

**Inmunobiología de la
escuticociliatosis del rodaballo
Psetta maxima (L.) en cultivo**

Juan Alberto Arranz Tagarro



Universidad de Santiago de Compostela

Instituto de Investigaciones y Análisis Alimentarios

Laboratorio de Parasitología

**Inmunobiología de la escuticociliatosis del
rodaballo *Psetta maxima* (L.) en cultivo**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por:

Juan Alberto Arranz Tagarro

Santiago de Compostela, marzo de 2008

José Manuel Leiro Vidal, Profesor Titular de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Certifica: Que la presente Tesis Doctoral titulada "**Inmunobiología de la escuticociliatosis del rodaballo *Psetta maxima* (L.) en cultivo**" que, para optar al grado de Doctor en Biología, presenta **Don Juan Alberto Arranz Tagarro**, ha sido realizada en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigaciones y Análisis Alimentarios bajo mi dirección y la del Profesor Raúl Iglesias Blanco, y que, considerándola concluida, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, marzo de 2008

Fdo: José Manuel Leiro Vidal

Fdo: Raúl Iglesias Blanco

Los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos de investigación:

Philasterides dicentrarchi (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, **46** (1): 47-55 (2001).

In vitro growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Veterinary Parasitology*, **111** (1): 19-30 (2003).

Philasterides dicentrarchi (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, **217** (1-4): 73-80 (2003).

Philasterides dicentrarchi (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology*, **126** (2): 125-134 (2003).

Chemotactic responses of the fish-parasitic scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* to blood and blood components of the turbot *Scophthalmus maximus*, evaluated using a new microplate multiassay. *Journal of Microbiological Methods*, **58** (3): 361-366 (2004).

Effects of the histophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. *Fish and Shellfish Immunology*, **17** (1): 27-39 (2004).

Ultrastructure and phylogeny of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatia) from farmed turbot in NW Spain. *Parasitology*, **132** (4): 555-564 (2006).

A mi familia.

*A mis abuelos y a mi tío,
que siempre estarán en mi memoria.*

A Mónica.

De todas las suposiciones absurdas de la humanidad, nada supera las críticas a los hábitos de los pobres hechas por quienes tienen buena casa, buen abrigo y buen alimento.

Herman Melville

Nadie combate la libertad; a lo sumo combate la libertad de los demás. La libertad ha existido siempre, pero unas veces como privilegio de algunos, otras veces como derecho de todos.

Karl Heinrich Marx

Deseo agradecer a los profesores Manuel L. Sanmartín Durán, José Manuel Leiro Vidal y Raúl Iglesias Blanco la oportunidad que me han dado de trabajar en un laboratorio de investigación, así como el apoyo, la orientación y la dirección durante el desarrollo de este trabajo.

También expresar todo mi agradecimiento a Aurea, Elvira, Esperanza, Floro, Tere, Fernanda, Hipólito, José Antonio y Román, profesores e investigadores del departamento con los que he tenido contacto, así como a Suso, del Departamento de Biología Celular y Ecología, por el trato que me han dispensado durante todo este tiempo.

Al Dr. Santiago Cabaleiro, director del *Cluster* de Acuicultura, por el material biológico que nos suministró. Asimismo a D. Jacobo Fernández, responsable de Insuiña, por su colaboración en la realización de este trabajo.

Asimismo, me gustaría agradecer a la Xunta de Galicia la concesión de la Beca de Tercer Ciclo y la Beca Predoctoral, sin las cuales no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A Anabel y a Ovidio, por mantener los ratones bien vigilados.

A Ana, que ha mantenido limpios la mesa y el ordenador en los que se ha gestado el presente trabajo, así como el resto del laboratorio.

Aunque no he tenido mucho trato con ellas por mi forma de ser, a Anabel, de la que ha aprendido tanto técnicas de laboratorio como a mantenerlo limpio y ordenado, a Francisca, con quien mantuve breves conversaciones que amenizaron el trabajo diario, y a Charo, con la que compartí técnicas moleculares.

A mis compañeros actuales del Instituto, Belén, Carla y Pedro, con los que aún no he mantenido excesivo trato por haberme encontrado en la redacción de esta Tesis y con quienes a partir de ahora compartiré trabajo cotidiano en el laboratorio, y a Laura, con la que he mantenido cortas charlas en los momentos libres que nos dejaban mis experimentos y sus análisis sobre el lobo.

A toda mi familia, es decir, mis padres Juan Alberto y Arantza, mis hermanos Gorka y Edurne, y mi tía Edurne, que con su amor y cariño han hecho que sea lo que soy y llegase hasta aquí, y por supuesto a mis cuñados en pecado Ana y Rachid.

A Mercedes, Merche y Matías, cuyos apoyo e interés hacia a mi trabajo han sido de gran ayuda en el día a día.

A toda la Piña de Caleruega, los cuales estoy seguro de que realmente no saben a qué me dedico por mucho que me lo han preguntado, y que han conseguido que recargase las pilas durante los meses de agosto.

A Álex, Ana y Olga, que hicieron que la carrera fuese mucho más llevadera entre cenas, cafés y chistes, y que aunque últimamente no nos vemos mucho, siempre que lo hacemos no faltan las preguntas acerca de cómo llevo la Tesis.

A Koldo, David e Iñigo, mis amigos de Bilbao, que me dieron todo su ánimo y compartieron mi entusiasmo cuando decidí emprender mi aventura gallega allá por octubre de 1996.

A Abel, Alba, Carmen y Iago, mi “familia” catalana, de los que aparte de una gran amistad he recibido un ánimo incondicional.

A Víctor, compañero de piso al principio y amigo después, con el que he compartido la práctica totalidad de mi estancia en Santiago y del que he aprendido casi todo lo que sé de Historia gracias a las largas conversaciones y discusiones que hemos mantenido.

A Fran, con quien he compartido una gran cantidad de horas de fútbol y de autobús recorriendo Galicia de campo en campo.

Y por supuesto a Mónica, que accedió a venirse conmigo a tierras gallegas desde su Zamora natal, y que con su apoyo, comprensión, paciencia, e infinitos amor y cariño ha hecho que siguiera hacia adelante en los buenos y los malos momentos, muchos más de los primeros que de los segundos.

Claro está que me habré olvidado de alguien debido a mi mente dispersa, así que muchas gracias a todos los que en algún momento han aportado algo a la realización de este trabajo.

Sólo espero que cuando tengáis en vuestras manos un ejemplar de esta Tesis Doctoral no hagáis como Julius Marx (Groucho): “Desde el momento en que cogí su libro me caí al suelo rodando de risa. Algún día espero leerlo”.

La realización experimental de la presente Tesis Doctoral ha sido financiada económicamente a través de diversos Proyectos de Investigación concedidos por instituciones públicas autonómicas y nacionales:

Xunta de Galicia:

Estudio de la posible implicación de las enzimas del parásito *Philasterides dicentrarchi* en la colonización del rodaballo *Scophthalmus maximus*. Proyecto financiado por la Consellería de Presidencia y Administración Pública, y Secretaría de Investigación y Desarrollo con el código PGIDIT02RMA23701PR (2002).

Evaluación y mejora de una nueva vacuna frente al ciliado *Philasterides dicentrarchi* patógeno del rodaballo. Proyecto financiado por la Consellería de Innovación, Industria y Comercio con el código PGIDIT05RMA015E (2005).

Nuevo desarrollo de una vacuna frente a *Philasterides* sp. para su aplicación en alevines de rodaballo. Proyecto financiado por el Cluster de Acuicultura de Galicia con el código PGIDIT06BTF00601 (2006).

Gobierno de España:

Mecanismos moleculares de inmunomodulación y desarrollo de vacunas de ADN frente a *Philasterides dicentrarchi* (Scuticociliatia) y *Tetramicra brevifilum* (Microspora) en cultivos de rodaballo. Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología con el código AGL2003-04644 (2003).

Mecanismos de interacción patógeno-hospedador y desarrollo de nuevas estrategias de control de la escuticociliatosis en el rodaballo. Proyecto financiado por el Ministerio de Investigación y Ciencia con el código AGL2006-12872-C02-01/ACU (2006).

- AC:** fracción antigénica ciliar.
- ACF:** adyuvante completo de Freund.
- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- ANOVA:** análisis de la varianza de una vía.
- ARN:** ácido ribonucleico.
- CFF:** ciliados fijados en formalina.
- CLUSTAL W:** programa de alineamiento múltiple progresivo de secuencias.
- D.O.:** densidad óptica.
- DAB:** 3,3'-diaminobenzidina.
- DAPI:** 4'-6-diamidino-2-fenilindol.
- DMEM:** medio de Eagle modificado por Dulbecco.
- DMSO:** dimetilsulfóxido.
- E-64:** L-trans-epoxisuccinil-leucil-amido (4-guanidino) butano.
- EC:** extracto crudo.
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.
- ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay*.
- FBS:** suero fetal bovino.
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína.
- HBSS:** solución salina balanceada de Hank.
- H-E:** tinción hematoxilina-eosina.
- HEPES:** ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazina-*N'*-2-etanosulfónico.
- Ig:** inmunoglobulina.
- iNOS:** enzima óxido nítrico sintasa inducible.
- IPTG:** isopropil- β -D-tiogalactósido.
- L-15:** medio L-15 de Leibovitz.
- LB:** medio de Luria-Bertoni.
- LC:** lisado de ciliados.
- L-NMMA:** *N*^G-monometil-L-arginina monoacetato.

LPS: lipopolisacárido de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4.

MP: membrana paraoral.

NJ: método de neighbour-joining (vecino más próximo).

OPD: ortofenilendiamina.

PBS: tampón fosfato salino (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 4.3 mM de Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mM de KH₂PO₄, pH 7.3).

PCO: policinética oral.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

pH: potencial hidrógeno.

PM: proteínas integrales de la membrana.

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato.

PMSF: fenilmetanosulfonil fluoruro.

RNS: especies reactivas del nitrógeno.

ROS: especies reactivas del oxígeno.

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico.

SEM: microscopía electrónica de barrido.

SRI: suero de rodaballo infectado.

SRN: suero de rodaballo normal.

SSF: solución salina fisiológica.

SSUrRNA: gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad pequeña.

TBE: tampón Tris borato EDTA (45 mM de Tris-base, 45 mM de H₃BO₃, 1 mM de EDTA, pH 8.0).

TBS: tampón Tris salino (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7.4).

TBS-T₁: tampón Tris salino que contiene un 0.05% de Tween-20.

TBS-T₂: tampón Tris salino que contiene un 0.2% de Tween-20.

TEM: microscopía electrónica de transmisión.

UR3: anticuerpo monoclonal de ratón anti-rodaballo.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido.

Introducción	1
La acuicultura y el rodaballo.....	3
La acuicultura.....	3
Biología del rodaballo.....	4
Cultivo del rodaballo.....	5
Principales enfermedades.....	8
Biología de los ciliados.....	10
Características generales.....	10
Estructura de la corteza.....	11
Dimorfismo nuclear.....	15
Conjugación.....	15
Morfogénesis.....	16
Cambios facultativos en su morfología.....	17
Cambios cíclicos en su morfología.....	18
División celular de los ciliados.....	19
Tipos de división celular.....	19
Control de la división celular.....	20
Formación del patrón en los ciliados.....	22
Regeneración, reorganización y división.....	22
Estomatogénesis.....	23
Taxonomía y sistemática de los ciliados.....	25
Escuticociliados.....	27
Epidemiología.....	27
Morfología.....	28
Ciclo biológico.....	33
Patología.....	34
Técnicas de diagnóstico.....	40
Rutas de entrada en el hospedador.....	47
Quimiotaxis y adaptación al parasitismo.....	48
Profilaxis y control.....	49
Cultivo.....	53
Taxonomía y filogenia.....	54
El sistema inmunitario de los peces.....	57
Órganos y tejidos linfohematopoyéticos.....	57

Sistema inmunitario innato.....	59
Respuesta inmunitaria celular innata.....	59
Granulocitos.....	60
Monocitos/macrófagos.....	63
Células citotóxicas no específicas (NCC).....	66
Respuesta inmunitaria humoral innata.....	67
Fagocitosis.....	69
Producción de metabolitos tóxicos.....	70
La explosión respiratoria.....	72
El óxido nítrico.....	73
Sistema inmunitario adquirido.....	75
Respuesta inmunitaria celular adquirida.....	75
Respuesta inmunitaria humoral adquirida.....	77
Complejo principal de histocompatibilidad (MHC).....	81
Factores que alteran la respuesta inmunitaria.....	84
Respuesta inmunitaria de los peces frente a los parásitos.....	85
Respuesta inmunitaria de los peces frente a los ciliados.....	88
Objetivos.....	91
Material y Métodos.....	97
Animales de experimentación.....	99
Ciliados.....	99
Aprobación ética.....	100
Microscopía de contraste de fases y tinción May Grünwald-Giemsa.....	100
Impregnación con nitrato de plata.....	101
Tinción del aparato nuclear (DAPI).....	102
Examen histológico.....	103
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	105
Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	105
Extracción del ADN.....	108
Amplificación por PCR, clonación y secuenciación del gen SSUrRNA.....	108
Análisis filogenéticos.....	110
Preparación de un cultivo axénico.....	111
Preparación de los medios de cultivo.....	113

Experimentos de cultivo <i>in vitro</i>	114
Exposición de los datos.....	115
Métodos de estudio de la infección experimental y las posibles rutas de entrada del ciliado en el rodaballo.....	116
Análisis de la respuesta quimiotáctica del ciliado.....	117
Quimioatrayentes empleados.....	118
Ensayos quimiotácticos.....	119
Preparaciones antigénicas, vacunación y ensayos de protección.....	121
Preparaciones antigénicas.....	121
Inmunización, obtención de los sueros e infección de los rodaballos.....	125
Inmunización y obtención de los sueros de los ratones.....	126
Ensayos para la cuantificación y la caracterización de la respuesta inmunitaria adaptativa.....	127
Ensayo de inmovilización/aglutinación.....	127
ELISA doble indirecto.....	128
Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	129
Electrotransferencia e inmunorreconocimiento antigénico por anticuerpos (<i>Immunoblot</i> , <i>Western blot</i>).....	130
Métodos para determinar la capacidad moduladora del ciliado sobre la respuesta inmunitaria innata del rodaballo.....	131
Estímulos, fármacos y productos químicos.....	131
Estimulación y aislamiento de los leucocitos inflamatorios peritoneales.....	132
Ensayo de la fagocitosis.....	133
Ensayos de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	134
Ensayo de la producción de nitrito.....	136
Análisis estadístico.....	137
Resultados.....	139
Descripción del ciliado y patología.....	141
Descripción del ciliado.....	141
Signos clínicos y patología.....	144
Estudio ultraestructural y análisis filogenéticos.....	150
Ultraestructura del ciliado.....	150
Análisis filogenéticos.....	155

Preparación de un cultivo axénico.....	158
Dosis óptima de cultivo.....	158
La temperatura, el pH y la salinidad óptimos.....	159
Requerimientos nutricionales.....	162
Infección experimental y estudio de las posibles rutas de entrada del ciliado en el rodaballo.....	164
Ensayos de la infección experimental.....	164
Respuestas quimiotácticas y adaptación al parasitismo.....	169
Preparaciones antigénicas e inmunización.....	173
Inmovilización/aglutinación de los ciliados por los diferentes sueros de rodaballo y reactividad de estos sueros con los antígenos de los ciliados (ELISA).....	173
Inmovilización/aglutinación de los ciliados por los diferentes sueros de ratón.....	176
Eficacia de los diferentes protocolos de inmunización en los rodaballos y reactividad de sus sueros con los antígenos de los ciliados (ELISA).....	177
Evaluación de los diferentes protocolos de inmunización frente a la infección experimental.....	179
Caracterización de los principales antígenos de <i>P. dicentrarchi</i> reconocidos por los sueros de rodaballo y ratón con capacidad de inmovilización/aglutinación.....	180
Capacidad moduladora del ciliado sobre la respuesta inmunitaria innata del rodaballo.....	182
Efectos de la dosis y la viabilidad de <i>P. dicentrarchi</i> en la actividad fagocítica de los leucocitos peritoneales.....	182
Efectos de la dosis de <i>P. dicentrarchi</i> en la producción intracelular y extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales.....	184
Efectos de la viabilidad de <i>P. dicentrarchi</i> en la producción extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales.....	186
Efectos de la inoculación previa de los rodaballos con <i>P. dicentrarchi</i> en la producción <i>in vitro</i> de NO [•] por los leucocitos peritoneales.....	188
Discusión.....	191
Conclusiones.....	219
Bibliografía.....	223

Introducción

La acuicultura y el rodaballo

La acuicultura

La acuicultura marina experimentó un auge importante a partir de los años 70, en los que las capturas anuales de peces procedentes de la pesca parecían estancarse alrededor de los 55-65 millones de toneladas.

En la actualidad es una actividad en rápido y constante desarrollo. En el caso de los peces, en particular, la producción y el ritmo de crecimiento de éstos son impresionantes, debido a que las tecnologías de engorde son conocidas y transferibles fácilmente entre las diferentes especies, por lo que una vez que se logra la producción de alevines, el desarrollo de los engordes es rápido.

Galicia es una de las regiones europeas que presenta un sector pesquero relevante, el cual constituye un gran motor económico y una parte muy importante de su tejido social, industrial y financiero. Como consecuencia de la presión internacional sobre la actividad pesquera de nuestro país, la acuicultura marina cobró un interés especial, siendo especialmente potenciada a través de las administraciones española y europea, representando en la actualidad, concretamente en nuestra comunidad autónoma, uno de los principales pilares de su política pesquera.

En Galicia se conjugan dos aspectos fundamentales para el desarrollo de los cultivos marinos: por una parte, la existencia de un importante mercado tradicional de pescado fresco que facilita en gran manera la distribución del producto, y por otra, la superficie litoral que queda por desarrollar, que se caracteriza por unas aguas limpias poco industrializadas con unas comunidades pesqueras que pueden desarrollar estos cultivos.

Por todo ello, en Galicia, desde el punto de vista económico y empresarial, el sector de los cultivos de peces es uno de los más dinámicos y en expansión,

participando en él reconocidas empresas nacionales e internacionales, además de grandes entidades financieras.

Biología del rodaballo

El rodaballo *Psetta maxima* (L.) es un pez teleósteo que pertenece al orden Pleuronectiformes y a la familia Scophthalmidae. Se caracteriza por tener un cuerpo casi circular y carente de escamas, pero provisto de numerosos tubérculos óseos. Los radios anteriores de la aleta dorsal están poco ramificados y no se prolongan fuera de la membrana de la aleta. La aleta dorsal está provista de 57-80 radios y la anal de 43-58 radios. Ambas presentan un perfil externo anguloso y al estar desplegadas dan una forma romboide al contorno corporal (Figuras 1A, B, C).

La mandíbula inferior ocupa una posición oblicua, así como la abertura bucal, de modo que su extremo anterior está adelantado respecto a la mandíbula superior (Figuras 1A, B). La rama inferior del primer arco branquial presenta de 10 a 12 branquispinas.

