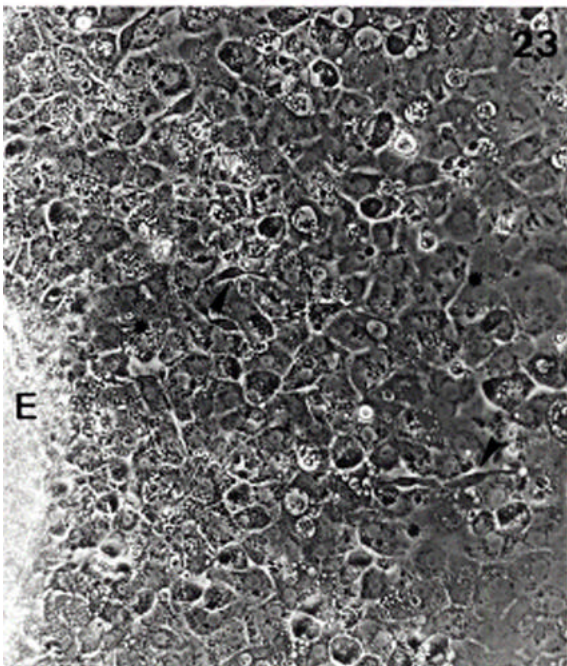
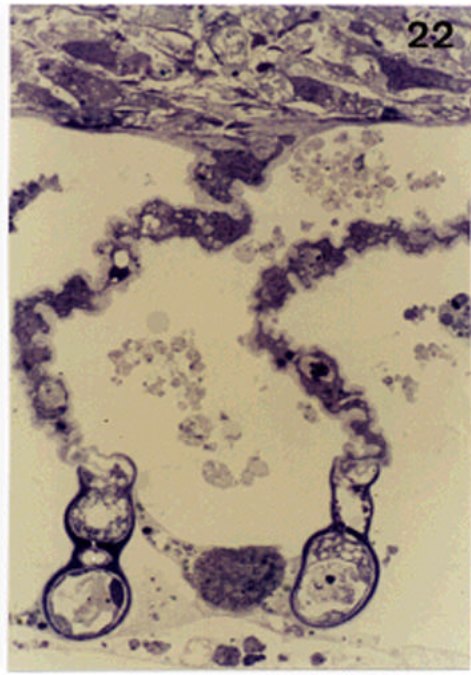
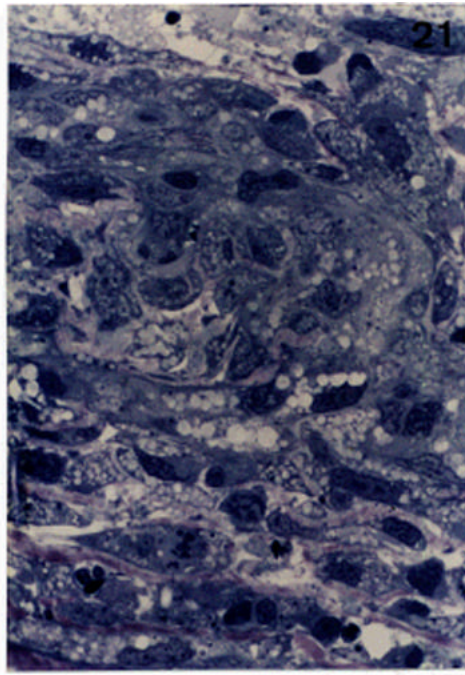


Fig. 25.- Panorámica de un condrocito en un explante de branquia. x 5.000.

Fig. 26.- Detalle de la figura anterior mostrando el citoplasma del condrocito en el que destacan la presencia de haces de filamentos (Ç) y cuerpos residuales (H). x 33.300.

Fig. 27.- Panorámica de la capa condrógena del cartílago del filamento branquial en cultivo. x 5.000.

Fig. 28.- Detalle del citoplasma de una célula de la capa condrógena. Filamentos (Ç), aparato de Golgi (P), retículo endoplásmico rugoso (ä). x 52.300.

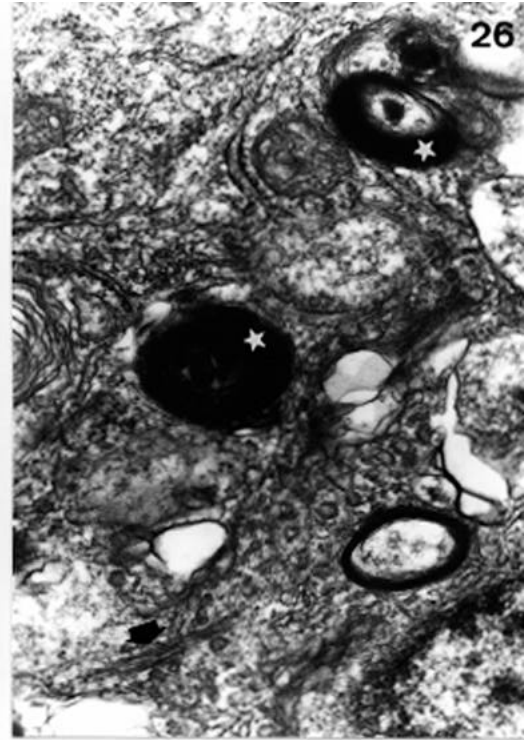
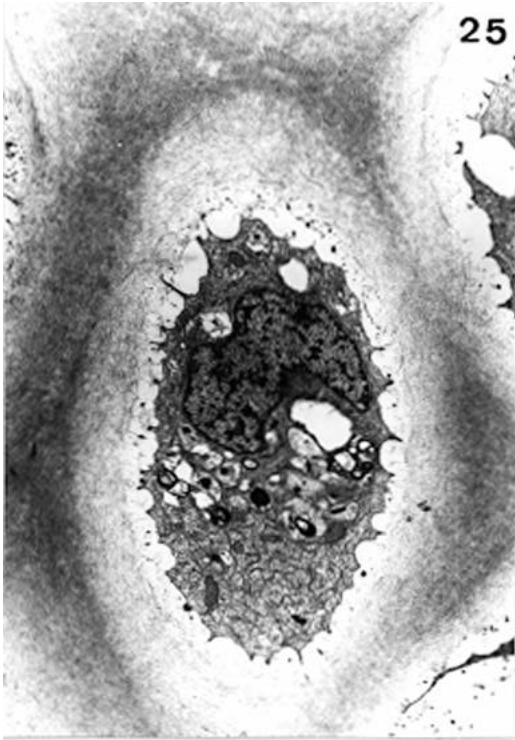


Fig. 29.- Aspecto del pericondrio con fibroblastos y fibras colágenas. x 20.000.

Fig. 30.- Electronografía de un vaso sanguíneo en el tejido conjuntivo del filamento de un explante de branquia. Notar los restos que llenan la luz del vaso. Células endoteliales (E). x 3.800.

Fig. 31.- Aspecto de la porción externa del tejido conjuntivo de un filamento branquial. Fibroblastos (F), fibras de colágeno (H), membrana basal (λ), célula linfocítica (L), epitelio (E). x 13.200.

Fig. 32.- Epitelio de un filamento branquial en cultivo. Membrana basal (I), unión estrecha (P). x 16.600.

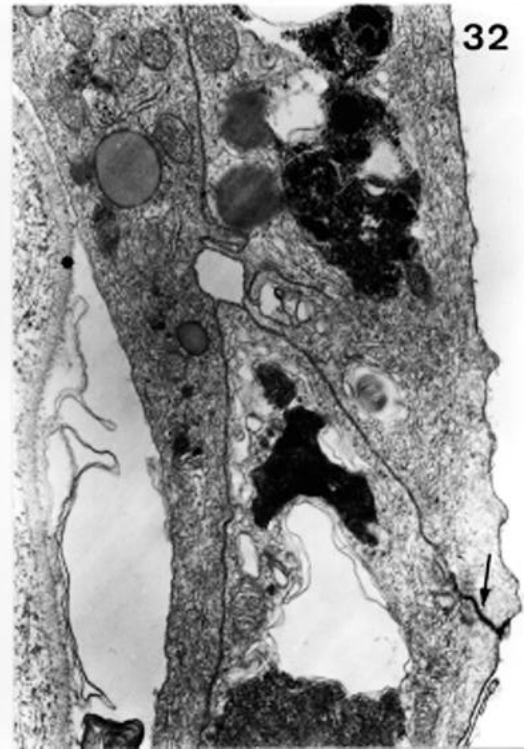
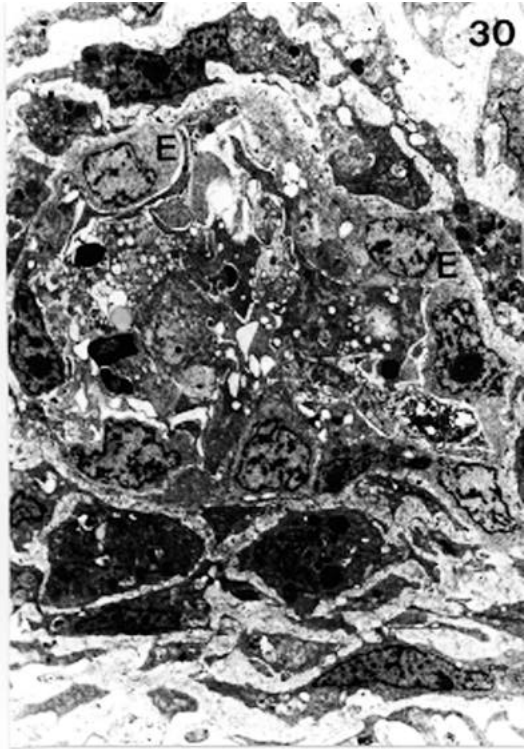
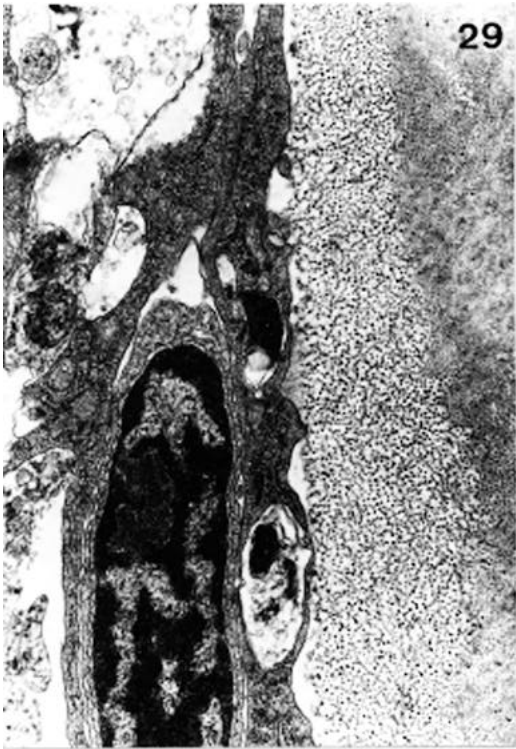


Fig. 33.- Detalle del epitelio del filamento branquial mostrando un complejo de unión (P) e interdigitaciones (C) entre las células epiteliales. Membrana basal (A). x 40.500.

Fig. 34.- Panorámica que muestra el aspecto de las laminillas branquiales después de 20 d. en cultivo. x 3.600.

Fig. 35.- Citoplasma de una célula pilar en el que destaca el gran desarrollo del aparato de Golgi (P). Membrana basal (A). x 42.100.

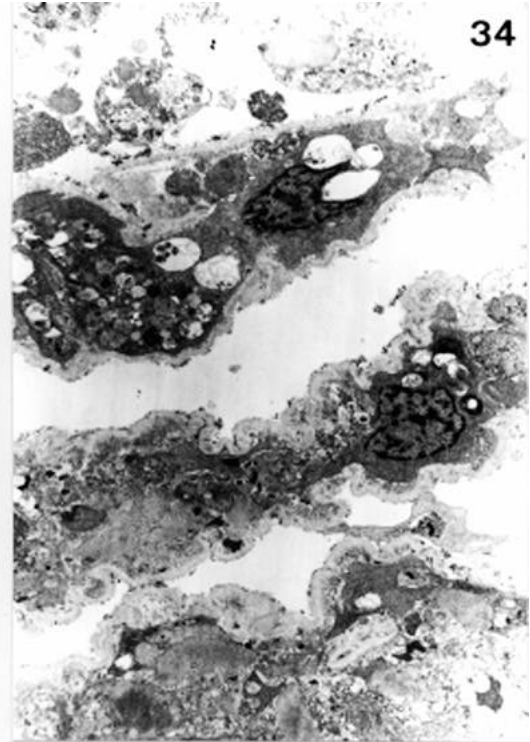
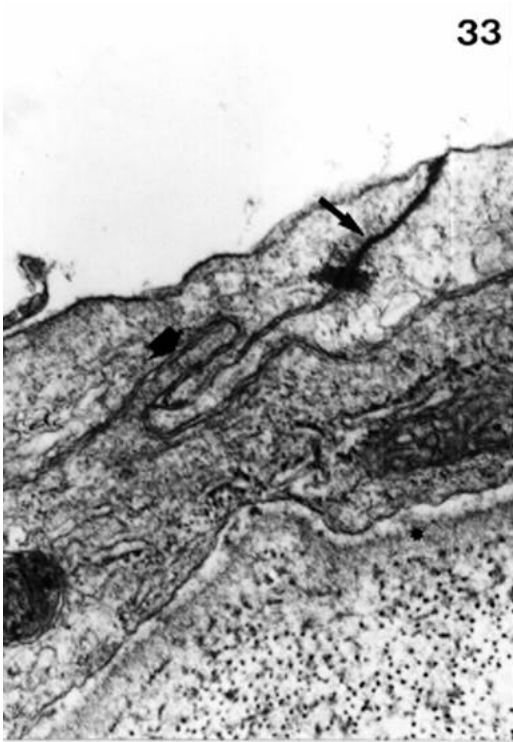


Fig. 36.- Imagen del extremo apical de una laminilla. Célula pilar (P), células endoteliales (E), membrana basal (Λ). x 4.000.

Fig. 37.- Célula localizada en la capa de células de aspecto epitelial que rodea al extremo distal de las laminillas. x 16.300.

Fig. 38.- Detalle del citoplasma de la célula de la figura anterior mostrando las mitocondrias (H) y el desarrollado sistema de canales (ç). x 10.200.

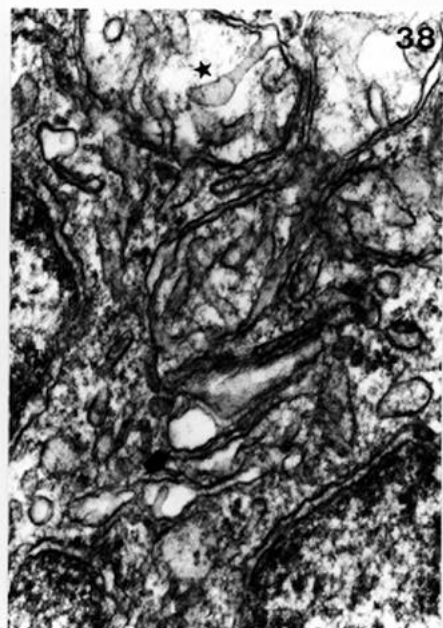
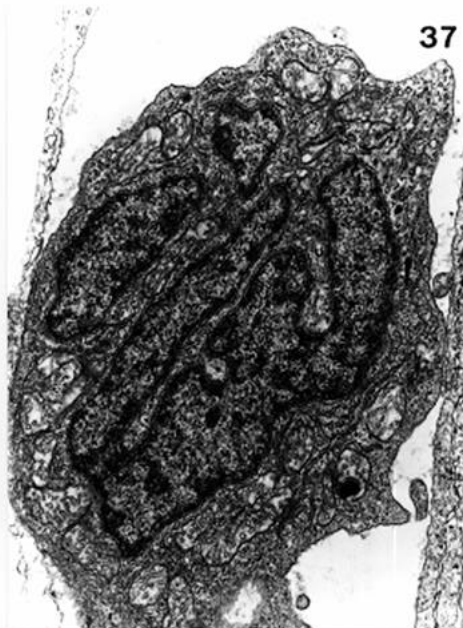


Fig. 39.- Grupo de células libres en un cultivo primario de branquia. Células epitelioides (E), células fibroblastoides (F), macrófago (M), célula linfoide (L). x 7.300.

Fig. 40.- Células epitelioides del borde de crecimiento de la monocapa de un cultivo primario de branquia. Material extracelular amorfo (H). x 7.200.

Fig. 41.- Detalle del citoplasma de las células epitelioides de la monocapa de un cultivo primario de branquia. Aparato de Golgi (P), vesículas de contenido heterogéneo (ç), haces de filamentos (ä). x 33.300.

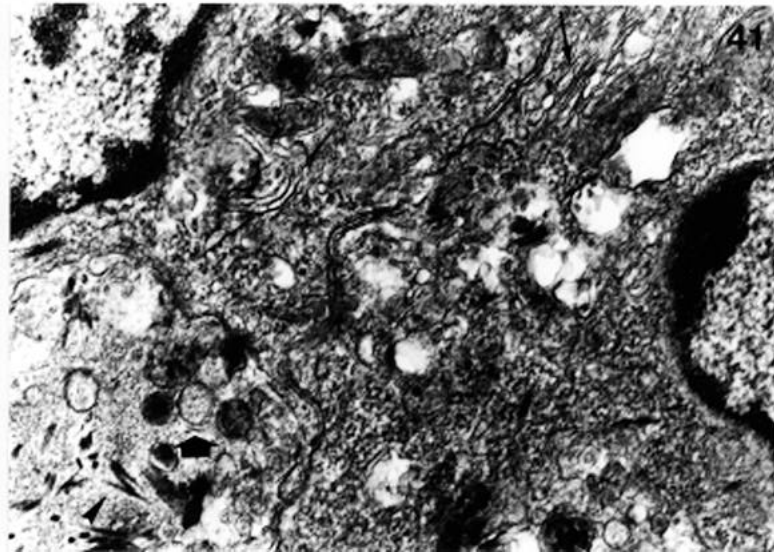
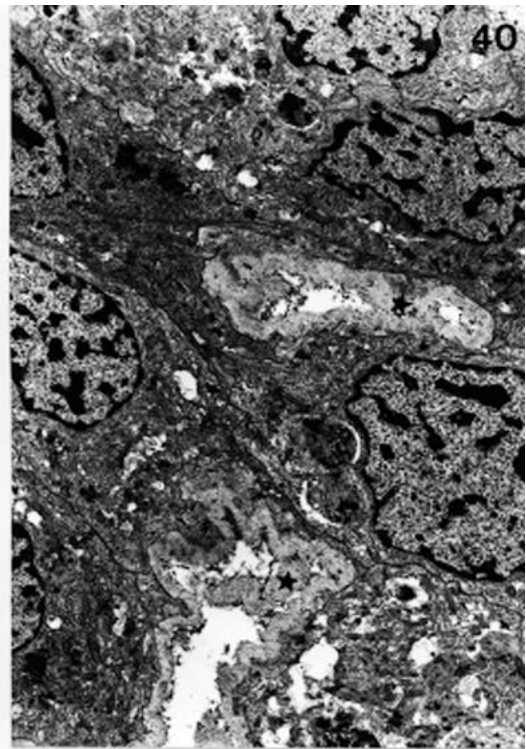
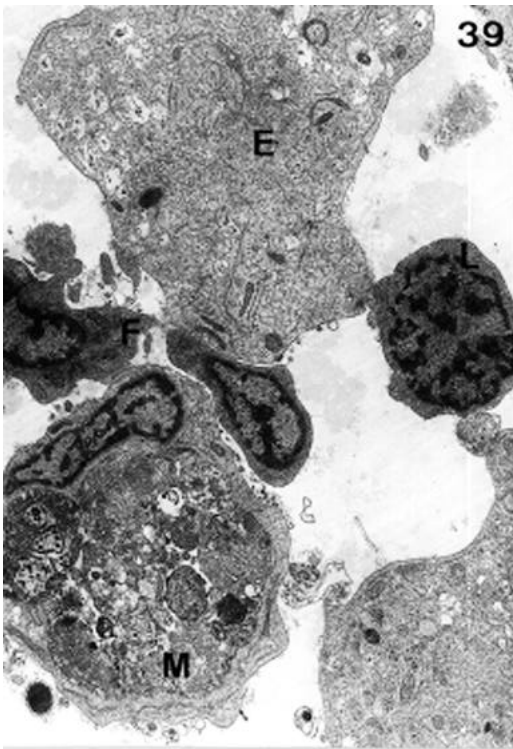


Fig. 42.- Micrografía de las células subcultivadas de branquia (pase 4). Destacan los gránulos electrodensos y los filamentos. x 9.600.

