

IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

GALEOTTI M.

Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Udine

IMMUNITA' ASPECIFICA

1. BARRIERE SUPERFICIALI

1.1 Muco

Il muco ricopre in modo continuo la cute, le branchie e l'intestino, costituendo una barriera che inibisce la colonizzazione del tegumento da parte dei microrganismi. La produzione di muco risulta accentuata in seguito all'instaurarsi di un processo flogistico o ad un semplice fenomeno irritativo di tipo chimico-fisico. La funzione più importante del muco è quella di protezione dell'interno dell'organismo dall'invasione da parte di batteri e funghi o dalla penetrazione di particelle o altro materiale estraneo sospeso nell'acqua.

Fino ad ora le informazioni relative al muco dei pesci erano scarse e spesso trasferite per analogia da quello dei mammiferi. Attualmente è noto che il muco contiene enzimi come la tripsina, il lisozima e anticorpi agglutinanti.

1.2 Cute

La cute dei teleostei è costituita, partendo dall'esterno, dall'epidermide, dal derma e dall'ipoderma. Annessi alla cute esistono organi accessori come recettori sensoriali, squame, ghiandole mucose e organi luminescenti. L'epidermide a sua volta è costituita da due strati: uno più superficiale, di tipo stratificato, e uno più profondo, lo strato delle cellule basali o delle cellule germinali, che è composto da cellule indifferenziate.

Le cellule mucose, presenti su tutto il corpo, si originano negli strati intermedi dell'epidermide e successivamente raggiungono gradualmente la superficie della cute, aumentando di dimensioni. La loro secrezione contiene principalmente glicoproteine.

Nelle forme larvali di alcuni pesci e fino allo stadio di avannotto è stata osservata la presenza di una discreta quantità di tripsina (fig. 1) e di lisozima (fig. 2) a livello dell'epidermide. Questi enzimi rivestirebbero notevole importanza soprattutto nei primi stadi di vita del pesce, quando ancora altri tipi

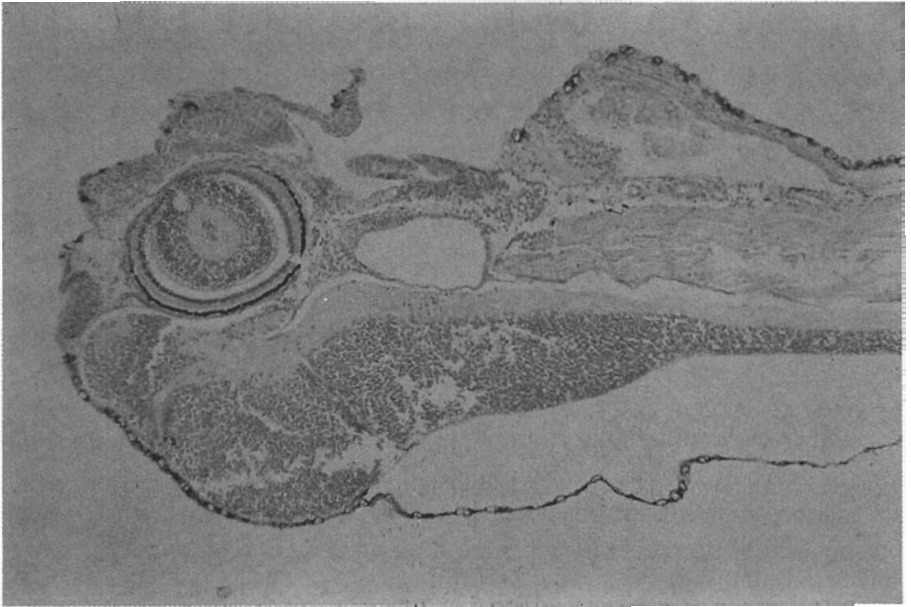


Fig. 1 - Larva di branzino (*Dicentrarchus labrax*), Evidenziazione immunocistochimica di tripsina a livello della cute. ABC e diaminobenzidina, contrastata con Ematossilina. 10X.

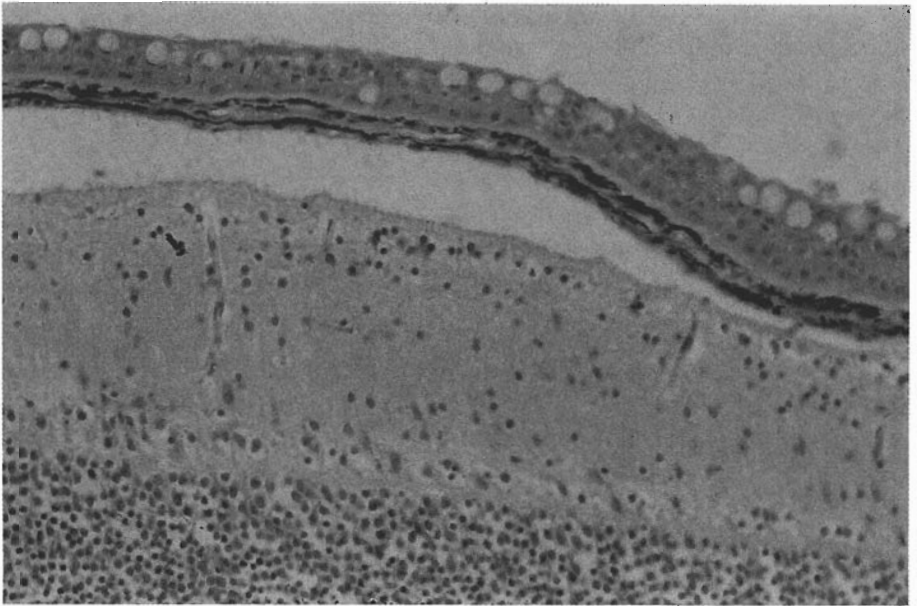


Fig. 2 - Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), avannotto. Cute. Evidenziazione immunocistochimica di lisozima nelle cellule dell'epidermide. ABC e diaminobenzidina, contrastata con Ematossilina. 20X.

di difese immunitarie sono inadeguati. (tabella 1 e 2). Fra l'epidermide e lo strato muscolare ci sono alcuni strati di cellule pigmentate, che conferiscono il colore al pesce. Nel derma sottostante, costituito prevalentemente da tessuto connettivo, sono contenute le squame.

L'integrità dell'epidermide è fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio osmotico e la difesa dai microrganismi. Il processo riparativo delle ferite cutanee risulta estremamente rapido grazie alla migrazione di cellule che dallo strato malpighiano alla periferia della lesione, vanno a coprire il tessuto di granulazione chiudendo superiormente la ferita.

1.3 Branchie

Le branchie sono costituite dall'arco branchiale, che è la principale struttura portante, dalle lamelle primarie (filamenti) e dalle lamelle secondarie (lamelle) innestate sulle precedenti. L'arco branchiale è ricoperto da un tessuto epidermico tipico dei teleostei, sotto il quale si trova abbondante tessuto linfatico, comprendente linfociti e, in molte specie, grosse cellule contenenti granuli acidofili. (fig. 4). Le lamelle primarie sono ricoperte da un epidermide di tipo mucoide, contenente nelle specie eurialine le c.d. "cellule del cloruro" che servono al pesce per l'osmoregolazione (fig. 3). Sono inoltre presenti linfociti, cellule fagocitarie, e grosse cellule di tipo granulocitario con granuli acidofili (fig. 4). Le branchie costituiscono una importante via d'entrata per molti microrganismi, pertanto sono protette da una forte produzione di muco. Inoltre, a livello di cellule epiteliali che rivestono le lamelle secondarie delle branchie di trota iridea, si sono evidenziate, con metodiche immunoistochimiche due enzimi che possiedono una efficace attività battericida: la tripsina e il lisozima. I processi infiammatori a livello branchiale determinano spesso iperplasia epiteliale con fusione di lamelle vicine.

2. FATTORI UMORALI ASPECIFICI

- 2.1) Inibitori della crescita;
- 2.2) Inibitori di enzimi prodotti dai patogeni;
- 2.3) Sostanze inducenti lisi cellulare;
- 2.4) Precipitine e Agglutinine.

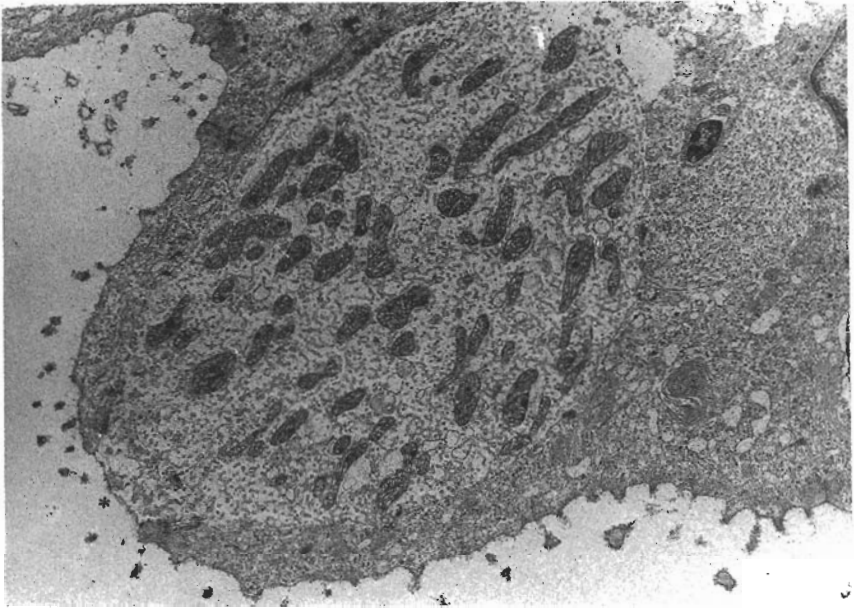


Fig. 3 - Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Branchie. Tipica "cellula del cloruro" sporgente dalla mucosa branchiale. Si noti la "cripta" (*) in prossimità del lume ed i numerosi mitocondri che ne assicurano l'elevata attività metabolica. Trota adattata all'acqua salata. Microscopia elettronica a trasmissione (4900x).