La cara superior está pigmentada y presenta un color variable, adaptándose al fondo en el que se encuentra (Figura 1C), pero en general es pardo o gris con numerosas manchas, normalmente pequeñas y redondas, en los flancos y las membranas de las aletas (Figura 1A). Alcanza una talla máxima de 90-100 cm (aproximadamente 12 kg).



Figura 1. Caras superior (A) e inferior (B) del rodaballo. (C) Rodaballo adaptándose al fondo sobre el que se encuentra.

Presenta una amplia distribución, pudiendo localizarse a lo largo de las costas atlánticas europeas, incluyendo el Mar Báltico y el Mar del Norte, en las costas de Islandia y Escandinavia, y en áreas que van desde Marruecos, penetrando en el Mediterráneo, hasta el Mar Negro. Habita principalmente en fondos arenosos (aunque también se encuentra en fondos rocosos), generalmente en aguas poco profundas, pudiendo localizarse también hasta profundidades de 100-125 m. Permanece en aguas someras en primavera y verano, descendiendo a mayor profundidad al llegar el invierno.

En su dieta se encuentran pequeños crustáceos y bivalvos durante la fase juvenil, cambiando a ingerir exclusivamente peces a partir de los 10-15 cm de longitud.

En cuanto a su reproducción, el rodaballo no presenta diferenciación sexual externa, y alcanza la madurez sexual durante su quinto año de vida. Posee un patrón de reproducción cíclico, caracterizado por un desarrollo gonadal masivo, con cambios morfológicos de color y volumen, siendo significativos en los ovarios antes de la expulsión de los gametos. Su periodo de puesta se produce en primavera (entre abril y julio) y la fecundidad se estima entre 5×10^5 y 10^6 ovocitos/kg de peso. Los huevos son pelágicos y miden de 0.9 a 1.2 mm. Tras la eclosión, las larvas pelágicas y simétricas de 2.1-2.8 mm se alimentan de presas vivas (zooplancton), permaneciendo en esta fase unos 60 días a 16 °C (principios de verano). Al finalizar esta etapa sufren una metamorfosis, desarrollando la asimetría y haciéndose bentónicas.

Cultivo del rodaballo

El cultivo del rodaballo estuvo olvidado durante más de cincuenta años. Fueron los trabajos de Shelbourne y Nash (1966) y Shelbourne (1968) con la solla (*Pleuronectes platessa*) y el lenguado (*Solea solea*), junto con los resultados

obtenidos por Purdon y col. (1972) en el engorde del rodaballo en densidades elevadas los que dieron un impulso definitivo a su cultivo.

El rodaballo es un pez de fácil mantenimiento, que no sufre daños en el manejo y se puede cultivar en grandes densidades. No es agresivo ni presenta problemas de jerarquía. En general, una vez superada la metamorfosis, el rodaballo posee excelentes cualidades para ser cultivado. La frágil naturaleza de las larvas se ve sin embargo compensada por una alta tasa de fecundidad.

El ciclo del cultivo está directamente relacionado con la temperatura, principal responsable de la determinación del tiempo necesario para que el rodaballo alcance la talla comercial (ver Figura 2).

En el caso particular de Galicia, esta zona reúne las condiciones óptimas para el cultivo del rodaballo a escala industrial. La particularidad de las características del agua en cuanto a temperatura y calidad de nuestro litoral, unida a la facilidad de distribución e introducción en el mercado nacional y comunitario de los productos derivados de la pesca y de la acuicultura, dotan a Galicia de una situación única para el cultivo de esta especie.

El cultivo del rodaballo se inició en Galicia al final de la década de los setenta, fecha en la que se realizaron las primeras experiencias de cría larvaria. Simultáneamente, se iniciaron las primeras investigaciones sobre el engorde con alevines salvajes capturados en el mar. Posteriormente, en los años ochenta, estas experiencias continuaron en colaboración con centros de investigación gallegos. Dichos ensayos demostraron que el rodaballo en condiciones de cultivo presentaba un crecimiento rápido, un buen índice de conversión, toleraba densidades de cría elevadas y mostraba una relativa gran resistencia a las enfermedades (Iglesias, 1994).

Tras una etapa inicial de incertidumbre por el riesgo que conllevaba el inicio de una nueva actividad, el máximo desarrollo del cultivo de rodaballo en Europa se alcanzó en España, principalmente en las costas de Galicia.

Desde la implantación de su cultivo, la producción ha seguido un proceso de expansión desde las aproximadamente 100 Tm en 1984 hasta las 800 Tm en 1990 y las 3.347 Tm en 2000. Hoy en día, las instalaciones existentes en España tienen una capacidad de producción de 5.815 Tm/año (producción en 2006), de las que el 92% corresponde a la capacidad de producción de Galicia, y una previsión para el año 2007 de 5.975 Tm, manteniéndose el porcentaje de producción en Galicia en el 92%. Es previsible que estas cifras se incrementen en años posteriores (Informe Apromar, 2007).

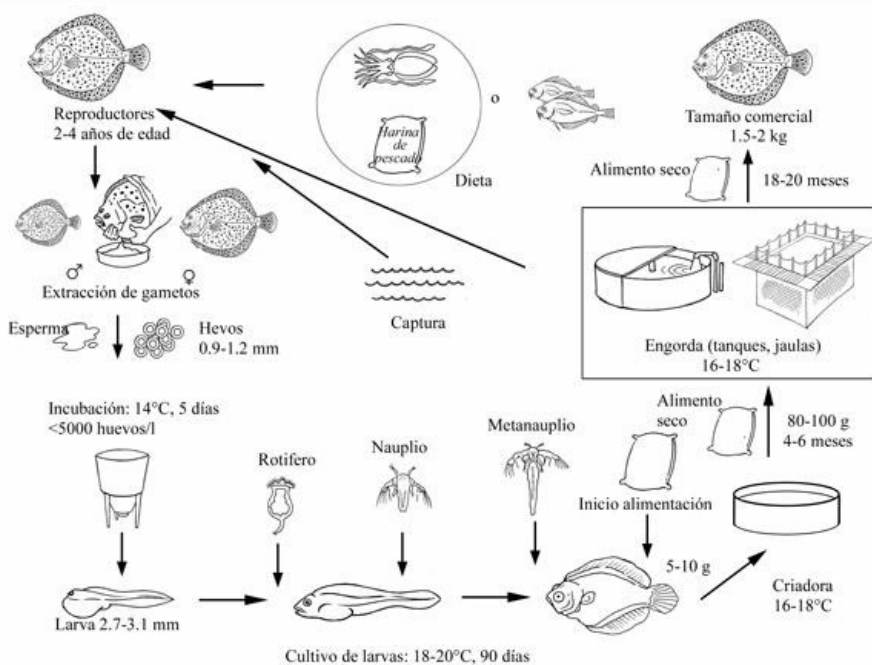


Figura 2. Ciclo de producción del rodaballo en acuicultura. Fuente: FAO.

No obstante, existen algunos problemas que pueden producirse durante el proceso de cultivo. Uno de los problemas, que limita drásticamente su crecimiento y productividad, es el zoonosanitario. El cultivo intensivo de peces altera su

ecofisiología y favorece enormemente la aparición de organismos parásitos que pueden ocasionar importantes enfermedades, presentando, en ocasiones, un desarrollo epizootico. Algunos parásitos pueden provocar patologías muy graves asociadas con una elevada mortalidad en los cultivos (fundamentalmente especies de protozoos). Sin embargo, lo más usual es que los organismos parásitos se mantengan crónicamente entre las especies de peces ocasionando un considerable retraso en el crecimiento y alteraciones en el aspecto morfológico que influyen negativamente en su posterior valor comercial.

Principales enfermedades

Los rodaballos pueden sufrir enfermedades virales, bacterianas y parasitarias.

Los **virus** que afectan al rodaballo son, por ejemplo, el nodavirus, el virus de la septicemia hemorrágica, el megalocitivirus y el rhabdovirus (Johansen y col., 2004; Nishizawa y col., 2006; Oh y col., 2006; Zhang y col., 2007).

Dentro de las **bacterias** causantes de infecciones encontramos, por ejemplo, *Vibrio pelagius*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Listonella anguillarum*, y *Tenacibaculum maritimum* y especies relacionadas (Villamil y col., 2003b; Björnsdóttir y col., 2005; Padrós y col., 2006; Qin y col., 2006; Piñeiro-Vidal y col., 2007).

Los rodaballos pueden verse afectados por numerosos **parásitos** que les causan enfermedades:

Amebas

Neoparamoeba sp., que son parásitos epizoicos que causan la enfermedad amebiana de las branquias produciendo dificultad y daño respiratorio. En el rodaballo, aparte de *Neoparamoeba pemaquidensis*, debe ser tenida en

consideración la especie íntimamente relacionada *Neoparamoeba aestuarina*, así como una supuesta tercera especie de *Neoparamoeba* (Fiala y Dyková, 2003).

Microsporidios

Son parásitos intracelulares obligados que provocan afecciones musculares y digestivas, y producen retraso en el crecimiento. En el caso de *Tetramicra brevifilum* las consecuencias no son inmediatas mientras se desarrolla la enfermedad, porque el crecimiento del parásito es lento, pero puede llegar a producir mortalidades masivas (Fernández-Puentes y col., 1991; Estévez y col., 1992; Leiro y col., 2001, 2002b).

Mixosporidios

Éste es el caso del endoparásito *Enteromyxum scophthalmi*, agente causante de enteritis severa, degradación del epitelio, hemorragias e inflamación del intestino (Palenzuela y col., 2002; Quiroga y col., 2006; Bermúdez y col., 2007).

Criptosporidios

Producen la distensión de las células epiteliales por la presencia de grandes vacuolas, conteniendo grupos de ooquistes, y pueden llevar a la separación de la mucosa intestinal, como sucede en el caso de *Cryptosporidium scophthalmi*. (Álvarez-Pellitero y col., 2004b).

Ciliados

Cabe citar a *Trichodina* sp., que dependiendo de la intensidad de parasitación puede causar hipersensibilidad o astenia, pérdida del apetito, ulceraciones cutáneas o branquiales, y mortalidades (Devesa, 1996). También los escuticociliados pueden parasitar al rodaballo, causando encefalitis, licuación

cerebral, úlceras y hemorragias en la piel y las aletas, necrosis branquial, etc., y finalmente la muerte del pez (Dyková y Figueras, 1994; Sterud y col., 2000; Ramos y col., 2007).

Cestodos

Bothriocephalus scorpii, que en infestaciones masivas provoca apatía y una degeneración física progresiva del rodaballo (Sanmartín y col., 1989).

Biología de los ciliados

Subphylum Ciliophora (Doflein, 1901). Anteriormente fue denominado Ciliata (Perty, 1852) e Infusoria (Bütschli, 1887). En la actualidad se conocen más de 8.000 especies. Adl y col. (2007) han estimado un número potencial de especies de 30.000, para lo que se basan en el número de secuencias de ADN desconocidas en las muestras medioambientales. Los principales caracteres comunes de este grupo residen en sus organizaciones morfológicas y en sus ciclos biológicos.

Características generales

Se caracterizan por la presencia de unas estructuras filiformes denominadas cilios que pueden rodear toda la célula o parte de ella (Figura 3).

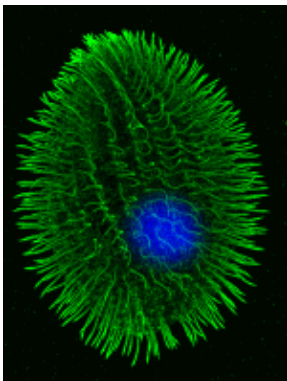


Figura 3. Imagen de la ciliatura y del macronúcleo de *Tetrahymena*.

Aparte de la presencia de estos numerosos cilios, las características generales de los ciliados pueden reducirse a tres rasgos:

- La estructura de la corteza
- Presentan dualismo nuclear
- Se reproducen sexualmente mediante conjugación.

Basándonos sólo en esta combinación de características, pueden definirse los ciliados como un taxón monofilético.

Estructura de la corteza

La corteza es una porción especializada de la célula que está en contacto con el ambiente por una parte y con el citoplasma por otra. Muestra una organización compleja, y todos sus elementos membranosos, filamentosos y microtubulares juegan un papel importante, siendo responsables de la relativa constancia en la forma de los individuos. Tiene un grosor total que varía de uno a varios micrómetros y comprende dos componentes: (a) la película y (b) la infraciliatura. La corteza puede presentar también otros elementos estructurales.

A la **película** pertenecen la membrana celular (plasmalema) y también, en algunos casos, un perilema adicional como componente extracelular (Modeo y col., 2003; Song, 2005). Esta película queda delimitada por un sistema de membranas que comprende la membrana plasmática (o externa o limitante), una membrana alveolar externa y una membrana alveolar interna (Chapman y Kern, 1983; Fyda y col., 2006) (Figura 4). Un sistema de alvéolos (vacuolas alveolares) se encuentra localizado directamente bajo el plasmalema, jugando un importante papel en el intercambio iónico y en la estabilidad de la corteza (Paulin y col., 1996). Próximas a los cilios se encuentran unas invaginaciones dominadas sacos parasomales que se disponen regularmente y representan lugares de actividad endocítica (Allen y col., 1992; Elde y col., 2005).

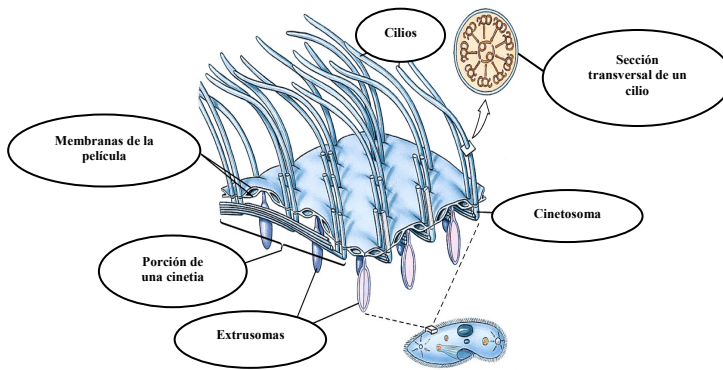


Figura 4. Esquema representando estructuras que forman parte de la corteza de los ciliados

La película, en el sentido más amplio, incluye una capa proteínica llamada epiplasma debajo de las vacuolas alveolares, y franjas longitudinales de microtúbulos citoesqueléticos que corren paralelos al epiplasma (microtúbulos supra y subepiplásmicos) (Paulin, 1996). Ambos componentes tienen posiblemente una función de estabilización, así como jugar un papel en la morfogénesis de la corteza (Adoutte y Fleury, 1996).

Los constituyentes fundamentales de la **infraciliatura** son las cinétidas. Están formadas por uno o dos cuerpos basales o cinetosomas (nueve grupos de tripletes de microtúbulos dispuestos en forma de rueda de carro), los cilios que surgen de ellos, y las fibrillas y los microtúbulos asociados a la base del cinetosoma. Pueden presentarse combinados como componentes individuales, dobles o múltiples, de ahí las monocinétidas y las dicinétidas somáticas, y las policinétidas orales. No es necesario para cada cinetosoma tener su propio cilio. Las estructuras asociadas a la base del cinetosoma comprenden una fibrilla cinetodesmal dirigida sobre todo anteriormente compuesta de subunidades filamentosas, así como dos cinturones de microtúbulos que corren o como microtúbulos transversos al lateral del ciliado o como microtúbulos postciliares oblicuamente al extremo posterior de la célula (Paulin, 1996).

Los cinetosomas están conectados frecuentemente a otros mediante cinturones microtubulares basales (subcinetal), por microtúbulos postciliares y por fibrillas cinetodesmales, lo que permite una exacta orientación longitudinal de los cinetosomas y de los cilios cuando éstos están presentes. De este modo, los cilios somáticos que sirven para la locomoción están dispuestos en hileras longitudinales llamadas cinetias (Paulin, 1996) (Figura 4). Este patrón regular está interrumpido sólo en la región oral por las cinetias periorales. Los cilios pueden formar cirros, que son complejos formados por numerosos cilios estrechamente relacionados entre sí que funcionan como una unidad, y membranelas, que son orgánulos ciliares dispuestos en serie. Los cirros sirven como extremidad para sus desplazamientos y las membranelas esencialmente para el arremolinamiento de las partículas de alimento (Banchetti y Erra, 2003; Wilks y Sleight, 2004).

La corteza contiene otros orgánulos, principalmente extrusomas (Figura 4) y fibrillas contráctiles (mionemas), pero también mitocondrias, cisternas del retículo endoplasmático y diversos tipos de vesículas (Kurz y Tiedtke, 1993; Maloney y col., 2005; Fyda y col., 2006; Vd'ačný, 2007). La gran organización de la estructura de la corteza no influye en su contractilidad, pero afecta generalmente al intercambio con el medioambiente. En la cara ventral de muchos ciliados existe un espacio bastante grande en el patrón cortical denominado sutura que está reservado para importar y exportar sustancias. En esta región, los ciliados tienen un conducto o surco oral profundamente invaginado (Figura 5), el fondo del cual está envuelto en la fagocitosis y en la formación de las vacuolas fagocíticas. De modo similar, existen aquí también diferentes complejos estructurales para eventos exocíticos que implican la fusión de las membranas vacuolares con el plasmalema: un citoprocto o citopigio para la expulsión de los residuos degradados de comida, y uno o más poros para la eliminación de los contenidos fluidos de las vacuolas contráctiles (Grim, 2006; Long y col., 2007) (Figura 5). La especial arquitectura de

la corteza también influye en el modo de dividirse en la medida en que el plano de fisión corre normalmente perpendicular a la dirección de las cinetias.

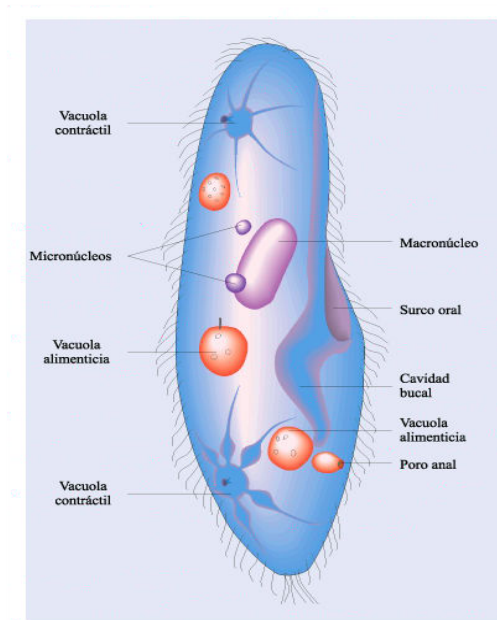


Figura 5. Dibujo donde se muestran diversos componentes de los ciliados.