Fig. 43.- Detalle de las uniones entre células subcultivadas de branquia (pase 4). Desmosomas (c). x 20.000.

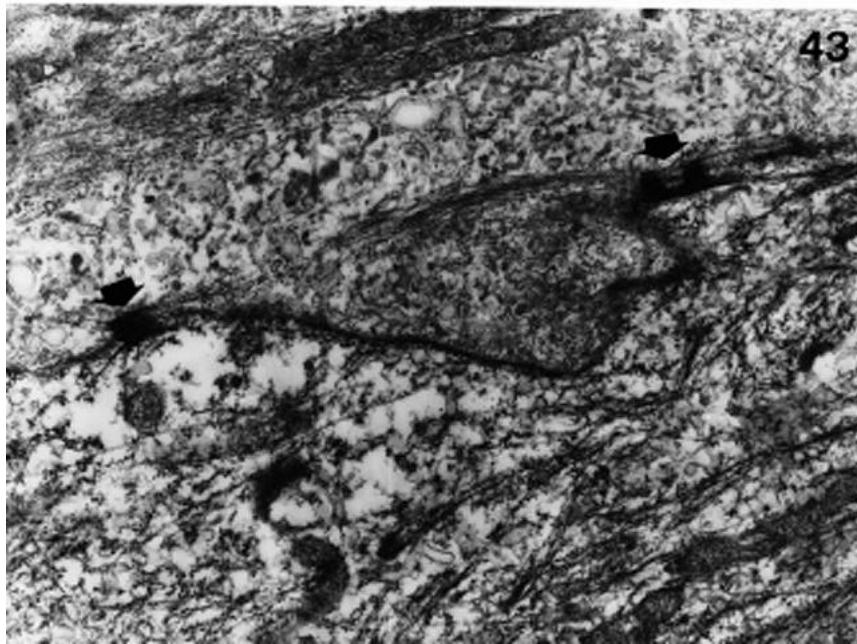
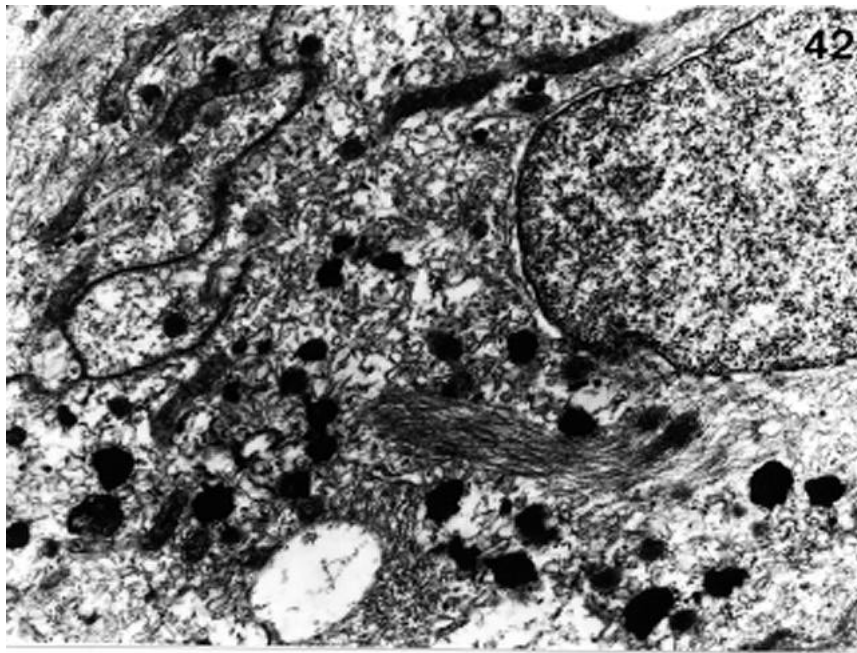


Fig. 44.- Células subcultivadas de branquia (pase 10) marcadas con el anticuerpo anti-proteína S-100. x 300.

Fig. 45.- Células subcultivadas de branquia (pase 10) marcadas con el anticuerpo anti-queratina KB-37. x 300.

Fig. 46.- Actividad AKPH en la sección de un filamento de branquia a los 4 d. de cultivo. x 150.

Fig. 47.- Subcultivo de células de branquia (pase 12) teñido con rojo al aceite O. x 300.

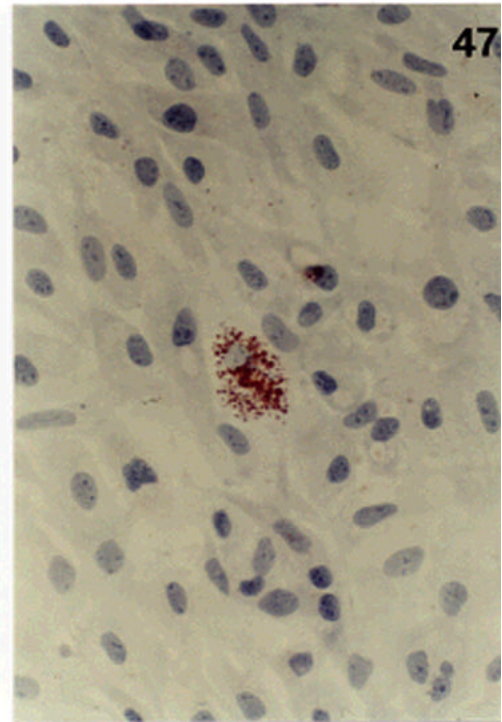
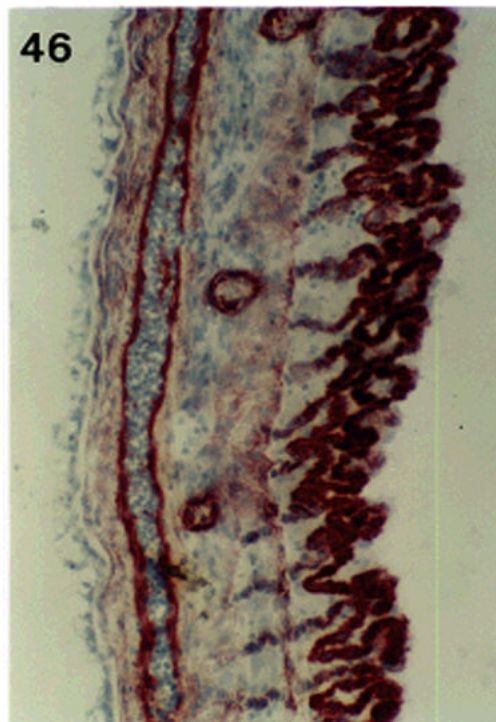
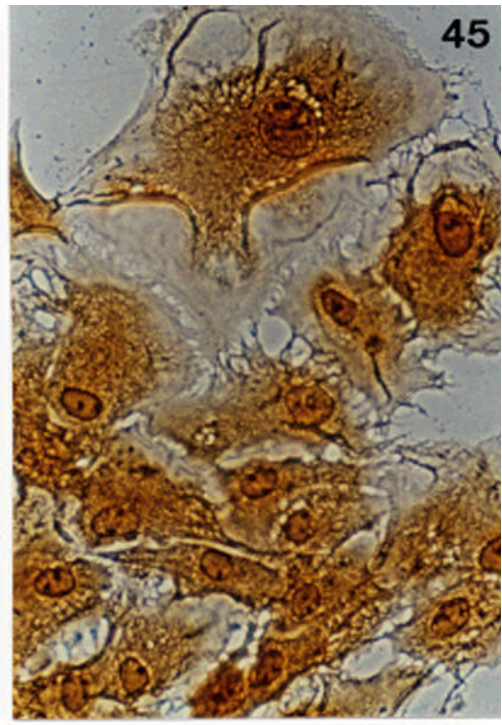
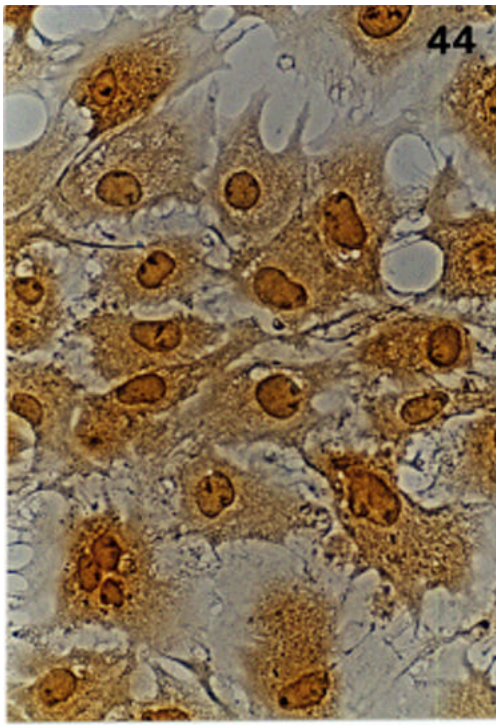


Fig. 48.- Corte semifino de un explante de pronefros a los 20 d. de cultivo en el que se aprecian la zona interna (I), la zona de transición (T) y el borde de crecimiento (C). Azul de toluidina.. x 300.

Fig. 49.- Cultivo primario de pronefros a los 15 d. Células epitelioides (ä), células fibroblastoides (P), melanomacrófagos (ç) y células redondeadas (P). x 200.

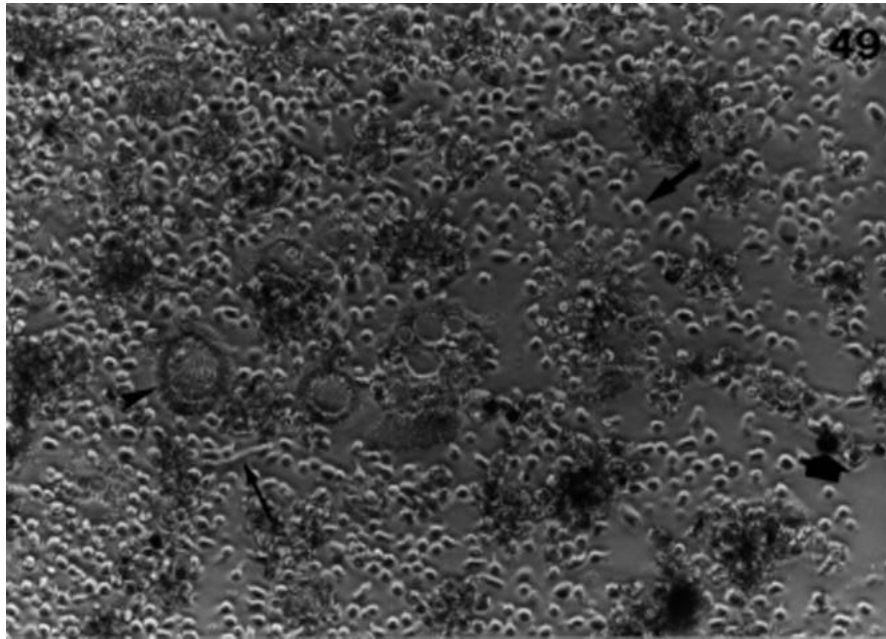
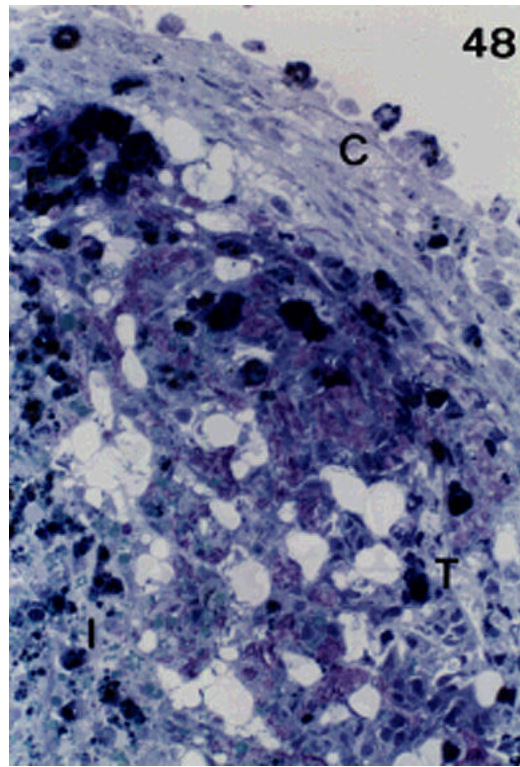


Fig. 50.- Zona interna de un explante de pronefros mostrando células reticulares con gotas de grasa y cuerpos residuales (R), restos celulares (H) y fibras colágenas (λ). x 4.000.

Fig. 51.- Detalle del citoplasma de una célula reticular de la zona interna de un explante de pronefros, en el que se aprecia el notable desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y grandes cuerpos residuales. x 20.000.

Fig. 52.- Melanomacrófago localizado entre restos celulares y núcleos picnóticos en la zona interna de un explante de pronefros. Notar el gran número de gotas de grasa. x 6.500.

Fig. 53.- Células reticulares (R) en el límite de la zona interna (I) de un explante de pronefros. x 4.800.

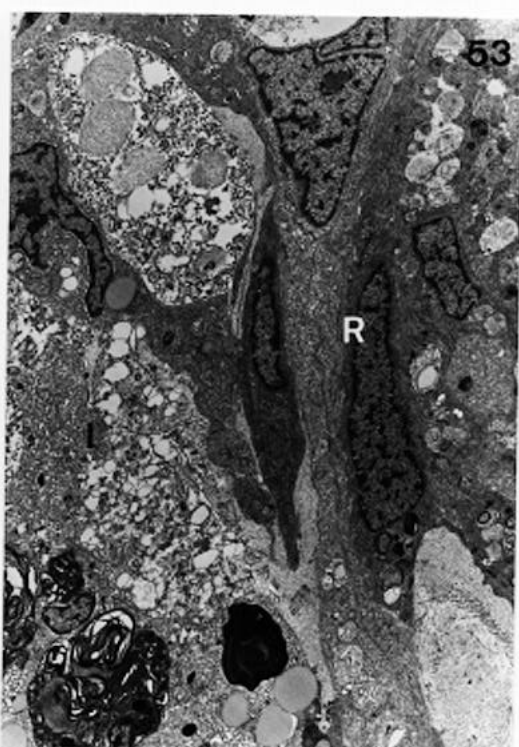
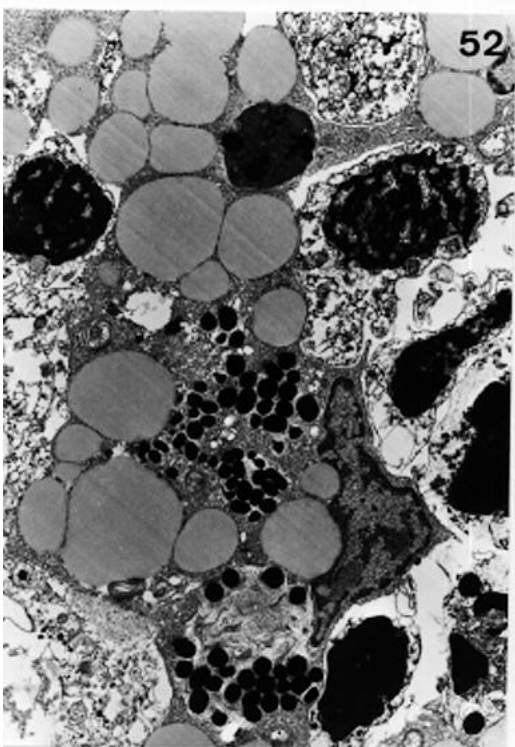
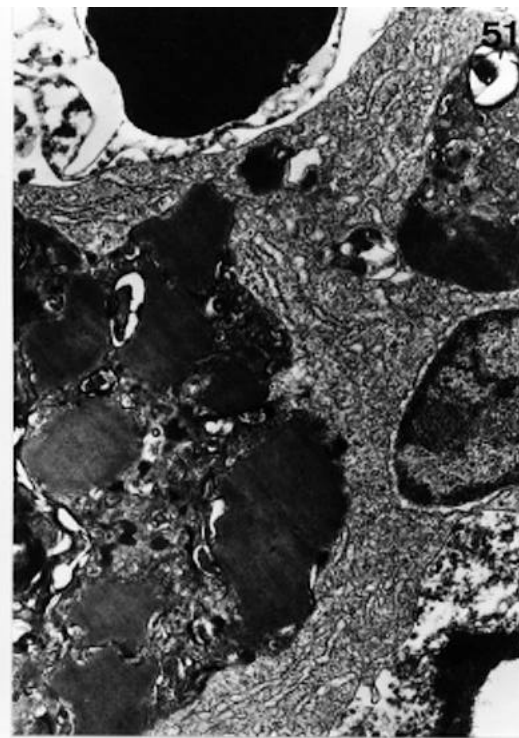
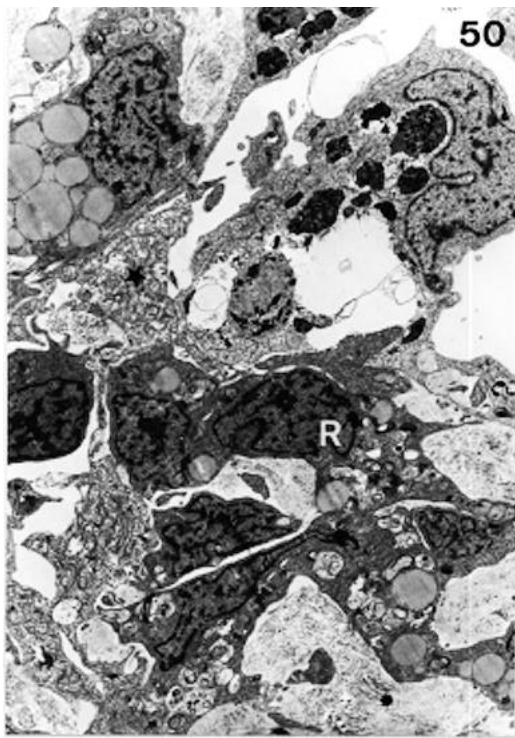
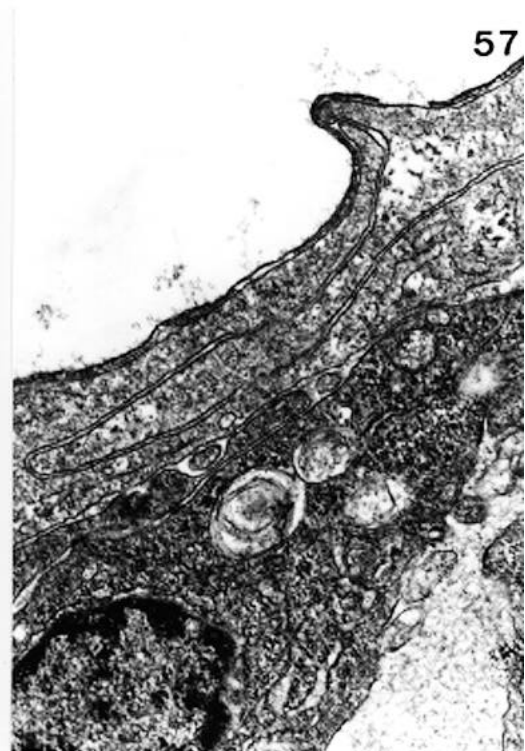
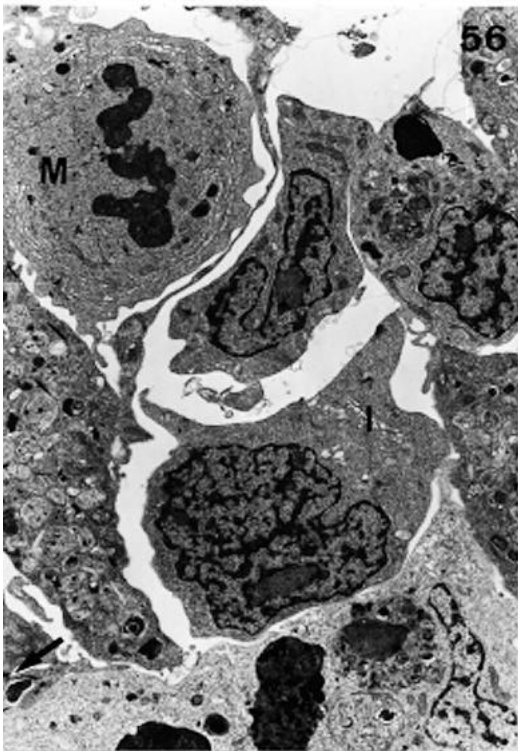
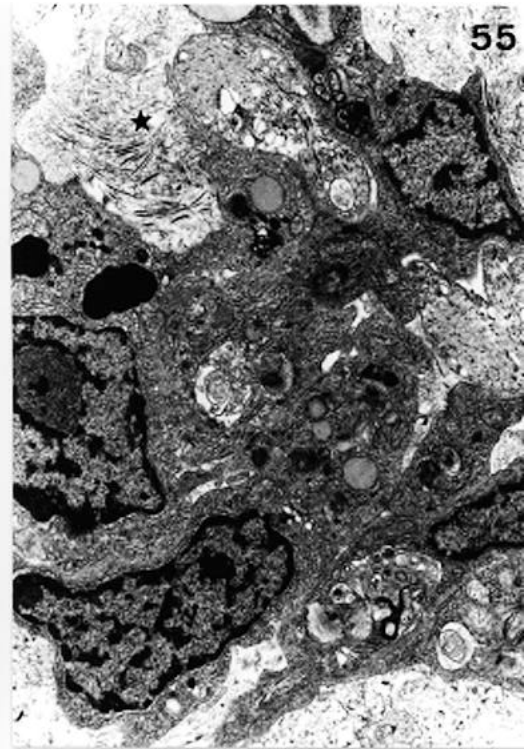
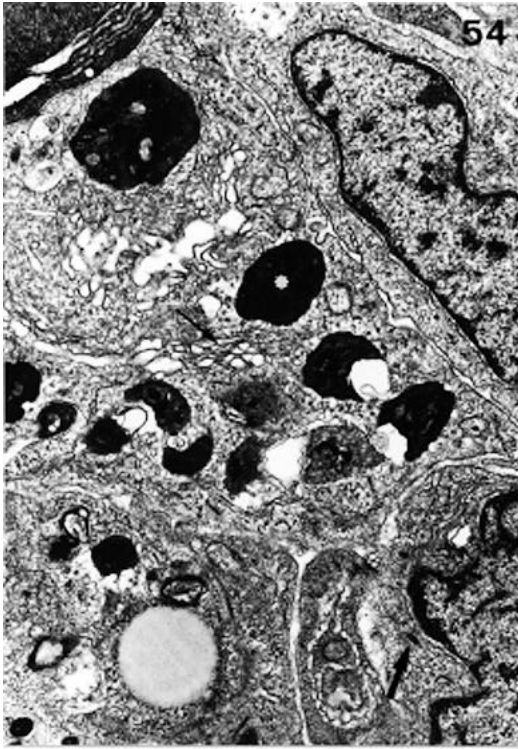


Fig. 54.- Detalle del citoplasma de las células reticulares localizadas entre la zona interna y el borde de crecimiento en un explante de pronefros. Aparato de Golgi (P), cuerpos electrodensos (Λ), y haces de filamentos (P). x 13.500.