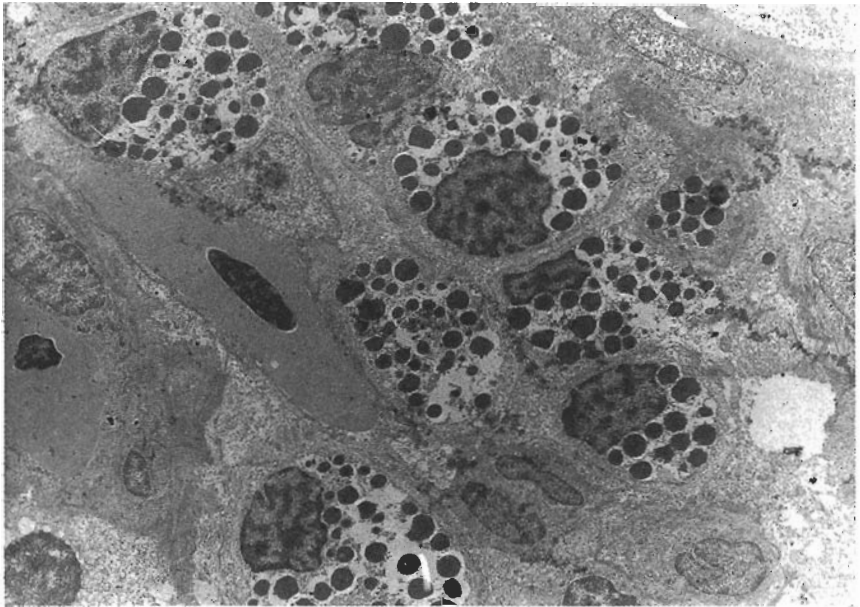


Fig. 4- Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Branchie. Asse di una lamella primaria. Gruppi di cellule con grossi granuli citoplasmatici. Queste cellule costituiscono una importante difesa di tipo aspecifico, con una azione simile a quella dei granulociti di mammifero. Microscopia elettronica a trasmissione (2800x).

2.1) *Inibitori della crescita*

Transferrina

Ceruloplasmina

Metallotioneina

Interferone

2.1.1) Transferrina (PM ,80KDa)

Proteina globulare presente nel siero di tutti i vertebrati, inclusi i pesci. Manifesta forte tendenza a legare il ferro ed è un importante fattore di crescita per molti microrganismi. La transferrina esercita un importante effetto batteriostatico e fungistatico. Ritarda la moltiplicazione microbica fino a quando la risposta immune dell'animale può avere luogo. E' stata studiata nella carpa (*Cyprinus carpio*), nel salmone (*Oncorhynchus kisutch*) e nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*).

2.1.2) Ceruloplasmina

Proteina dotata di alta affinità per il rame ed altri cationi metalloivalenti. E' in grado di ossidare Fe ferroso a ferrico (forma che può legarsi alla transferrina). La funzione antimicrobica sembra essere dovuta prevalentemente alla attività ferrosidasiaca.

E' stata isolata dal sangue di passera (*Pleuronectes platessa*).

2.1.3) Metallotioneina

Proteina a basso peso molecolare isolata dal fegato di passera. Particolarmente ricca di cisteina, manifesta tramite questo aminoacido una forte affinità per gli ioni metallici. La sua produzione viene stimolata anche dalla liberazione di endotossine batteriche. La sua funzione non è ancora del tutto chiarita.

2.1.4) Interferone

La sua importante attività antivirale è stata dimostrata nella carpa e nella trota iridea. L'azione è simile a quella dei mammiferi: l'interferone si lega a recettori cellulari, inducendo da parte della cellula la produzione di un sistema enzimatico inibente la sintesi delle proteine virali.

Nei pesci sono stati isolati l' IFN α , l'IFN β e l'IFN γ .

2.2) *Inibitori di enzimi Prodotti dai patogeni*

Inibitori delle proteinasi anti-serina
Inibitore delle proteinasi anti-cisteina
Inibitore della metalloproteinasi
 α -2 macroglobina

2.2.1) Inibitori delle proteinasi anti-serina

Inibitore della proteinasi α 1
Antitrombina-3
 α 2 - antiplasmina
Inibitore del C1
Inattivatore inter- α tripsina

Inibitore della proteina α 1

In origine era chiamato inibitore della tripsina, ma ora è nota la sua capacità di inibire tutte le proteinasi seriniche. E' formato da una singola catena polipeptidica.

Antitrombina 3

Controlla le proteinasi antiseriniche nel corso della coagulazione. Inoltre inattiva tripsina e chimotripsina.

α 2 antiplasmina

Forma complessi stabili con la plasmina, inibendone la funzione. Aumenta velocemente e in quantità significativa durante la fase acuta di reazione difensiva.

Inibitore del C1

E un componente del sistema del complemento. Inibisce C1s e C1r.

Inattivatore inter α tripsina

Contiene ioni zinco e forma complessi inattivanti con tripsina e chimotripsina. Attivo nella fase acuta dell'inflammatione.

2.2.2) Inibitore delle proteinasi anti-cisteina

E presente in due forme a diverso P.M. (57 e 175 KDa) altamente specifiche nei confronti di 2 proteinasi anti-cisteina. Normalmente non è presente nel siero, può essere riscontrato solo in seguito a liberazione di alcuni enzimi dopo morte cellulare.

2.2.3) Inibitore della metalloproteinasi

Inibisce la collagenasi della cute, del liquido sinoviale reumatoide e dei granulociti. Il complesso che forma con gli enzimi è soggetto ad azione fagocitaria.

2.2.4) α -2 macroglobina

Molecola di PM=360 KDa, isolata dalla passera. Si attacca a tutte le proteinasi inducendo una variazione conformazionale del sito attivo che le rende incapaci di legare il substrato. E' coinvolta nella protezione dei salmonidi dalle proteasi extracellulari di *Aeromonas salmonicida*.

2.3) Sostanze inducenti lisi cellulare

Idrolasi

Lisozima

Chitinasi e chitobiasi

Proteinasi

Complemento

2.3.1) Idrolasi

Sono state identificate nei tessuti di pesce e risultano attive contro vari glicosidi

2.3.2) Lisozima

PM=12,5 - 15 KDa (il lisozima della trota iridea ha il 71 % di omologia con quello umano) Funzione: attacca strutture presenti nella parete di batteri Gram(-); idrolizza la glicochitina ed ha un moderato effetto sulla chitina (componente della parete delle cellule fungine). Enzima riscontrato in vari pesci sia marini che di acqua dolce, a livello delle secrezioni, come il muco, e di molti tessuti, specialmente di quelli più soggetti ad aggressione batterica come il rene, il tratto alimentare, la milza, le branchie. E' presente anche nel siero. E' possibile evidenziare il lisozima su sezioni istologiche di materiale fissato in formalina, con una tecnica immunistochemica utilizzando un anticorpo policlonale per il lisozima dell'uomo. In questo modo viene rintracciato in vari tessuti (tabella 1 e 2) fra i quali la cute (fig. 2) di stadi giovanili di alcuni pesci. Il livello di lisozima prodotto è in relazione con: il periodo stagionale, il sesso, lo stadio di maturità sessuale, la stimolazione antigenica ed eventi stressanti che agiscono sul pesce.

Tabella n° 1 - Localizzazione immunistochimica di tripsina e lisozima in organi di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Galeotti et al. (1995).

TROTA IRIDEA	Anticorpo anti-TRIPSINA UMANA	Anticorpo anti-TRIPSINA SALMONE	Anticorpo anti-LISOZIMA
LARVE	non testato	negativo	cute +
AVANNOTTI	cute ++ cellule mucosa gastrica ++ cellule epitelio branchiale +	cute ++ cellule mucosa gastrica ++ mucosa intestinale con cellule positive (verso il lume) branchie negative	cute + epiteliotubuli renali + globuli rossi + macrofagi? ++nel rene
PANCREAS ADULTI	negativo	granuli citoplasmatici ++/+++	granuli debolmente positivi
BRANCHIE ADULTI	alcune cellule dell'epitelio con citoplasma abbondante +++ (macrofagi?)	negativo	cellule epitelio delle lamelle secondarie ++ cellule epiteliali desquamate ++ globuli rossi +

2.3.3) Chitinasi e chitobiasi

Riscontrate nel tessuto linfomieloide e nel sangue di vari pesci. La chitinasi ha un PM.=30 KDa.

2.3.4) Proteinasi

Il muco dei pesci contiene proteinasi tripsino-simili. Queste proteinasi sono inibite da componenti seriche. Sono molto efficaci nella distruzione di batteri Gram (-) (come per es. *Vibrio anguillarum*).

2.3.5) Complemento

Il complemento è un sistema biologico di difesa aspecifico che assicura un'efficace protezione contro infezioni sostenute da vari microrganismi. Nei mammiferi circa 20 glicoproteine, tra costituenti proprie e regolatori solubili o di membrana, presenti in circolo o nei tessuti in forma inattiva, fanno parte del sistema complementare. Le componenti più importanti sono quelle numerate dal C1 al C9. Le azioni principali del complemento sono quelle di:

- 1) provocare la lisi cellulare;
- 2) attivare cellule fagocitarie;

Tabella n° 2 - Localizzazione immunistochemica di tripsina e lisozima in organi di branzino (*dicentrarchus labrax*). Galeotti et al. (1993).