La complejidad de la organización de la corteza puede observarse a nivel de microscopía óptica con ayuda de ciertas impregnaciones con plata. Aunque no está siempre claro qué elementos de la película o de las estructuras de las cinétidas son realmente visualizadas por estas técnicas, los resultados son reproducibles y específicos de cada especie, por lo que este análisis de la línea de plata es un método fiable que se sigue empleando en la actualidad para hacer investigaciones sistemáticas y morfogénicas (Lin y col., 2007; Shao y col., 2007). Sin embargo, para observar la complejidad total de la corteza es necesario el análisis de cortes seriados ultrafinos con microscopía electrónica de transmisión, gracias a la cual puede observarse con gran detalle y precisión su estructura (Cameron y col., 2002; Kornilova y col., 2006; Modeo y col., 2006).

Dimorfismo nuclear

Otro carácter relevante de los ciliados es su condición de heterocariontes, presentando uno o más núcleos somáticos (macronúcleo) y también uno o varios núcleos generativos (micronúcleo) (Figura 5). Los micronúcleos permanecen relativamente pequeños mientras que los macronúcleos son mucho más grandes y polimórficos (Raikov y Kovaleva, 1990; Katz, 2001; Vd'ačný, 2007). Los macronúcleos contienen un genoma incompleto del ciliado y es donde se produce la síntesis del ARN, siendo los responsables del metabolismo normal de la célula. Los micronúcleos, sin embargo, son los lugares de almacenamiento (contienen el genoma completo del ciliado) y recombinación del material genético, pero no están envueltos en el mantenimiento y la regulación de las funciones celulares. Esto está sustentado por la existencia de especies sin micronúcleo (Kaney y Speare, 1985). Sólo los micronúcleos realizan una división mitótica o meiótica regular, durante la que se forma un huso intranuclear. Para la cariocinesis de los macronúcleos, sin embargo, los mecanismos de separación no involucran la participación de husos y no está completamente entendida. Durante la fase de reproducción sexual, los macronúcleos normalmente sufren una degeneración y posteriormente son restablecidos desde los micronúcleos modificados (Katz, 2001).

Conjugación

En los ciliados, el proceso sexual viene definido por este fenómeno, en el que dos organismos de la misma especie se fusionan parcialmente entre sí (Figura 6) y comienza una serie de procesos: (1) la meiosis de los micronúcleos, (2) la producción de uno o más pronúcleos haploides en cada célula que interviene en el proceso (conjugante), (3) la transferencia del pronúcleo desde uno de los conjugantes al otro, (4) la fusión de dos pronúcleos en un núcleo cigótico (sincarion), (5) uno o más ciclos de mitosis del núcleo cigótico, (6) la diferenciación de los productos de estas mitosis en el nuevo micronúcleo y en el

nuevo macronúcleo, (7) la eliminación del viejo macronúcleo, (8) la separación o la fusión completa de las células unidas y (9) la reorganización de las estructuras corticales. Mediante estos procesos, los individuos viejos son reemplazados por otros nuevos (Miyake, 1996; Katz, 2001).

La conjugación puede producirse entre células similares morfológicamente (conjugación isomorfa) o entre dos células con diferente estructura o tamaño (conjugación anisomorfa). También puede clasificarse en función de si el proceso da lugar a dos cigotos (bicigótica o temporal o parcial) o a un solo cigoto (monocigótica). En la primera, las dos células implicadas en el proceso se separan dando lugar a dos células, mientras que en la segunda las células se fusionan completamente dando lugar a una sola célula o se separan produciendo una célula grande que continúa su desarrollo y una pequeña que degenera. El ciclo de la conjugación se cierra cuando las células resultantes del proceso o sus descendientes (producidos por fisión binaria) conjugan nuevamente. La conjugación isomorfa bicigótica es la más común (Miyake, 1996).



Figura 6. Ciliados en conjugación (izquierda) y dividiéndose mediante bipartición (derecha).

Morfogénesis

Muchos ciliados pueden cambiar su estructura en respuesta a señales externas y/o internas. Cuando estos cambios están acompañados por una

reabsorción y/o una construcción de partes nuevas de los organismos o de nuevos orgánulos, el proceso se denomina generalmente morfogénesis. Los ciliados pueden sufrir (a) cambios facultativos en su morfología y (b) cambios cíclicos en su morfología.

Cambios facultativos en su morfología

Estas variaciones pueden ser causadas principalmente por factores externos (por ejemplo, salinidad, temperatura, pH del medio, suministro de alimento, defensa frente a predadores, exposición a contaminantes como los metales pesados). Los cambios facultativos pueden incluir la formación de quistes, la adopción de diferentes morfologías (polimorfismo), etc.

Los **quistes** normalmente son estadios inactivos que presentan paredes gruesas y altamente resistentes constituidas por varias capas (Gutiérrez y col., 2003; Foissner y col., 2005; Foissner y col., 2007). El proceso de enquistamiento (criptobiosis) en protozoos ciliados es dependiente de la biosíntesis de ARN, de proteínas y de la glucosilación de las proteínas (Benítez y col., 1991; Benítez y Gutiérrez, 1997; Gutiérrez y col., 2003). También sabemos que los principales constituyentes macromoleculares de las paredes quísticas de los ciliados son los carbohidratos (a menudo en forma de quitina), las proteínas, las glucoproteínas y los polisacáridos (Mulisch, 1993; Calvo y col., 2003; Gutiérrez y col., 2003). El enquistamiento implica normalmente cambios morfológicos y fisiológicos drásticos como, por ejemplo, una deshidratación citosólica, una disminución del volumen celular, una alta actividad autofágica y cambios macronucleares (Gutiérrez y col., 2001; Díaz y col., 2003; Martín-González y col., 2005).

En el **polimorfismo**, ciliados de las mismas especies pueden adoptar diferentes morfologías (morfortipos); se dice que son polimórficos. Un caso de polimorfismo lo representa *Tetrahymena vorax*, que cambia de la forma microstoma a la forma macrostoma en presencia de *Tetrahymena thermophila* para

alimentarse de ella. El estímulo que desencadena esta diferenciación en *T. vorax* es un complejo de hierro y catabolitos de ácidos nucleicos llamado estomatina (Grønlien y col., 2002). En *Tetrahymena pyriformis*, por ejemplo, se produce la disminución del tamaño celular, la reducción de su volumen interno y la variación de la forma celular en presencia de contaminantes metálicos (Mountassif y col., 2007). Una vez que las condiciones vuelven a ser las habituales (alimento, ambiente, etc.), la célula revierte a su tamaño normal. Otros cambios morfológicos que sufren diversas especies de ciliados se producen en presencia de ciertos predadores, de modo que aumentan su tamaño y modifican su corteza celular formando unas extensiones laterales con forma de alas y salientes dorsales para evitar su ingestión por parte de los mismos, como es el caso del ciliado *Euplotes octocarinatus* en presencia del ciliado *Lembadion lucens* (Kuhlmann y Heckmann, 1985), o que se acortan y engrosan para dificultar la ingesta por parte del predador, como es el caso del himenostomado *Colpidium kleini* en presencia de *Lembadion bullinum* (Fyda y col., 2006). En base a diversos estudios, la modificación del citoesqueleto está inducida por sustancias secretadas por los predadores (Jerka-Dzidosz y col., 1987; Wicklow, 1997).

Cambios cíclicos en su morfología

Existen varios tipos de ciliados que adquieren diversas formas corporales durante su ciclo biológico, y estas variaciones suelen estar asociadas con cambios de hábitos, como pueden ser vivir fuera del hospedador, invadir células hospedadoras, protección frente a la respuesta inmunitaria del hospedador, etc. Cada una de estas fases se define normalmente con términos específicos (trofonte, tomonte, tomite, teronte). Un ejemplo de estos cambios cíclicos lo tenemos en el ciliado parásito de peces de agua dulce *Ichthyophthirius multifiliis*, que infecta a la anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Aguilar y col., 2005, Aguilar, 2006), a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Jørgensen y Buchmann, 2007), a la carpa

común (*Cyprinus carpio*) (González y col., 2007a, b), entre otros. El trofante reside y se alimenta en el epitelio de la piel y las branquias del hospedador donde crece pero no se reproduce. Una vez que deja de alimentarse, da lugar al tomonte que abandona el hospedador y eventualmente forma un quiste reproductivo donde se producen repetidas divisiones, originando los tomites (pueden variar entre 50 y unos pocos cientos). Éstos maduran antes de su salida del quiste, originando las formas infectivas (terontes) que nadan en búsqueda de otro pez en el que penetran a través del mucus y del epitelio, donde se transforman nuevamente en trofontes (Dickerson, 2006).

División celular de los ciliados

Tipos de división celular

La división de los ciliados puede producirse mediante fisión binaria, fisión múltiple y gemación.

La **fisión binaria** es la forma más común de reproducción en los ciliados. Se produce cuando la célula madre da lugar a dos células hijas iguales, para lo que todos los orgánulos deben duplicarse antes o durante la división, y repartirse igualmente entre los dos productos de la división, lo mismo que se sintetizan los precursores de las estructuras corticales, del aparato mitótico y de los dos núcleos (Paulin, 1996). En general, se dividen perpendicularmente a su eje longitudinal (Figura 6), originando una célula desde la parte anterior (*proter*) y otra desde la posterior (*opiste*). En la separación de las células (citocinesis) intervienen elementos contráctiles que están situados en un área con forma de anillo bajo el surco de fisión (Hirono y col., 1987; Numata y Gonda, 2001; Hosein y col., 2003). El Ca^{2+} y la calmodulina parecen estar envueltos en la determinación del plano de división (Gonda y Numata, 2002). La separación nuclear (cariocinesis) sucede durante el curso de la citocinesis.

La **fisión múltiple** da lugar a una rápida producción de un gran número de células. Los ciclos biológicos de diversos ciliados incluyen una forma de reproducción conocida como palintomía, experimentando una serie de divisiones consecutivas sin producirse fases de crecimiento, como por ejemplo el himenostomado *Ophryoglena hemophaga* (Molloy y col., 2005).

La **gemación** es un tipo de reproducción en la que el citoplasma se divide en dos partes de tamaño muy desigual, la menor de las cuales se conoce con el nombre de yema. Puede ser simple, cuando sólo se produce una yema, o múltiple, cuando aparecen varias; también pueden aparecer cadenas de ciliados unidos entre sí, resultado de diferentes procesos de gemación. Según el lugar en el que se producen las yemas, la gemación se clasifica en dos clases: exógena y endógena. La gemación exógena, que se produce en muchos ciliados de las subclases Suctoria y Chonotrichia, implica la formación de una protuberancia externa de la célula parental de la que posteriormente se separa la progenie (Corliss, 1979; Snoeyenbos-West y col., 2004). También hay procesos de gemación endógena en miembros de Suctoria, como en la especie *Acineta arcaehoniensis*, donde una o varias células hijas más pequeñas se desarrollan dentro de la célula madre en una bolsa interna de la progenie (Fernández-Leborans y Tato-Porto, 2000).

Control de la división celular

La morfogénesis en los ciliados está fuertemente asociada con el ciclo celular puesto que cerca del final de éste, los ciliados entran irreversiblemente en la división celular, produciéndose modificaciones del citoesqueleto por la separación de los orgánulos, la morfogénesis de la corteza y la citocinesis (Adl y Berger, 1996; Berger, 2001). Los procesos básicos del ciclo celular de las células eucariotas, como son la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis, son desencadenados por un sistema de control central del ciclo celular. Éste es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, compuesto por un conjunto de proteínas

interactivas y dependientes entre sí que inducen y coordinan los procesos subordinados básicos (aquellos procesos que ocupan una posición inferior en la jerarquía del control del ciclo celular) que duplican y dividen los contenidos de la célula. Durante un ciclo celular típico, el sistema de control está regulado por unos factores de retraso que pueden parar el ciclo en unos puntos de control determinados. En ellos, existen señales de retroalimentación que pueden retrasar el propio sistema de control, evitando que se desencadene el proceso siguiente sin que el anterior haya terminado adecuadamente. Un ejemplo claro es que la célula no puede entrar en mitosis hasta que el ADN nuclear no se ha replicado. El sistema de control del ciclo celular está basado en dos familias claves de proteínas: la primera es la familia de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) que sufren fosforilación sobre sus aminoácidos (serinas y treoninas) y la segunda es la familia de las ciclinas, las cuales se unen a las Cdk y controlan sus reacciones de fosforilación. El ensamblaje cíclico entre estos dos compuestos, su activación y desensamblaje son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular. Hay por lo menos dos complejos que regulan el ciclo celular: uno en el punto de control tardío de la fase G_1 (fase donde no se produce síntesis de ADN) justo antes de la fase S (fase de síntesis de ADN) y otro en el punto de control tardío de la fase G_2 (fase sin síntesis de ADN) justo antes de la fase M (fase mitótica). El ensamblaje del complejo entre la Cdk y la ciclina G_1 regula la entrada en la fase S produciéndose la replicación del ADN, siendo el punto de control principal del ciclo celular. La regulación en G_2 se produce de modo que la ciclina mitótica, que se genera y acumula gradualmente durante la fase G_2 , se asocia con la Cdk para formar el factor promotor de la fase M (FPM) que se activa posteriormente y desencadena una serie de procesos que llevan a la célula a entrar en mitosis. La degradación de la ciclina mitótica inactiva el FPM permitiendo a la célula salir de la mitosis. (Alberts y col., 2004). Los estudios realizados en animales (Santamaría y col., 2007), en plantas (Francis, 2007) y en levaduras (Forsburg y Nurse, 1991; Bloom y

Cross, 2007) indican que el mecanismo básico es universal; sin embargo, según se desprende de los diversos estudios realizados en algunos ciliados, como *Paramecium*, *Tetrahymena* y *Eufolliculina* (Adl y Berger, 1996; Markmann-Mulisch y col., 1999; Zhang y col., 1999; Berger, 2001; Zhang y col., 2002), las moléculas y los mecanismos envueltos en la regulación del ciclo celular de los ciliados parecen ser bastante diversos, y no está completamente entendido el mecanismo de control del ciclo celular.

Formación del patrón en los ciliados

Los ciliados presentan un complejo patrón de las subunidades corticales, con una disposición precisa de los orgánulos -aparato bucal, la(s) vacuola(s) contráctil(es) y el citopigio- y de las hileras de cilios (Shang y col., 2002; Kaczanowska y col., 2003). Cada célula tiene polaridad antero-posterior y asimetría entre los lados izquierdo y derecho, observándose ambas no sólo en la organización general de la célula sino también en la estructura de cada unidad cortical (cinétida) (Aufderheide y col., 1999; Iftode y Fleury-Aubusson, 2003; Kaczanowska y col., 2003). El desarrollo y la disposición de las cinétidas pueden visualizarse con microscopía óptica mediante impregnación con plata y técnicas de inmunofluorescencia, así como mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido (Iftode y Fleury-Aubusson, 2003; Kaczanowska y col., 2003).

Regeneración, reorganización y división

Los ciliados pueden normalmente reemplazar y reconstruir partes de su cuerpo que han sido eliminadas o dañadas (Zou y Ng, 1991; Lanners, 2003).

Gracias a los múltiples trabajos realizados acerca de la morfogénesis de los ciliados, se puede observar un gran número de fenómenos morfogenéticos que pueden estar asociados con la división celular: los procesos de degradación (por ejemplo del aparato bucal), así como el ensamblaje y el posicionamiento de los

nuevos orgánulos; las estructuras parentales nuevas y viejas (por ejemplo el aparato bucal) pueden experimentar cambios morfogenéticos; y las cinétidas somáticas deben ser duplicadas y el citoesqueleto reorganizado (Mulisch y Hausmann, 1985; Hu y col., 2000; Iftode y Fleury-Aubusson, 2003; Shao y col., 2006; Da Silva Paiva y Da Silva-Neto, 2007; Shao y col., 2007).

La regeneración, la reorganización y la división celular comparten algunos caracteres de la morfogénesis, y los límites entre estos procesos están mal definidos. En la mayoría de los procesos morfogenéticos de los ciliados, la proliferación de los cuerpos basales está acompañada por cambios nucleares (mitosis del micronúcleo, condensación y descondensación de las cadenas de los núcleos), lo que sugiere que señales comunes podrían actuar sobre la regeneración, la reorganización y la división celular. Uno de los mecanismos actualmente en discusión es que la activación de una proteína cinasa dependiente de ciclinas desencadena los cambios citoesqueléticos y nucleares durante la morfogénesis de los ciliados (Zhang y col., 2002).

Estomatogénesis

Las estructuras orales pueden degradarse, y posteriormente ser reorganizadas o reemplazadas mediante la estomatogénesis o formación del aparato bucal. En los ciliados con una ciliatura oral compleja no se repara el aparato bucal existente, sino que la división celular y el daño a las estructuras orales llevan generalmente al desarrollo de un nuevo aparato bucal. El primer paso visible en la estomatogénesis es la producción de nuevos cinetosomas en una región específica de la corteza. Éstos se agrupan para formar el primordio oral, y todos los componentes orales se completan y ensamblan posteriormente siguiendo el patrón específico de cada ciliado. Los ciliados presentan diferencias en el origen de los cinetosomas, así como en el desarrollo de la estomatogénesis (Díaz y col., 2003; Hu y col., 2004b; Agatha y Riedel-Lorjé, 2006; Ma y col., 2006).

Los ciliados con una ciliatura oral semejante a la ciliatura somática se consideran los más primitivos. En éstos, la formación de la nueva infraciliatura oral se produce por la participación directa de alguno de los cinetosomas en las extremidades anteriores de todas o algunas de las cinetias somáticas circundantes, o de los cinetosomas que comprenden los cinetofragmentos cortos disponibles en las proximidades del área citostómica u oral (Corliss, 1979; Foissner, 1996). Este patrón denominado **telocinetal** lo presentan, por ejemplo, *Hyalophysa chattoni* (Bradbury y col., 1997), *Colpoda minima* (Díaz y col., 2003), *Chlamydon mnemosyne* (Bardele y Kurth, 2001) y *Cyrtolophosis elongata* (Díaz y col., 2000).

En otros ciliados, por ejemplo, los escuticociliados (Dragesco y col., 1995; Ma y Song, 2003; Ma y col., 2003b; Song y col., 2005; Ma y col., 2006), el género *Paramecium* (Shi y col., 1997) y la especie *Loxodes striatus* (Bardele y Klindworth, 1996), los cinetosomas parentales orales están directamente envueltos en la generación de la ciliatura oral completa, denominándose este proceso **bucocinetal** (Corliss, 1964; Foissner, 1996).

Otro patrón de formación del primordio oral se denomina **paracinetal**. El primordio oral deriva directamente de (o aparece junto a) una o más de las cinetias somáticas parentales postorales en un nivel destinado a ser levemente posterior al eventual surco de fisión; el área primordial del aparato bucal aparece así subecuatorialmente en la superficie ventral en una localización (lejana) de las partes bucales parentales (Corliss, 1964; Foissner, 1996). Este patrón se observa, por ejemplo, en heterotricos (Aescht y Foissner, 1998), en hipotricos (Hu y col., 2004b), en el género *Tetrahymena* (Bakowska y col., 1982) y en la especie *Sultanophrys arabica* (Foissner y Al-Rasheid, 1999).