Fig. 55.- Grupo de células reticulares de la zona de transición de un explante de pronefros. Notar en su citoplasma el desarrollado retículo endoplásmico rugoso, los numerosos cuerpos residuales y las gotas lipídicas. Fibras colágenas (H). x 8.500.

Fig. 56.- Imagen de un grupo de células reticulares, algunas de ellas inmaduras o en mitosis (M). Desmosoma (P). x 7.200.

Fig. 57.- Espacio libre en la zona de transición de un explante de pronefros delimitado por prolongaciones de varias células. x 18.000.



Acceso a Tesis

Fig. 58.- Sinusoide sanguíneo de la zona de transición de un explante de pronefros conteniendo eritrocitos (E) y trombocitos (T). Células sinusoidales degeneradas (S), uniones estrechas (ä), linfocito (L), células reticulares (R). x 5.800.

Fig. 59.- Detalle de un blasto en la zona de transición de un explante de pronefros. x 18.900.

Fig. 60.- Células epitelioides (E) y fibroblastoides (F) en un cultivo primario de pronefros. Destaca el desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (∧) y del aparato de Golgi (H), la gran cantidad de cuerpos residuales y los haces de filamentos (ä). x 8.100.

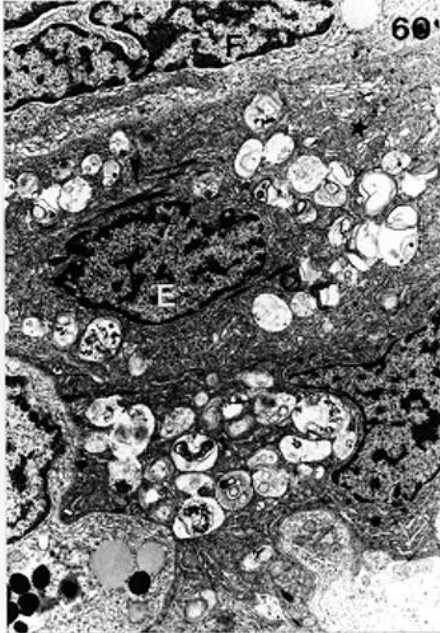
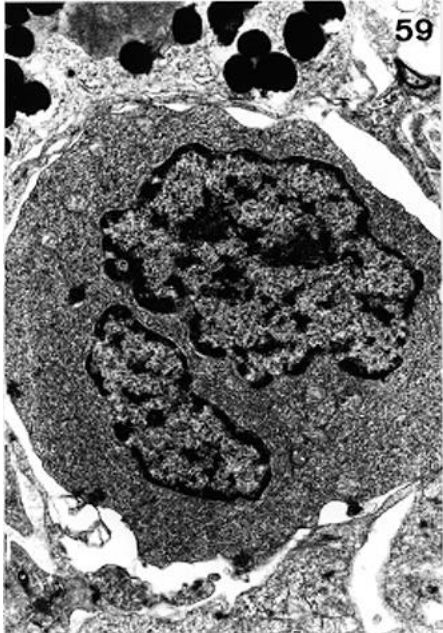
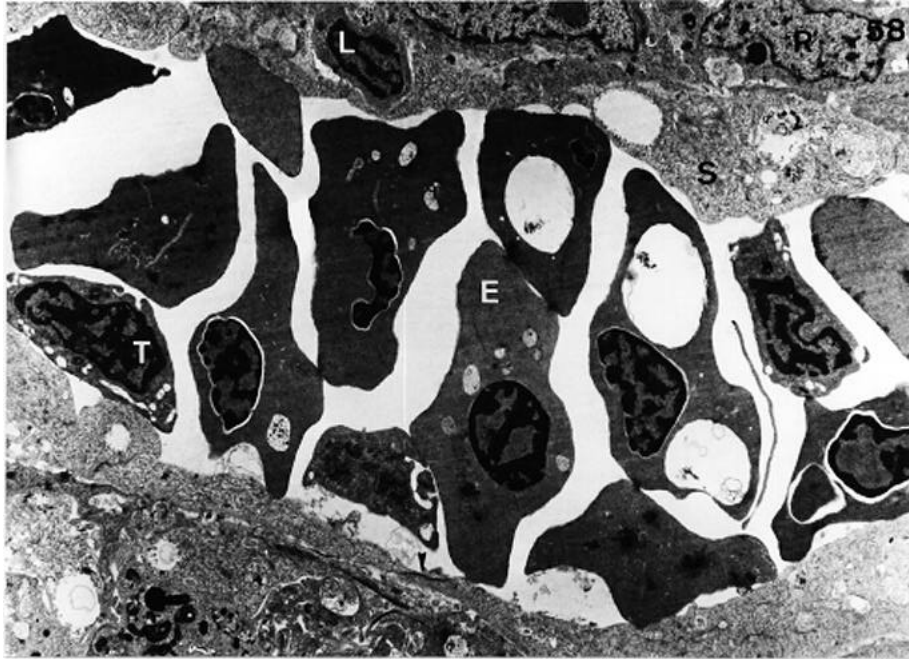


Fig. 61.- Células epitelioides (E) y fibroblastoides (F) en el borde de crecimiento de un cultivo de pronefros. x 11.300.

Fig. 62.- Detalle del citoplasma de una célula fibroblastoide de un cultivo primario de pronefros rodeada por matriz extracelular. Destacan los cuerpos residuales y las vesículas de contenido heterogéneo. x 16.700.

Fig. 63.- Imagen de un grupo de células fibroblastoides (F) en un cultivo primario de pronefros. Célula en mitosis (M). x 5.000.

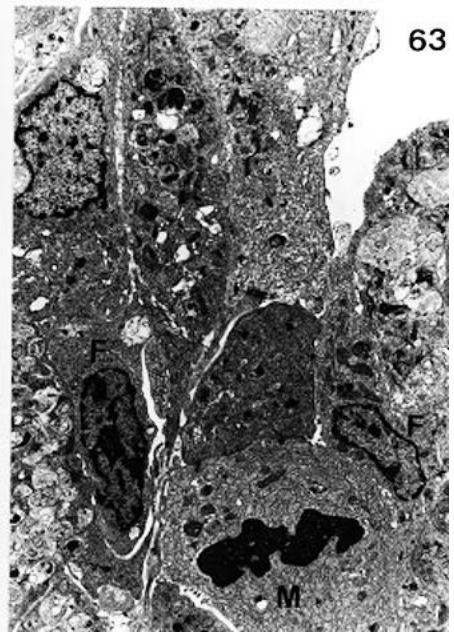
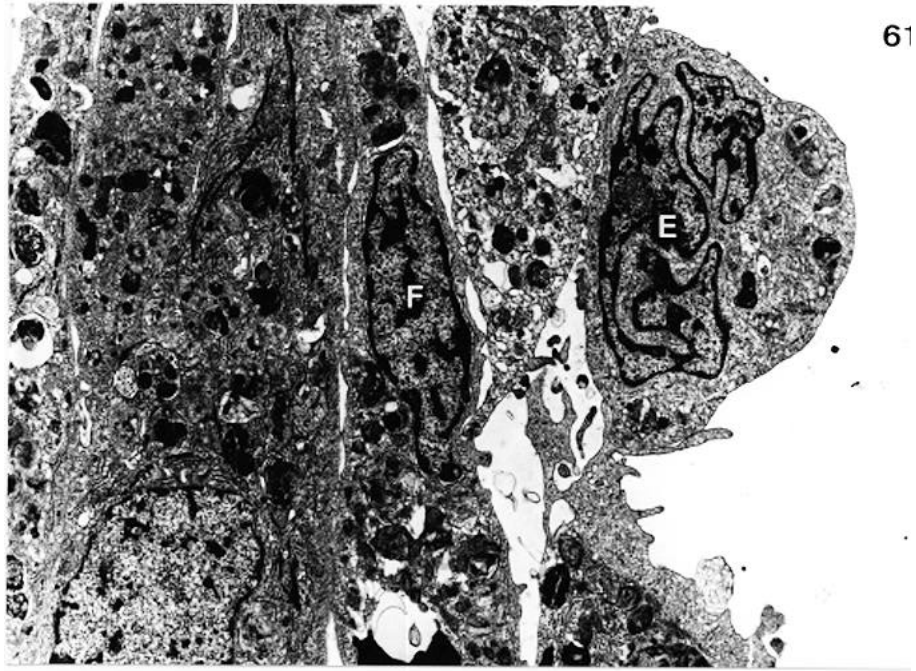


Fig. 64.- Panorámica de un cultivo primario de pronefros. Melanomacrófagos (M), células epitelioides (E), células fibroblastoides (F). x 9.000.

Fig. 65.- Célula gigante multinucleada de un cultivo primario de pronefros. En su citoplasma destacan grandes vesículas de contenido granular (Λ), retículo endoplásmico liso (H) y haces de filamentos (Ç). x 18.400.

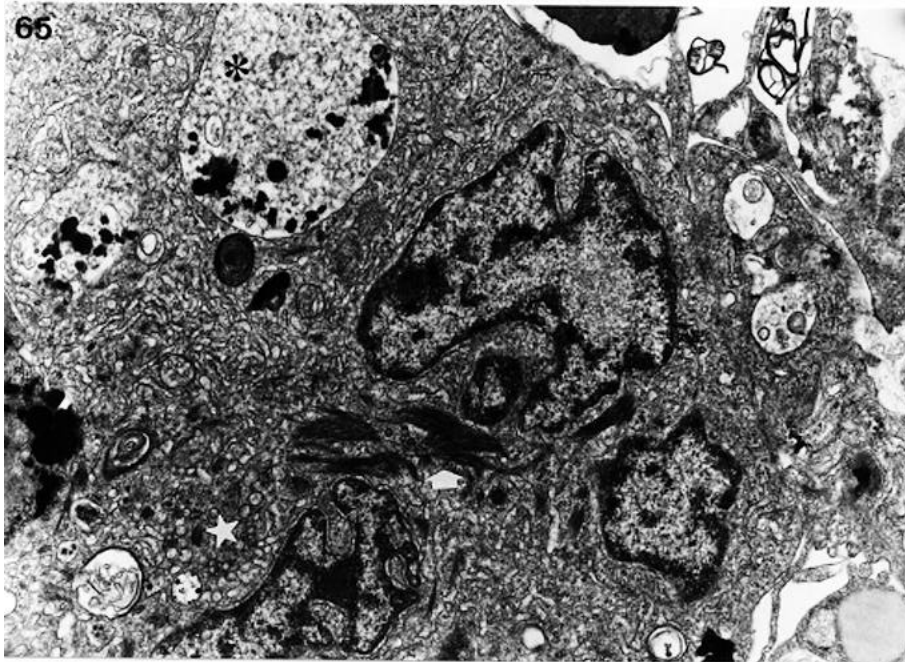
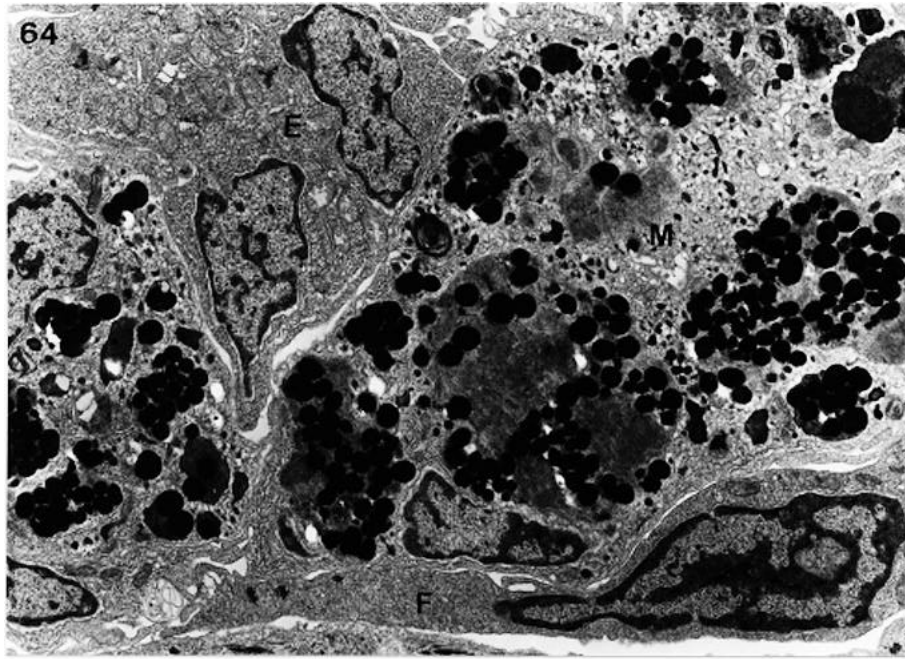


Fig. 66.- Sección de un explante de pronefros transcurridos 20 d. de cultivo marcado con un anticuerpo pan-queratina. x 150.

Fig. 67.- Actividad ACPH en un explante de pronefros tras 8 d. en cultivo. x 300.

Fig. 68.- Patrón de actividad AKPH en las células reticulares de un explante de pronefros a los 8 d. de cultivo. x 300.

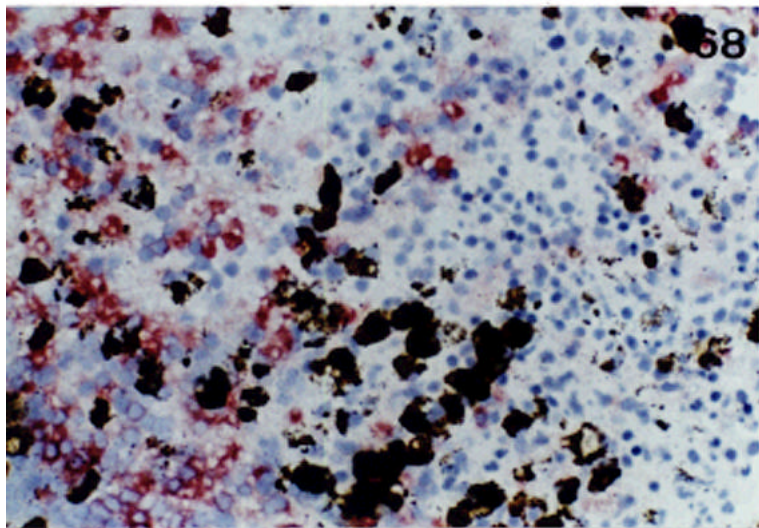
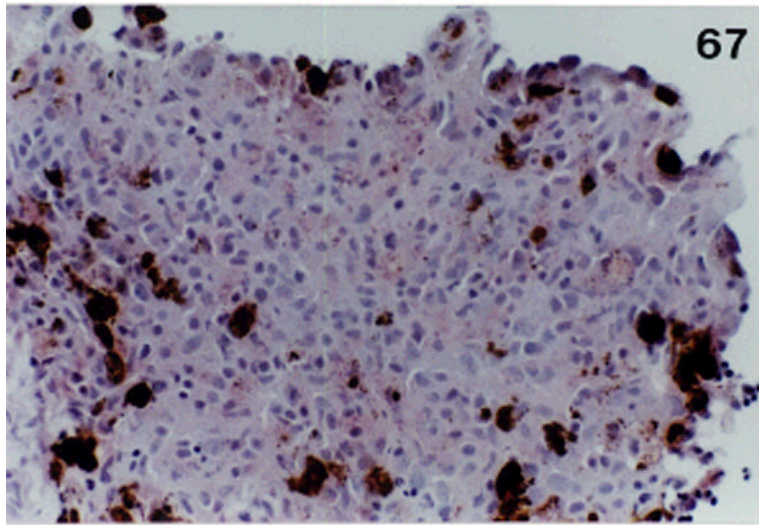
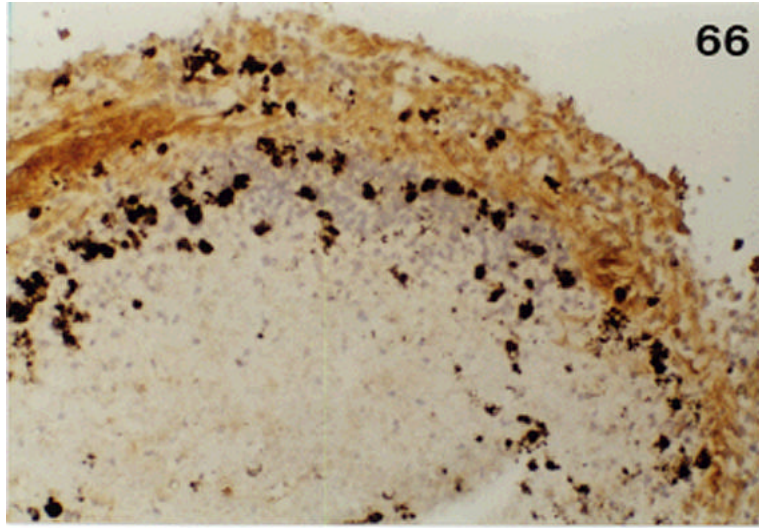


Fig. 69.- Panorámica de una sección de un explante de pronefros a los 12 d. de cultivo incubada para demostrar la actividad ANAE. x 75.

Fig. 70.- Actividad ACPH en la monocapa de un cultivo primario de pronefros a los 30 d. de cultivo. x 300.