BRANZINO	Anticorpo anti TRIPSINA UMANA	Anticorpo anti TRIPSINA SALMONE	Anticorpo anti LIZOZIMA
LARVE AL MOMENTO DELLA SCHUSA	Cellule epidermiche +++ su tutta la superficie corporea Cellule epiteliali del tubo digerente+	Negativo	Cute ++ Sacco vitellino + Cellule mucosa tratto digerente ++ (positività granulare citoplasmatica)
LARVE DI 17° GIORNI	Cellule epidermiche ++/+++ su tutta la superficie corporea Cellule mucose + tratto prossimale tubo digerente Cellule epiteliali in corrispondenza del retto	Negativo	Cute +/- Citoplasma epatociti +/- Mucosa stomaco e intestino +/- (positività granulare citoplasmatica)
AVANNOTTI	Cellule mucosa gastrica +/++ (positività granulare citoplasmatica)	Negativo	Cute negativa Rene anteriore: varie cellule con positività citoplasmatica +/++ (macrofagi?)
EPATOPANCREAS ADULTI	Negativo	Negativo	Non testato

3) effettuare l'opsonizzazione.

Gli studi sul complemento dei pesci sono iniziati tra gli anni '60 e '70. Ross e Jensen (1973) hanno dimostrato la presenza della componente C1 nel siero di un pesce cartilagineo, lo squalo. Nonaka et al. (1984) hanno evidenziato una alta attività emolitica da parte del complemento di trota iridea e hanno descritto il C3 e il C5. Numerosi studi seguenti hanno dimostrato chiaramente:

1) - L'attivazione del complemento tramite *via classica* in varie specie di pesci ossei marini e di acqua dolce come la lampreda (*Petromyzon marinus*) e la trota iridea;

2) - L'attivazione del complemento per *via alternativa* (emolisi indipendente dalla presenza di anticorpi) in vari pesci come la carpa la trota iridea e il pagro (*Pagrus major*).

Labilità al calore. Nei pesci di acque fredde il complemento presenta una discreta labilità al calore. L'attività emolitica del siero di trota iridea scompare dopo trattamento a temperature $> 44^{\circ}\text{C}$ per 20'. Le condizioni per inattivare il complemento delle diverse specie ittiche sono variabili e difficili da standardizzare: tendenzialmente il complemento delle specie di acqua fredda viene inattivato a temperature più basse rispetto a quello di specie di acqua calda.

Fattori che influenzano l'attività del complemento:

1) Cationi bivalenti: il Mg^{2+} e il Ca^{2+} sono importanti per l'attivazione di entrambe le vie del complemento. Nella trota iridea la presenza di EDTA, chelante Mg^{2+} e Ca^{2+} , induce una completa perdita di attività del complemento. Tuttavia l'emolisi spontanea si conserva.

2) E' stata provato che esiste interferenza da parte del siero di una specie diversa con l'attivazione del C sia per via classica che alternativa. Questa interferenza sarebbe da attribuire alla competizione tra il complemento e un componente del siero (non ancora identificato) per l'attacco ai siti cellulari affini al complemento.

3) L'attivazione del C in assenza di anticorpo è possibile in presenza di alcuni lipopolisaccaridi derivati dalla parete dei batteri Gram (-).

Effetto della temperatura sull'attività emolitica del C

L'attività del C di trota iridea aumenta gradualmente passando dai 15 ai 30°C , ma cade rapidamente a 37°C . Il C di pesci di acque fredde è meno stabile rispetto a quello di mammifero perdendo il 30 - 60 % della sua attività se tenuto per 3 ore a temperature $>30^{\circ}\text{C}$. Per quanto riguarda invece i pesci di acque calde, esiste una relazione tra esposizione a basse temperature e calo dell'attività emolitica. Esperimenti effettuati sul pescegatto americano (*Ictalurus punctatus*) hanno dimostrato che un rapido decremento della T° dell'acqua riduce l'attività emolitica del C. Questa azione è mediata probabilmente anche dall' NH_3 , che a basse temperature fa risentire maggiormente i suoi effetti tossici. In condizioni di bassa T° l'N ammoniacale totale e l' NH_3 non ionizzata contenuti nell'acqua, raggiungono livelli maggiori. L' NH_3 ed altri composti aminici (metilamina, etilamina, idrazina, idrossilamina) sono noti come inibenti l'attività del sistema del C, in seguito all'attacco in corrispondenza del legame tioestere sulle molecole del C3 e C4.

Effetto opsonizzante esercitato dal C3 sui granulociti neutrofili

Il complemento di carpa aumenta la fagocitosi di particelle estranee; il requisito essenziale è la fissazione sulle particelle del componente C3. Sulla

superficie dei granulociti neutrofili di carpa è stata identificata la presenza di recettori per il C3. Recettori per il C3 sono stati evidenziati, inoltre, sui macrofagi di salmone e trota iridea (il trattamento con tripsina determina la scomparsa del recettore di superficie per il C3, riducendo notevolmente l'effetto opsonizzante e quindi la fagocitosi).

2.4) *Precipitine e agglutinine.*

Proteina c-reattiva

Anticorpi naturali

2.4.1) Proteina c-reattiva

Nei mammiferi questa proteina è in grado di attivare il complemento; nei pesci il suo ruolo non è stato chiarito, ma sembra essere coinvolta nelle reazioni di ipersensibilità immediata. E' stata riscontrata nel siero normale e nelle uova di numerosi pesci ossei.

2.4.2) Anticorpi naturali

Sostanze non precisamente definite, riscontrate nel siero e nelle uova di molti pesci.

Hanno attività agglutinante e precipitante su eritrociti, batteri e polisaccaridi. Probabilmente appartengono alle lectine o alle immunoglobuline.

3) *IMMUNITA' CELLULARE ASPECIFICA*

3.1) *FAGOCITI*

Come nei mammiferi anche nei pesci esistono due cellule capaci di una discreta attività fagocitaria, i macrofagi e i granulociti neutrofili.

3.1.1) *Monociti e Macrofagi*

I monociti dei pesci sono numerosi nel tessuto emopoietico del rene, ma si trovano anche circolanti nel sangue. Sono considerati i precursori dei macrofagi tissutali, capaci di migrazione dal sangue ai tessuti sede di processi infiammatori. I macrofagi hanno una vasta distribuzione in molti tessuti, compresi peritoneo e branchie, ma sono presenti soprattutto come macrofagi fissi nel rene, nella milza e in alcuni pesci anche nell'atrio del cuore. (Vedi paragrafo "Il sistema dei fagociti mononucleati"). Molti macrofagi dei pesci contengono melanosomi all'interno dei loro lisosomi, sono i c.d.

melanomacrofagi, particolarmente numerosi nel rene e nella milza. La melanina, contenuta in queste cellule, sembra originarsi da melanociti presenti nel rene stesso ed avrebbe importanti funzioni battericide.

3.1.2) *Granulociti neutrofili*

Nei pesci i granulociti neutrofili si trovano distribuiti nel rene, nella milza e circolanti nel sangue. La loro funzione fagocitaria, se pure ridotta rispetto a quella dei macrofagi, è stata ormai accertata anche per i pesci. Dal punto di vista morfologico i neutrofili dei pesci presentano molta analogia, a parte qualche eccezione, con quelli dei mammiferi.

Tab. 3 - Dimensioni dei granulociti neutrofili in alcune specie di pesci.

Specie	Nome comune	Dimensioni
<i>Pleuronectes platessa</i>	Passera	8 - 10 μ
<i>Ictalurus punctatus</i>	Pescegatto americano	9 - 15 μ
<i>Anguilla japonica</i>	Anguilla giapponese	10 - 15 μ
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa	5 - 8 μ
<i>Morone saxatilis</i>	Branzino americano	9 - 12 μ

Nei granulociti neutrofili di molti pesci sono state evidenziate le seguenti attività enzimatiche: Fosfatasi acida, Cloroacetato esterasi, Perossidasi, Fosfatasi alcalina e Lisozima.

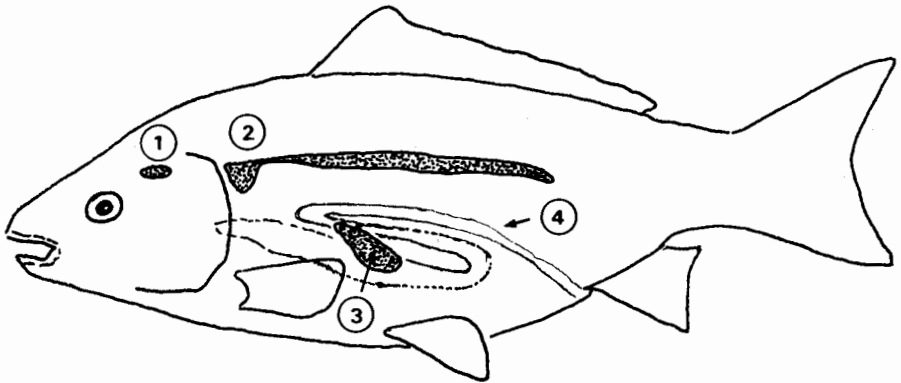
3.2) *CELLULE A CITOTOSSICITA NATURALE (NCC)*

Nei pesci sono state evidenziate cellule che presentano proprietà molto simili alle cellule "natural killer" (NK) dei mammiferi, che però non possono con certezza essere assimilate a queste. Le NCC sono state rintracciate in vari pesci e morfologicamente hanno l'aspetto di monociti. La loro azione citotossica è stata provata testandole con svariati tipi cellulari, ma sembra essere più esaltata quando le stesse cellule sono infettate da virus, o quando si rivolge verso cellule parassitarie.