En la mayoría de los casos, como sucede en los patrones estomatogénicos anteriores, los cinetosomas nuevos se forman en base a unos ya preexistentes. Sin embargo, en algunos ciliados, los cinetosomas orales surgen sin una visible asociación con la ciliatura somática u oral, o el aparato bucal parental; se denomina

a este proceso de formación del primordio oral **apocinetal** (Corliss, 1964; Foissner, 1996) y está presente, por ejemplo, en *Strombidinopsis minima* (Agatha, 2003), en hipotricos (Hu y col., 2004a), en *Tintinnopsis cylindrica* (Agatha y Riedel-Lorjé, 2006) y en *Apokeronopsis crassa* (Shao y col., 2007).

También está presente en los ciliados un patrón estomatogénico en el que las cinetias somáticas y el aparato bucal parental actúan simultáneamente en la formación de la infraciliatura oral, como se ha encontrado en los nasúlidos, los microtorácidos, *Protocruzia* y posiblemente en apostomados. Recibe el nombre de **mixocinetal** (Foissner, 1996).

En todos los patrones estomatogénicos citados previamente, el citostoma, donde se forman las vacuolas fagocíticas, se desarrolla al concluir la estomatogénesis cuando el aparato bucal ha alcanzado su posición final en el ciliado.

Taxonomía y sistemática de los ciliados

En base a los resultados de la investigación ultraestructural y de los estudios moleculares, Adl y col. (2005) han realizado una clasificación donde la posición taxonómica de los ciliados (Ciliophora) en la actualidad es la expuesta a continuación, siendo un clado de segundo nivel subdividido a su vez en clados de nivel inferior (estos autores, como puede observarse, han adoptado un sistema jerárquico sin designaciones formales de nivel, tales como "clase", "subclase", "superorden" u "orden" por razones de utilidad, evitando así el problema de que un solo cambio cause una cascada de variaciones en el sistema):

Biota**Eukaryota** Chatton, 1925**Chromalveolata** Adl y col., 2005**Alveolata** Cavalier-Smith, 1991**Ciliophora** Doflein, 1901**Postciliodesmatophora** Gerassimova y Seravin, 1976**Karyorelictea** Corliss, 1974**Heterotrichea** Stein, 1859**Intramacronucleata** Lynn, 1996**Spirotrichea** Bütschli, 1889**Armophorea** Jankowski, 1964**Litostomatea** Small y Lynn, 1981**Phyllopharyngea** de Puytorac y col., 1974**Nassophorea** Small y Lynn, 1981**Colpodea** Small y Lynn, 1981**Prostomatea** Schewiakoff, 1986**Plagiopylea** Small y Lynn, 1985**Oligohymenophorea** de Puytorac y col., 1974**Peniculia** Fauré-Fremiet en Corliss, 1956**Scuticociliatia** Small, 1967**Hymenostomatia** Delage y Hérouard, 1896**Apostomatia** Chatton y Lwoff, 1928**Peritrichia** Stein, 1859**Astomatia** Schewiakoff, 1896

Debido a que las investigaciones en la ultraestructura y la genética molecular avanzan constantemente, debemos esperar nuevos cambios en el sistema de clasificación.

Escuticociliados

Como podemos observar en la clasificación previa, dentro de Oligohymenophorea se encuentra Scuticociliatia (Small, 1967). En un principio, los escuticociliados fueron un grupo bastante pequeño; sin embargo, pronto se volvió más grande y actualmente está en crecimiento debido a que diferentes estudios han demostrado que muchos géneros que fueron originalmente clasificados en otros grupos pertenecen a los escuticociliados.

Epidemiología

Los escuticociliados que infectan organismos marinos son serios patógenos, tanto en la producción salvaje como en la acuicultura marina mundial, pudiendo causar mortalidades importantes de modo que se producen pérdidas económicas.

Tabla 1. Organismos causantes de la escuticociliatosis en peces, los hospedadores y la localización de estos brotes.

Hospedador	Localización	Escuticociliado
Lenguado japonés (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Corea	<i>Philasterides dicentrarchi</i> <i>Miamiensis avidus</i> <i>Pseudocohnilembus persalinus</i> <i>Uronema marinum</i>
Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	Francia, España, Portugal Noruega	<i>Philasterides o Miamiensis</i> <i>Uronema marinum</i>
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Francia	<i>Philasterides dicentrarchi</i>
Atún de aleta azul del sur (<i>Thunnus maccoyii</i>)	Australia	<i>Uronema nigricans</i>
Palometa plateada (<i>Pampus argenteus</i>)	Kuwait	<i>Uronema</i> sp.

Estos ciliados histiófagos causan escuticociliatosis en peces (Dyková y Figueras, 1994; Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Sterud y col., 2000; Jee y col., 2001; Álvarez-Pellitero y col., 2004a; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2005; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007) (Tabla 1) y en crustáceos (Morado y Small, 1994; Cawthorn y col., 1996; Messick y Small, 1996; Small y col., 2005) de importancia comercial.

Morfología

Los miembros de este taxón presentan unas características generales: son alargados en mayor o menor grado; presentan un macronúcleo y un micronúcleo; la ciliatura somática está constituida por cinetias polares formadas por cinétidas; tienen un escútica; el aparato bucal está constituido por 3 membranelas (policinétidas orales) y una membrana paraoral; poseen un citopigio, una vacuola contráctil con su poro y un cilio caudal; también es común la presencia de un meridiano-director no ciliado. Estas características sufren variaciones entre los diferentes géneros y especies de este taxón, las cuales no son lo suficientemente significativas como para hacer que los organismos dejen de pertenecer a los escuticociliados.

Forma corporal

Los escuticociliados son alargados y presentan diversas formas (ovoides, fusiformes, etc.). Tienen un extremo posterior redondeado (Cheung y col., 1980; Dragesco y col., 1995; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2005; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007), y un extremo anterior puntiagudo (Dragesco y col., 1995; Kim y col., 2004a; Jung y col., 2005, 2007; Ramos y col., 2007) o más redondeado (Cheung y col., 1980; Kim y col., 2004b; Azad y col., 2007) (Figura 7).

Aparato nuclear

Presentan un macronúcleo esférico (Dragesco y col., 1995; Jung y col., 2007), oval (Cheung y col., 1980; Munday y col., 1997) o globular (Kim y col., 2004b) y un micronúcleo adyacente. Ambos se encuentran situados en torno al centro del ciliado (Figura 7A).

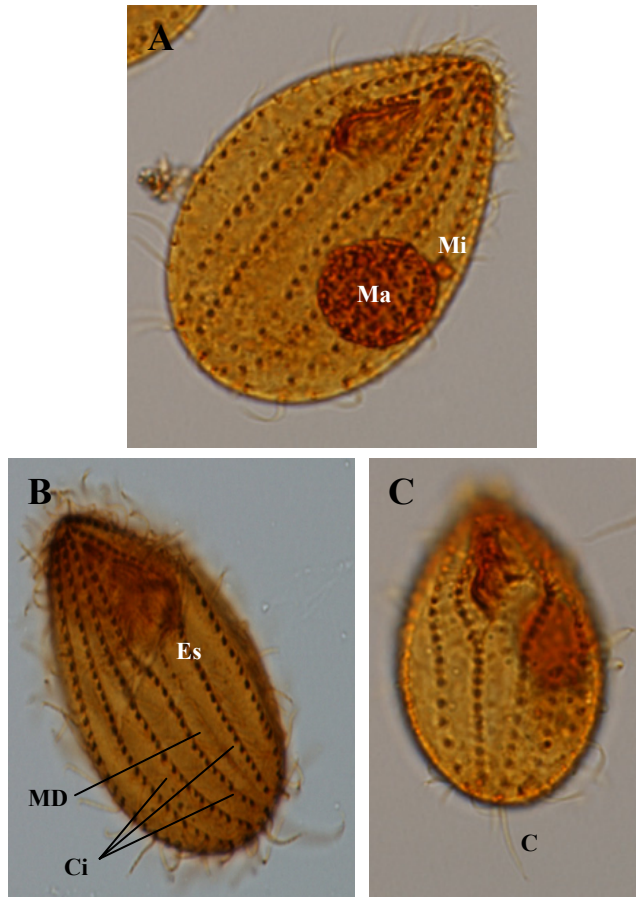


Figura 7. Diversas imágenes de escuticociliados impregnados con carbonato de plata amoniaco en las que podemos observar el macronúcleo (Ma) y el micronúcleo (Mi) (A), las cinetias (Ci), el meridiano-director (MD) y el escutela (Es) (B), y el cilio caudal (c) (C). Fuente: Belén Budiño.

Ciliatura somática

Está constituida de cinetias polares formadas por cinétidas (Figura 7B), variando entre los diferentes géneros y especies. El número de cinetias constituyentes de la ciliatura somática puede variar, por ejemplo, desde las 8 observadas por Kim y col. (2004b) hasta las 15 observadas por Dragesco y col. (1995) y Kim y col. (2004a). En general, la mayoría de las especies estudiadas presentan 13-14 cinetias (Dragesco y col., 1995; Jee y col., 2001; Kim y col., 2004a; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007). Los escuticociliados presentan cinetias con dicinétidas en las dos terceras partes anteriores del ciliado (Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Ramos y col., 2007) o en el tercio anterior (Dyková y Figueras, 1994).

Escútica

Es una estructura cinetosomal transitoria identificable por su forma, localización y presencia durante el desarrollo de la estomatogénesis, que aparece en una fase ontogénica tardía de la fisión binaria. Bastante notorio y en general no ciliado durante su (efímera) existencia, el escútica representa el resto de un a menudo mucho mayor área estomatogénica de cuerpos basales localizado cerca de la terminación posterior de la presunta base infraciliar de la membrana paraoral en el *proter* y en el *opiste*. Manifiesta normalmente una configuración de gancho o látigo. Sus cuerpos basales surgen de partes de la infraciliatura oral de los organismos parentales (Foissner, 1996). Si no desaparece en conjunto o se incorpora completamente en la base haplocinetal de la membrana paraoral, persiste como un vestigio cilífero o no cilífero próximo a la base de la membrana paraoral de los trofontes y/o en el extremo anterior del meridiano-director (Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Kim y col., 2004b) (Figuras 7B y 8), presentando diversas formas y tamaños como por ejemplo forma de Y (Dragesco y col., 1995) o de V (Jee y col., 2001). El escútica se piensa que está limitado a miembros de la

subclase a la que da nombre, Scuticociliatia, pero una estructura homóloga puede estar presente en especies de otros órdenes (Foissner, 1996).

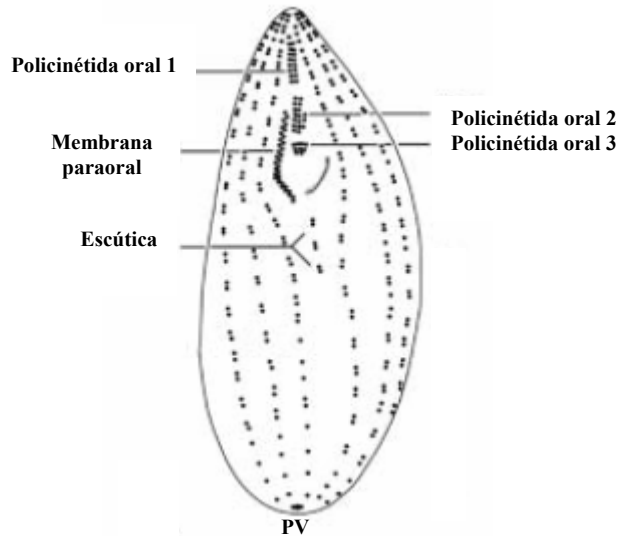


Figura 8. Dibujo de un escuticociliado en el que podemos observar los componentes del aparato bucal, el escútica y el poro de la vacuola contráctil (PV) (Ma y Song, 2003).

Aparato bucal

Ocupa generalmente entre la mitad y el tercio anterior del cuerpo (Jee y col., 2001; Kim y col., 2004a; Ramos y col., 2007). Está compuesto por una membrana paraoral y tres membranelas (policinétidas orales) (Figura 8) localizadas típicamente en una estrecha cavidad bucal. En el caso de la membrana paraoral, ésta puede ser una estructura única continua (Cheung y col., 1980; Munday y col., 1997; Kim y col., 2004b) o una estructura compuesta de dos partes separadas por un estrecho espacio (Dragesco y col., 1995; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007). Las policinétidas orales y la membrana paraoral arremolinan el medio circundante, moviendo las partículas de alimento a la región citostómica.

La transformación microstoma-macrostoma se produce en algunas especies en determinadas condiciones, reorganizándose las estructuras orales parentales parcial o totalmente (Gómez-Saladín y Small, 1993).

El principal carácter que unifica a los escuticociliados es la estomatogénesis, que es bucocinetal del subtipo escuticobucocinetal en todos ellos: la infraciliatura oral deriva o de la membrana paraoral y del escutica localizado posterior o paralelamente a la membrana paraoral, o sólo de la membrana paraoral (Foissner, 1996).

Citopigio

También llamado citoprocto o ano celular, por donde se produce la expulsión de las sustancias de desecho. Se encuentra localizado en la mitad posterior de la célula entre la primera y la última cinetia (Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Jee y col., 2001; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007).

Vacuola contráctil

Es un orgánulo envuelto en la regulación osmótica que sirve para prevenir una rotura de la célula debida al continuo flujo de agua hacia el interior de la célula que sucede, de acuerdo con el gradiente osmótico, entre el citoplasma y el medio circundante (Paulin, 1996). La vacuola presenta un poro (poro de la vacuola contráctil) por el que expele el agua al exterior (Figura 8). El poro de la vacuola contráctil presenta diferentes localizaciones según la especie, encontrándose situado en el extremo posterior de la segunda cinetia somática (Cheung y col., 1980; Jung y col., 2007), de la tercera cinetia somática (Kim y col., 2004b) o entre la primera y la segunda cinetia somática (Dragesco y col., 1995).

Cilio caudal

Esta estructura ha sido observada en todos los escuticociliados que producen escuticociliatosis en los peces en cultivo. Su longitud es mayor que la del resto de los cilios (Figura 7C), variando entre las diferentes especies (Dragesco y col., 1995; Jee y col., 2001; Kim y col., 2004b; Ramos y col., 2007).

Meridiano-director

Ha sido observado que esta estructura es un meridiano no ciliado que comienza justo posteriormente al citostoma y se une con la primera cinetia en el extremo posterior (Kim y col., 2004a, b) (Figura 7B).

Ciclo biológico

Como indicamos previamente en las características generales de los ciliados, los escuticociliados presentan reproducción asexual y sexual.

En lo referente a la reproducción **asexual**, los escuticociliados causantes de infección en los peces se dividen homotetogénicamente en condición activa, no habiéndose observado la formación de quistes (Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Jee y col., 2001; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2007). Sin embargo, sí que se han observado escuticociliados marinos no parásitos que presentan la capacidad de formar quistes, como por ejemplo, *Urocyclon cymruensis* (Pérez-Uz y Hope, 1997), *Pseudocohnilembus pusillus* (Olendzenski, 1999) o *Glaucanema tortum* y *Glaucanema trihymene* (Pérez-Uz y Guinea, 2001; Ma y col., 2006). En esta reproducción, los organismos pasan por diferentes estadios: un estadio de crecimiento exponencial, un estadio estacionario y un estadio de resistencia.

Pero la generalidad de los escuticociliados, incluyendo los causantes de la escuticociliatosis en peces (Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Jee y col., 2001; Álvarez-Pellitero y col., 2004a), presenta una división binaria homotetogénica o transversal que se produce en un plano perpendicular al eje

longitudinal de la célula (Figura 9A), dando lugar a la célula hija que se origina desde la parte anterior de la célula parental (*proter*) y a la célula hija originada desde la parte posterior de la célula parental (*opiste*).

La reproducción **sexual** dentro de los escuticociliados viene definida por el fenómeno de la conjugación (Figura 9B), como se ha observado, por ejemplo, en *Uronema marinum* (Coppellotti, 1990), *Miamiensis* o *Philasterides* (Álvarez-Pellitero y col., 2004a) y *Anophryoides haemophila* (Cawthorn, 1997), que siguen un patrón similar al general de los ciliados explicado con anterioridad. Este proceso de conjugación es, aparentemente, común entre los escuticociliados (Morado y Small, 1995; Cawthorn, 1997).

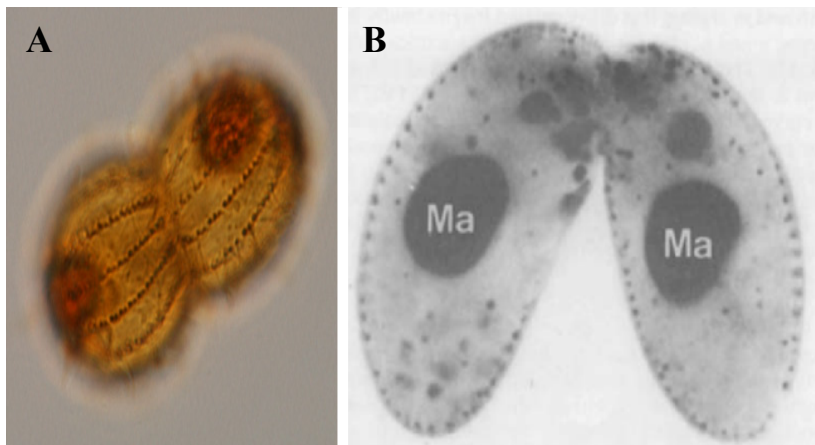


Figura 9. Escuticociliados en división binaria (A) (Fuente: Belén Budiño) y en conjugación (B) (Pérez-Uz y Guinea, 2001). Ma: macronúcleo.

Patología

En general, una especie parásita dañina puede provocar la muerte de un único individuo o de muchos ejemplares que forman una población. Simultáneamente, la muerte del hospedador no beneficia la supervivencia del parásito, por lo que éste se propaga a otros hospedadores. Los cambios que

produzcan los parásitos dentro del hospedador no dependen sólo del tipo de parásito y de su afinidad por un órgano o tejido determinado, sino que dependen también de las etapas del ciclo de desarrollo. Estos cambios en los tejidos y en los órganos de peces, juzgando su severidad, pueden ir desde cambios mínimos hasta alteraciones severas de la estructura de algunos órganos y tejidos, llegando a ser letales.

En el caso de los escuticociliados que infectan peces, los cambios son siempre perjudiciales, pudiendo provocar lesiones serias y llegando a poner en peligro la vida del propio hospedador.

Los parásitos causantes de la enfermedad pueden observarse a nivel de los órganos y los tejidos como se detalla a continuación.

Piel

Los ciliados se han descrito tanto en la epidermis como en la dermis de los individuos infectados, produciendo una destrucción severa de ambas capas.

La epidermis puede sufrir alteración y necrosis, observándose células epidérmicas necróticas y la posterior descamación (Jee y col., 2001; Umehara y col., 2003; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007). Ha sido observado constantemente en los casos de lesiones de la piel causadas por escuticociliados una degeneración necrótica licuante de la musculatura subyacente (Azad y col., 2007). También se han encontrado en la piel ciliados con eritrocitos fagocitados (Jee y col., 2001).