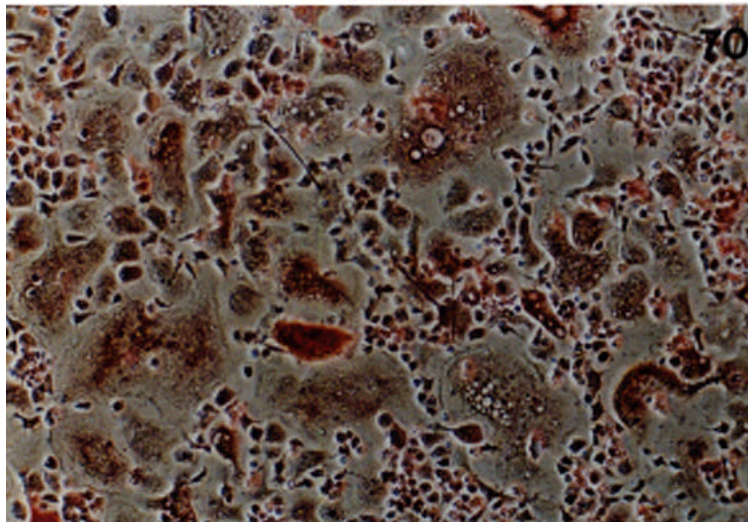
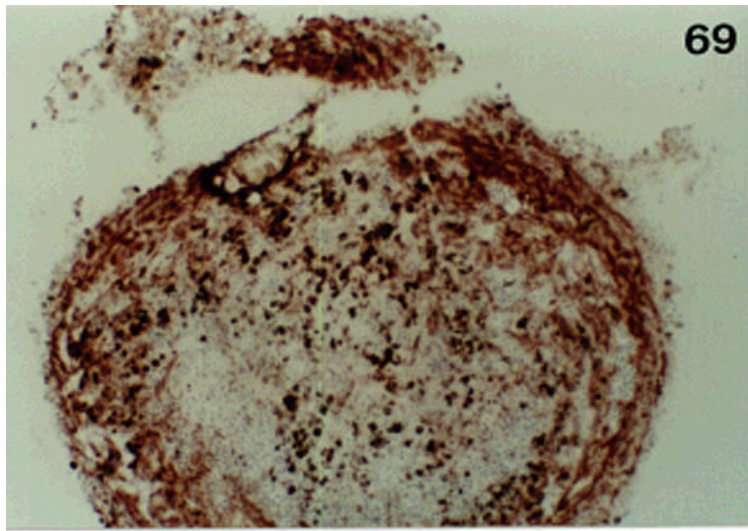


Fig. 71.- Corte semifino de un explante de bazo. Zona interna (I), zona de transición (T) y borde de crecimiento (C). Azul de toluidina. x 750.

Fig. 72.- Monocapa de un cultivo primario de bazo transcurridos 5 d. Células epitelioides (ä), células fibroblastoides (P). x 180.

Fig. 73.- Monocapa de un cultivo primario de bazo a los tres meses de cultivo, suplementado con medio completo C. Colonias hematopoyéticas (H). x .180

Fig. 74.- Monocapa de células subcultivadas de bazo (pase 4). Células epitelioides (ä), células fibroblastoides (P), gotas lipídicas (λ). x 180.

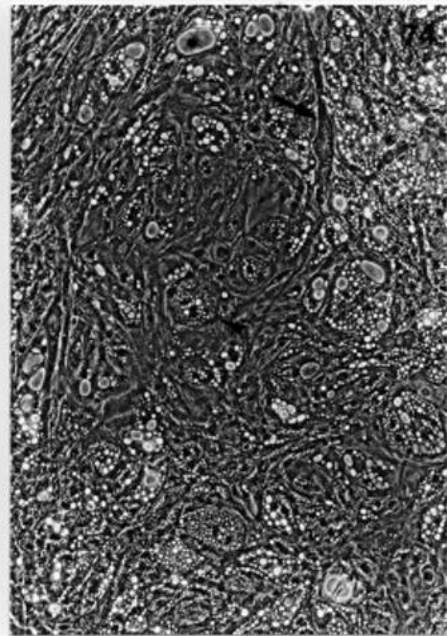
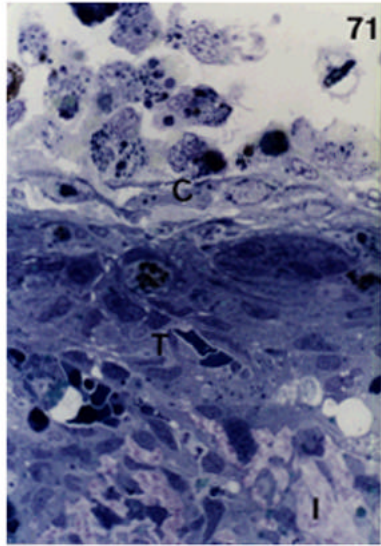


Fig. 75.- Grupo de células reticulares en la zona interna de un explante de bazo. Gotas lipídicas (H). x 7.500.

Fig. 76.- Detalle de la figura anterior en el cual se aprecia el gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi. x 33.000.

Fig. 77.- Célula reticular de la zona interna de un explante de bazo con el citoplasma completamente ocupado por gotas lipídicas. x 9.800.

Fig 78.- Célula granular eosinófila degenerada en la zona interna de un explante de bazo. x 8.400.

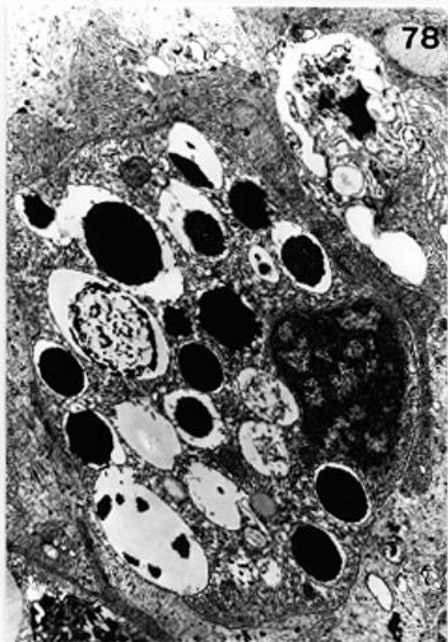
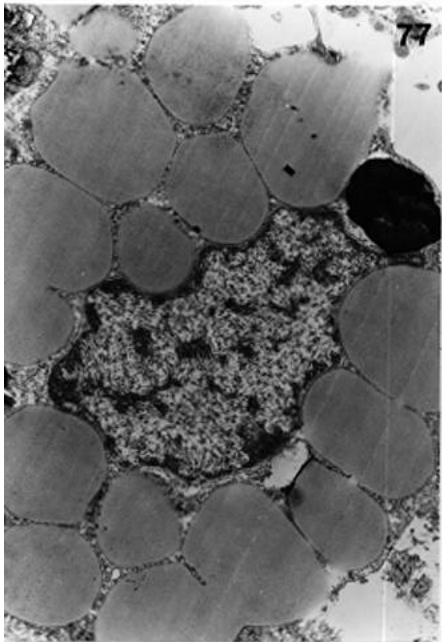
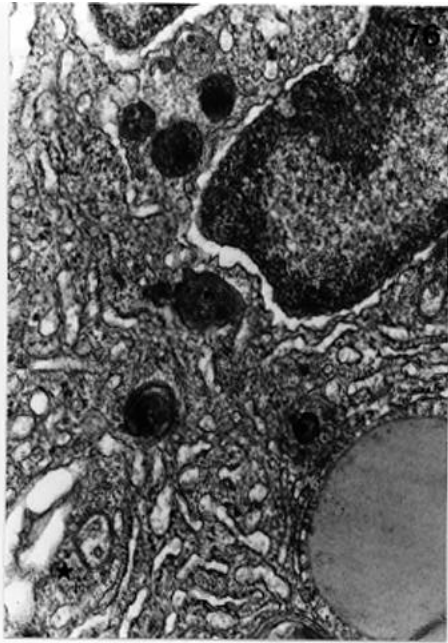
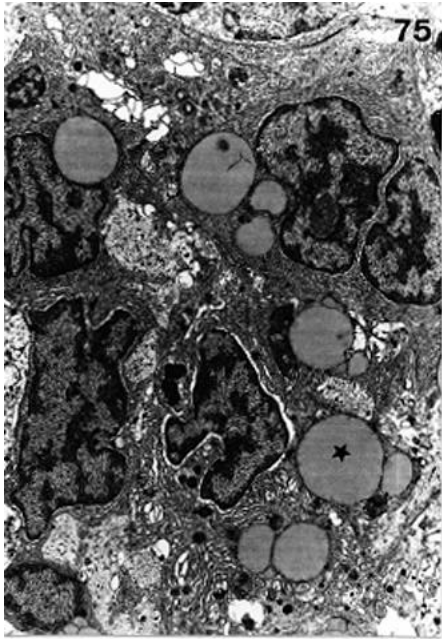


Fig. 79.- Grupo de células reticulares en la zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento. Uniones gap (ä), matriz extracelular (H). x 8.100.

Fig. 80.- Detalle del citoplasma de una de las células de la figura anterior. Aparato de Golgi (λ), cuerpos multivesiculares (ä), gotas lipídicas (H). x 24.000.

Fig. 81.- Acúmulo de melanomacrófagos en la zona de transición de un explante de bazo. x 7.300.

Fig. 82.- Célula linfoide rodeada por prolongaciones de células reticulares en la zona de transición de un explante de bazo. Desmosoma (ä), haces de filamentos (ç). x 16.500.

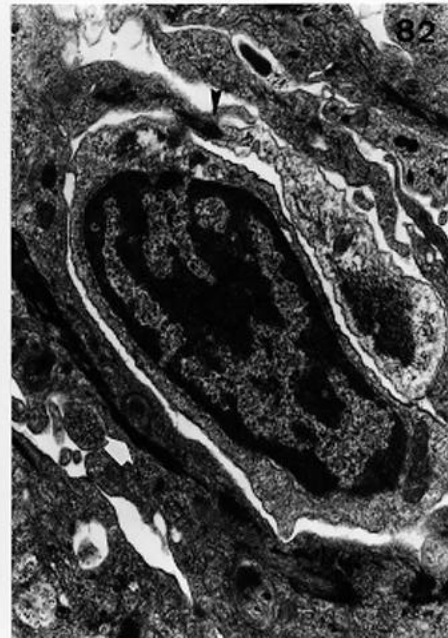
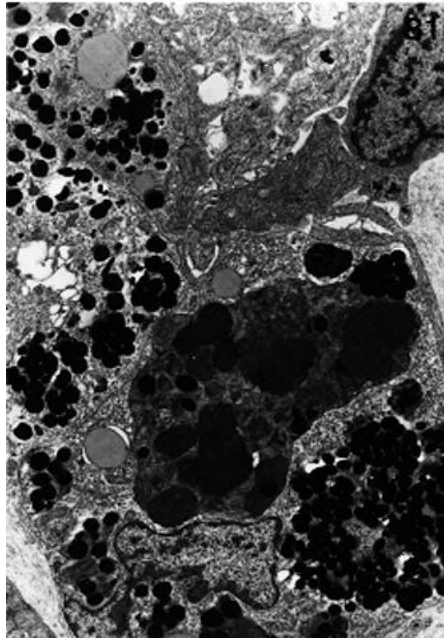
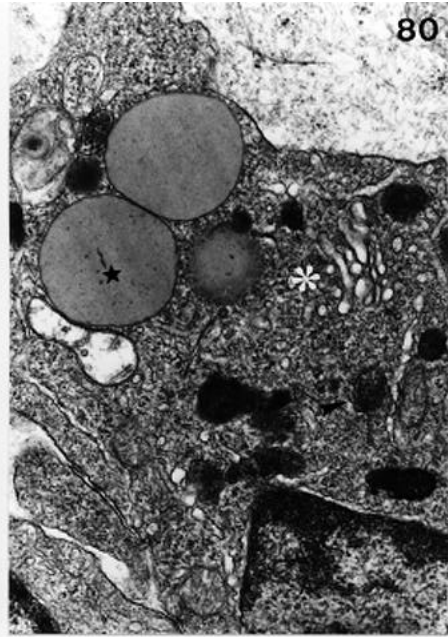
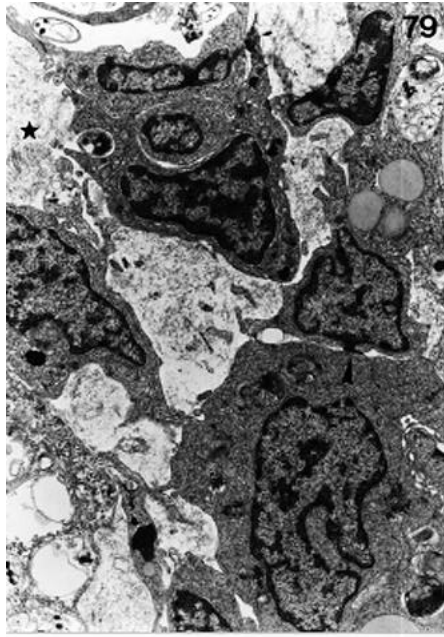


Fig. 83.- Célula granular eosinófila localizada en la zona de transición de un explante de bazo.
x 27.300.

Fig. 84.- Células granulares eosinófilas maduras en proceso de desgranulación en el entramado reticular de un explante de bazo. Notar la fusión de gránulos y el proceso de desgranulación. x 14.500.

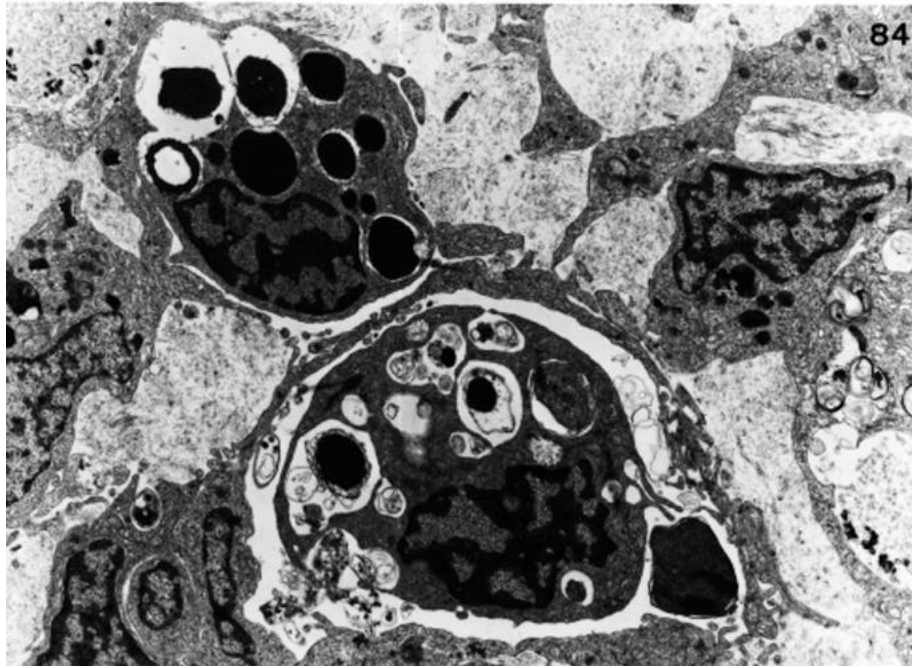
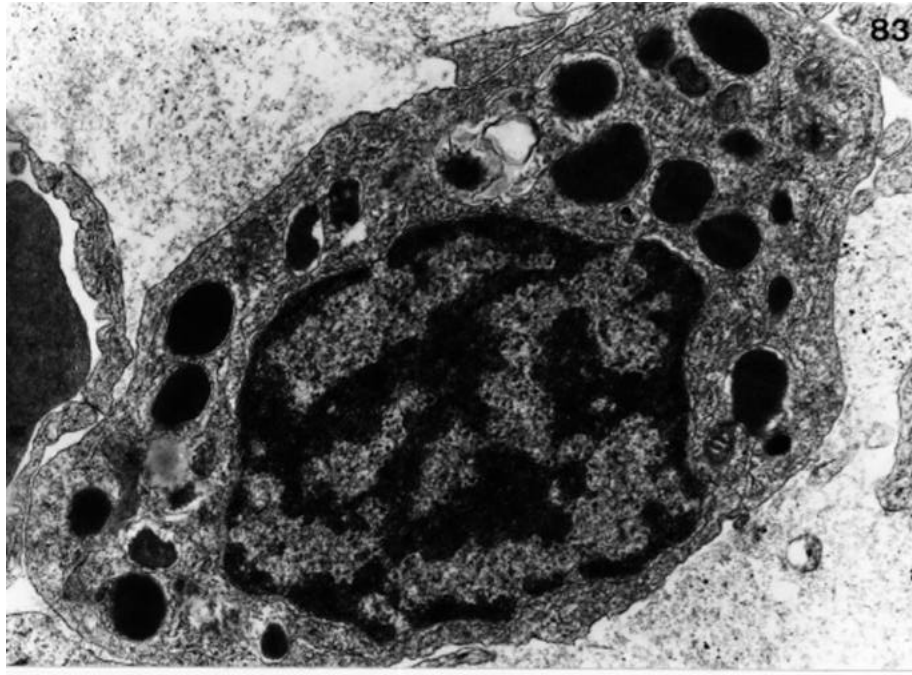


Fig. 85.- Monocito (Mc) y macrófago (M) en la zona de transición de un explante de bazo. x 8.000.

Fig. 86.- Sinusoide de la zona de transición de en un explante de bazo. Células limitantes sinusoidales degeneradas (S), células reticulares (R). x 6.800.

Fig. 87.- Trombocito (T) en los restos de un sinusoide esplénico en cultivo. x 7.200.

Fig. 88.- Entramado laxo de células epitelioides (E) en la monocapa de un cultivo primario de bazo. Notar la gran cantidad de haces de filamentos (Ç) y de gotas lipídicas (Λ). x 4.800.

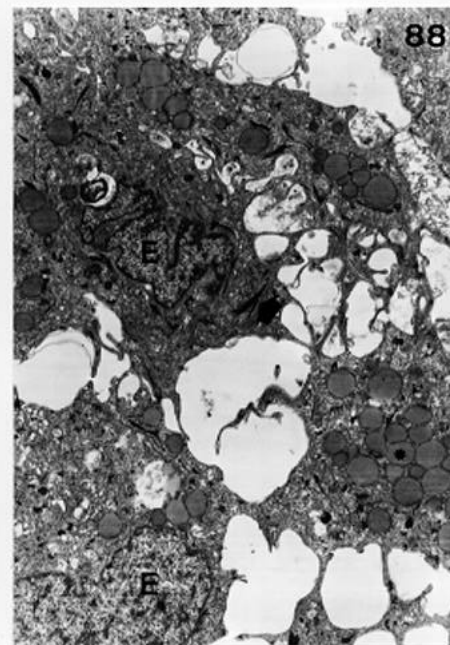
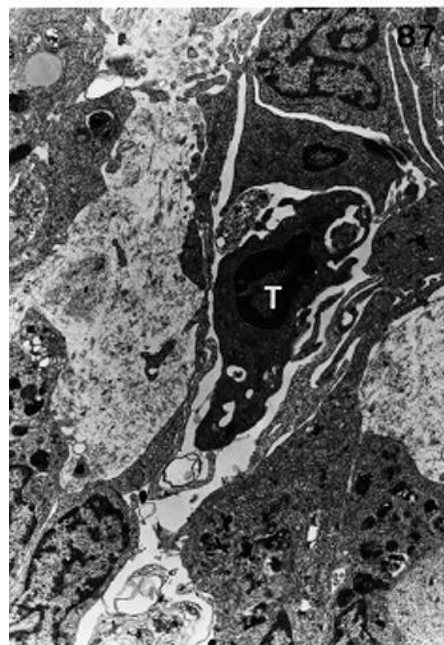
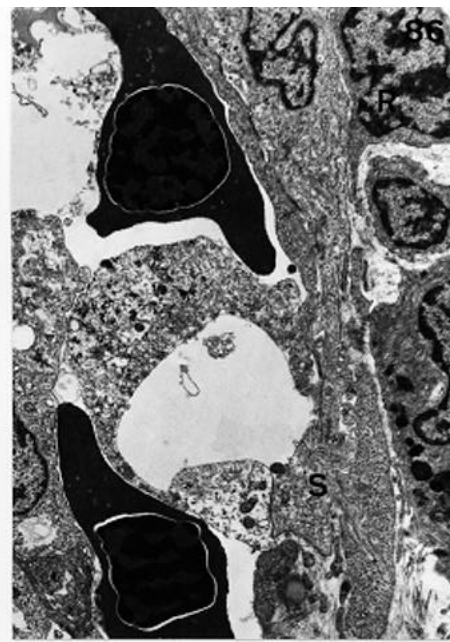
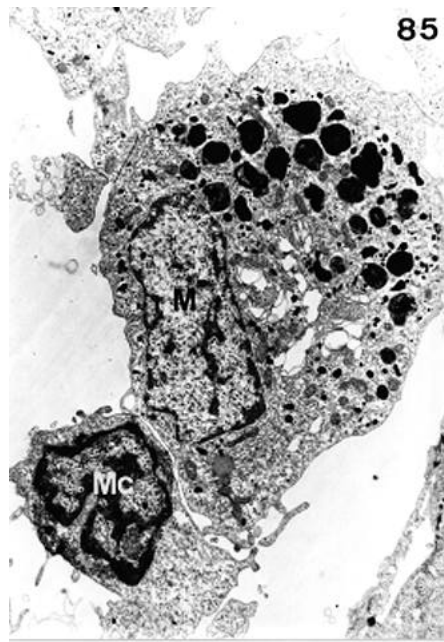


Fig. 89.- Panorámica mostrando la multicapa que se forma en los cultivos primarios de bazo.