GLI ORGANI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

I principali organi del sistema immunitario dei teleostei sono il timo, la milza e il rene anteriore o pronefro (Fig. 5). A questi deve essere aggiunto il tessuto linfatico associato all'intestino (GALT) che verrà trattato nel paragrafo 5. "Il sistema immunitario delle mucose".

Fig. 5 - Rappresentazione schematica dei principali organi del sistema immunitario dei pesci: 1) timo; 2) rene anteriore o pronefro; 3) milza; 4) tessuto linfatico associato all'intestino.



1) TIMO

Il timo dei pesci è un organo pari, localizzato sulla parete dorso-laterale del faringe, dal primo al quarto arco branchiale. A differenza dei mammiferi, è un organo molto superficiale, essendo disposto tra la membrana basale e l'epitelio mucoso della cavità branchiale.

La struttura è simile a quella dei mammiferi, anche se c'è poca differenziazione fra zona corticale e midollare. Il parenchima è costituito da tessuto linfoide il quale è quasi interamente composto da linfociti in vari stadi di sviluppo e sottili fibre argirofile di supporto, mentre all'esterno è rivestito da una capsula connettivale. I vasi sanguigni possiedono uno speciale endotelio con giunzioni strette, simili a quelle presenti nel timo dei mammiferi. In alcuni pesci si evidenziano numerosi macrofagi, talvolta in stretta associazione con i linfociti. In alcune specie sono state evidenziate strutture che assomigliano ai corpuscoli di Hassall. Il timo è più evidente nell'avannotto mentre diventa meno preminente nel pesce adulto, anche se

esistono grosse differenze legate alla specie. Infatti nei teleostei meno evoluti tendenzialmente presenta involuzione prima della maturità sessuale, mentre in quelli più evoluti permane anche dopo questo momento ed addirittura si può accrescere. Generalmente l'involuzione è molto più lenta, rispetto ai mammiferi, ed è caratterizzata da accumolo di tessuto connettivo.

Vengono di seguito riportati i punti ancora aperti sulla comprensione delle funzioni del timo nei pesci.

1) La superficialità in molte specie (di più nella trota, soprattutto soggetti giovani, meno nella carpa), e la presenza di grosse fenestrature nell'epitelio di rivestimento dell'organo, contrastano in parte con la necessità di segregazione dell'organo da parte dell'ambiente esterno per evitare che si creino fenomeni di tolleranza da parte delle cellule T verso determinati patogeni.

2) Come nei mammiferi, si suppone che il timo nei pesci rivesta una funzione di organo primario del sistema immunitario. Nel timo avviene la maturazione delle cellule T immunocompetenti? La timectomia non ha effetto sul tessuto linfatico del rene, anche se si osserva nel contempo marcata deplezione dei linfociti nella milza. La risposta anticorpale e il rigetto di allotrapianto è ancora conservato.

2) MILZA

E' l'organo che ha maggior somiglianza con il tessuto linfatico e soprattutto con i linfonodi di mammifero. E' di colore rosso-scuro o nero, con margini affilati ben definiti. E' situata in prossimità della grande curvatura dello stomaco, generalmente singola, anche se talvolta può essere suddivisa in milze più piccole. Esiste una capsula fibrosa priva di fibre muscolari e mancano anche le numerose trabecole connettivali che da questa entrano nella polpa, come accade per i mammiferi. I principali elementi costitutivi sono gli ellissoidi, la polpa e i centri melanomacrofagici (CMM).

Le arteriole spleniche terminano dividendosi in numerosi capillari con spessa parete, gli ellissoidi, che si aprono poi a loro volta negli spazi della polpa. Gli ellissoidi hanno un vaso assiale ricoperto da endotelio, circondato da una guaina di cellule reticolari sostenute da fibre reticolari (fig. 6). Gli ellissoidi contengono eritrociti e fagociti e sono capaci di trattenere grosse quantità di particelle dalla circolazione. I macrofagi qui presenti, dopo fagocitosi del materiale migrano dagli ellissoidi ai CMM, che spesso si trovano in prossimità dei vasi stessi. E' interessante sottolineare che antigeni, inizialmente trattenuti in altri siti dell'organismo, possono essere poi ricollocati nella milza, probabilmente trasportati dai macrofagi. Questa ipo-

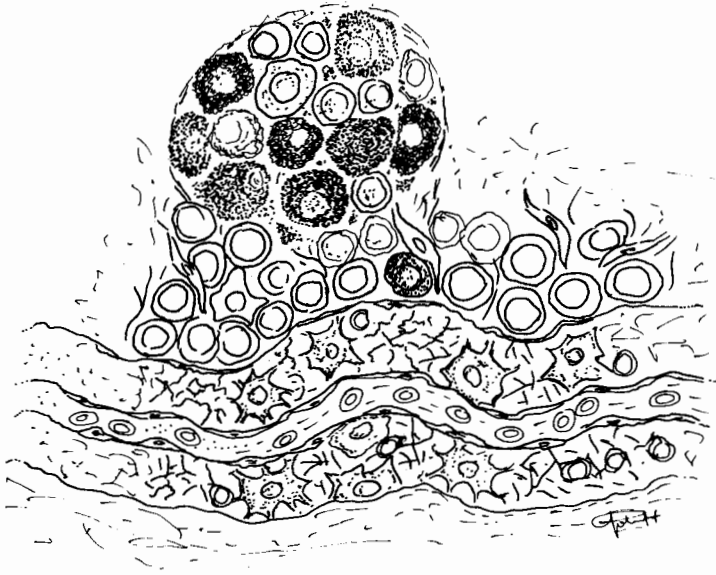


Fig. 6 - Rappresentazione schematica di un ellissoide della milza con in prossimità un centro melanomacrofagico.

tesi è stata provata nella trota iridea, dopo inoculo di batteri uccisi e controlli effettuati a 1 e 18 ore. Una situazione simile, con le dovute differenze, si osserva anche nei mammiferi dove linfociti B memoria migrano dai follicoli dei linfonodi alla polpa bianca che circonda le arteriole pennicillari nella milza.

La polpa splenica è costituita da tessuto sinusoidale, in parte simile a quello presente nel rene, nel quale sono trattiene molti eritrociti, e da tessuto emopoietico. Quest'ultimo è principalmente ma non esclusivamente linfopoietico. In molte specie, come nella trota iridea, la milza è la sede di maggior produzione di eritrociti.

CMM sono generalmente situati in vicinanza dei vasi e sono circondati da una sottile membrana limitante di tipo reticolare. Il tessuto linfatico della milza è più organizzato nei teleostei più evoluti ma non raggiunge mai un alto livello di strutturazione. Generalmente è formato da cuffie di tessuto linfatico che circondano gli ellissoidi e i CMM associati. Nella carpa, dopo stimolazione antigenica, o in corso di malattie croniche, si osserva un aumento della polpa bianca, specialmente attorno ai CMM, mentre compaiono plasmacellule, insieme a gruppi di cellule pironinofile a livello degli ellissoidi. Con tecniche immunoistochimiche sono state evidenziate cellule

positive per la proteina S100 nella milza di carpa, trota e orata (Tab. 4). Tali cellule si presentano di grosse dimensioni, sono provviste di prolungamenti citoplasmatici e sono spesso in stretto contatto con linfociti; il loro aspetto e la positività alla proteina S100 le rende molto simili alle cellule Interdigitate Dendritiche (IDc) dei mammiferi. Le cellule IDc dei mammiferi sono cellule con funzione APc (Antigen Presenting cell) e sono importanti nell'iniziare la risposta immunitaria verso l'antigene; il rinvenimento di cellule simili anche negli organi linfatici di pesce potrebbe costituire una prova molto importante della presenza, anche nei pesci, di cellule capaci di esercitare una funzione APc.

3) *TESSUTO EMOPOIETICO RENALE*

Il tessuto interstiziale emopoietico forma in tutto il rene dei teleostei un supporto per l'apparato escretore vero e proprio, mentre nella porzione anteriore, definita "testa" del rene o pronefro, si trova esclusivamente tessuto emopoietico. Il tessuto emopoietico del rene è costituito da un sistema di sinusoidi ricoperti da cellule di tipo reticoloendoteliale simile a quello del midollo osseo dei mammiferi, fra i quali è interposto il tessuto linfatico costituito da linfociti e plasmacellule. La contemporanea presenza di queste due componenti fornisce la caratteristica principale di questo tessuto; infatti, a differenza del midollo osseo, il tessuto emopoietico renale ha anche una forte attività di tipo fagocitario e contiene inoltre cellule mature capaci di produrre anticorpi. Da questo punto di vista possiede una discreta somiglianza con i linfonodi.

Attorno alle vene e ai sinusoidi si osservano molti precursori della serie mieloide, i granuloblasti, che per le loro proprietà istochimiche sono considerati analoghi ai mieloblasti e ai mielociti presenti nel midollo osseo dei mammiferi.

Altra importante prerogativa del tessuto emopoietico dei teleostei è la costante presenza di cellule ricche di pigmenti, identiche a quelle descritte nella milza, che possono essere sparse nel tessuto o aggregate a formare dei centri. Queste cellule sono di due tipi principali: i melanociti e i melanomacrofagi.