La dermis puede presentar lesiones hemorrágicas (Jung y col., 2007), y la acumulación de ciliados en esta capa produce un desprendimiento de la epidermis (Jee y col., 2001; Umehara, y col., 2003). También se encontraron varios ciliados y, en algunos casos, congestión de los vasos sanguíneos en el tejido conectivo necrótico de la dermis (Ramos y col., 2007).

Branquias

Los ciliados pueden estar presentes tanto libres en el exterior como en el interior de las estructuras branquiales (Padrós y col., 2001). En determinados casos pueden disponerse sobre células epiteliales sin causarles aparentemente ningún daño (Padrós y col., 2001). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los parásitos penetran hacia el interior de las laminillas (Dyková y Figueras, 1994; Ramos y col., 2007) y posteriormente hacia el interior del filamento (Cheung y col., 1980; Jung y col., 2007). En las laminillas se observa la presencia de los parásitos en sus capilares y arteriolas, pudiendo producir un bloqueo del aporte sanguíneo al extremo de las laminillas (Cheung y col., 1980; Jung y col., 2007). También producen la formación de aneurismas en las laminillas (Cheung y col., 1980) y la degradación del epitelio respiratorio (Dyková y Figueras, 1994; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007). En los filamentos también se observa la presencia de ciliados conteniendo eritrocitos ingeridos en su citoplasma (Jung y col., 2007). En general, la infección de las branquias lleva a la necrosis de las mismas (Jee y col., 2001; Azad y col., 2007; Ramos y col., 2007).

Músculo

Provocan miositis degenerativa (Padrós y col., 2001; Azad y col., 2007) y necrosis de las fibras musculares (Cheung y col., 1980; Dyková y Figueras, 1994; Jee y col., 2001; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007), observándose también hemorragias severas en estas fibras (Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007). Producen una invasión tanto de la musculatura roja como de la blanca (Cheung y col., 1980; Padrós y col., 2001). En algunos casos puede encontrarse una moderada respuesta inflamatoria alrededor de los escuticociliados (Padrós y col., 2001; Azad y col., 2007) formada por linfocitos y células granulocíticas (Padrós y col., 2001). También se han observado en la musculatura escuticociliados conteniendo eritrocitos en su interior (Azad y col., 2007).

Sistema digestivo

Han sido descritos ciliados en el tejido conectivo subepitelial del tracto digestivo; pequeños grupos de ciliados se localizaron en la submucosa gástrica, en las láminas musculares del intestino y en el tejido conectivo que rodea los vasos sanguíneos mesentéricos (Dyková y Figueras, 1994). También se han encontrado en la submucosa del intestino y en la serosa gástrica e intestinal, observándose sólo en los casos en que hay afectación por los parásitos de otros órganos abdominales o de la serosa abdominal, y siendo la respuesta inflamatoria muy escasa (Padrós y col., 2001). Jung y col. (2007) han observado las láminas propias del estómago y del intestino fuertemente infectadas. La degradación de la mucosa del epitelio intestinal con restos celulares en la luz intestinal, la degeneración necrótica del epitelio de las microvellosidades intestinales, la pérdida completa del epitelio mucoso del estómago y la degeneración miosítica de la musculatura gástrica han sido observadas (Azad y col., 2007).

Hígado

En este órgano se han hallado los escuticociliados en las estructuras ricas en tejido conectivo, como es la cápsula hepática y alrededor de las venas y los conductos biliares, en los que la densidad de parásitos, en determinados casos, suele ser muy elevada; más raramente se han observado entre los hepatocitos (Sterud y col., 2000; Padrós y col., 2001). La reacción inflamatoria está presente, pero es relativamente escasa y casi siempre asociada a zonas con tejido necrótico abundante (Padrós y col., 2001).

Bazo y riñón

Los escuticociliados se han observado parasitando principalmente la serosa, llegando en algunos casos a penetrar hacia el interior del parénquima esplénico y/o renal (Padrós y col., 2001). En el caso del riñón, los túbulos renales y

los tejidos hematopoyéticos se han encontrado también infectados (Cheung y col., 1980; Padrós y col., 2001; Azad y col., 2007), produciendo el bloqueo de la luz de los túbulos renales, y la necrosis severa del epitelio tubular y del epitelio de los conductos colectores (Azad y col., 2007). Hay un incremento en el riñón del número de células inflamatorias, y se han observado también en los túbulos renales pequeñas gotas hialinas (Jung y col., 2007).

Sistema nervioso central

Los ciliados han sido observados en las meninges, el telencéfalo, el mesencéfalo, el diencefalo, los lóbulos ópticos, el cerebelo, la médula oblongata, el nervio óptico y los lóbulos olfatorios (Munday y col., 1997; Padrós y col., 2001; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007). Los organismos infectados pueden presentar hemorragia, necrosis, y en algunas lesiones los ciliados aparecen con restos de células sanguíneas en su interior, eritrocitos en general, en las áreas de licuación/reblandecimiento (Munday y col., 1997; Jee y col., 2001; Padrós y col., 2001; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007). En los individuos infectados puede observarse respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central (Munday y col., 1997; Jung y col., 2007).

Corazón

Se observaron algunos casos de escuticociliados que afectan este órgano sólo en casos de infección avanzada y muy generalizada, siendo su localización en el epicardio, el endocardio y dentro del ventrículo (Sterud y col., 2000; Padrós y col., 2001). La reacción inflamatoria es muy escasa (Padrós y col., 2001).

Páncreas y gónadas

En algunos casos se han encontrado ciliados parasitando estos órganos, en los que los parásitos se localizaron principalmente en las zonas con mayor presencia de tejido conectivo (Dyková y Figueras, 1994; Padrós y col., 2001).

También se ha observado en el tejido adiposo la presencia de ciliados, y la formación pericondral de los huesos se ha visto alterada por la proliferación de los mismos (Dyková y Figueras, 1994).

Aparte de estas observaciones a nivel microscópico, la escuticociliatosis puede presentar diversas evidencias a nivel macroscópico: (1) hemorragias y úlceras en la piel y la musculatura subyacente (Figura 10A), las aletas, alrededor de la boca, el área dorsal y el tejido periorbital (Cheung y col., 1980; Sterud y col., 2000; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007), presentándose en algunos casos las úlceras rodeadas de un halo blanco (Ramos y col., 2007). Si la ulceración a nivel de las aletas llega a alcanzar el músculo, puede exponer los radios de las aletas (Ramos y col., 2007); (2) oscurecimiento de las rosetas olfatorias, la piel de la cara ventral y la cabeza (Munday y col., 1997; Sterud y col., 2000; Ramos y col., 2007); (3) palidez de las branquias anémicas (Sterud y col., 2000); (4) exoftalmia (Sterud y col., 2000) (Figura 10B); (5) enrojecimiento en la base de las aletas (Ramos y col., 2007); (6) licuación/reblandecimiento del cerebro (Munday y col., 1997; Sterud y col., 2000; Azad y col., 2007); y (7) distensión de la cavidad abdominal causada por la acumulación de fluido ascítico (Figura 10C), que bajo microscopía óptica muestra la presencia de ciliados (Azad y col., 2007; Ramos y col., 2007).

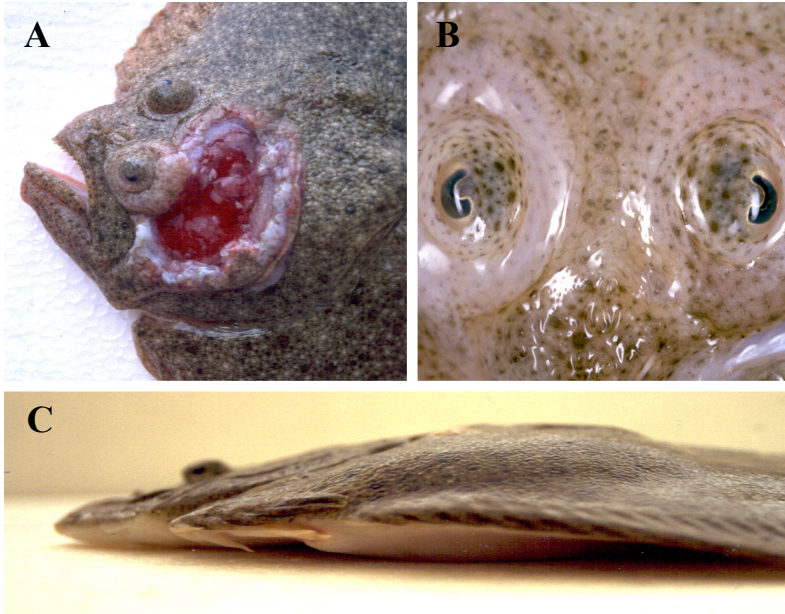


Figura 10. Signos clínicos de rodaballos con escuticociliatosis mostrando úlcera en el opérculo (A), exoftalmia bilateral (B) y distensión abdominal (C) (Fuente propia).

Técnicas de diagnóstico

Lo esencial del diagnóstico parasitológico radica en la observación morfológica y estructural del parásito presente en un determinado contexto clínico y de lesión.

Existen dos etapas claramente diferenciadas en el diagnóstico, donde una tiende hacia la orientación más o menos extendida dentro de la taxonomía del parásito y, en general, no conlleva mayores dificultades, y otra es la de su identificación específica.

Impregnaciones

Las impregnaciones con nitrato de plata -método de Chatton-Lwoff descrito por Foissner (1991)-, con carbonato de plata -método descrito por Ma y col. (2003a)- y con protargol o proteinato de plata -método de Borian modificado

por Wilbert (1975)- permiten observar las características morfométricas y las infraciliaturas somática y oral de los escuticociliados impregnados (Dragesco y col., 1995; Jee y col., 2001; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2007) (Figura 11A).

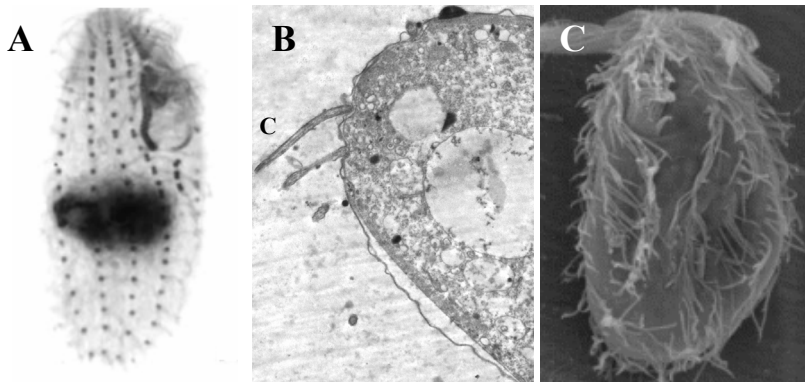


Figura 11. (A) Escuticociliado impregnado con protargol (Ma y col., 2003). (B) Microfotografía de un ciliado obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Observar el cilio caudal (c) (Fuente propia). (C) Microfotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (Umehara y col., 2003).

Por ello, pueden emplearse como método de diagnóstico a la hora de saber si la infección que sufre el organismo es por un escuticociliado o por otro tipo de ciliado, puesto que los escuticociliados tienen unas características específicas que los diferencian de otros ciliados como ha sido expuesto anteriormente. Además, nos permiten saber qué escuticociliado es el causante de la infección.

Histología

Esta técnica explora la estructura tisular de los diferentes órganos del individuo a nivel microscópico. Para ello, se sigue un procedimiento de fijación y tinción de los tejidos, y un posterior corte de los mismos empleando el microtomo. La presencia de los escuticociliados en los tejidos de los diversos hospedadores embebidos en parafina puede detectarse mediante la tinción con hematoxilina y

eosina. Este método histológico es un examen que puede emplearse para la detección de escuticociliados que infectan un organismo, observándose la presencia y la situación de éstos en los tejidos que invaden (Figura 12), así como el daño que pueden producir en dichos tejidos (Cheung y col., 1980; Jee y col., 2001; Umehara y col., 2003; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007).

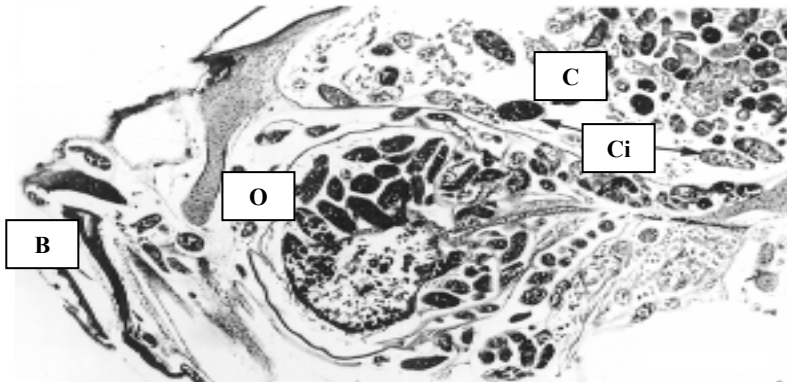


Figura 12. Sección longitudinal de la cabeza de un rodaballo mostrando numerosos ciliados en la boca y en la cavidad de las branquias. Abreviaturas: boca (B), ojo (O), cerebro (C) y ciliados (Ci) (Sterud y col., 2000).

Serología

Es el estudio de las propiedades, los componentes, y las alteraciones del suero en condiciones normales y patológicas.

Los procedimientos serológicos varían en especificidad y sensibilidad, lo que hace que a veces sean difíciles de interpretar, siendo el antígeno en muchas de las lesiones producidas por parásitos el componente con mayor influencia en la especificidad de un test.

Estas pruebas serológicas incluyen, por ejemplo, el ELISA. Esta técnica puede ser estandarizada y cuantificada espectrofotométricamente, eliminando la subjetividad del hospedador. Otra técnica serológica estandarizable es el *Western blot*, en la cual se separan las proteínas en un gel electroforético para el posterior

reconocimiento antigénico por parte de los sueros.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM)

Antes de la introducción de las microscopías electrónicas de transmisión y de barrido, las descripciones de los ciliados, incluidos los escuticociliados, estaban basadas en la microscopía óptica, lo que acarreó una serie de problemas debido a la limitación del método.

Para la observación de la mayoría de los escuticociliados en estado fresco o fijados y teñidos basta con la microscopía óptica, que es una técnica no invasiva y es práctica para realizar un diagnóstico rutinario (Jee y col., 2001; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2007). Sin embargo, un diagnóstico definitivo depende de un examen ultraestructural mediante el uso de la microscopía electrónica de transmisión (Dragesco y col., 1995) y de un examen de alta precisión de las ciliaturas somática y oral empleando la microscopía electrónica de barrido (Dragesco y col., 1995; Jee y col., 2001; Umehara y col., 2003; Ramos y col., 2007) (Figuras 11B y C). Sin embargo, estos tipos de microscopía electrónica (transmisión y barrido) muestran una serie de desventajas, ya que son métodos relativamente costosos y que consumen bastante tiempo, siendo inviables para su uso como técnicas rutinarias de diagnóstico.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Desde el descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick (1953), la manipulación de esta molécula, y más concretamente de secuencias de genes específicos, se ha visto impedida por la carencia de un método rápido y simple para aislar secuencias específicas de ADN.

Para realizar el estudio de la función y de la estructura genética se precisan cantidades suficientes de ADN. Hasta hace poco, esto se realizaba usando

microorganismos para generar múltiples copias de los genes, proceso que es largo y laborioso. Sin embargo, a mediados de los años 80 se describió una nueva técnica basada en un primer concepto propuesto hacía 15 años (Kleppe y col., 1971; Panet y Khorana, 1974) en la que no es preciso el uso de los microorganismos, y que se denominó reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ésta es la forma con la que se ha denominado a la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN mediante ciclos repetidos de síntesis dirigida por cebadores. El mecanismo es, básicamente, el usado por las células durante su replicación, puesto que cada vez que una célula se divide, ésta requiere duplicarse a sí misma, lo que incluye el contenido del ADN. Para realizar esta técnica son precisos: (1) dos cebadores oligonucleotídicos con un tamaño medio de 20 bases que serán complementarios a las regiones de las cadenas opuestas que flanquean la secuencia de ADN a amplificar, (2) una muestra de ADN que se usará como molde, (3) una ADN polimerasa termoestable (la Taq ADN polimerasa que puede soportar temperaturas de 95 °C o más elevadas), y (4) cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP).

La especificidad de la amplificación se basa en el uso de dos oligonucleótidos que flanquean el segmento a amplificar y que hibridan cada uno con una cadena del ADN. El proceso de la PCR implica una desnaturalización del ADN de doble cadena por calentamiento a elevada temperatura (94-95 °C), a continuación, la hibridación de los dos cebadores (cada uno complementario a los extremos 3' de la secuencia que se va a amplificar) mediante una adecuada disminución de la temperatura según cuales sean los cebadores, y finalmente, una elongación de éstos con la Taq ADN polimerasa a una temperatura intermedia (72 °C). Este conjunto de tres pasos consecutivos se denomina ciclo, y la amplificación está basada en la repetición de este ciclo dando lugar a una acumulación exponencial de la secuencia específica de aproximadamente 2^n , donde n es el número de ciclos.

Debido a la acumulación exponencial de las copias procedentes de una secuencia progenitora única, la amplificación basada en la Taq ADN polimerasa representa una forma de clonación *in vitro* que puede realizarse automáticamente en 2-3 horas, que de otra tardaría semanas de crecimiento biológico y de purificación bioquímica.

En base a esta amplificación del ADN, podemos realizar diferentes técnicas para la identificación/diagnóstico de los escuticociliados:

(1) **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA; ADN polimórfico amplificado al azar). Es una técnica que permite amplificar regiones anónimas del ADN mediante el empleo de cebadores arbitrarios, siendo de las más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990 (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). Se usa una colección de cebadores (8-12 nucleótidos) para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar en el genoma. Su pequeño tamaño y la baja temperatura de alineamiento aseguran que se unen a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos del ADN. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, y proporcionarán un patrón característico. Es muy cómoda, rápida, requiere poco ADN que además no necesita estar muy puro, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia, y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos.

Teniendo en cuenta que mediante este método se producen patrones individualizados de cada especie, podría emplearse como un buen sistema para un diagnóstico eficiente y rápido de los escuticociliados que infectan peces (y crustáceos). Shang y Song (2005) emplearon este método para obtener el patrón de varias especies de escuticociliados marinos, entre los que se encontraba *Uronema marinum*, causante de escuticociliatosis en peces (Cheung y col., 1980; Sterud y col., 2000 -mediante comunicación personal nos confirmaron que el causante de

este brote de escuticociliatosis en el rodaballo en cultivo descrito en Noruega era *Uronema marinum*-; Jee y col., 2001) y *Mesanothryx carcini*, causante de escuticociliatosis en crustáceos (Grolière y Leglise, 1977).

(2) PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism; Reacción en cadena de la polimerasa-Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción). Técnica que radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos amplicones (productos de amplificación de la PCR) presentan una variación de la secuencia nucleotídica en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos.