Haces de filamentos (P), gotas lipídicas (λ), desmosomas (ä). x 6.100.

Fig. 90.- Detalle de las células de la monocapa de un cultivo primario de bazo. Gotas lipídicas

(λ), haces de filamentos (P), gránulos electrodensos (ä). x 9.500.

Fig. 91.- Detalle del citoplasma de dos células de la monocapa de un cultivo primario de bazo.

Desmosoma (P). x 38.900.

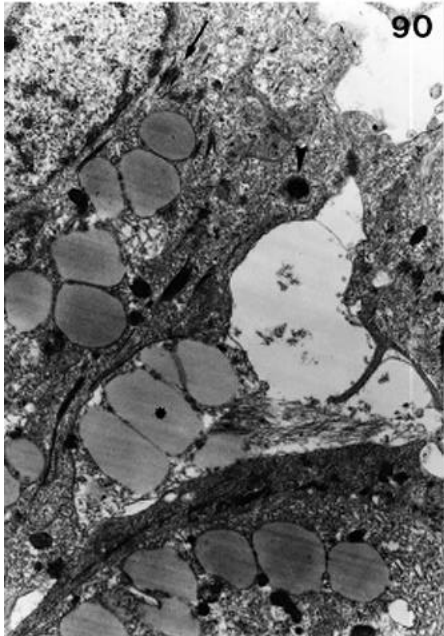
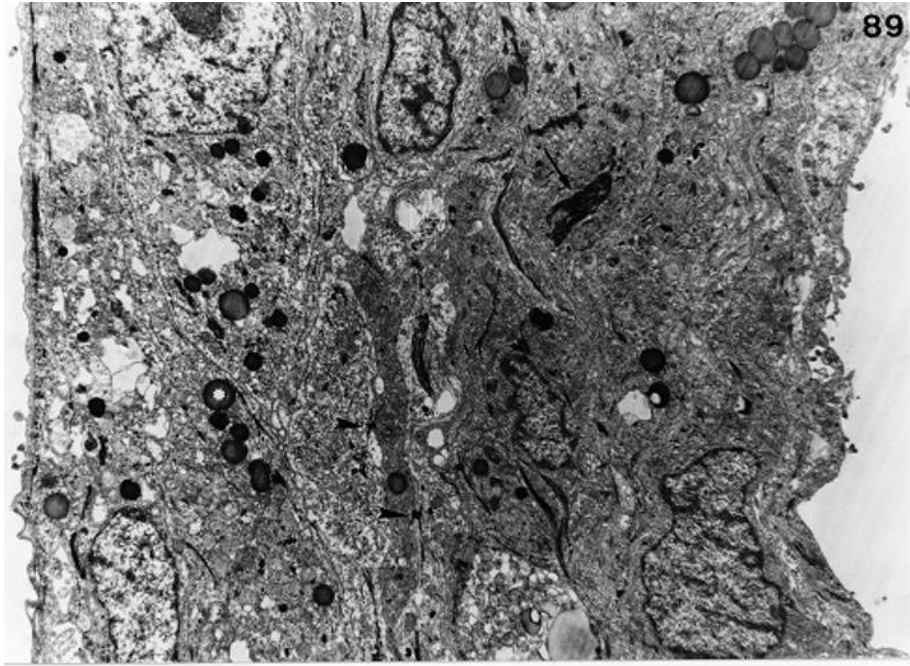


Fig. 92.- Detalle de una unión gap (ç) entre dos células de la monocapa de un cultivo primario de bazo. x 50.400.

Fig. 93.- Imagen de un melanomacrófago en la monocapa de un cultivo primario de bazo. x 6.800.

Fig. 94.- Células epitelioides de un subcultivo de bazo (pase 10). Notar el gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (H) y la presencia de vesículas electroclaras (ã) y cuerpos residuales (ç). x 4.700.

Fig. 95.- Detalle de las células subcultivadas de bazo (pase 10). Desmosomas (P). x 25.000.

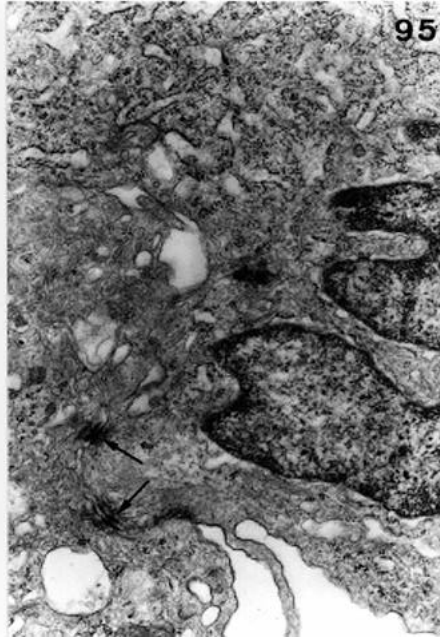
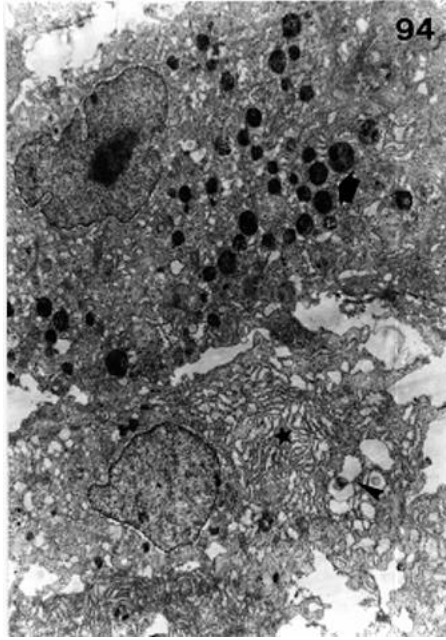
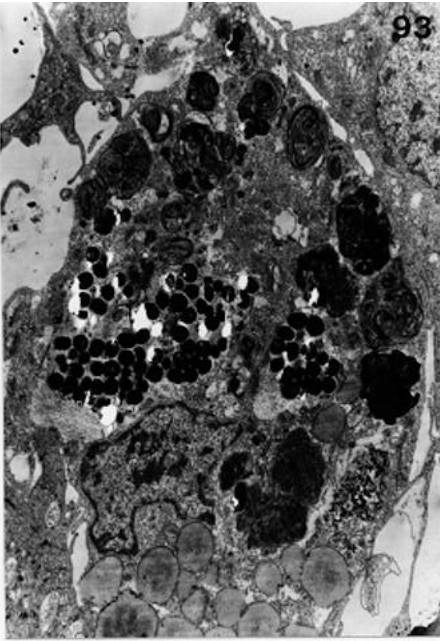


Fig. 96.- Células subcultivadas de bazo (pase 10) marcadas con el anticuerpo pan-queratina. x 300.

Fig. 97.- Actividad AKPH en una sección de un explante de bazo tras 8 d. de cultivo. x 300.

Fig. 98.- Sección de un explante de bazo tras 8 d. de cultivo incubado para la actividad ACPH. x 300.

Fig. 99.- Actividad ANAE en un explante de bazo a los 4 d. de cultivo. x 300.

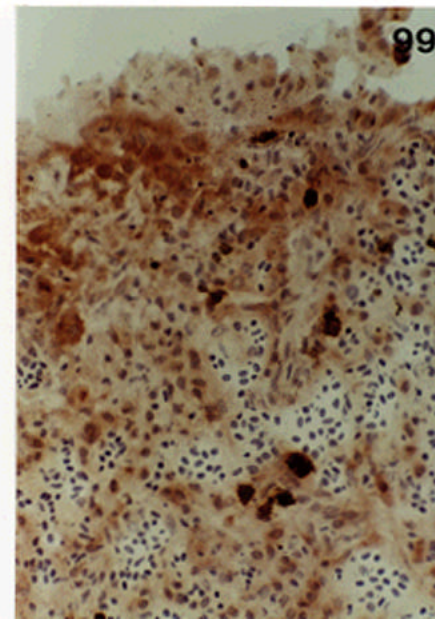
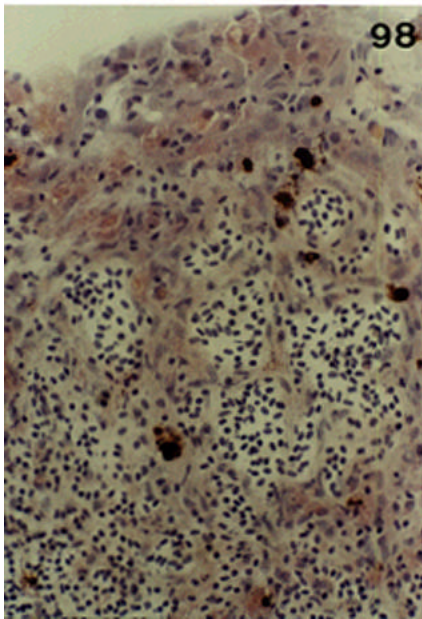
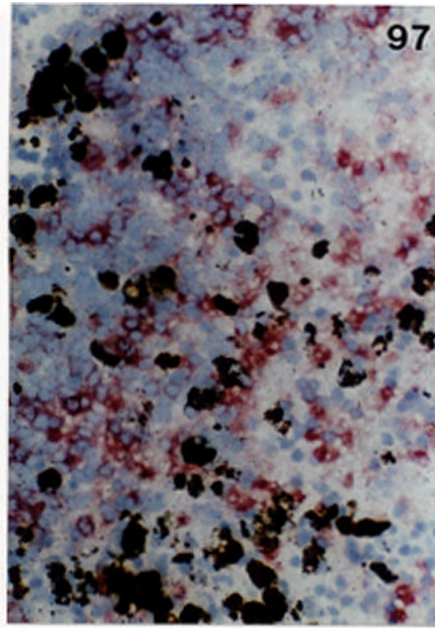
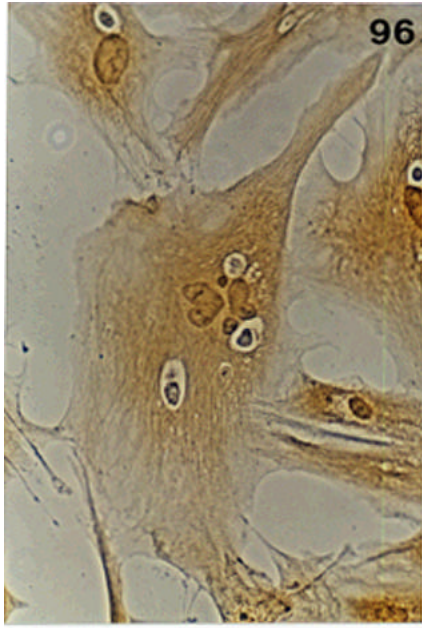


Fig. 100.- Actividad ANAE en la monocapa de un cultivo primario de bazo a los 12 d. Célula gigante multinucleada (H). x 75.

Fig. 101.- Células subcultivadas de bazo (pase 4) incubadas para la actividad ANAE. x 75.

Fig. 102.- Fagocitosis de partículas de carbón (ã) en las células subcultivadas de bazo (pase 10). x 180.

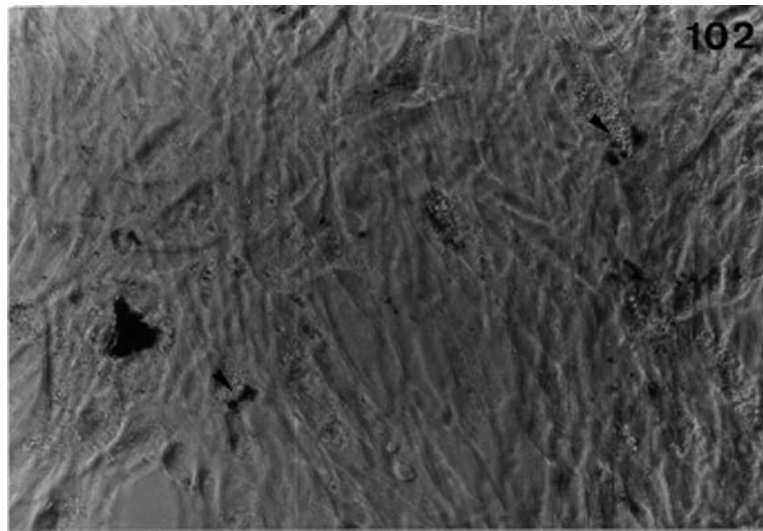
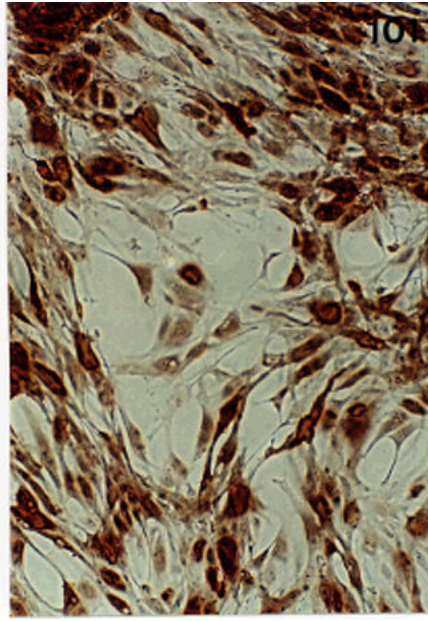
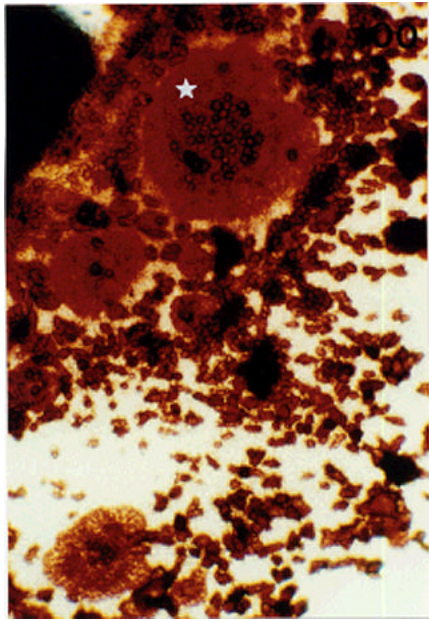


Fig. 103.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en el epitelio del filamento de un explante de branquia a 1 h.p.i. infectado con la cepa ATCC 33209. x 750.

Fig. 104.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en un explante de pronefros a 2 s.p.i. infectado con la cepa ATCC 33209. x 750.

Fig. 105.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en las células epitelioides de la monocapa de un cultivo de bazo a 3 s.p.i. con la cepa ATCC 33209. x 300.

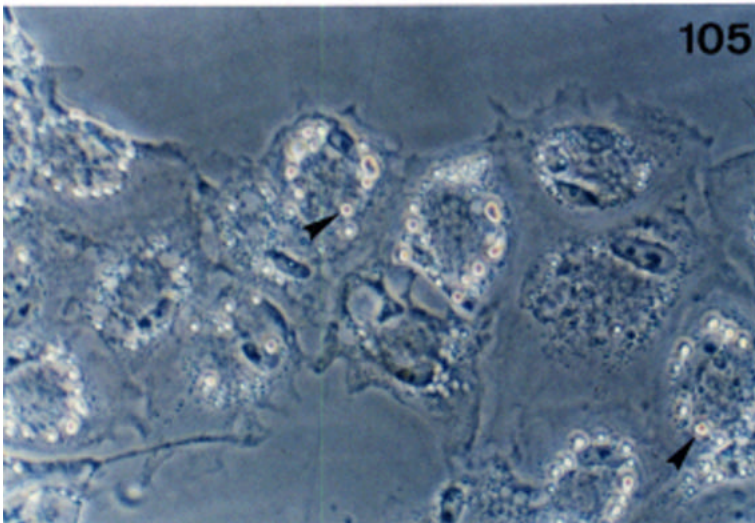
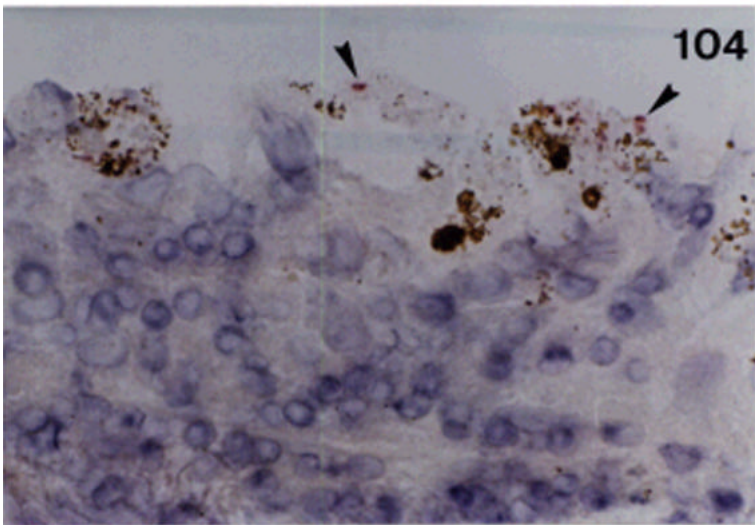
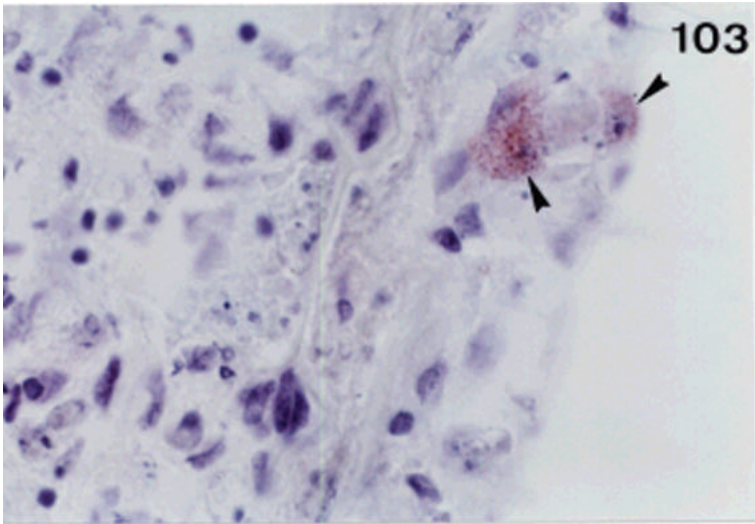
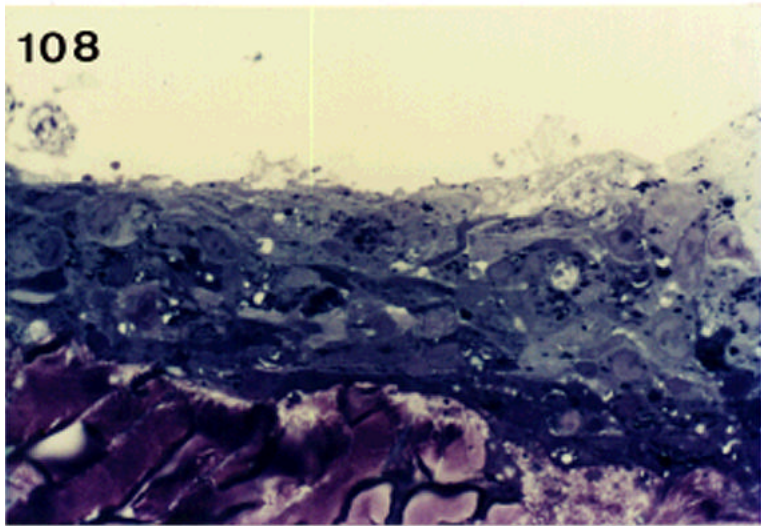
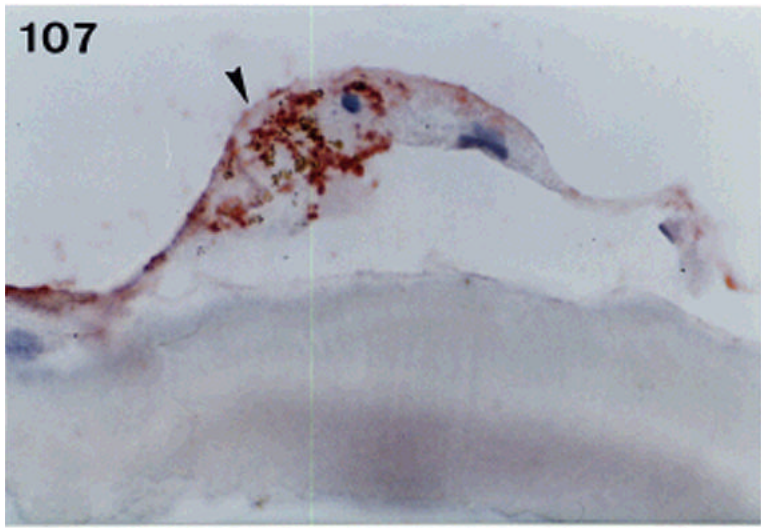
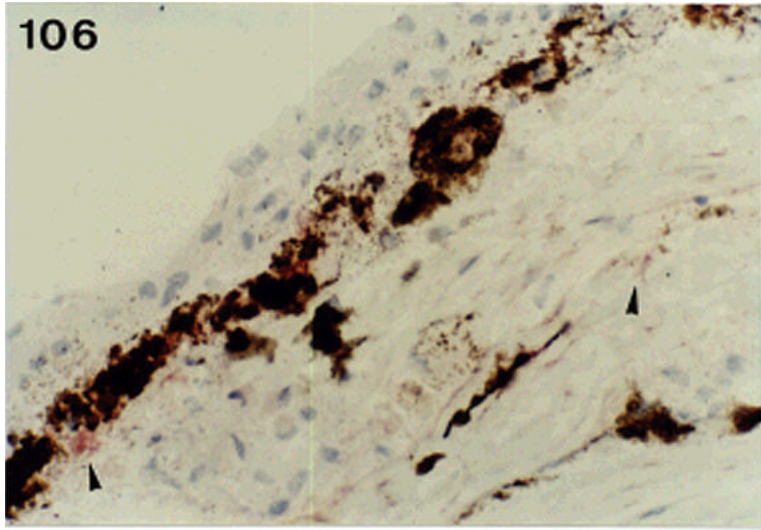


Fig. 106.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (‰) en un explante de tegumento a 3 s.p.i. infectado con la cepa FT10. x 300.