Nei teleostei primitivi come i salmonidi si osserva una bassa specializzazione tissutale, mentre nei teleostei più evoluti come i ciprinidi e i pleuronectidi è già evidente un certo grado di specializzazione del tessuto emopoietico. Infatti in questi ultimi si osserva una costante aggregazione dei melanomacrofagi.

Tabella n°4 - Localizzazione immunistoichimica di proteina S-100 in organi di alcune specie di pesci

	MILZA	RENE	FEGATO	CUTE	CERVELLO
CARPA	Cellule simil macrofagiche, posizione in endoteliale e cellule RDCs-simili	Negativo	Cellule endotelio vasi sanguigni	Negativo	Nucleo e citoplasma di numerose cellule gliali
TROTA IRIDEA	Rare cellule RDCs-simili	Rare cellule RDCs-simili	Non testato	Cellule denritiche nello strato delle cell. pigmentate (?)	Nucleo citoplasma di numerose cellule gliali
BRANZINO	Non testato	Negativo	Non testato	Negativo	Nucleo e citoplasma di numerose cellule gliali
ORATA	Rare cellule simil macrofagiche vicine ai vasi	Non testato	Non testato	Non testato	Non testato
ANGUILLA	Negativo	Negativo	Negativo	Non testato	Non testato

E' stata dimostrata la ricircolazione linfocitaria dai tessuti periferici al rene: i linfociti che arrivano al rene con la circolazione sanguigna, entrano nel parenchima renale attraversando particolari vasi a parete sottile, e in circa 24 ore raggiungono i CMM.

Ugualmente, dopo stimolazione antigenica, nella carpa iniziano a comparire nel tessuto emopoietico aggregati sferici di cellule pironinofile. Questo tipo di risposta, che trova il suo massimo a circa tre settimane dalla stimolazione, precede il picco del titolo anticorpale serico, suggerendo un meccanismo di produzione anticorpale simile a quello che si osserva nei mammiferi. L'esatto ruolo degli aggregati di cellule pironinofile non è del tutto chiarito. Si pensa che questi possano evolvere in CMM e che possano avere funzioni analoghe ai centri germinativi dei vertebrati superiori. Studi di ME hanno confermato la presenza di plasmacellule nel rene ed è stato anche riscontrato che sono più numerose a questo livello che nella milza. Nella trota iridea, con una tecnica immunistoichimica e l'impiego di anticorpi policlonali per le Ig di questo pesce, sono state evidenziate plasmacellule sparse nel tessuto emopoietico o radunate in gruppetti in prosimità di aggregati di melanomacrofagi.

Ulteriore particolarità del tessuto emopoietico renale è quella di avere incluso al suo interno il tessuto surrenale, presente come isolotti rotondi od ovali, rivestiti da una sottile capsula connettivale.

I MELANOMACROFAGI E I CENTRI MELANOMACROFAGICI (CMM)

I melanomacrofagi sono un particolare tipo di fagociti con citoplasma infarcito di melanina o di ceroidi e lipofuscine. Queste cellule formano spesso degli aggregati forniti di una discreta organizzazione che vengono definiti CMM. Oltre che nel tessuto interstiziale del rene, sono presenti anche nella milza, nel fegato e occasionalmente in altri siti come gonadi e tiroide.

Il numero e le dimensioni dei CMM appaiono incrementati in particolari situazioni come: malattie croniche, catabolismo eccessivo (prolungato digiuno), permanenza in acque inquinate, senilità.

Tabella 6 - Modalità di coltura e stimolazione di leucociti di pesce

SPECIE ITTICA	FONTE DI LEUCOCITI UTILIZZATA	TERRENO DI COLTURA**	MITOGENI ed ANTIGENI*	TEMP. °C	% CO ₂
P/euronectesa. Winter flounder	milza	RPMI 1640	LPS	15°	5%
Cyprinus carpio Carp	reneant. milza sangue perif.	RPMI 1640 modificato	PHA IL-2 <i>*Trypanos. b.</i>	33°	5%
Oncorhynchus mykiss Rainbow trout	reneant. timo milza sangue perif.	RPMI 1640	LPS + plasma omologo (cellule T e B) PHA (timociti) PHA+ vit C <i>*Aeromonas s</i> <i>*Vibrio ang.</i>	17°-19°	5% 10%
Salmosalar Atlantic salmon	reneant. timo-milza sangue perif.	RPMI 1640	LPS (cellule T e B) PHA (timociti)	19°	5%
Oncorinchus kisutch Salmon	rene ant. sangue periferico	RPMI 1640	LPS + plasma omologo	17°	10%
Ictalurus punctatus Channel catfish	sangue perif.	L-15 AIM-V	LPS (cell.B) ConA(cell.T)	27°	5%
Brevoortia tyrannus Atlantic m.	milza rene ant.	HBSS RPMI	LPS PWM Pha	27°	5%

* Gli antigeni inducono proliferazione in vitro nel caso in cui il pesce sia stato sensibilizzato.

** In genere il medium culturale viene addizionato con siero fetale bovino o siero autologo al 5-10%.

Il colore dei CMM in pesci normali, varia dal rosa al bruno-dorato (ceroidi o lipofuscine), ma tende ad essere nero (melanina) nei pesci vecchi o malati.

I CMM, vera differenza con i mammiferi, variano nel loro grado di organizzazione, a seconda della specie. Nei teleostei meno evoluti, come i salmonidi, i melanomacrofagi sono più facilmente isolati o riuniti in piccoli aggregati distribuiti nel tessuto emopoietico. Il grado di melanizzazione varia con l'età, ma a tutte le età il pigmento presente è bruno scuro o nero ed ha le proprietà chimiche e biochimiche della melanina.

Nei teleostei più evoluti la quantità di pigmenti scuri presenti nei centri di pesci normali è generalmente poca, e la maggioranza del pigmento è più chiara. Dal punto di vista istochimico è lipofuscina. La morfologia dei CMM dei teleostei più evoluti è molto più definita. Sono generalmente nodulari, con una delicata capsula argirofila, e contengono oltre ai melanomacrofagi anche linfociti e cellule pironinofile. In molte specie sono strettamente associati ai vasi, e possono avere attorno una corona di linfociti. Macrofagi circolanti, ripieni di materiale fagocitato, generalmente di origine microbica, o prodotti metabolici di rifiuto come ceroidi o emosiderina, ritornano o migrano selettivamente ai CMM, che possono essere considerati come centri di "stoccaggio di rifiuti metabolici". E' possibile che nei pesci più evoluti i CMM perdano in parte la loro funzione di centri di potente azione di fagocitosi e "killing" verso i patogeni, compito che sarebbe svolto da strutture più evolute (aggregati di macrofagi simili ai follicoli ?); questa situazione invece rimarrebbe nei teleostei meno evoluti che conservano CMM ricchi di melanina con potente effetto battericida.

IL SISTEMA DEI FAGOCITI MONONUCLEATI (SFM)

Le cellule dei teleostei che si possono considerare facenti parti del SRE sono:

- i promonociti degli organi emopoietici;
- i monociti del sangue e della linfa;
- i macrofagi del tessuto connettivo;
- i macrofagi fissi della cavità atriale del cuore.

Ci sono notevoli differenze dai mammiferi per quanto riguarda il SFM. Nei pesci i macrofagi fissi dell'atrio sono estremamente importanti, mentre non è descritta la presenza di cellule di questo tipo in animali filogeneticamente più evoluti. Nel fegato dei pesci, invece, non sembra esistere un corrispettivo delle cellule del Kupffer dei mammiferi.

Cellule giganti e cellule epitelioidi, che possono essere comprese nel sistema dei fagociti mononucleati, sono descritte in lesioni flogistiche croniche anche dei teleostei. Caratteristica interessante dei macrofagi dei teleostei è quella di formare degli aggregati, una volta che sono ripieni di materiale fagocitato. Molto spesso questi aggregati si rinvengono nei siti dei melanomacrofagi in tessuti ematopoietici, ma si possono frequentemente trovare, spesso pigmentati, all'interno o attorno a lesioni infiammatorie croniche.