Hasta el momento no se ha empleado para el diagnóstico de la escuticociliatosis, pero sí en el caso de, por ejemplo, microsporidiosis marinas (Leiro y col., 2000b). En el caso de la infección por escuticociliados, podría realizarse la restricción de la secuencia del gen del ARNr de la subunidad pequeña (SSUrRNA) -empleada por múltiples autores para el análisis filogenético de diversas especies de escuticociliados, tanto las no parásitas como las causantes de escuticociliatosis en peces y crustáceos (Ragan y col., 1996; Jung y col., 2005; Shang y col., 2006)- con enzimas que produzcan la restricción sobre secuencias nucleotídicas cortas (4-6 pares de bases). De este modo, se producirían múltiples fragmentos que permitirían la observación de las pequeñas variaciones que habría entre las diferentes especies de escuticociliados, determinando así la especie que produce la infección.

(3) Detección mediante el uso de cebadores específicos. Empleando la secuencia del gen SSUrRNA, se construyen cebadores basados en las regiones variables que amplifican sólo la secuencia del escuticociliado específico al realizar la PCR. Esto se ha realizado para escuticociliados que infectan crustáceos (Ragan y col., 1996) y

peces (Kim y col., 2004a).

(4) **PCR-multiplex.** Kim y col. (2004b) basándose en la comparación de la secuencia del gen SSUrRNA de varios escuticociliados, seleccionaron 3 regiones hipervariables para la construcción de los cebadores de la PCR para la amplificación específica de segmentos del gen SSUrRNA de las especies examinadas. Los productos obtenidos de la amplificación del ADN de cada especie por este método son diferentes para cada una de ellas, lo que permite distinguirlas de una forma rápida y sencilla incluso en el caso de hospedadores infectados por esas especies simultáneamente. Así, este procedimiento haría posible evitar la incomodidad y el gran tiempo consumido en los procedimientos del análisis morfológico para la identificación definitiva de los ciliados.

(5) **PCR en tiempo real.** Ha sido desarrollado un ensayo de PCR en tiempo real usando la tinción fluorescente SYBR Green™ para una rápida detección y cuantificación de *Ichthyophthirius multifiliis* (Jousson y col., 2005). El análisis se realiza usando los ciliados presentes en el agua durante el proceso infeccioso, lo que permite preservar la integridad del hospedador, y además, permite la detección de bajas concentraciones del parásito en el agua. En base a estas características, podría emplearse también para el diagnóstico de la escuticociliatosis.

Rutas de entrada en el hospedador

El conocimiento de las rutas de entrada de los escuticociliados en los peces es escaso, habiéndose propuesto la ruta nasal (Munday y col., 1997), la ruta oral (Dyková y Figueras, 1994) y el epitelio branquial y dérmico (Sterud y col., 2000; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007). Asimismo, también son pocos los estudios experimentales encaminados a determinar estas rutas, que además en ocasiones son infructuosos (Dragesco y col., 1995). Por ejemplo, Álvarez-Pellitero y col. (2004a)

han logrado la infección experimental del rodaballo intraperitonealmente mientras que Jung y col. (2007) han conseguido infectar lenguados japoneses mediante inmersión.

Quimiotaxis y adaptación al parasitismo

La quimiotaxis es una clase de respuesta en la que la dirección de la locomoción de las células o los organismos está determinada por cambios en la concentración de sustancias en sus ambientes. Los ciliados exhiben respuestas quimiocinéticas conocidas a gradientes de varias sustancias químicas, y estas respuestas han sido ampliamente estudiadas recientemente (Leick y col., 1994; Fenchel y Blackburn, 1999). Diversos autores han desarrollado trabajos en los que se estudia la respuesta quimiotáctica de los ciliados frente a hormonas (la oxitocina, la insulina, la histamina, etc.) y citocinas (la IL-8, el RANTES y el TNF- α) (Köhidaï y Csaba, 1998; Csaba y col., 2000; Köhidaï y col., 2000) mediante ensayos que utilizan tubos capilares. Debido a la gran eficacia y precisión que han demostrado estos ensayos, consideramos que pueden ser también empleados para el estudio de la respuesta quimiotáctica de los escuticociliados.

También es conocido que diversos ciliados son capaces de transformar su aparato bucal en respuesta a estímulos químicos liberados por la presa (Grønlien y col., 2002) como expusimos con anterioridad, algo que también ha sido observado en los escuticociliados (Gómez-Saladín y Small, 1993), y que la motilidad quimiotáctica es esencial para la invasión y la virulencia en los peces (O'Tool y col., 1999). Hasta la fecha, los estímulos que inducen la conversión del predador de vida libre *P. dicentrarchi* en parásito de peces son desconocidos.

Profilaxis y control

Desde que la incidencia de la escuticociliatosis se está incrementando en los últimos años hasta el punto de convertirse en una de las principales infecciones parasitarias de ciertas especies en cultivo, la búsqueda de medidas de control efectivas es un objetivo prioritario para evitar las importantes pérdidas económicas que producen.

Una de estas medidas de control de la escuticociliatosis es el empleo de agentes terapéuticos, como la formalina, ensayada frente a *Anophryoides haemophila*, *Uronema nigricans* y *Philasterides dicentrarchi* (Novotny y col., 1996; Crosbie y Munday, 1999; Iglesias y col., 2002). En este último caso, su uso se determinó inapropiado como tratamiento porque puede acelerar la muerte del pez al disminuir la disponibilidad de oxígeno, pero puede emplearse como medida profiláctica (baños periódicos a bajas dosis) porque presenta efectividad para matar las formas libres del parásito y está aprobado para su uso en acuicultura (Iglesias y col., 2002). Otro agente quimioterapéutico estudiado frente a la infección por escuticociliados es la dihidrofolato reductasa (DHFR) que, combinada con la sulfaquinoxalina, provoca la lisis *in vitro* de *Anophryoides haemophila*, causante de la enfermedad *Bumper car* en la langosta (Novotny y col., 1996). En *Philasterides dicentrarchi* también ha sido ensayada la DHFR, siendo efectiva a altas dosis (100 ppm) (Iglesias y col., 2002).

En el caso de la escuticociliatosis producida por *Philasterides dicentrarchi*, se han probado otros agentes quimioterapéuticos, como el dimetridazol, con el que Dragesco y col. (1995) controlaron los brotes de esta enfermedad en la lubina, aunque no han proporcionado datos de los procedimientos empleados en el tratamiento; sin embargo, no mostró efecto frente a *Philasterides dicentrarchi* en el trabajo realizado por Iglesias y col. (2002). En el estudio realizado por estos autores, fueron ensayados *in vitro* 52 agentes quimioterapéuticos de los que, excepto los citados previamente, ninguno se había probado frente a los

escuticociliados. De ellos, sólo 13 mostraron efectividad *in vitro* frente al parásito que infecta al rodaballo.

Además de este trabajo, se han realizado otras investigaciones encaminadas a encontrar agentes quimioterapéuticos frente a *Philasterides dicentrarchi* (Quintela, y col., 2003; Paramá y col., 2004a). En ellas, se observó que todos los componentes que mostraban actividad *in vitro* frente a este escuticociliado contenían un anillo piperazina en su estructura química. A pesar del hecho de la falta de eficacia de las piperazinas simples, la presencia de este anillo en los compuestos parece incrementar su actividad antiprotozoaria frente a *Philasterides dicentrarchi*. Si esto se prueba cierto, un conocimiento de la relación entre la estructura y la actividad de estos compuestos facilitaría el desarrollo de fármacos efectivos para el control de estos protozoos patogénicos. Lo importante, sin embargo, es certificar si esta efectividad también se produce *in vivo*.

Recientemente, Paramá y col. (2007c) observaron que el empleo de concentraciones farmacológicas de la indometacina (un fármaco antiinflamatorio no esteroideo) inhibía el crecimiento de cultivos *in vitro* de *P. dicentrarchi* posiblemente mediante un mecanismo que involucra la producción de la apoptosis, indicando su uso potencial no sólo para mitigar los efectos patogénicos relacionados con el daño producido por la respuesta inflamatoria durante la escuticociliatosis, sino también como un potencial agente quimioterapéutico directo contra el ciliado.

No obstante, las medidas quimioterapéuticas para el control de la escuticociliatosis en peces, crustáceos y moluscos en cultivo presentan problemas, como que los escuticociliados histiófagos son especies altamente virulentas que se dividen rápidamente (por fisión binaria) e invaden varios órganos y tejidos, de modo que los fármacos frente a estos organismos deben ser capaces de eliminar completamente los escuticociliados, porque la supervivencia de tan sólo uno o dos por hospedador es suficiente para causar un segundo ataque de la infección

(Iglesias y col., 2002; Quintela y col., 2003; Paramá y col., 2004a), y que en la actualidad hay pocos agentes quimioterapéuticos aprobados para su uso en acuicultura en la legislación de varios países, lo que dificulta la opción del tratamiento de la escuticociliatosis (Iglesias y col., 2002).

Puesto que no se conoce aún un tratamiento quimioterapéutico contra la infección interna por escuticociliados, hay actualmente un creciente interés sobre el uso terapéutico de polifenoles vegetales para la prevención de los efectos patológicos presentados por la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) (Young y Woodside, 2001). Algunos polifenoles, como la manguiferina y la epigalocatequina-3-galato, poseen potentes efectos contra protozoos y helmintos parásitos que infectan a mamíferos (Das y col., 1989; Awe y col., 1998; Kolodziej y col., 2001; García y col., 2003). El resveratrol ha sido sugerido que puede ser empleado en el tratamiento de las infecciones producidas por *Encephalitozoon cuniculi* y *Leishmania major* (Leiro y col., 2004b; Kedzierski y col., 2007). En estudios *in vitro*, la manguiferina, la epigalocatequina-3-galato y el resveratrol se ha observado que presentan actividad antiprotozoaria frente al escuticociliado *Philasterides dicentrarchi* que infecta al rodaballo en cultivo, aumentando la posibilidad de un tratamiento *in vivo* de los peces, posiblemente mediante la inclusión del/los polifenol(es) en la comida. Por supuesto, habría que investigar si los efectos *in vitro* se mantienen *in vivo* tras la administración oral (Leiro y col., 2004a). Además, estos polifenoles presentan una baja toxicidad incluso a altas concentraciones (García y col., 2003), lo que permitiría una administración durante prolongados periodos de tiempo. Otra ventaja es que son agentes antioxidantes que protegen los tejidos del estrés oxidativo producido durante la respuesta inflamatoria, observándose una atenuación de esta respuesta por parte de estos compuestos (García y col., 2002; Leiro y col., 2002a, 2003), con la consiguiente reducción de los efectos inmunopatológicos asociados. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio

han demostrado que el resveratrol puede presentar un efecto antiparasitario frente a *P. dicentrarchi* debido a que la actividad pro-oxidativa en este tipo de células incrementa la cantidad de ROS intracelular y bloquea la protección frente a la explosión respiratoria por la desregulación de enzimas detoxificantes.

Considerando que, hasta el momento, el control de este parásito debe realizarse mientras se encuentra fuera del hospedador, se ha desarrollado un método basado en el uso de microesferas de quitosano estabilizadas con glutaraldehído y conteniendo ciclodextrina beta que, en ensayos *in vitro*, producían la muerte del 100% de los ciliados. Esta alta eficiencia, unida a la baja patogenicidad en los peces y a la rápida biodegradación de los componentes individuales, sugieren su posible uso como alternativa a los baños en formalina (Paramá y col., 2005).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, el desarrollo de una vacuna para la escuticociliatosis es una de las medidas de control más prometedoras y efectivas que pueden desarrollarse (Kim y col., 2006). Estudios con otro ciliado que infecta peces, como es el himenostomado *Ichthyophthirius multifiliis*, han demostrado que los peces que sobreviven a las infecciones naturales o que están sometidos a experimentos de infección subletal pueden desarrollar protección frente a una reinfección, y producen anticuerpos en el suero capaces de aglutinar, inmovilizar o incluso provocar la lisis de los parásitos *in vitro* (Clark y col., 1995; Dickerson y Clark, 1998). Wang y Dickerson (2002) han demostrado que los antígenos de superficie involucrados en esta respuesta, denominados comúnmente antígenos de inmovilización (antígenos-i), están envueltos directamente en la respuesta protectora observada, y que la inyección de preparaciones purificadas de este antígeno puede ser efectiva para la protección frente a la enfermedad del punto blanco producida por este parásito.

Kim y col. (2006) han realizado estudios inmunoproliféricos con la β -tubulina recombinante para el tratamiento de la escuticociliatosis causada por el

parásito *Pseudocohnilembus persalinus* en el lenguado japonés, proponiendo que puede ser empleada como antígeno diana para el desarrollo de una vacuna frente a la escuticociliatosis.

Recientemente, Sanmartín y col. (2008) han desarrollado una vacuna atenuada frente a *Philasterides dicentrarchi* con una protección relativa del 77% y del 66% tras 1 y 5 meses de la segunda vacunación, indicando que la emulsión de antígeno más adyuvante empleada induce una protección duradera frente a la infección producida por este parásito tras la administración de dos vacunaciones.

Cultivo

Para realizar los diferentes ensayos y experimentos es necesario tener grandes cantidades del parásito, por lo que es preciso un cultivo *in vitro*. Diversos escuticociliados parásitos (géneros *Anophryoides*, *Mesanoophrys*, *Uronema*, *Miamiensis* y *Philasterides*) han sido cultivados en medios conteniendo bacterias (Hamilton y Preslan, 1969; Parker, 1976; Nerad y Daggett, 1992; Bernard y Fenchel, 1996) y en medios conteniendo fragmentos u homogeneizados de tejidos animales, o células animales (Coats, 1992; Morado, 1993; Jee y col., 2001; Álvarez-Pellitero y col., 2004a; Jung y col., 2005; Castro y col., 2007). Sin embargo, mayoritariamente, estas técnicas de cultivo xénicas no son apropiadas cuando se quieren realizar estudios inmunológicos, puesto que es difícil obtener extractos de antígeno puro del organismo de interés.

Es por lo tanto necesario el uso de técnicas axénicas. Varios escuticociliados marinos han sido cultivados previamente bajo condiciones axénicas empleando medios químicamente definidos o indefinidos, cuya preparación es bastante compleja en la mayoría de los casos (Hanna y Lilly, 1971; Soldo y Merlín, 1972; Nerad y Daggett, 1992; Morado, 1993), o medios disponibles comercialmente (Messick y Small, 1996; Álvarez-Pellitero y col., 2004a; Kim y col., 2004a).

A la hora de preparar estos cultivos axénicos, hay que tener en consideración diferentes aspectos que pueden afectar al crecimiento del escuticociliado *in vitro*, tales como la temperatura, la salinidad, el pH, la dosis de cultivo y los componentes nutricionales (lípidos, factores de crecimiento, proteínas, vitaminas, aminoácidos, etc.) (Nerad y Daggett, 1992; Morado, 1993; Álvarez-Pellitero y col., 2004a; Kim y col., 2004a).

Taxonomía y filogenia

Durante los últimos 40 años han sido realizados numerosos estudios en la taxonomía, la morfología y el desarrollo celular de los escuticociliados (Small, 1967; Corliss, 1979; Lynn, 1979; Song, 2000; Song y Wilbert, 2000; Long y col., 2007), siendo considerados por la mayoría de los investigadores como un grupo monofilético dentro de los ciliados (Corliss, 1979; Lynn, 1979; de Puytorac y col., 1984; Lynn y Sogin, 1988; Lynn y Small, 1997, 2000; Strüder-Kypke y col., 2000). Gracias a estos estudios, este grupo de ciliados pequeños, morfológicamente similares y cosmopolitas presenta una riqueza mucho mayor que la que se consideraba previamente, lo que es especialmente cierto para los grupos que habitan los biotopos marinos, de los que muchos aún deben ser descritos (Song y col., 2003).

Basándose mayoritariamente en los datos morfológicos y morfogenéticos, Lynn y Small (1997) dividieron los escuticociliados en tres órdenes: Philasterida, Pleuronematida y Thigmotrichida. Comparativamente, se han realizado pocos estudios en la sistemática de este grupo (Lynn y Small, 1997, 2000) a pesar del hecho de que la morfología y la morfogénesis de muchas especies, especialmente del orden Philasterida, han sido investigadas detalladamente mediante el uso de métodos modernos (Grolière, 1980; Morado y Small, 1994; Song, 2000; Song y Wilbert, 2000; Small y col., 2005; Long y col., 2007).

Los métodos moleculares, y en particular la determinación de la secuencia del gen SSUrRNA, han sido empleados para evaluar las relaciones filogenéticas de muchos grupos de escuticociliados (Ragan y col., 1996; Shang y col., 2003; Song y col., 2005; Li y col., 2006; Shang y col., 2006). Ello se basa en que estos genes son razonablemente largos (1800 nucleótidos aproximadamente), altamente conservados y en que los datos disponibles se han incrementado rápidamente en los últimos años. La información de estas secuencias parciales y completas del gen SSUrRNA ha corroborado algunas relaciones taxonómicas basadas en los caracteres ultraestructurales y otras características morfológicas (Song y col., 2005; Li y col., 2006). Sin embargo, varios estudios realizados en base a técnicas moleculares proporcionan diferentes conclusiones de aquellos basados en los caracteres morfológicos y/u ontogénicos (Ragan y col., 1996; Strüder-Kypke y col., 2000; Small y col., 2005).

Los escuticociliados causantes de las infecciones en peces también han sido estudiados mediante el empleo de técnicas modernas para determinar su morfología y su morfogénesis (Cheung y col., 1980; Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Jee y col., 2001; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2007; Ramos y col., 2007), así como han sido a su vez empleadas técnicas moleculares basadas en la secuencia del gen SSUrRNA para determinar las relaciones filogenéticas dentro de este grupo (Jung y col., 2005).

Adl y col. (2005) propusieron una nueva clasificación taxonómica de los eucariotas con especial énfasis en los protistas incorporando los resultados de los estudios ultraestructurales -como ya hacía la anterior de Levine y col. (1980)- que se han obtenido desde 1980 y los de los estudios moleculares filogenéticos. Así, los escuticociliados quedan posicionados en los ciliados como detalla a continuación:

Ciliophora Doflein, 1901

Intramacronucleata Lynn, 1996

Oligohymenophorea de Puytorac y col., 1974

Scuticociliatia Small, 1967,

y como ya mencionamos con anterioridad, Scuticociliatia está subdividida según Lynn y Small (1997, 2000) de la siguiente manera:

- Subclase **Scuticociliatia** Small, 1967
 - Orden **Philasterida** Small, 1967
 - Orden **Pleuronematida** Fauré-Fremiet en Corliss, 1956
 - Orden **Thigmotrichida** Chatton y Lwoff, 1922.