Fig. 107.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (‰) en un explante de tegumento a 2 s.p.i. infectado con la cepa FT10. x 750.

Fig. 108.- Corte semifino de un explante de tegumento infectado con la cepa FT10. Notar los gránulos basófilos en las células del estrato laxo. x 750.



Acceso a Tesis

Fig. 109.- Panorámica de un explante de tegumento infectado con la cepa FT10. Notar los gránulos electrodensos en los fibroblastos (F) del estrato laxo. Células epiteliales (E). x 13.600.

Fig. 110.- Detalle de una bacteria intracelular en un fibroblasto del estrato laxo de la dermis de un explante de tegumento infectado con la cepa FT10. x 19.200.

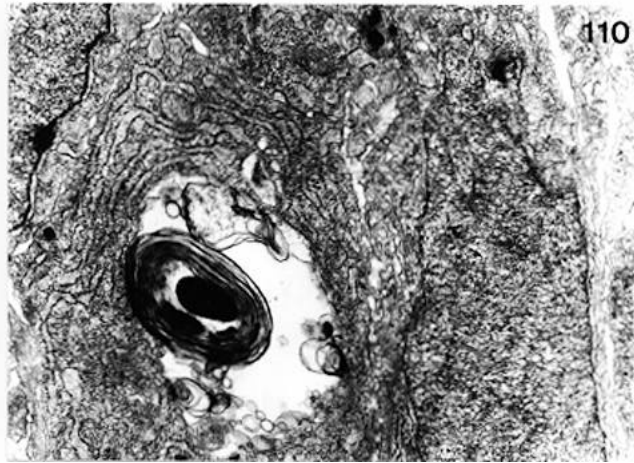
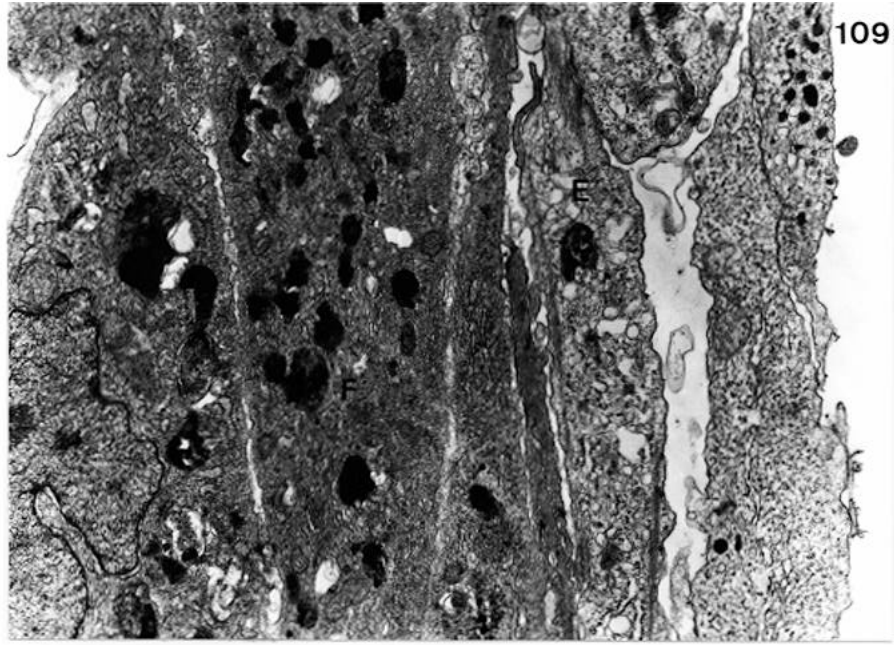


Fig. 111.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 en un explante de branquia a 1 s.p.i. infectado con la cepa FT10. x 300.

Fig. 112.- Corte semifino de un explante de branquia infectado con la cepa FT10 en el que se aprecia la desorganización del tejido conjuntivo. Azul de toluidina. x 750.

Fig. 113.- Corte semifino de un explante de branquia infectado con la cepa FT10 en el que se aprecian numerosas células granulares eosinófilas (ã). Azul de toluidina. x 750.

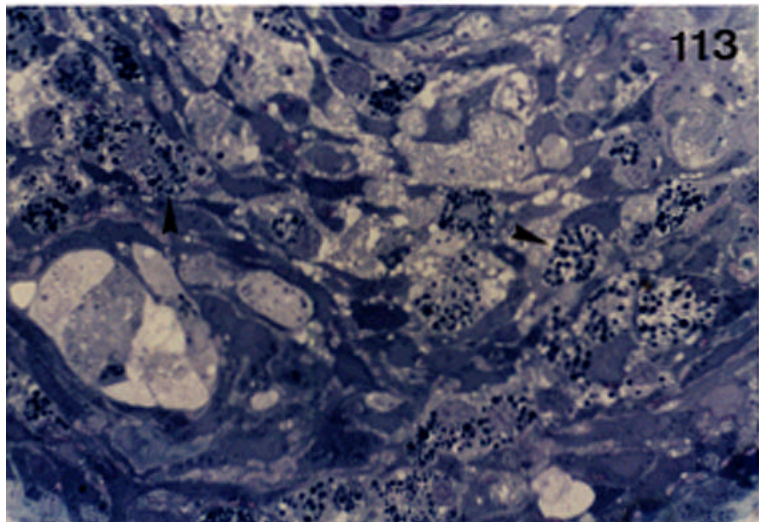
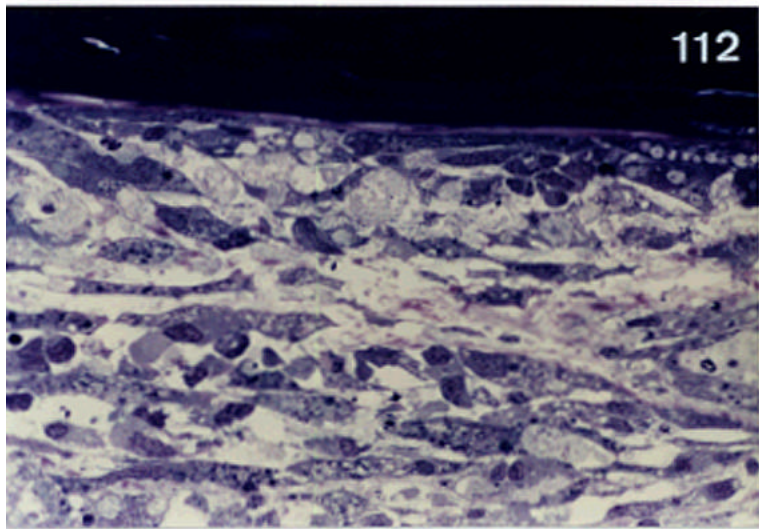
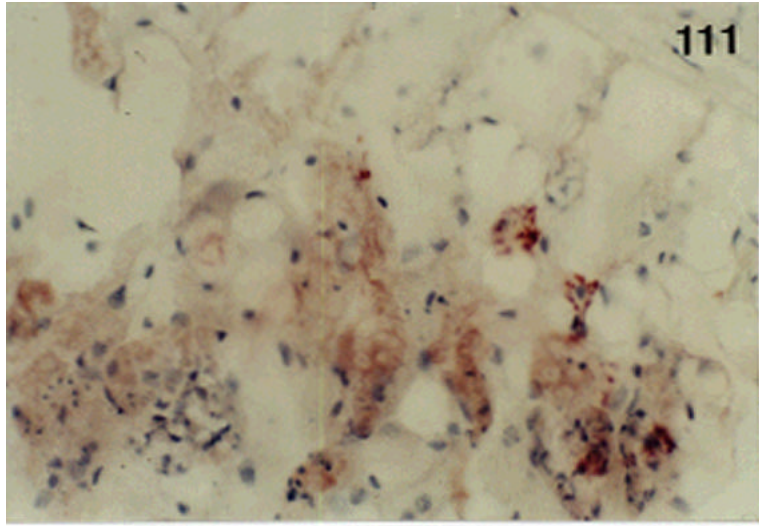


Fig. 114.- Panorámica del cartílago de un explante de branquia infectado con la cepa FT10.

Notar la presencia de numerosos cuerpos electrodensos (P) en el citoplasma degenerado de un condrocito. x 8.400.

Fig. 115.- Panorámica del filamento de un explante de branquia infectado con la cepa FT10.

Cartílago (C), pericondrio (P), célula granular eosinófila (G). x 8.600.

Fig. 116.- Fibroblastos en el tejido conjuntivo del filamento de un explante de branquia

infectado con la cepa FT10. Destaca su núcleo eucromático y la presencia de gránulos electrodensos en su citoplasma (P). x 8.200.

Fig. 117.- Detalle de una bacteria rodeada por múltiples membranas en el citoplasma de un

fibroblasto de un explante de branquia infectado con la cepa FT10. x 96.600.

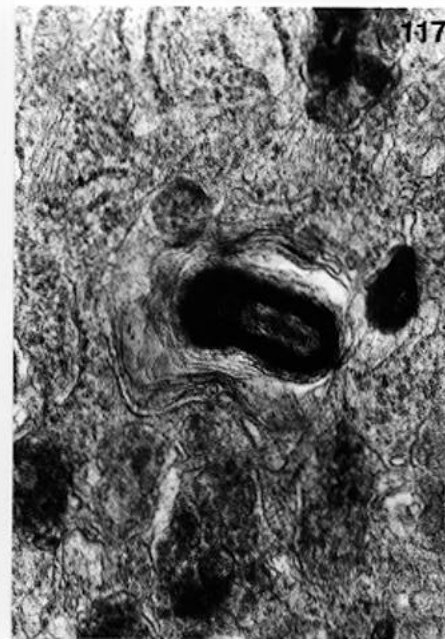
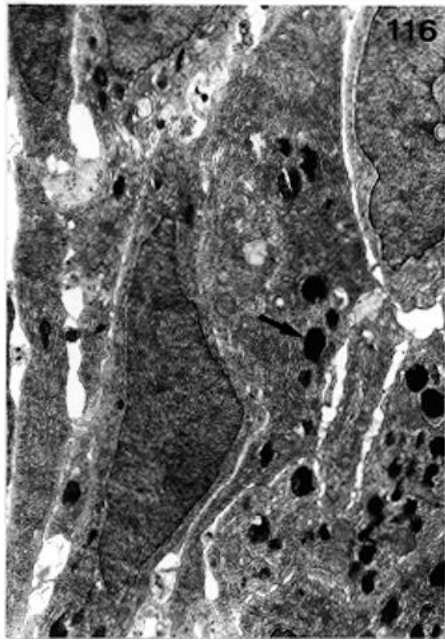


Fig. 118.- Células granulares eosinófilas inmaduras entre prolongaciones de los fibroblastos (H). Explante de branquia infectado con la cepa FT10. x 10.100.

Fig. 119.- Detalle de la figura anterior donde se aprecian vesículas con contenido granular (Λ), gránulos (H) y numerosos ribosomas libres (P) en el citoplasma de las células granulares eosinófilas inmaduras. Explante de branquia infectado con la cepa FT10. x 25.000.

Fig. 120.- Célula granular eosinófila en estadio intermedio de maduración. Notar las estrechas aposiciones con las prolongaciones de los fibroblastos (ä). Explante de branquia infectado con la cepa FT10. x 13.600.

Fig. 121.- Detalle del citoplasma de una célula granular eosinófila en estadio intermedio de maduración. Destaca la presencia de pequeñas vesículas con un contenido electrodenso (P) apuestas al aparato de Golgi. Explante de branquia infectado con la cepa FT10. x 33.700.

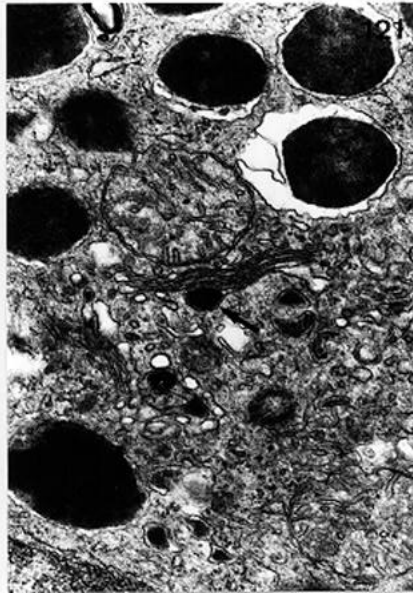
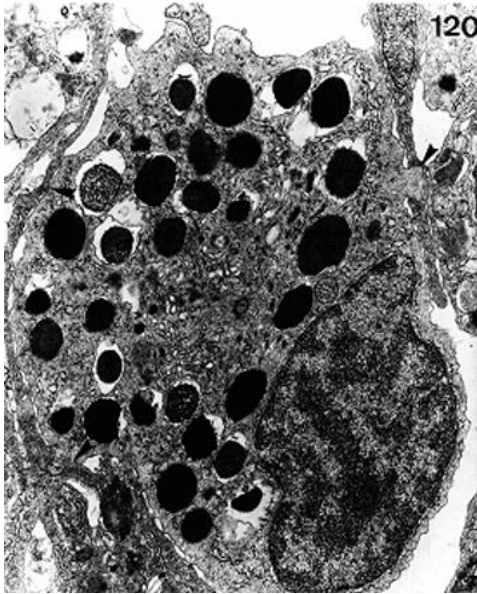
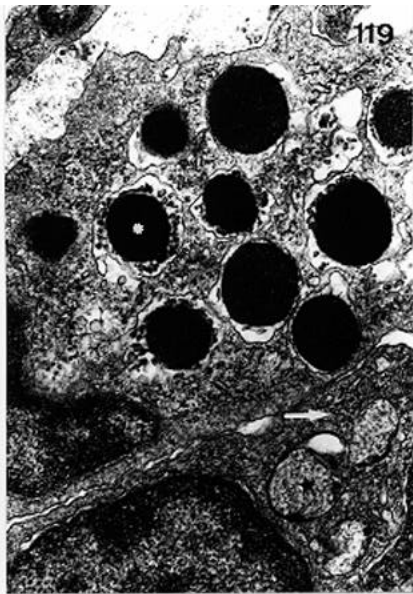
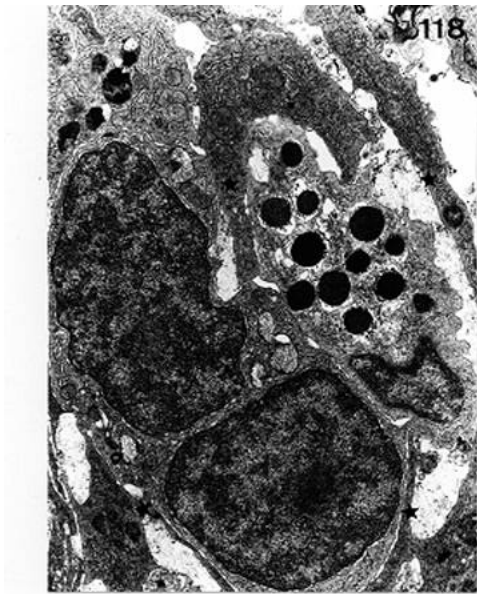


Fig. 122.- Célula granular eosinófila con gránulos en proceso de desintegración (H). Explante de branquia infectado con la cepa FT10. x 13.500.

Fig. 123.- Detalle del citoplasma de una célula granular eosinófila madura. x 34.400.

Fig. 124.- Micrografía de una célula pilar en un explante de branquia infectado con la cepa FT10. Cuerpos residuales (H). x 10.500.

Fig 125.- Aspecto de las células pilares degeneradas. Explante de branquia infectado con la cepa FT10. x 12.000.

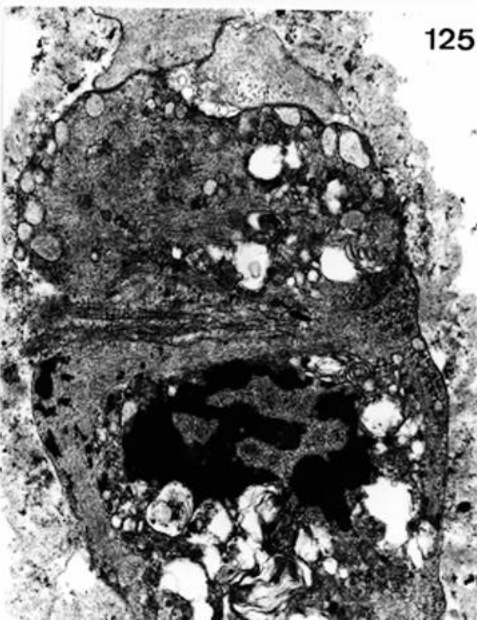
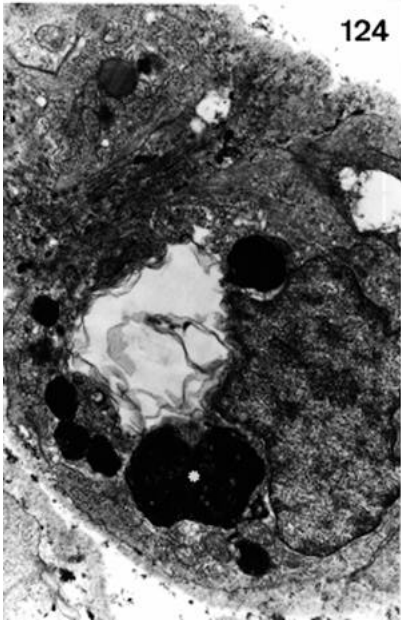
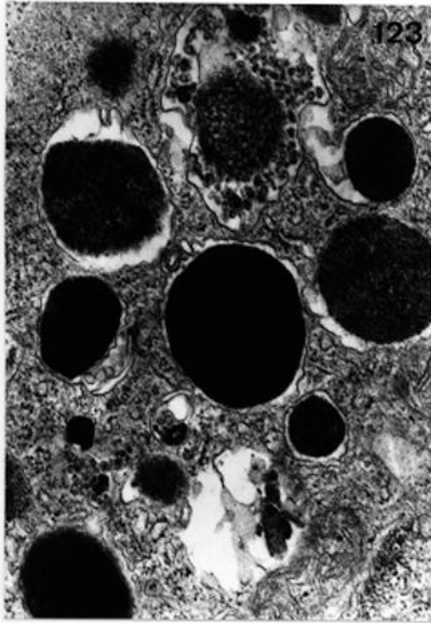
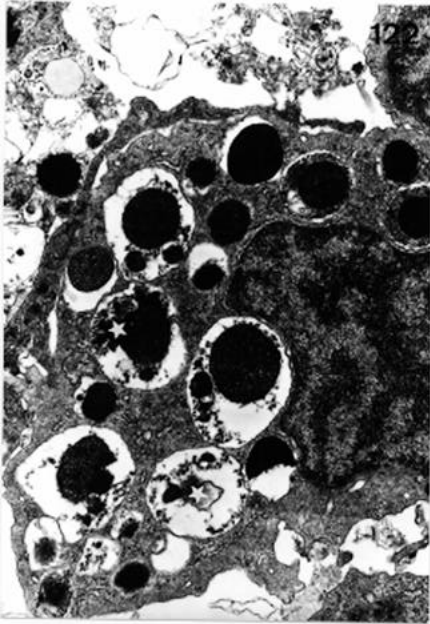


Fig. 126.- Monocapa de un cultivo primario de branquia infectado con la cepa FT10. Notar la gran cantidad de vesículas y cuerpos residuales. x 8.000.