IMMUNITA' SPECIFICA

1) IMMUNOGLOBULINE

1.1) Caratteristiche strutturali

Nei pesci gli anticorpi sono stati rintracciati a livello di molti fluidi tissutali (plasma, linfa, bile, muco della cute, muco intestinale). Nel sangue costituiscono dal 40 al 50 % delle proteine sieriche totali. Nella trota iridea i valori di immunoglobuline variano da 4,5 a 10,8 g/100 ml. Il sistema vascolare del pesce è discretamente permeabile alle Ig sieriche:

PESCE contenuto di Ig		MAMMIFERO contenuto di Ig	
siero +++++	linfa ++++ (solo 20% in meno)	siero ++++++ maggioranza	linfa (+) quasi assenti

L'emivita degli anticorpi circolanti sembra abbastanza varia:

Carpa	12 giorni
Perciformi (Sarago)	16 giorni
Salmone coho	49 ore a 12°C

Caratteristica particolare delle immunoglobuline di pesce è la presenza di una unica classe. La forma di immunoglobulina prevalente è quella tetramericata costituita da quattro subunità formate ciascuna da 2 catene pesanti (H) e da 2 catene leggere (L) (fig. 7). Le quattro subunità sono unite tra loro tramite ponti disolfuro che collegano le catene H. Come rappresentato dalla tabella 3, esistono anche Ig di tipo dimerico e monomero, che non sono state comunque rintracciate in tutti i pesci. In base al PM della catena

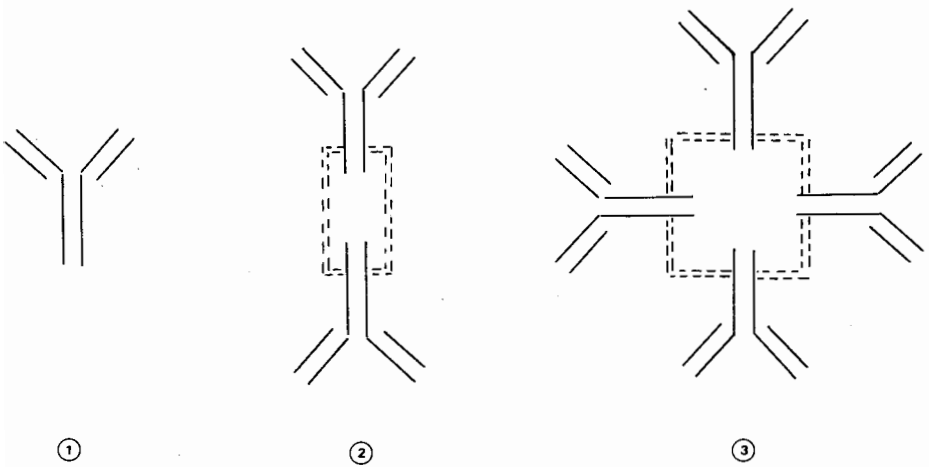


Fig. 7 - Rappresentazione schematica delle principali forme di immunoglobuline rintracciate nei teleostei. 1)Ig monomerica; 2)Ig dimerica; 3)Ig tetrameric.

pesante, ai ponti disolfuro intercatena, al tipo di aminoacidi e al contenuto di carboidrati, le immunoglobuline dei pesci mostrano una forte somiglianza con le IgM dei mammiferi. Verranno di seguito definite come IgM.

Esiste solo un gruppo di pesci, quello con parziale respirazione simile agli anfibi ("lungfish") che possiede una seconda classe di Ig monomeriche di 7S. Nei pesci cartilaginei, invece, le IgM sono di due tipi: pentameriche e monomeriche. L' IgM di teleosteo è una molecola ad alto peso molecolare composta da 4 subunità (8 catene pesanti, 8 catene leggere) con coefficiente di sedimentazione 16S e P.M. di 700.000. Alcune specie di pesce (passera) possiedono anche una forma monomerica di IgM di 7S, non considerata comunque come classe a sè, mentre altre specie come i salmonidi e la carpa hanno solo tetrameri. In alcuni pesci le IgM presenti nella bile sono dimeri, formati da due catene contrapposte, che presentano una singolare somiglianza con i dimeri IgA dei mammiferi. Sono state ritrovate anche immunoglobuline nelle uova di carpa e passera, suggerendo la possibilità di un trasferimento di anticorpi materni. I dati forse più completi al riguardo sono quelli attinenti il pesce rosso, nel quale in situazioni di prolungata

immunizzazione si formerebbero principalmente LMWlg (immunoglobuline a basso P.M.) che sarebbero antigenicamente ed elettroforeticamente distinte dai polimeri HMWlg (immunoglobuline ad alto P.M.) A parte questo dato nessuna ricerca prova l'esistenza di uno "shift" immunoglobulinico come nei mammiferi.

1.2) Subclassi Immunoglobuliniche

La specializzazione funzionale delle differenti classi di Ig nei mammiferi è una proprietà che deriva dalla diversa struttura della catena pesante (H) che ne determina la classe. Nei pesci, a parte casi particolari, non sono descritte differenti classi di immunoglobuline. Nell'ambito, comunque, delle IgM sembra esistere una eterogeneità, che potrebbe riflettere anche un diverso repertorio funzionale. Nel sarago (*Diplodus sargus*), per esempio, si sono rintracciate: IgM1- monomeriche; IgM2 - dimeriche; IgM4 - tetrameriche, caratterizzate da differenti P.M. delle catene pesanti.

Tab. 5 - Differenti subclassi di immunoglobuline rintracciate nel sarago.
(Da Lobbe et al. 1981, parzialmente modificata)

Subclasse	P.M. Catena pesante	Localizzazione
IgM1	45 KDa	siero
IgM2	55KDa	bile
IgM2	70KDa	muco cutaneo
IgM4	70KDa	muco cutaneo,siero

Con l'avvento degli anticorpi monoclonali e con il miglioramento delle tecniche di separazione delle proteine si sono ottenuti ulteriori dati molto interessanti. Per le immunoglobuline del pesce gatto americano sono stati ottenuti tre anticorpi monoclonali che riconoscono tre differenti tipi di catene H. Inoltre sono stati ottenuti due anticorpi monoclonali che riconoscono differenti catene L. Utilizzandoli in prove di cromatografia per affinità, si sono evidenziate anche differenti percentuali dei due tipi di catene L: approssimativamente il 60 % delle Ig sieriche sono definite da uno dei due monoclonali (3F12) e il 40% dall'altro (1G7). Analisi aminoacidiche potranno definire se si tratta di differenti catene L come nel caso dei mammiferi (catene K e catene lambda).

1.3) Eterogeneità funzionale delle Ig di pesce

Si sta quindi definendo una sorta di eterogeneità funzionale delle Ig di pesce che può correlarsi a differenze strutturali. Infatti, mentre l'attività agglutinante è facilmente dimostrabile per molte Ig di pesce, lo è molto meno l'attività precipitante.

In alcuni pesci teleostei, infatti, le IgM4 (16S) hanno alta attività agglutinante per la BSA, mentre le IgM1 (7S) non possiedono attività agglutinante. Nella cernia (*Epinephelus spp.*) le IgM4 (16S) hanno forte attività precipitante a differenza delle le IgM1 (7S).

Nella trota iridea le IgM1 e Le IgM4 sieriche hanno catene L identiche, mentre le catene H differiscono nel tipo di peptidi, P.M. e immunoreattività. Dal punto di vista funzionale si osservano evidenti differenze: infatti, mentre le IgM1 hanno bassa capacità di attivare il complemento e solo per via alternativa, le IgM4 hanno attività 100 volte maggiore e possono attivarlo sia per via classica che per via alternativa.

Inoltre sono state trovate variazioni stagionali nell'attività agglutinante e citolitica degli anticorpi di trota iridea: in inverno per es. il titolo citolitico è più basso, così come la produzione di IgM1.

Questi dati supportano l'idea che nei teleostei sia avvenuta una diversificazione filogenetica delle Ig. Non è ancora accertato se queste differenti forme di Ig hanno anche differenti funzioni biologiche.

1.4) Funzioni delle Ig di pesce

A dispetto delle scarse informazioni presenti sulle Ig di pesce, le loro funzioni non appaiono troppo dissimili da quelle delle più conosciute Ig di mammifero. Le principali funzioni delle Ig di pesce vengono di seguito schematizzate.

1.4.1) Neutralizzazione di virus - E' questa una funzione importante delle Ig dei pesci (neutralizzano anche tossine batteriche).

1.4.2) Attivazione del complemento - Le immunoglobuline di pesce possono attivare il C per via classica o per via alternativa. Come per i mammiferi è richiesta la presenza di Ca^{2+} . Non tutte le Ig di pesce hanno lo stesso potere attivante il C.

1.4.3) Opsonizzazione di particelle - Nei mammiferi i fagociti hanno recettori per la porzione Fc dell'anticorpo; le IgG hanno potere opsonizzante mentre le IgM non lo possiedono. Nella passera non è stata osservata attività opsonizzante delle Ig. Nella trota iridea, in assenza di C, la presenza di

anticorpi specifici per *Yersinia ruckeri* (l'agente eziologico della "bocca rosa") aumenta notevolmente la fagocitosi del batterio. Questo non accade se ad *Y.Ruckeri* si sostituisce *Aeromonas salmonicida* (l'agente eziologico della "forunculosi"). Questo proverebbe che, a differenza dei mammiferi, le IgM di alcune specie di pesce possono avere un ruolo come opsonine, grazie anche alla presenza di recettori specifici sui fagociti.

1.4.4) Ipersensibilità - Anche in questo caso si osserva una forte differenza con i mammiferi, dove le reazioni di ipersensibilità sono legate alle IgE e ai mastociti. Soltanto in un numero molto limitato di pesci, è stata dimostrata la presenza di mastociti nei tessuti, ma non si hanno dati sull'esistenza di anticorpi simili alle IgE. E' interessante considerare, però, che nel pesce rosso (*Carassius auratus*) sono state riportate osservazioni di reazioni di tipo anafilattico indotte dopo sensibilizzazione con antigene specifico. Non si esclude quindi l'importanza di reazioni di tipo anafilattico soprattutto nel caso di vaccinazioni.

1.4.5) Alcune considerazioni conclusive sulle Ig - Dal punto di vista della immunità umorale il pesce appare filogeneticamente primitivo se confrontato con i vertebrati di classi superiori dove si hanno da 2 a 5 distinte classi di Ig. E' possibile che l'evoluzione di classi multiple di Ig a basso P.M. abbia cercato di seguire l'evoluzione di un sistema vascolare efficiente, idoneo allo spostamento via aria o alla locomozione terrestre. Infatti, la forte pressione sanguigna, presente negli uccelli e nei mammiferi, ha richiesto la formazione di giunzioni strette e resistenti fra le cellule endoteliali, allo scopo di prevenire l'essudazione di fluidi plasmatici e proteine. Questo avrebbe determinato l'impossibilità da parte delle grosse macromolecole di Ig ad uscire per raggiungere gli interstizi tissutali, ed avrebbe favorito l'evoluzione di forme di Ig a basso P.M.