Todos los ciliados causantes de escuticociliatosis pertenecen a Philasterida. Seguidamente, exponemos la clasificación de los escuticociliados causantes de estas infecciones en peces con importancia comercial:

- Subclase **Scuticociliatia** Small, 1967
 - Orden **Philasterida** Small, 1967
 - Familia **Uronematidae** Thompson, 1964
 - Género *Uronema* Dujardin, 1841
 - Uronema marinum* Dujardin, 1841
 - Uronema nigricans* Mueller, 1786
 - Familia **Pseudocohnilembidae** Evans y Thompson, 1964
 - Género *Pseudocohnilembus* Evans y Thompson, 1964
 - Pseudocohnilembus persalinus* Evans y Thompson, 1964
 - Familia **Philasteridae** Kahl, 1931
 - Género *Philasterides* Kahl, 1931
 - Philasterides dicentrarchi* Dragesco y col., 1995
 - Familia **Parauronematidae** Small y Lynn, 1985
 - Género *Miamiensis* Thompson y Moewus, 1964
 - Miamiensis avidus* Thompson y Moewus, 1964.

Estudios recientes, basados en los caracteres morfológicos y en la secuencia del gen SSUrRNA, han concluido que *Miamiensis avidus* y *Philasterides dicentrarchi* son especies sinónimas, proponiéndose *Miamiensis avidus* como el sinónimo senior de *Philasterides dicentrarchi* (Song y Wilbert, 2000; Jung y col., 2007). Además, Song y Wilbert (2000) incluyeron *Miamiensis* en Uronematidae, contradiciendo así a Lynn y Small (2000); sin embargo, en una clasificación de los ciliados realizada en 2002 y revisada por Lynn (no publicada), *Miamiensis avidus* permanecía en la familia Parauronematidae (The Ciliate Resource Archive, 2002).

El sistema inmunitario de los peces

La inmunidad en los peces tiene la capacidad de distinguir lo propio de lo extraño, aunque es menos compleja que la de los homeotermos (Ellis, 1982). Como el resto de los vertebrados, presenta una inmunidad innata o inespecífica y una inmunidad adquirida o específica, implicando en los dos casos una respuesta celular y una respuesta humoral.

La inmunidad innata presenta una primera línea de defensa formada por las escamas, la superficie mucosa de la piel y las branquias, y la epidermis, que impiden o dificultan la invasión por los microorganismos (Ellis, 2001a; Magnadóttir, 2006). La respuesta celular depende de diversas poblaciones de leucocitos, como los granulocitos, los monocitos/macrófagos y las células citotóxicas no específicas (NCC). Los parámetros humorales incluyen los inhibidores del crecimiento, varias enzimas líticas y componentes del sistema del complemento, las aglutininas y precipitinas (opsoninas, principalmente lectinas), los anticuerpos naturales, las citocinas y los péptidos antibacterianos (Magnadóttir, 2006).

La inmunidad adquirida incluye un componente celular compuesto por los linfocitos T y B, que en los peces representan la población mayoritaria dentro de los leucocitos, y un componente humoral constituido por las inmunoglobulinas o anticuerpos.

Órganos y tejidos linfohematopoyéticos

En los teleósteos, los principales órganos linfohematopoyéticos son el riñón, el timo y el bazo.

Riñón

Es el principal órgano hematopoyético de los peces óseos (Zapata, 1979; Roszell y Rice, 1998). Está dividido en dos segmentos de similar estructura,

denominados riñón anterior y riñón posterior o troncal. Aunque ambos poseen capacidad hematopoyética, es mayor en el riñón anterior debido a la pérdida de su función renal (Press y Evensen, 1999). En este órgano se lleva a cabo una importante función de limpieza de sustancias presentes en la sangre, que son endocitadas por las células endoteliales sinusoidales y los macrófagos, donde son degradadas (Christiansen y col., 1996). En el riñón se encuentran fagocitos, células plasmáticas, linfocitos B, etc. (Zapata y Cooper, 1990; Meseguer y col., 1991). Los antígenos son procesados y presentados a las células T, comenzando así la respuesta específica (Vallejo y col., 1992a, b; Stensvag y col., 1995). El riñón anterior parece ser el primer órgano productor de linfocitos B en los teleósteos (Zapata y col., 2006).

El riñón anterior del rodaballo contiene un porcentaje de leucocitos del 95.9% del total de poblaciones celulares (Quentel y Obach, 1992). Santarém (1996) obtuvo una proporción de macrófagos del $1 \pm 0.3\%$, de neutrófilos del $11.6 \pm 5.3\%$, de linfocitos del $82.7 \pm 11.4\%$ y de trombocitos del $4.1 \pm 2.1\%$ en la población de leucocitos maduros.

Timo

En los peces es un órgano bilateral y par que está situado detrás de las branquias y localizado inmediatamente por encima del epitelio branquial (Ellis, 1977). El parénquima está formado por una red de células epiteliales entre las que se distribuyen células libres, mayoritariamente linfocitos de diversos tamaños, pero también melanomacrófagos y otras células (Zapata y col., 1996). En los teleósteos, igual que en otros vertebrados, es un órgano linfohematopoyético primario (Sweet y col., 1998) donde se producen en primer lugar los linfocitos T (Zapata y col., 2006), y que no participa ni en el reconocimiento de antígenos, ni en la fagocitosis ni en la producción de anticuerpos (Ruben y col., 1977; Castillo y col., 1998).

Bazo

Está rodeado de una cápsula fibrosa de la que parten pequeñas trabéculas que se extienden entre el parénquima, el cual se divide en una pulpa roja y una pulpa blanca. La primera ocupa la mayor parte del órgano, y está constituida por un entramado de células reticulares entremezcladas con sinusoides y células hematopoyéticas, incluyendo macrófagos y linfocitos. La segunda en general está poco desarrollada, y contiene elipsoides y grupos de melanomacrófagos (Press y Evensen, 1999). Posee funciones hematopoyéticas, de limpieza de macromoléculas y células viejas circulantes, de degradación y procesamiento de antígenos, y de producción de anticuerpos (Dalmo y col., 1997).

Otros órganos, como el corazón y el hígado, participan en la eliminación de sustancias y partículas circulantes por la potente actividad endocítica de algunas de sus células. Además, los linfocitos, los macrófagos y los granulocitos de distintos tipos son especialmente abundantes en las láminas propia y submucosa del intestino, en el epitelio branquial y en la piel (McMillan y Secombes, 1997; Reite, 1997; Lin y col., 1998; Moore y col., 1998).

Sistema inmunitario innato

La respuesta inmunitaria de los peces depende en gran medida del sistema innato de defensa, puesto que su sistema adquirido no está tan desarrollado como en los mamíferos (Robertsen, 1999).

Respuesta inmunitaria celular innata

Las células fagocíticas -granulocitos (neutrófilos) y los monocitos/macrófagos- y las células citotóxicas no específicas (NCC) son las principales células del sistema de defensa innato de los peces (Magnadóttir, 2006).

Granulocitos

Los granulocitos son una población de células diversa estructural y funcionalmente. Están subdivididos, como en los mamíferos, en neutrófilos, eosinófilos y basófilos; sin embargo, esta clasificación no es unánime puesto que los criterios morfológicos empleados en los mamíferos no se pueden aplicar siempre para la identificación de los granulocitos de los peces. Esta identificación se basa en criterios como el tamaño y la forma celular, la forma del núcleo, las tinciones histoquímicas y la intensidad de la tinción, la composición química y la forma de los gránulos presentes en el citoplasma, y la ultraestructura (Ainsworth, 1992; Burrows y col., 2001). Los granulocitos se aíslan habitualmente de la sangre, los riñones, el bazo y la cavidad peritoneal. Hay especies que presentan los tres tipos de células mientras que hay otras que sólo presentan uno. Han sido descritos granulocitos diferentes de los eosinófilos que se han denominado células granulares eosinófilas y que, en algunas especies, se cree que son funcionalmente similares a los mastocitos de los mamíferos.

Neutrófilos. Son, tras los linfocitos, los leucocitos más abundantes en la sangre de los peces (Lewis, 1985; Lamas y col., 1994), considerándose neutrófilos las células granulares que presentan tinción neutra a los colorantes sanguíneos (Aisworth, 1992). Están presentes en la mayoría de las especies estudiadas y en algunas es el único tipo de granulocito que está presente, como sucede por ejemplo en la lamprea de río adulta (*Lamprea fluviatilis*) (Page y Rowley, 1983), en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Lamas y col., 1994) y en el rodaballo (*Psetta maxima*) (Burrows y Fletcher, 1987, Burrows y col., 2001). En ciertas especies, las propiedades de tinción de los gránulos varían y, en estos casos, las células que presentan similitud funcional con los neutrófilos han recibido el nombre de heterófilos o granulocitos acidófilos (Meseguer y col., 1993; Zapata y col., 1996; Rey Vázquez y Guerrero, 2007).

En los peces óseos, los neutrófilos presentan una forma redonda generalmente, con un núcleo excéntrico redondo, ovalado o bilobulado.

Los neutrófilos del rodaballo son células esféricas de aproximadamente 11 μm con un núcleo excéntrico normalmente redondeado, aunque puede ser oval en algunas ocasiones, que, en general, ocupa un tercio o un cuarto de la célula (Figura 13A). Este tipo de granulocito representa el 5.6% de los leucocitos de la sangre del rodaballo y exhibe propiedades morfológicas e histoquímicas propias de neutrófilos de mamíferos (Burrows y Fletcher, 1987; Burrows y col., 2001).

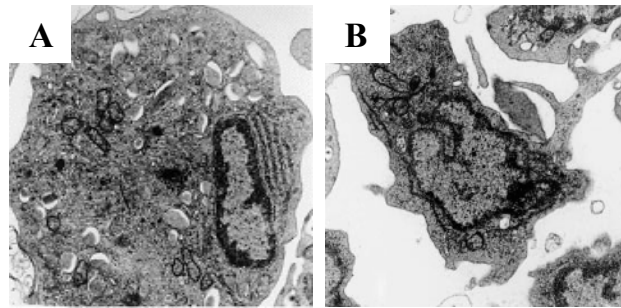


Figura 13. Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de un neutrófilo que muestra gránulos citoplasmáticos electrondensos (A) y de un monocito mostrando pseudópodos de extrusión (B) de rodaballo (Burrows y col., 2001).

Estos granulocitos pueden obtenerse a partir de la sangre, del riñón anterior y del líquido intraperitoneal tras la inyección con un agente inflamatorio (Lamas y Ellis, 1994a; Leiro y col., 2006) y ser aisladas mediante centrifugación en gradientes de densidad (Lamas y Ellis, 1994a).

En los peces, los neutrófilos están implicados en la respuesta inflamatoria, tienen una gran movilidad con capacidad de migración frente a sustancias quimiotácticas, y poseen capacidad fagocítica y microbicida mediante la liberación de enzimas y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) (Ainsworth y Dexiang, 1990; Lamas y Ellis, 1994a; Secombes,

1996; Leiro y col., 2000a, 2001, 2006; Bownik y Siwick, 2007; Nakayama y col., 2007).

Eosinófilos. En general, son poco abundantes en la sangre de los peces y se han descrito en algunos, incluidos los elasmobránquios (Hine y Wain, 1987; Pacheco y col., 2002) y los teleósteos (Hine y Wain, 1989; Shigdar y col., 2007). Sin embargo, en el atún de aleta azul del sur los eosinófilos representan el granulocito mayoritario (Rough y col., 2005).

En el rodaballo no se ha encontrado este tipo de célula (Burrows y Fletcher, 1987; Burrows y col., 2001).

Los eosinófilos se caracterizan por la presencia de gránulos citoplasmáticos eosinofílicos, que se tiñen de rojo brillante con la tinción de Romanowsky o con eosina, y por las estructuras cristaloides y centrales que presentan éstos (Ainsworth, 1992; Shigdar y col., 2007). Su función no ha sido demasiado estudiada en los peces, aunque se ha observado actividad fagocítica en los eosinófilos del exudado peritoneal de varias especies (Bodammer, 1986; Suzuki, 1986).

Basófilos. Estos granulocitos también se han encontrado en algunas especies (López Ruiz y col., 1992; Fijan, 2002; Tripathi y col., 2004; Shigdar y col., 2007; Tavares-Dias y De Moraes, 2007). Se caracterizan ultraestructuralmente por la posesión de unos gránulos de gran tamaño, con un contenido electrodensito homogéneo o con una matriz granular, que ocupan la mayor parte del citoplasma (Fijan, 2002; Tripathi y col., 2004; Shigdar y col., 2007). Su función en los peces es aún una incógnita y ha sido sugerida su implicación en procesos inflamatorios (Suzuki e Iida, 1992).

Mastocitos/células granulares eosinófilas (M/CGEs). Se han observado en el intestino, las branquias, la piel, las meninges, el hígado y alrededor de los vasos sanguíneos principales de los salmónidos (Lamas y col., 1991; Sveinbjörnsson y col., 1996; Jordanova y col., 2007), en el exudado peritoneal de la anguila (*Anguilla australis*) (Hine y Wain, 1989), en las branquias y el exudado peritoneal de la dorada (*Sparus aurata*) (Noya y Lamas, 1997), en las branquias de la platija de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*) (Murray y col., 2003) y en el intestino del gourami perlado (*Trichogaster leeri*) (Leknes, 2007), entre otros. Los gránulos de los M/CGEs muestran una notable diversidad en sus propiedades de tinción, con componentes basofílicos y acidofílicos en su interior (Reite y Evensen, 2006). Los M/CGEs de los teleósteos presentan capacidad migratoria a los lugares de inflamación persistente, están presentes en las reacciones de hipersensibilidad, responden a estímulos nocivos, presentan actividad fagocítica, y liberan o producen sustancias involucradas en la reacción inflamatoria y en la migración de los neutrófilos (Lamas y col., 1991; Reite, 1997; Reite y Evensen, 2006).

Monocitos/macrófagos

Monocitos. Son células circulantes que cuando se establecen en los tejidos se diferencian en macrófagos. En la sangre de los peces el porcentaje de monocitos es muy bajo en relación a los leucocitos totales, representando por ejemplo el 0.8% en la trucha (*Salmo gairdneri*) (Angelidis y col., 1987) o el 1.6% en el rodaballo (Burrows y Fletcher, 1987; Santarém, 1996). Se ha observado que presentan capacidad fagocítica.

En el rodaballo son células grandes (11.5 μm) y con forma variable que tienen un gran núcleo esférico o dentado (ocasionalmente presenta una forma bilobulada) que ocupa aproximadamente la mitad de la célula (Burrows y Fletcher, 1987; Burrows y col., 2001) (Figura 13B).

Macrófagos. Están ampliamente distribuidos en los peces, siendo especialmente abundantes en el bazo y en el riñón, aunque también están presentes en otros órganos y en la cavidad peritoneal, donde son abundantes tras una inyección intraperitoneal con un agente inflamatorio (Leiro y col., 2001, 2006). Se caracterizan por la presencia en su citoplasma de lisosomas y vacuolas de diferentes tamaños, de mitocondrias, de abundante retículo endoplasmático rugoso y de un aparato de Golgi bien desarrollado. Presentan una forma celular irregular con un núcleo ovalado, redondo o con forma de riñón (Secombes, 1996; Jensch y col., 2006).

Los macrófagos representan una parte fundamental de la defensa innata, puesto que son las principales células fagocíticas de los peces (Blazer, 1991), poseen receptores para las inmunoglobulinas y el complemento (Secombes y Fletcher, 1992) y realizan una función de limpieza del tejido necrótico. Tienen un amplio rango de funciones basadas en la producción y la secreción de moléculas reguladoras, incluyendo enzimas, péptidos antimicrobianos, metabolitos del ácido araquidónico, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, y citocinas (Aranishi y col., 1997; Shoemaker y col., 1997; Sørensen y col., 1997; Weyts y col., 1997; Ganassin y Bols, 1998; Buentello y Gatlin, 1999; Castro y col., 1999; Neumann y col., 2000; Hanington y Belosevic, 2007; Kales y col., 2007). Además, los macrófagos forman parte integral de la respuesta específica funcionando como células accesorias, puesto que reconocen y procesan antígenos, y desencadenan la activación de los linfocitos mediante la liberación de moléculas inmunomoduladoras (Secombes y Fletcher, 1992; Vallejo y col., 1992a; Ellsaesser y Clem, 1994). De modo similar a lo que ocurre en los mamíferos, los macrófagos de los teleósteos son capaces de presentar antígenos en su membrana mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (Hordvik y col., 1993; Klein y col., 1993; Glamann, 1995; Koppang y col., 2003). Los estudios de marcaje radiactivo realizados por Vallejo y col. (1992b) confirmaron que el

antígeno procesado es expresado en la superficie de las células presentadoras de antígeno.

Diversas sustancias exógenas como lipopolisacáridos bacterianos, peptidoglucano/muramildipéptido, diversos péptidos, citocinas de mamíferos, β -1-3-D-glucanos y compuestos químicos (por ejemplo el ionóforo del calcio A23187) pueden modular las funciones de los macrófagos de los peces (Kodama y col., 1993; Solem y col., 1995; Dalmo y col., 1996; Leiro y col., 2000a; Bonaldo y col., 2007; Doñate y col., 2007; Gjøen y col., 2007), pudiendo afectar a la producción de metabolitos tóxicos, a la fagocitosis, y a la producción y la secreción de enzimas lisosómicas.

Melanomacrófagos. Son macrófagos que contienen fragmentos derivados de las células fagocitadas, principalmente eritrocitos, y pigmentos como la melanina, la lipofucsina y la hemosiderina (Micale y Perdichizzi, 1990; Passantino y col., 2005; Bombonato y col., 2007). Los melanomacrófagos aparecen en todos los grupos de peces y a medida que se avanza en la escala evolutiva presentan una mayor organización, desde melanomacrófagos dispersos en agnatos y elasmobranquios hasta grupos organizados, denominados centros melanomacrofágicos, en los peces óseos. En éstos, el riñón y el bazo presentan gran cantidad de centros melanomacrofágicos que pueden estar encapsulados completa o parcialmente, asociados normalmente a los vasos sanguíneos (Meseguer y col., 1994; Zapata, 1996; Passantino y col., 2005).

Se les ha atribuido una función en el sistema de defensa como centros de limpieza de materiales endógenos y exógenos para su destrucción, detoxificación y reciclaje, y de destrucción de eritrocitos que han ingerido microorganismos (Vogelbein y col., 1987; Passantino, 2005). Participan en el catabolismo y el procesamiento de antígenos (Agius, 1985).

Células citotóxicas no específicas

Las células citotóxicas no específicas (NCC) forman parte de la respuesta inmunitaria innata de los peces (Graves y col., 1985a, b; Jaso-Friedmann y col., 1997, 2001), y han sido propuestas como el precursor evolutivo de las células NK de los mamíferos (Evans y col., 1984; Graves y col., 1985a; Evans y Jaso-Friedmann, 1992; Jaso-Friedmann y col., 2001; Cuesta y col., 2005). Estas NCC fueron descritas en primer lugar como linfocitos pequeños y agranulares en el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Evans y col., 1984), pero estudios posteriores en otras especies de peces han identificado estas células con varios tipos celulares (linfocitos, monocitos/macrófagos, y/o granulocitos) (McKinney y col., 1986; Cuesta y col., 1999; Sasaki y col., 2002; Cuesta y col., 2005). Es sabido que estas células citotóxicas matan variedad de células diana, incluyendo células tumorales, células transformadas por virus y protozoos parásitos (Evans y Jaso-Friedmann, 1992; Jaso-Friedmann y col., 2001; Shen y col., 2002). Para ello, es necesario un contacto con las células diana para que se produzca la lisis de éstas, bien mediante la inducción de necrosis o más característicamente induciendo apoptosis (Greenlee y col., 1991; Secombes, 1996; Jaso-Friedmann y col., 2000; Evans y col., 2001).