Fig. 127.- Bacteria degenerada entre restos celulares. Cultivo de branquia infectado con la cepa FT10. x 63.700.

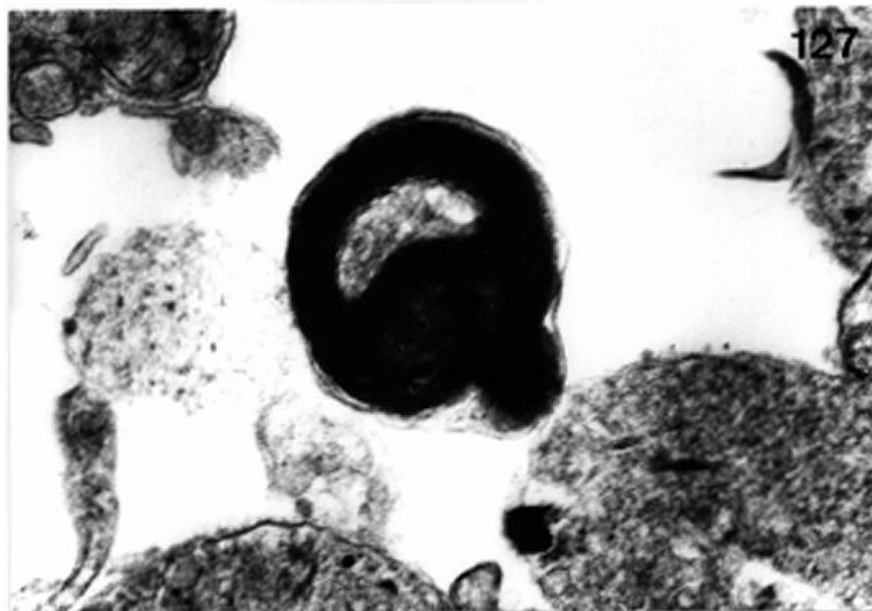
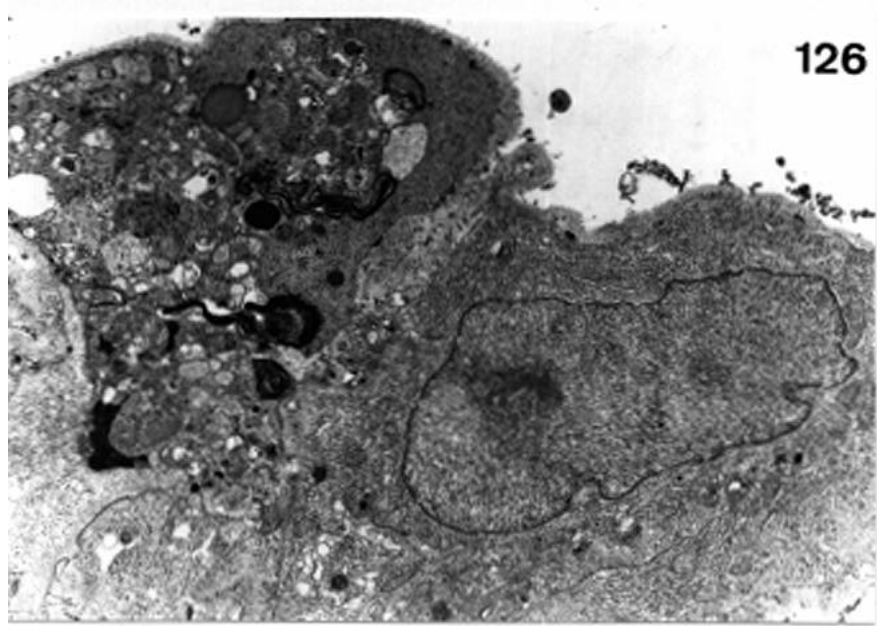


Fig. 128.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 en un cultivo de pronefros a 3 s.p.i. infectado con la cepa FT10. x 150.

Fig. 129.- Corte semifino de un explante de pronefros infectado con la cepa FT10 en el que se observan eritrocitos (P) y eritroblatos (ä) entre el entramado reticular. Bacterias (H) en el citoplasma de células epitelioideas. Azul de toluidina. x 750.

Fig. 130.- Imagen de la zona de transición (T) y del borde de crecimiento (C) de un cultivo de pronefros infectado con la cepa FT10. Obsérvese el gran número de bacterias (H) en el borde de crecimiento. Azul de toluidina. x 750.

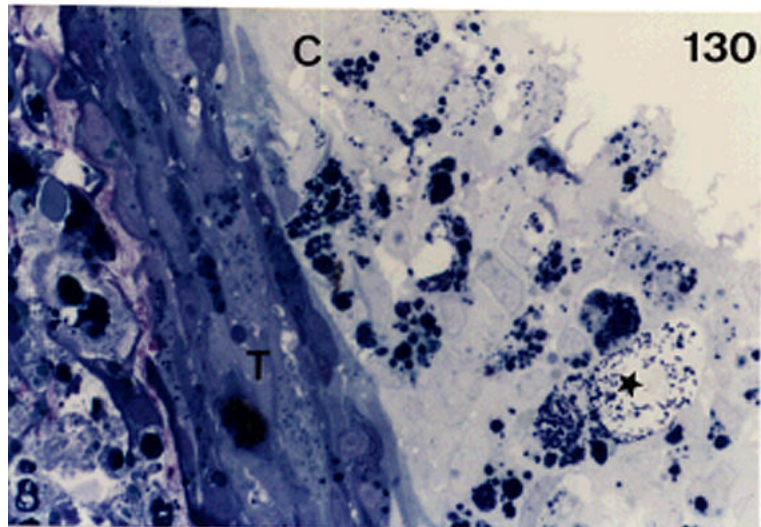
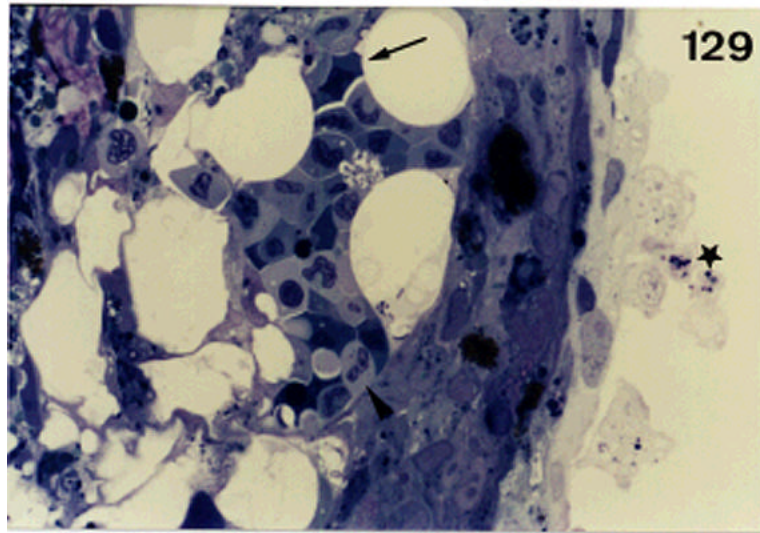
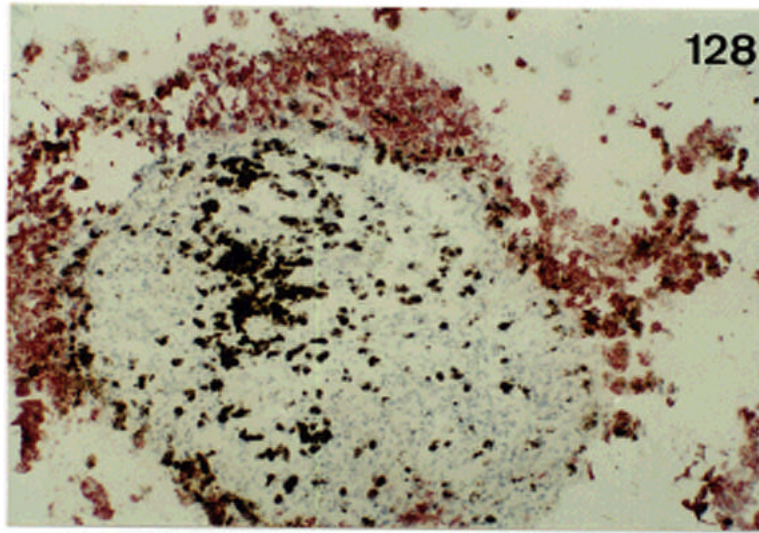


Fig. 131.- Panorámica de la zona interna de un explante de pronefros infectado con la cepa FT10 donde se aprecian células reticulares (R) entre gran cantidad de restos celulares. x 4.100.

Fig. 132.- Bacterias entre restos celulares en la zona interna de un explante de pronefros infectado con la cepa FT10. x 21.400.

Fig. 133.- Zona de transición de un explante de pronefros infectado con la cepa FT10 donde se muestra la presencia de eritrocitos entre las fibras de colágeno y prolongaciones citoplasmáticas de células reticulares (R), una de las cuales presenta numerosas bacterias (B) en su interior. x 4.100.

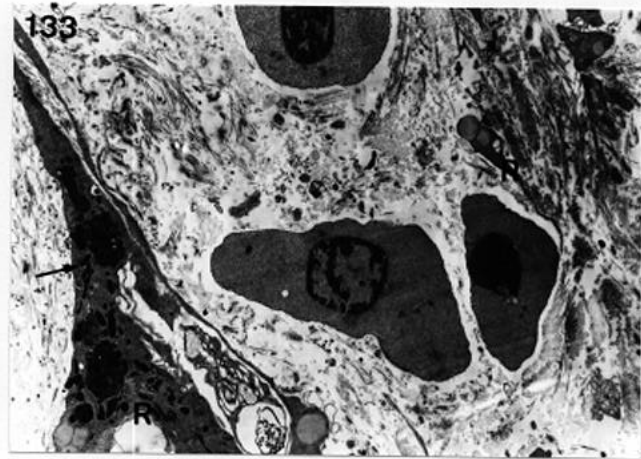
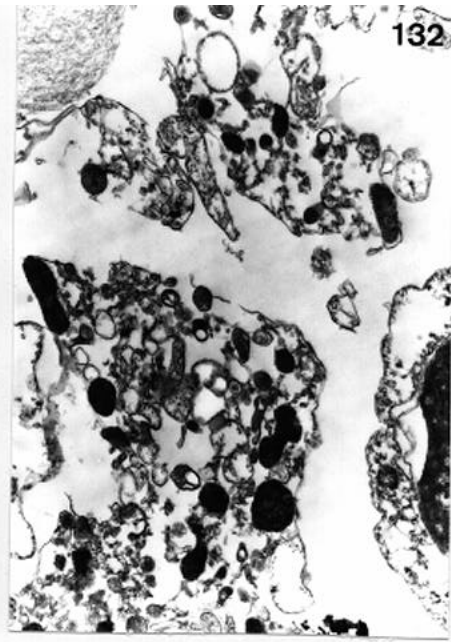
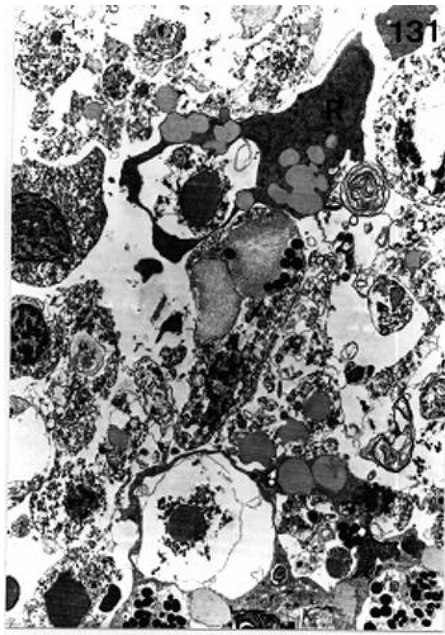


Fig 134.- Célula epitelioide del borde de crecimiento con gran cantidad de bacterias intracitoplasmáticas (P). Cultivo primario de pronefros infectado con la cepa FT10. x 12.800.

Fig. 135.- Detalle de la figura anterior que muestra una bacteria intracelular en proceso de tabicación. x 81.400.

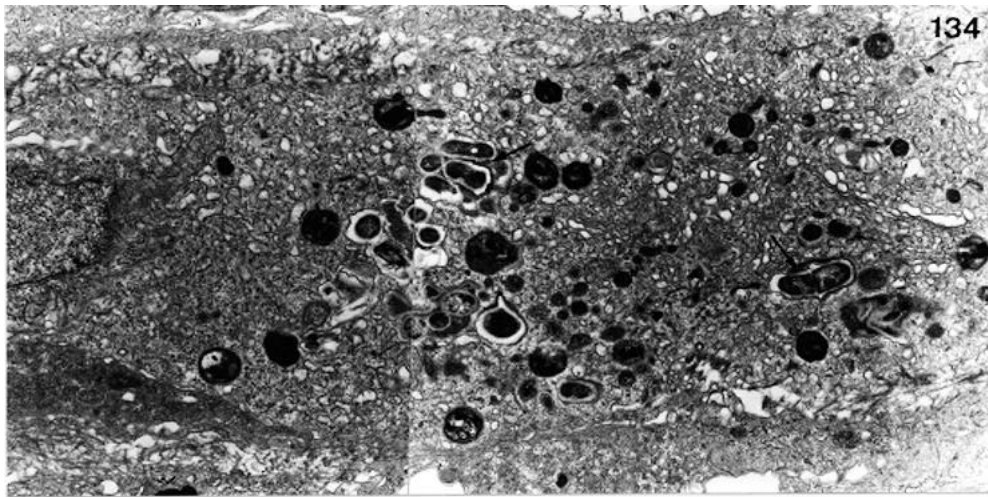


Fig. 136.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 en una sección de un explante de bazo a 3 s.p.i. infectado con la cepa FT10. x 150.

Fig. 137.- Corte semifino de un explante de bazo infectado con la cepa FT10. Sinusoide (S), con eritrocitos y eritroblastos, localizado en la zona de transición, borde de crecimiento (C). Azul de toluidina. x 750.

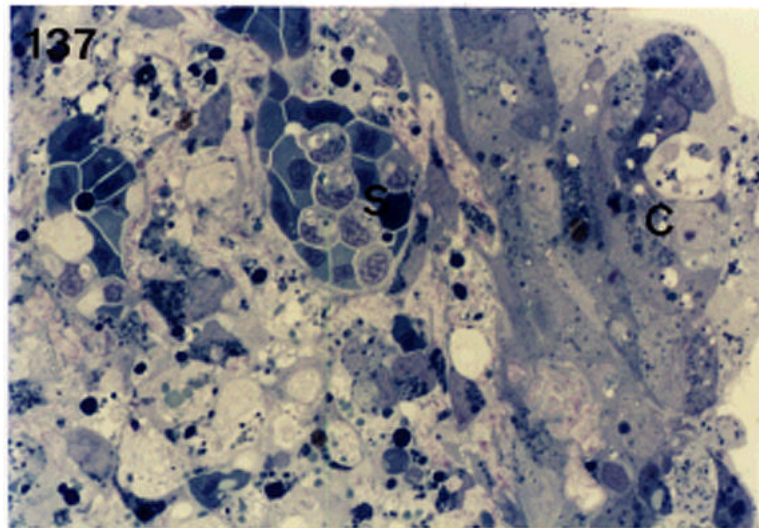
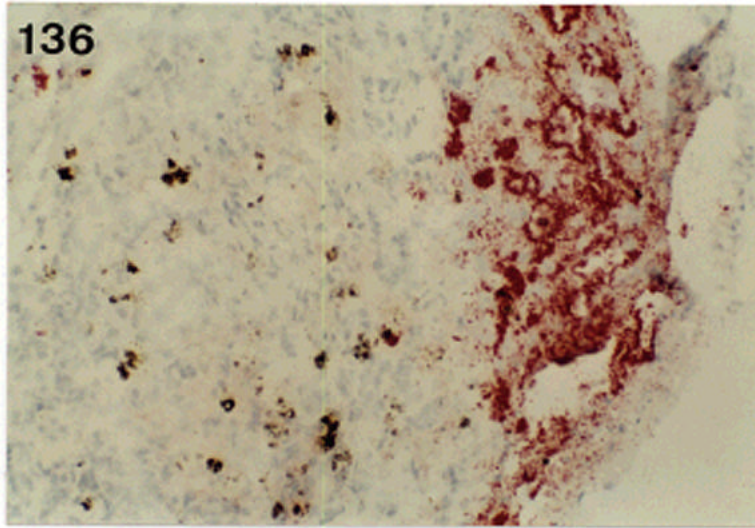


Fig. 138.- Bacteria rodeada por múltiples membranas en la zona interna de un explante de bazo infectado con la cepa FT10. x 40.200.

Fig 139.- Panorámica de las células reticulares de la zona interna de un explante de bazo infectado con la cepa FT10. x 9.700.

Fig. 140.- Detalle de la figura anterior donde se muestran los numerosos gránulos electrodensos que estas células contienen en su citoplasma. x 11.700.