Nel pesce, al contrario, le diverse esigenze metaboliche consentono l'esistenza di un sistema vascolare con bassa pressione e ampie fenestrature endoteliali, che lasciano fuoriuscire le macromolecole di Ig. Questo non avrebbe determinato nel pesce la formazione di Ig a basso P.M. Una eccezione la troviamo a livello cutaneo dove, per mantenere una buona integrità dell'organismo, l'elitelio esterno richiede giunzioni cellulari strette; è significativo perciò che le IgM secretorie dei teleostei siano dimeriche. L'eterogeneità strutturale delle IgM dei pesci è ormai evidente. La specializzazione funzionale delle classi di Ig dei mammiferi si può rispecchiare nelle subclassi delle IgM dei pesci.

2) LINFOCITI

Nel pesce i linfociti si trovano nella circolazione sanguigna, negli organi linfoidei e in alcuni tessuti. Contrariamente ai linfociti dei vertebrati superiori, quelli di pesce non sono stati ancora ben caratterizzati. Numerosi dati suggeriscono, comunque, una dicotomia dei linfociti anche nei pesci. Uno dei primi metodi per distinguere i linfociti B dai T, che ancora viene utilizzato, è stato quello della marcatura delle immunoglobuline di superficie. Esistono infatti numerosi anticorpi poli o monoclonali che riconoscono immunoglobuline di trota, carpa, pesce gatto americano, branzino ecc. Grazie all'utilizzo di questi anticorpi si è potuto distinguere linfociti B Ig (+) da cellule linfatiche Ig (-) (di tipo T o NC). Inoltre sono stati ottenuti numerosi anticorpi monoclonali (MoAb) capaci di marcare molecole presenti sulla membrana di cellule linfatiche di pesce. Di seguito ne vengono riportati alcuni:

- 13C10 - questo MoAb reagisce con linfociti di pesce gatto americano Ig (-), ma non con quelli Ig (+). Riconosce la maggior parte dei timociti, i neutrofili e i trombociti.

- WC112 - MoAb per Ig sieriche di carpa, marca la maggior parte delle plasmacellule e un subset di linfociti probabilmente della linea B (20 - 30%). Al contrario di quanto avviene nelle cellule B di mammifero, le molecole Ig sono riunite in "clusters" sulla superficie cellulare.

- WCT23 - MoAb contro timociti di carpa, marca un numero molto elevato di linfociti, quindi non può essere considerato un marcatore specifico per le cellule T. Inoltre marca i granulociti e cross reagisce con le Ig. Probabilmente riconosce un determinante antigenico comune presente su varie membrane o molecole del siero, comprese le Ig.

- UB13 - MoAb contro timociti e cellule nervose di razza (*Raja clavata*), che riconosce anche timociti di carpa, rana, tartaruga, pollo e ratto. Riconosce probabilmente un determinante di superficie che si è conservato nell'evoluzione.

- sono stati ottenuti anche MoAbs che riconoscono frazioni leucocitarie di salmone atlantico (*Salmo salar*).

Tutti questi anticorpi, come molti altri che non vengono riportati, hanno dimostrato di possedere differente affinità per specifiche sottopopolazioni linfocitarie che sono tuttavia ancora da definire. A prova dell'ipotesi dell'esistenza di differenti tipi di linfociti sono le sperimentazioni che hanno dimostrato la presenza anche nel pesce dell'effetto carrier-aptene. Nel pesce rosso si è visto, infatti, che una buona produzione di anticorpi si ha soltanto verso

un aptenè coniugato con un carrier già usato nella prima stimolazione. Le cellule che operano nel riconoscimento del carrier e che cooperano nella produzione di anticorpi sarebbero probabilmente linfociti T del tipo "helper" dei mammiferi. Queste cellule si differenzierebbero nel timo. Per quanto concerne i sistemi di coltura e stimolazione di leucociti di pesce, numerose sono le esperienze al riguardo presenti in letteratura. Le più significative vengono riportate nella tabella 6. Da questa si evince che, a parte poche eccezioni, per quasi tutte le specie la temperatura di incubazione si discosta molto da quella normalmente usata per i leucociti di mammifero (37°C), oscillando da un minimo di 15° a un massimo di 27°C. Sono generalmente simili, invece, i terreni di coltura (fra i più usati l'RPMI 1640) e i mitogeni utilizzati per promuovere la stimolazione cellulare (buoni risultati con PHA e ConA). Le fonti preferenziali di leucociti sono il rene anteriore e il sangue periferico.

Anche nei linfociti di pesce si è evidenziata una differente capacità di rispondere alla stimolazione con mitogeni: tendenzialmente i linfociti che presentano Ig di superficie sono più responsivi a LPS, mentre quelli che non hanno Ig di superficie sono stimolati più attivamente da ConA e PHA.

3) IMMUNITA' CELLULO-MEDIATA (CMI)

Prove dell'esistenza di una efficace risposta immunitaria di tipo celluloso mediato sono ormai numerose anche nel caso dei pesci. Infatti molti dei test "in vitro" che vengono utilizzati per lo studio e la valutazione della CMI nei mammiferi sono stati adottati con successo anche nei pesci. Fra questi sono di valido ausilio:

- 1) il test della citotossicità
- 2) la reazione leucocitaria mista (MLR);
- 3) l'inibizione della migrazione macrofagica;
- 4) il test dell'attività macrofagica;
- 5) la blastizzazione linfocitaria indotta dall'antigene.

Poco si conosce al riguardo del ruolo giocato dalla CMI nella patogenesi delle malattie batteriche, virali e parassitarie. Nella trota iridea è stata descritta una tipica risposta immunitaria di tipo ritardato (IV tipo) verso *Mycobacterium tuberculosis*.

Il rigetto di un allotrapianto è stato osservato e descritto nei pesci cartilaginei e nei più evoluti pesci ossei, con la differenza che in questi ultimi la reazione di rigetto si esplica più velocemente. E' stato notato anche che allotrapianti ripetuti effettuati con lo stesso tessuto accelerano il tempo

di rigetto. Il tessuto che viene rigettato si presenta infiltrato di linfociti e mostra gravi alterazioni a livello vascolare e nelle cellule pigmentate.

Per quanto riguarda le molecole omologhe agli antigeni del Complesso Maggiore della Istocompatibilità (MHC) dei mammiferi, se ne sospetta l'esistenza pure nei pesci, anche se al momento non esistono prove certe dell'esistenza di un sistema della istocompatibilità ugualmente articolato. La carpa sembra possedere molecole di membrana omologhe alle catene alfa degli MHC di Classe I e alle catene beta degli MHC di Classe II.

4) CITOCHINE

Sull'esistenza e la funzione delle citochine nei pesci, numerose informazioni sono scaturite dalle ricerche effettuate da Secombes (1991) e più recentemente da Ahne (1993, 1994), condotte principalmente sui salmonidi. E' stata provata la liberazione da parte dei monociti di una molecola simile alla interleuchina-1, e da parte dei linfociti di una molecola che presenta forte analogia con la interleuchina-2. Inoltre dai leucociti di trota iridea, stimolati con ConA, si è evidenziata la produzione di IL-1 α , IL-3 e IL-6. Recentemente nel siero di alcuni pesci è stato evidenziato TNF α .

5) SISTEMA IMMUNITARIO DELLE MUCOSE (SIM)

Le ricerche effettuate sul SIM dei pesci sono abbastanza limitate ma stanno avendo un recente incremento visto l'accresciuto interesse per la possibilità di stimolazione dell'immunità locale con sistemi di vaccinazione per via orale. Per una più corretta trattazione dell'argomento è opportuno richiamare separatamente i siti dove nel pesce avviene preferenzialmente una risposta immunitaria di tipo locale.

Branchie

Le branchie rivestono un ruolo importante nell'opera di trattenimento di antigeni (particolati) provenienti dall'acqua. A livello branchiale viene attuata una attiva fagocitosi ad opera del sistema dei fagociti mononucleati che delimitano i vasi sanguigni delle lamelle secondarie. Nel corso di vari processi infettivi a livello branchiale si accumulano numerosi linfociti, a prova dell'importante azione di barriera che questo organo può esercitare.

Cute

Il muco che ricopre la cute contiene frazioni del complemento e Ig dimeriche che non derivano per essudazione dai vasi sanguigni, ma sono più probabilmente prodotte localmente. Nell'epidermide sono presenti linfociti e

talvolta plasmacellule. Esistono inoltre numerosi macrofagi e cellule Langhan-simili, che fanno sospettare una processazione locale degli antigeni che penetrano attraverso la cute e la possibilità di indurre una risposta locale.

Intestino

La presenza di Ig nell'intestino può originare dalla secrezione che proviene dalla mucosa o dalla bile. La mucosa dell'intestino e la lamina propria sono popolate da macrofagi, linfociti e plasmacellule, anche se manca una vera organizzazione di queste cellule in un tessuto linfatico associato alla mucosa. La vaccinazione per *Vibrio anguillarum*, effettuata nella trota per via orale, sembra stimolare una risposta locale, anche se ancora non si conosce esattamente come questo possa avvenire. E' stata recentemente dimostrata una endocizzazione di antigeni proteici da parte degli enterociti di carpa, con trasferimento nello spazio intercellulare degli antigeni stessi, che possono così venire a contatto con macrofagi e linfociti. Nei mammiferi è risaputo che antigeni processati a livello intestinale stimolano una forte risposta immunitaria locale, ma inducono anche cellule soppressorie che abrogano o comunque attenuano la risposta sistemica. Nella trota iridea la somministrazione orale di antigeni di *Aeromonas salmonicida* risulta in una soppressione della risposta sistemica umorale verso l'antigene iniettato. Questi dati, che presentano forte analogia con quanto accade nei mammiferi, fanno supporre l'esistenza anche nei pesci di un sistema immunitario delle mucose. A questo riguardo indagini condotte da Secombes (1991) provano che i linfociti isolati dall'intestino di trota sono funzionalmente attivi in vitro e sembrano avere un importante ruolo difensivo in vivo. Queste cellule liberano grosse quantità di IFN gamma aumentando notevolmente la fagocitosi dei batteri da parte dei macrofagi. In più, i macrofagi fissi intestinali dimostrano di possedere una forte attività fagocitaria, mostrano un efficace "respiratory burst" e liberano fattori chemiotattici che influenzano la migrazione di leucociti dal rene anteriore. Questi dati in ultima analisi spiegherebbero come nei pesci possano svilupparsi, a livello intestinale, imponenti reazioni infiammatorie in risposta a parassitosi. Tali reazioni verrebbero rafforzate dalle cellule granulari eosinofile (soggette a degranolazione) presenti in numero elevato nella lamina propria dell'intestino. La possibilità, da parte dei linfociti presenti nell'intestino, di liberare fattori che "up-regolano" la funzione battericida dei macrofagi residenti ha una grossa implicazione difensiva. Nei pesci è stato provato che proprio i linfociti intestinali, rispetto a quelli di altri distretti, sembrano produrre una maggior quantità di IFN γ . Questo avvalorava l'ipotesi che nei pesci l'immunità locale a livello intestinale

può giocare un ruolo importante nella risposta difensiva specifica contro molti patogeni. Questa azione svolta dal SIM, fino ad ora sottovalutata, potrebbe giustificare gli innumerevoli sforzi volti a ricercare nuovi e più efficaci sistemi di vaccinazione.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dr.ssa Donatella Volpatti per la collaborazione prestata nelle ricerche che hanno supportato questa relazione e nella stesura di alcune parti del manoscritto. Un ringraziamento anche alla Dr.ssa Laura D'Angelo e al Sig. Pierluigi Bagatella per l'allestimento dei preparati istologici e l'effettuazione delle prove immunoistochimiche.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Agius C. (1985) *The melano-macrophage cells of fishes: A review*. In Fish Immunology (M. J. Manning and M. Tatner, eds) pp. 85-106, Academic Press, London.
- 2) Ahne W. (1993) *Presence of interleukins (IL-1, IL-3, IL-6) and the tumor necrosis factor (TNF- α) in fish sera*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 13(3),106-107.
- 3) Ahne W. (1994) *Induced interleukin (IL-1 α , IL-3, IL-6) production in vitro by leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14(1), 33-35.
- 4) Ellis A.E. (1980) *Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa**. J. Fish Dis., 3, 413-26.
- 5) Ellis A.E. (1981a) *Non specific defence mechanisms in fish and their role in disease processes*. Dev. Biol. Stand., 49, 337-52.
- 6) Ellis A.E. et al. (1976) *Defence mechanisms in fish. 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa*)*. J. Fish Biol., 8, 67-78.
- 7) Ellis A.E., Grisley M.S. (1985) *Serum antiproteases of salmonids: Studies on the inhibition of trypsin and the proteolytic activity of *Aeromonas salmonicida* extracellular products*. In Fish and Shellfish Pathology, ed. A. E. Ellis, pp. 85-96. London: Academic Press.
- 8) Evans D. L. et al. (1984) *Non-specific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). IV. Target cell binding and recycling capacity*. Dev. Comp. Immunol., 8, 823-33.
- 9) Faisal M., Hargis Jr W.J. (1991) *Augmentation of mitogen-induced lymphocyte proliferation in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*, with Ulcer Disease Syndrome*. Fish & Shellfish Immunology 2, 33-42.
- 10) Galeotti M., Lanari D. (1989) *Aspetti istologici di branchie di trota iridea (*Salmo gairdneri* R.) adattata all'acqua dolce e all'acqua salata*. Zootecnica e Nutrizione Animale, 15, 413.
- 11) Galeotti M. et al. (1991) *La Necrosi Ematopoietica Infettiva della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*): indagine istologica ed immunoistochimica*. Bollettino Societ Italiana di Patologia Ittica, 7, 22.

- 12) Galeotti M. et al. (1993) *Immunohistochemical study of fish lymphoid organs with antibody against S-100 protein*. Europ. Ass. of Fish Path. 6th International Conference. Brest, France.
- 13) Galeotti M. et al. (1993) *Immunohistological localization of trypsin in Sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae at different stages of life*. Europ. Ass. of Fish Path. 6th International Conference. Brest, France.
- 14) Galeotti M. et al. (1994) *Indagine istologica e immunoistochimica in branzini (*Dicentrarchus labrax*) infettati sperimentalmente con *Pasteurella piscicida**. Convegno internazionale "Giornate di Acquacoltura", Cuneo (1994).
- 15) Graham (1990) *Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma?* Journal of Fish Biology, 36(4), 563-73.
- 16) Grfflin B.R. (1983) *Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leucocytes*. Dev. Comp. Immunol., 7, 253-60.
- 17) Hamers R. (1994) *Studies on Carp lymphoid cells from kidney, peripheral blood and spleen stimulated in vitro with blood parasites and super-antigen*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 14(6),191.
- 18) Hardie L.J. et al. (1993) *In vitro addition of vitamin C affects rainbow trout lymphocyte responses*. Fish & Shellfish Immunology 3, 207-219.
- 19) de Kinkelin P. et al. (1984) *Immunisation des poissons contre les viroses sévissant en eau froide*. In *Symposium sur la vaccination des poissons*. Off. int. Epiz. Paris, 189-224.
- 20) Lamers C.H.J., De Haas M.J.H. (1985) *Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*)*. Cell Tissue Res., 242, 491-8.
- 21) Lobb C.J., Clem L.W. (1981) *The metabolic relationships of immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus and bile*. J. Immun., 127, 1525-9.
- 22) MacArthur J.I., Fletcher T.C. (1985) *Phagocytosis in fish*. In Fish Immunology, ed. M. J. Manning & M. F. Tatner, pp. 29-46. London: Academic Press.
- 23) Manning M.J., Mughal M.S. (1985) *Factors affecting the immune responses of immature fish*. In Fish and Shellfish Pathology, ed. A. E. Ellis, pp. 27-40. London: Academic Press.
- 24) Nagelkerke L.A.J. et al. (1990) *Oxygen uptake of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes following stimulation of the respiratory burst*. J. exp. Biol., 154, 339-53.
- 25) Nonaka M. et al. (1984) *Purification of a major serum protein of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) homologous to the third component of mammalian complement*. J. biol. Chem., 259, 6327-33.
- 26) Reitan L.J., Thuvander A. (1991) *In vitro stimulation of salmonid leucocytes with mitogens and with *Aeromonas salmonicida**. Fish & Shellfish Immunology 1, 297-307.
- 27) Rijkers G.T. (1982) *Kinetics of humoral and cellular immune reactions in fish*. Dev. Comp. Immunol., Suppl. 2, 93-100.
- 28) Roberts R.J. (1989) "Fish Pathology", ed. Baillière Tindall, second edition.
- 29) Roberts R.J. (1975b) *Melanin containing cells of teleost fish and their relation to disease*. In The Pathology of Fishes, ed. W. E. Ribelin & G. Migaki, pp. 399-428. Madison, Wis.: University of Wisconsin Press.
- 30) Ross G.D., Jensen J.A. (1973). *The first component (C1n) of the complement system of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*)*. 1. Hemolytic characteristics of partially purified. Clin. J. Immunol. 110:175-182.

- 31) Sakai D.K. (1992) *Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish*. Annual Rev. of Fish Diseases, 223-247.
- 32) Secombes C.J. et al. (1982a) *The effect of primary and secondary immunization on the lymphoid tissues of carp, Cyprinus carpio L.J.* exp. Zool., 220, 277-87.
- 33) Secombes C.J. et al. (1982b) *Localization of immune complexes and heat-aggregated immunoglobulin in the carp, Cyprinus carpio L.* Immunology, 47,101-5.
- 34) Secombes C.J. (1991) *The phylogeny of cytokines*. In "The Cytokine Handbook" Academic Press Limited. 387-412.
- 35) 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., Suppl. 2, 181-6.
- 36) Stolen J.S. et al. (1986) "*Fish Immunology*", ed. Elsevier.
- 37) Stolen J.S. et al. (1990) "*Techniques in Fish Immunology*", 1st edition, SOS Publications.
- 38) Varichak T. (1938) *Studies on endothelial cells in the liver of fishes*. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 27, 46-51.
- 39) Warr G.W. et al. (1983) *Thymocyte plasma membrane of the rainbow trout, Salmo gairdneri: associated immunoglobulin and heteroantigens*. Comp. Biochem. Physiol. B., 76, 515-21.
- 40) Whyte S.K. et al. (1989) *Cytotoxic reactions of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, macrophages for larvae of the eye fluke Diplostomum spathaceum (Digenea)*. J. Fish Biol., 35, 333-45.
- 41) Galeotti M. et al. (1995) *Comparison of antigen and mitogen induced in vitro stimulation of lymphoid cells from various organs of sea bass (D. labrax)*. In pubblicazione su "Bulletin of the European Association of fish pathologists".