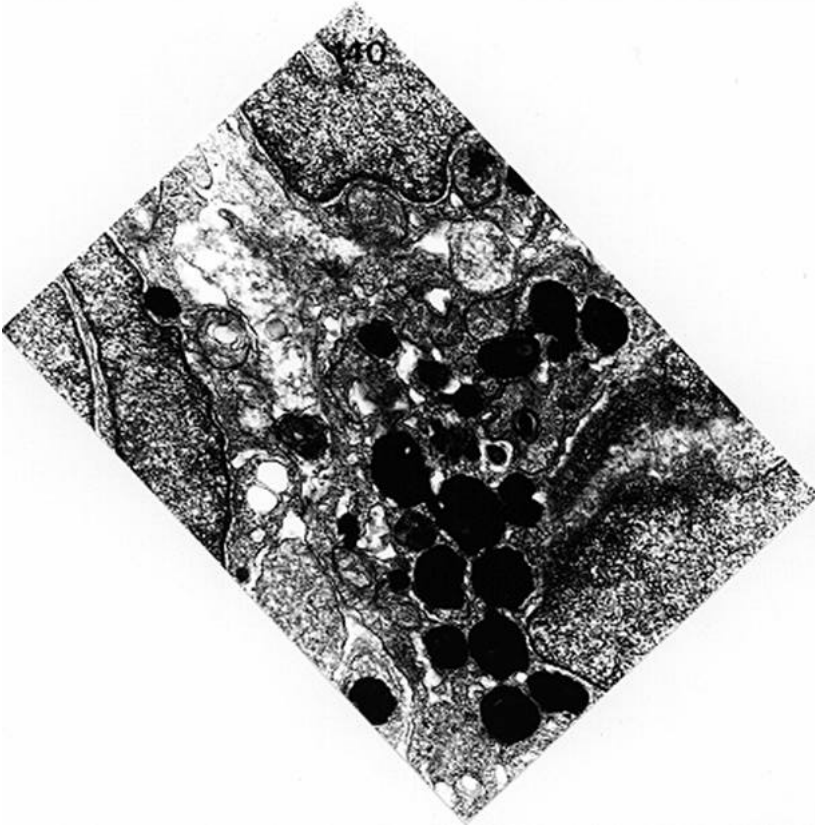
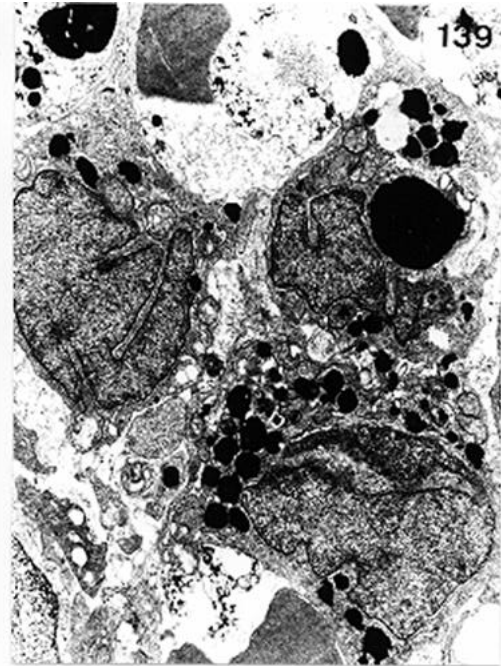
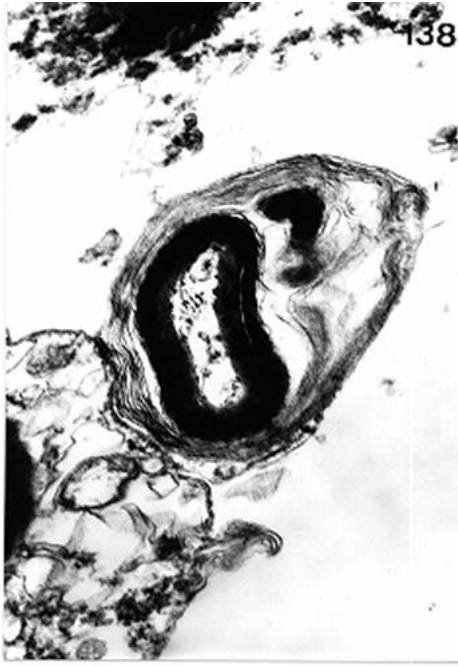


Fig. 141.- Panorámica de un sinusoide lleno de eritrocitos maduros e inmaduros en un explante de bazo infectado con la cepa FT10. Notar la presencia de gránulos de aspecto floculento en las células limitantes sinusoidales degeneradas (S). Células reticulares (R), monocito (Mc) y protrombocito (Pt). x 3.700.

Fig. 142.- Detalle de un protrombocito en un sinusoide esplénico procedente de un explante infectado con la cepa FT10. Microtúbulos (H). x 15.300.

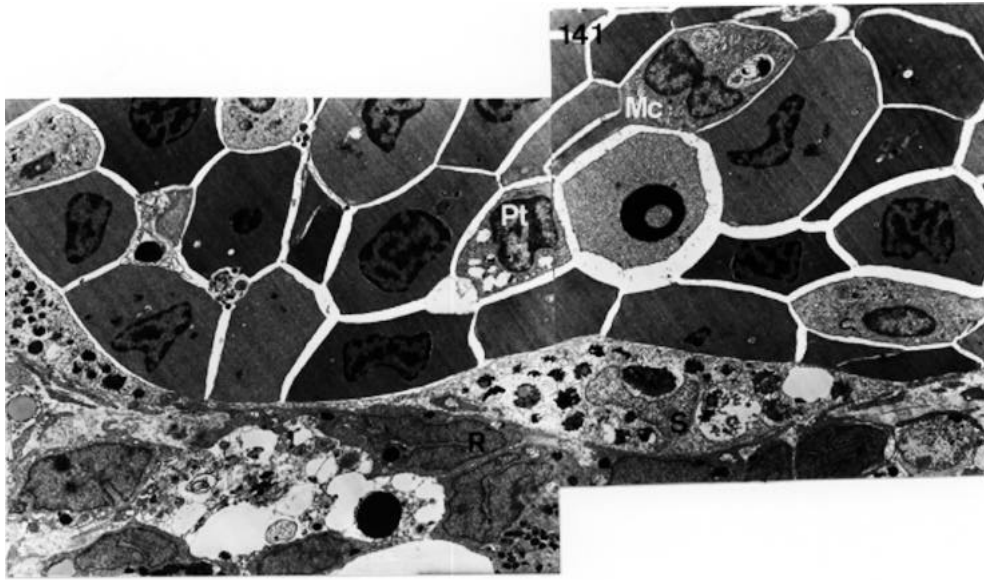


Fig. 143.- Panorámica de las células del borde de crecimiento de un cultivo de bazo infectado con la cepa FT10. Notar la gran cantidad de cuerpos residuales. x 5.100.

Fig. 144.- Detalle de una célula epitelióide con una bacteria (P), en un cultivo de bazo infectado con la cepa FT10. x 17.700.

Fig. 145.- Blasto en el borde de crecimiento de un explante de bazo infectado con la cepa FT10. x 9.800.

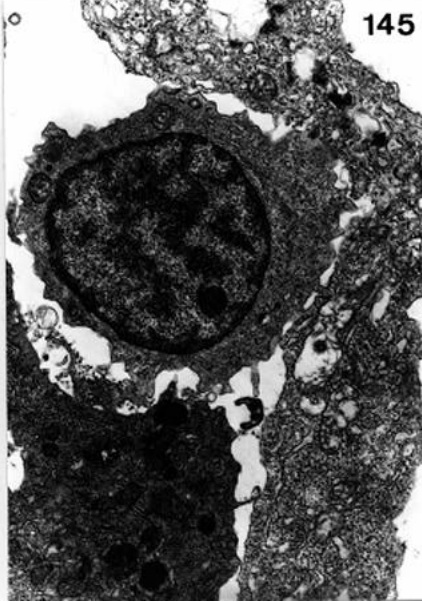
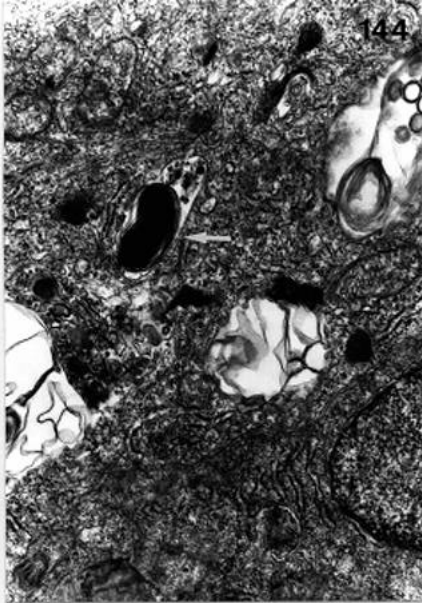
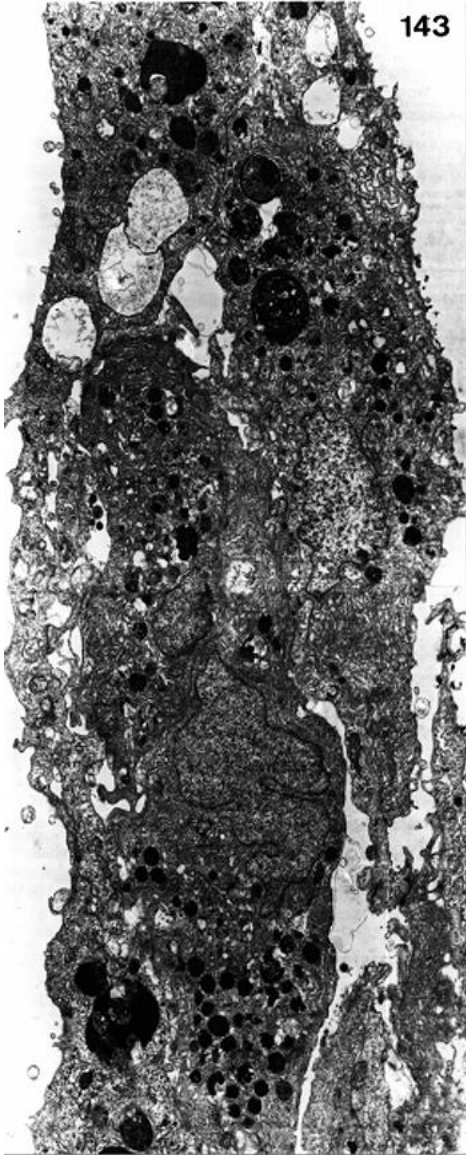


Fig. 146.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 en la células subcultivadas de bazo (pase 18) infectadas con la cepa FT10. x 935.

Fig. 147.- Imagen de contraste de fases de las células de la figura anterior. x 935.

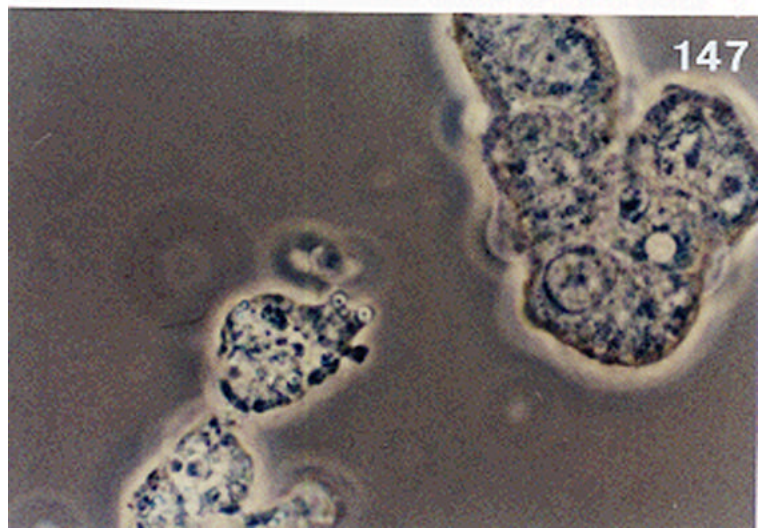
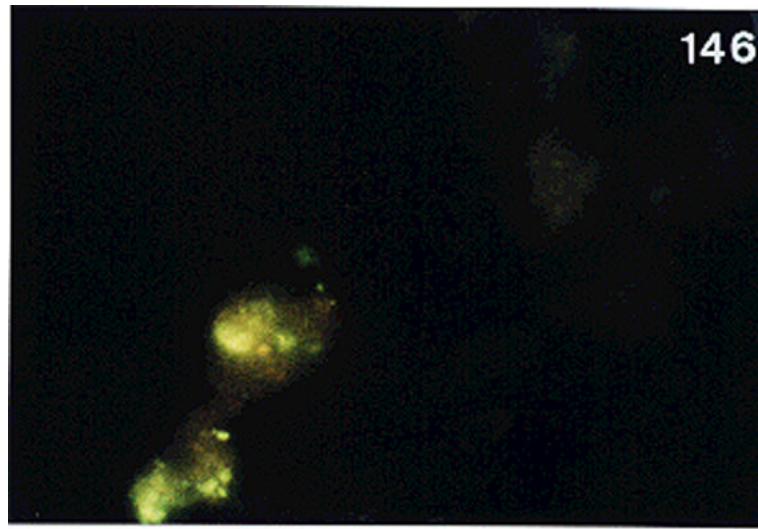


Fig. 148.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en las células epitelioides de la monocapa de tegumento transcurridas 2 s. de cultivo. Explante procedente de un pez a 15 d.p.i. con la cepa ATCC 33209. x 300.

Fig. 149.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en células del epitelio del filamento branquial, tras 2 s. en cultivo, procedente de un pez a 15 d.p.i., con la cepa ATCC 33209. x 750.

Fig. 150.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en la zona interna de un explante de pronefros a 4 s. de cultivo, procedente de un pez a 15 d.p.i., con la cepa ATCC 33209. x 750.

Fig. 151.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en células gigantes multinucleadas de la monocapa de un cultivo de pronefros a 4 s., procedente de un pez a 42 d.p.i., con la cepa ATCC 33209. x 300.

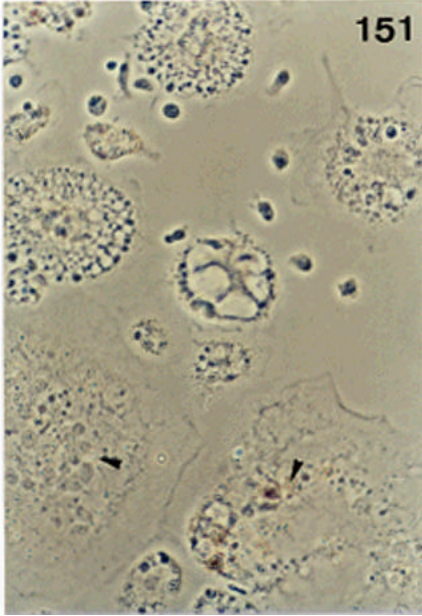
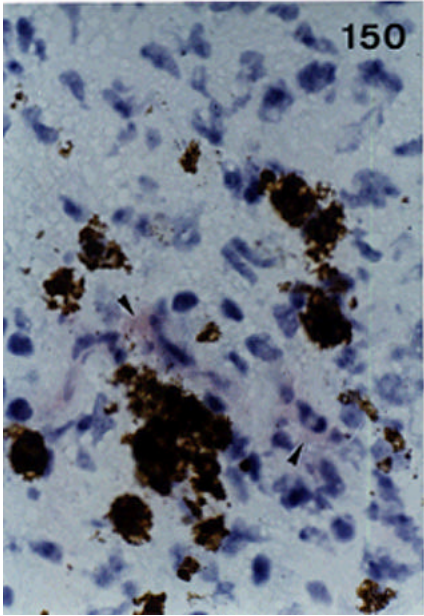
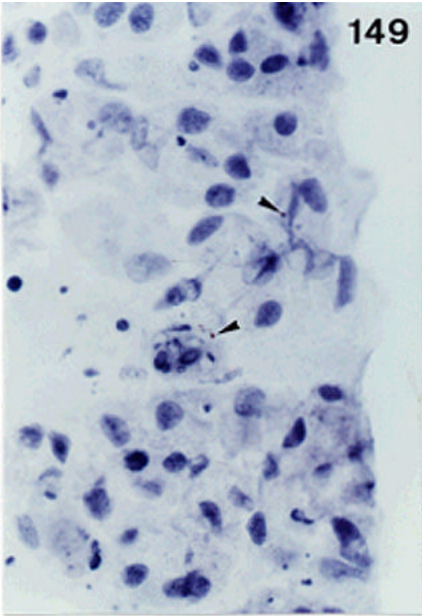
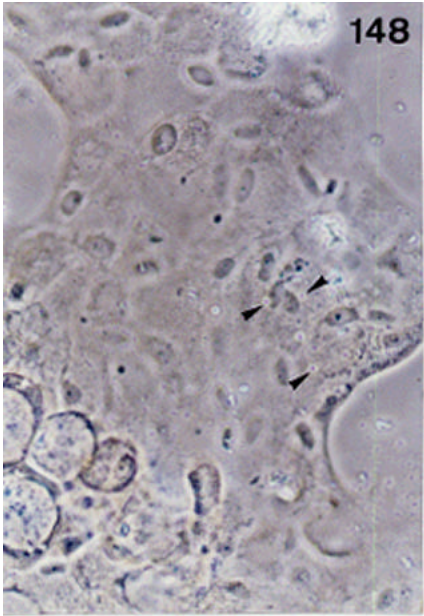


Fig. 152.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en la zona de transición entre la zona interna y el borde de crecimiento de un explante de bazo a 4 s. de cultivo, procedente de un pez a 15 d.p.i., con la cepa ATCC 33209. x 750.

Fig. 153.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en las células epitelioides del borde de crecimiento de un explante de bazo a 4 s. de cultivo, procedente de un pez a 15 d.p.i., con la cepa ATCC 33209. x 750.

Fig. 154.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en la monocapa de un cultivo primario de bazo tras 30 d. en cultivo. x 300.

Fig. 155.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (\ddot{a}) en un explante de tegumento a 3 s. de cultivo, procedente de un pez a 15 d.p.i., con la cepa FT10. x 750.

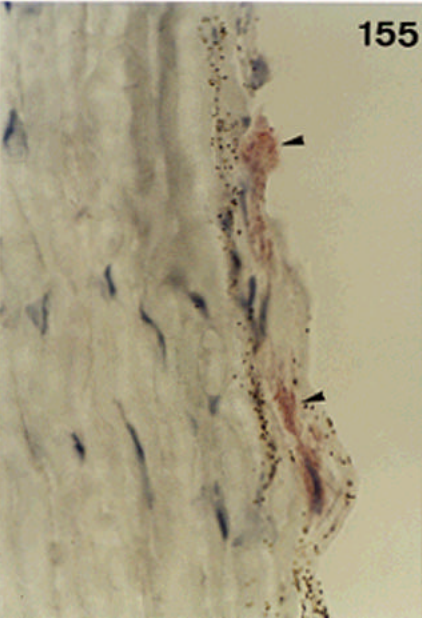
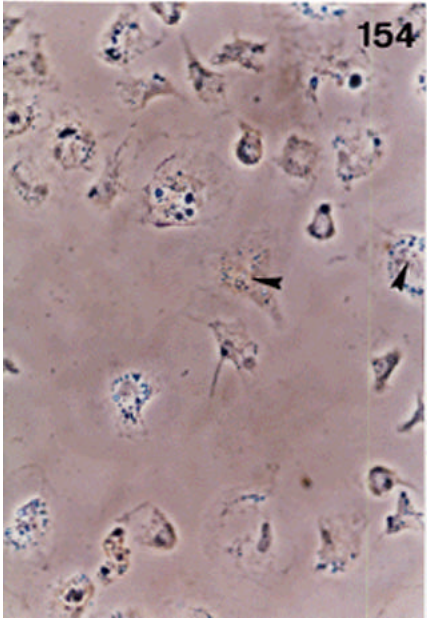
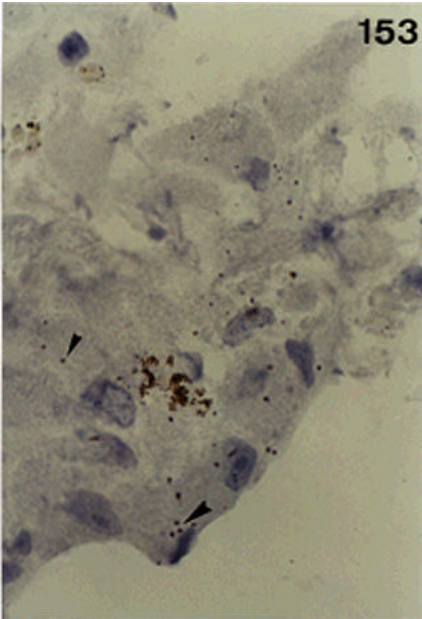
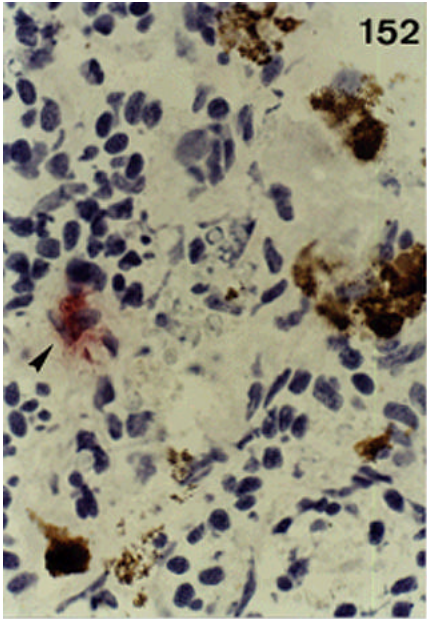


Fig. 156.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 en las células pilares de las laminillas de un explante de branquia a 1 s. de cultivo, procedente de un pez a 42 d.p.i., con la cepa FT10. x 300.

Fig. 157.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (H) en el borde de crecimiento de un explante de pronefros a 3 s. de cultivo, procedente de un pez a 15 d.p.i., con la cepa FT10. x 300.

Fig. 158.- Marcaje para el anticuerpo BW 3.6 (ä) en las células epitelioides de la monocapa de un cultivo de bazo tras 1 s., procedente de un pez a 15 d.p.i., con la cepa FT10. x 300.