Aunque varias rutas bioquímicas pueden estar disponibles para el inicio del ciclo lítico en las NCC, el contacto inicial con las células tumorales, el protozoo parásito, etc. está facilitado mediante el reconocimiento del antígeno diana por una proteína de membrana de las NCC denominada receptor de las células citotóxicas no específicas (NCCRP-1) (Jaso-Friedmann y col., 1997). Este receptor ha sido clonado y analizado en diversas especies de peces, como por ejemplo el pez gato (Jaso-Friedmann y col., 1997), la dorada (Cuesta y col., 2005), la carpa común o europea (*Cyprinus carpio*) (Sakata y col., 2005) y el bacalao común o atlántico (*Gadus morhua*) (Seppola y col., 2007). También ha sido secuenciado este receptor en el axolote (*Ambystoma mexicanum*), lo que sugiere la existencia de las NCC también en los anfibios (Reimers y col., 2006).

Además, la actividad citotóxica natural de los leucocitos puede modificarse tras la inyección de determinadas sustancias que actúan como inmunoestimulantes (Cuesta y col., 2002, 2003).

Recientemente, Shen y col. (2004) han demostrado la existencia de células similares a las NK en los leucocitos de la sangre periférica del pez gato, evidenciando que la citotoxicidad mediada por células también está mediada por linfocitos granulares carentes de marcadores para las NCC.

Respuesta inmunitaria humoral innata

Dentro de los factores que actúan en esta respuesta destaca el **sistema del complemento**. En los mamíferos, el sistema del complemento constituye una de las primeras líneas de defensa frente a las infecciones microbianas. En los peces constituye seguramente el factor humoral más importante de la respuesta innata (Ellis, 2001b). Este sistema puede activarse por una o por la combinación de tres vías: por la vía clásica de activación del complemento (para la que son precisos anticuerpos específicos), por la vía alternativa de activación del complemento y por la vía de la lectina, tanto en los vertebrados superiores como en los peces óseos, aunque en estos últimos se conoce poco acerca de los mecanismos y las moléculas que están involucrados en la activación de la vía de la lectina (Boshra y col., 2006). La molécula clave en la activación de todas las rutas del sistema del complemento es el factor C3 (Lambris y col., 1993; Løvoll y col., 2007).

El sistema del complemento de los peces es más lábil al calor que el de los mamíferos (40-45 °C frente a 56 °C), tiene una temperatura óptima de reacción menor, posee un efecto antimicrobiano mayor y es más específico de especie (Sakai, 1992; Holland y Lambris, 2002). Presenta una actividad de la vía alternativa de activación varios órdenes de magnitud mayor que la obtenida en los mamíferos gracias al polimorfismo genético del factor C3 (Zarkadis y col., 2001; Nakao y col., 2003b). El complemento juega un papel clave en la respuesta innata

mediante la fagocitosis, la explosión respiratoria, la quimiotaxis, la lisis celular y la opsonización (Holland y Lambris, 2002; Boshra y col., 2006).

La combinación de la mayor actividad de la vía alternativa y de la activación de este sistema a un rango amplio de temperaturas, junto con la diversidad de algunos de sus componentes clave, hacen del complemento un sistema de defensa muy potente en los peces (Boshra y col., 2006).

En los mamíferos existen claras evidencias que implican al sistema del complemento como un modulador de la respuesta inmunitaria adaptativa, como son los receptores y los moduladores del complemento presentes en los linfocitos B y T. El complemento y sus receptores ilustran gráficamente la difuminación de las que fueron claras líneas de división entre las respuestas innata y adaptativa, y son un ejemplo de los múltiples puentes que unen inexorablemente estos dos brazos de la inmunidad (Morgan y col., 2005). Hasta el momento, el conocimiento en los peces de la existencia funcional y estructural de los receptores del complemento en los linfocitos es escaso; sin embargo, Nakao y col. (2004) han observado que las dos isoformas del C3d de la carpa son capaces de unirse a los linfocitos periféricos del pez. Por supuesto, deben hacerse más estudios para una mejor comprensión de la evolución y de la función de estos receptores en los procesos de las inmunidades innata y adaptativa en los teleósteos.

También forman parte de la respuesta inmunitaria innata las citocinas -la interleucina-1beta (IL-1 β), la IL-6, la IL-8, los interferones (INFs), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)-, la lisozima, la quitinasa, las catepsinas, los eicosanoides, la tripsina, la proteína C reactiva, componentes del complemento, las aglutininas, los inhibidores de proteasas, las proteínas de unión a metales, los anticuerpos naturales, etc. (Ellis, 1999; Watts y col., 2001; Holland y Lambris, 2002; Magnadóttir, 2006).

Fagocitosis

La fagocitosis representa el mecanismo de defensa más importante en todos los organismos metazoos. De hecho, ha sido sugerido que la fagocitosis representa un rudimentario sistema de defensa en los eucariotas más simples, los protozoos (Nickel y col., 1999). Las principales células fagocíticas en los peces son los monocitos/macrófagos y los neutrófilos. En los peces óseos, es en el riñón y en el bazo donde las células fagocíticas localizan mayoritariamente los antígenos. Durante la infección, las células fagocíticas actúan en fases: (1) reclutamiento de un número adecuado de leucocitos al lugar de la infección por mecanismos quimiotácticos, (2) unión de los patógenos a la membrana de las células fagocíticas, (3) ingestión de los patógenos, y (4) muerte y digestión de los patógenos por mecanismos microbicidas dependientes o independientes de oxígeno (Verhoef, 1991).

Una vez que se han reclutado los leucocitos en el lugar de la infección, se produce el reconocimiento y la unión de la partícula a la membrana de las células fagocíticas. Este reconocimiento puede ser inespecífico mediante uniones hidrofóbicas de la membrana celular con la partícula diana o específico mediante receptores. En los peces, se ha observado actividad opsonizante de los sueros de individuos normales e inmunizados (Leiro y col., 1996; Frøystad y col., 1998) y se ha encontrado un amplio número de receptores en la superficie de sus fagocitos, entre los que se encuentran los receptores para las inmunoglobulinas y el complemento (Secombes y Fletcher, 1992; Koumans-van Diepen y col., 1994; Nakao y col., 2003a). Los receptores están involucrados en un determinado número de funciones celulares, como la mencionada fagocitosis, pero también en la producción del anión superóxido, la liberación de diversas citocinas, etc. También ha sido demostrada en los macrófagos de los peces la fagocitosis inespecífica por medio de lectinas (Ottinger y col., 1999).

Tras las dos primeras fases del proceso fagocítico se produce la ingestión (Figura 14), equivalente a la que tiene lugar en los mamíferos (Kodama y col., 1994), y posteriormente se produce la muerte y la digestión de los patógenos. Mediante microscopía electrónica se ha observado que los gránulos citoplasmáticos (lisosomas) se fusionan con los fagosomas, descargando su contenido alrededor de la partícula (Lamas y Ellis, 1994b; Couso y col., 2001). Empieza así la destrucción en el interior del fagosoma por la liberación de diversas enzimas degradantes y la producción de metabolitos tóxicos (Dalmo y Seljelid, 1995; Neumann y col., 2001).

Puede ser que la fagocitosis no sea sólo una actividad de la respuesta inmunitaria innata, sino que puede ser un paso de la respuesta inmunitaria adquirida.

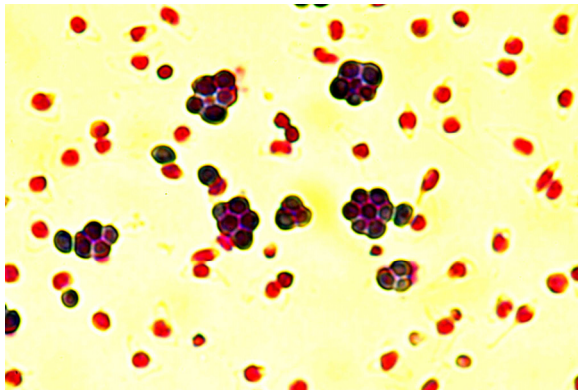


Figura 14. Macrófagos de rodaballo fagocitando levaduras. Observar la presencia de macrófagos con hasta siete levaduras ingeridas. Fuente: Belén Budiño.

Producción de metabolitos tóxicos

Ha sido demostrado que los fagocitos de los peces presentan una importante actividad bactericida y larvicida, poseyendo mecanismos de destrucción intra y extracelulares (Santarém y col., 1997). En los peces, igual que en los

mamíferos, la actividad microbicida de los fagocitos ha sido dividida de modo convencional en anaerobia y aerobia. No existe mucha información acerca de la actividad anaerobia, pero sí se conoce que implica la acción de una gran variedad de enzimas hidrolíticas almacenadas en el interior de los gránulos citoplasmáticos (lisosomas) que pueden tener actividad microbicida cuando éstos se fusionan con los fagosomas una vez que han internalizado las partículas extrañas (Rowley y col., 1988; Dalmo y Seljelid, 1995). Además, los fagocitos presentan enzimas con capacidad microbicida que son secretadas al exterior como defensa extracelular. En el caso del rodaballo, presentan la lisozima, y enzimas con actividad quitinolítica y proteolítica (Leiro y col., 1997). La actividad aerobia viene definida por la explosión respiratoria y la producción de óxido nítrico (Figura 15).

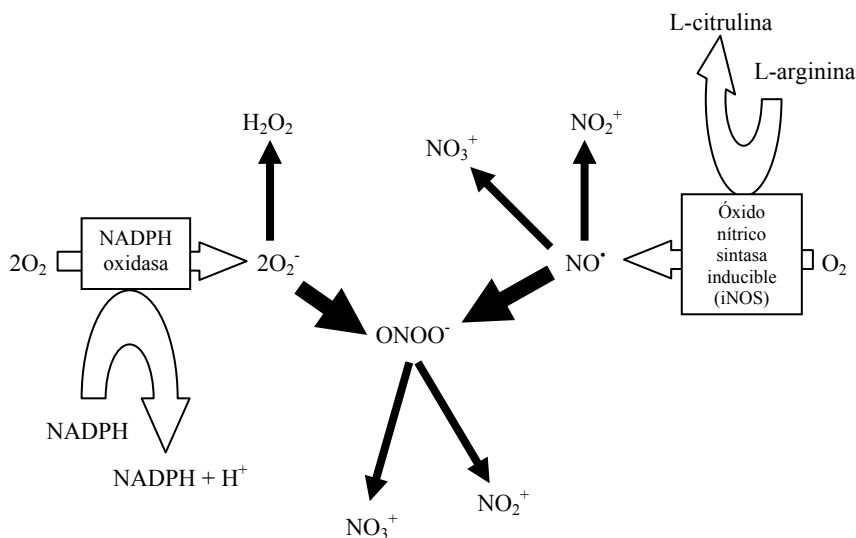
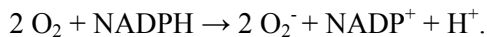


Figura 15. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante la explosión respiratoria y de especies reactivas del nitrógeno (RNS). Observar que cuando se producen el radical hidróxilo (O_2^-) y el óxido nítrico (NO^*) en el mismo ambiente, dan lugar al potente reactivo antimicrobicida peroxinitrito ($ONOO^-$).

La explosión respiratoria

Durante la fagocitosis, o cuando los fagocitos son estimulados, se produce un incremento en el consumo de oxígeno (Chanock y col., 1994). Este fenómeno se conoce como explosión respiratoria, durante el cual se producen especies reactivas del oxígeno (ROS) que presentan una gran actividad microbicida. Mediante estudios con inhibidores metabólicos se ha comprobado que este consumo de oxígeno es independiente de la respiración mitocondrial, no empleándose para la producción de energía (Cross, 1990).

La reacción primaria de la explosión respiratoria es la reducción parcial del oxígeno, originando un radical de anión superóxido (O_2^-) por la acción de la enzima NADPH oxidasa asociada a la membrana (Babior, 1978; Trush y col., 1978; Chanock y col., 1994; Cross y Segal, 2004; Quinn y Gauss, 2004). Esta enzima en los mamíferos es una molécula compleja formada por un citocromo b_{558} unido a la membrana, tres factores citosólicos y la GTPasa Rac2 (Geiszt, 2006). Durante la activación de la NADPH de las células fagocíticas, las proteínas citosólicas se traslocan a la membrana para constituir una unidad funcional (Geiszt, 2006) que cataliza la transferencia de un electrón del nucleótido NADPH al oxígeno mediante la siguiente reacción (Babior, 1999):



Un gran número de autores ha descrito la producción de especies reactivas del oxígeno durante la explosión respiratoria en los peces, tanto en los macrófagos (Dalmo y Seljelid, 1995; Castro y col., 1999; Leiro y col., 2000a, 2001, 2006; Ai y col., 2007) como en los neutrófilos (Castro y col., 1999; Couso y col., 2001; Leiro y col., 2000a, 2001; Shiibashi e Iida, 2001; Leiro y col., 2006; Nakayama y col., 2007), lo que sugiere que la NADPH oxidasa de estos fagocitos es muy similar funcionalmente a la de los mamíferos (Secombes y Fletcher, 1992; Itou y col.,

1998; Inoue y col., 2004). Ha sido también identificado un citocromo b de bajo potencial en diversas especies de peces (Secombes y col., 1992; Iida y Wakabayashi, 1995; Itou y col., 1998; Shiibashi y col., 1999).

Una vez producido el O_2^- , éste dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) bien de forma espontánea bien catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Secombes y col., 1992): $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

Aparte del O_2^- y del H_2O_2 se forman otras especies reactivas del oxígeno, como el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el ácido hipocloroso (OHCl), que también presentan una notable actividad microbicida.

Ha sido observado que una amplia cantidad de estímulos puede actuar sobre la explosión respiratoria. Por ejemplo, extractos de parásitos (Sharp y col., 1991; Leiro y col., 2000a, 2006; Sitjà-Bobadilla y col., 2006) pueden influir en ella. También opsoninas, péptidos y ADN genómicos bacterianos, y el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) pueden ser potentes activadores de la explosión (Chanock y col., 1994; Sitjà-Bobadilla y col., 2006; Sepulcre y col., 2007). La estimulación óptima de la explosión respiratoria requiere la opsonización de la partícula usada como estímulo con suero de peces no tratados (Nash y col., 1987; Leiro y col., 1997). En ciertas especies, el suero inmune actúa mejor como opsonina que el suero no inmune (Waterstrat y col., 1991), lo que sugiere que los anticuerpos, al igual que el complemento, pueden mejorar la actividad de la explosión respiratoria.

El óxido nítrico

Aparte de los ROS, las especies reactivas del nitrógeno (RNS) están también implicadas en el mecanismo empleado por los fagocitos para la destrucción de patógenos intracelulares (Liew, 1993; James, 1995; Nathan, 1995). Se ha observado que el NO^\cdot inhibe el crecimiento y la función de un amplio espectro de agentes infecciosos que incluye bacterias, hongos, y protozoos y

helmintos parásitos (Woods y col., 1994; Neumann y col., 2001; Hazlett y col., 2005; Authier y col., 2008). El NO[•] es un intermediario reactivo con una vida relativamente corta que se origina por la oxidación del nitrógeno guanidino terminal de la L-arginina (Moncada y col., 1991) mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Así, la L-arginina se convierte en L-citrulina y NO[•]. Se piensa que el NO[•] es la principal molécula citotóxica efectora, aunque otros subproductos como el nitrito (NO₂⁻), el nitrato (NO₃⁻) y las nitrosaminas pueden también ser tóxicas para los patógenos (Neumann y col., 2001). Cuando el NO[•] es producido concomitantemente con el O₂⁻ en el mismo ambiente celular, se produce una reacción extremadamente rápida para formar el anión peroxinitrito (ONOO⁻) (Verchier y col., 2007), un reactivo intermediario conocido por su potente actividad microbicida (Denicola y col., 1993; Hickman-Davis y col., 2002; Gookin y col., 2005). La descomposición espontánea del peroxinitrito también genera los iones estables nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻) (Verchier y col., 2007). Estos productos derivados de la biosíntesis del óxido nítrico, al igual que los de la explosión respiratoria, son a su vez potencialmente deletéreos para la supervivencia del hospedador, de modo que su sobreproducción debe ser regulada (Bastian y Hibbs, 1994), encontrándose implicadas, por ejemplo, algunas citocinas (IL-4, IL-13) (Coccia y col., 2000; Rutschman y col., 2001; Authier y col., 2008).

Se conoce ampliamente que el óxido nítrico (NO[•]) se produce en los tejidos de los mamíferos catalizado por las diversas isoformas de la NOS, como la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), que se expresan constitutivamente. Sin embargo, existe también en los mamíferos una isoforma inducible (iNOS) que se expresa en las células fagocíticas tras la estimulación con citocinas y componentes de bacterias, de algas o de parásitos (Nathan, 1992; Xie y col., 1992; Gordon, 2003; Leiro y col., 2007).

En los peces también ha sido demostrada la presencia de las tres isoformas de la NOS (Eddy, 2005), siendo los fagocitos estimulados capaces de producir NO[•]

(Neumann y col., 1995; Leiro y col., 2000a; Saeij y col., 2000; Tafalla y Novoa, 2000; Villamil y col., 2003a; Stafford y col., 2004; Leiro y col., 2006; Walsh y col., 2006). Los macrófagos del carpín dorado (*Carassius auratus*) infectados con el parásito intracelular obligado *Leishmania major* producen NO[•] en ausencia de señales exógenas (citocinas, etc.), lo que contrasta con los mamíferos en los que es precisa una señal accesoria (INF- γ , etc.) (Neumann y col., 2001).

La iNOS de los macrófagos del carpín dorado (Laing y col., 1996) ha sido secuenciada parcialmente, y la de la carpa (Saeij y col., 2000) y la de la trucha arco iris (Wang y col., 2001) han sido secuenciadas totalmente. También se ha secuenciado la iNOS en peces cartilagosos (Reddick y col., 2006).

La formación de NO[•] puede ser inhibida por la N^G-monometil-L-arginina monoacetato (L-NMMA) y otros análogos de la arginina, que inhiben la NOS por competición, tanto en los mamíferos (Nathan, 1992) como en los peces (Neumann y col., 1995; Yin y col., 1997; Leiro y col., 2000a; Tafalla y Novoa, 2000).

Sistema inmunitario adquirido

Los peces son, posiblemente, los animales más primitivos que poseen un sistema inmunitario constituido por linfocitos e inmunoglobulinas (Marchalonis, 1977).

Respuesta inmunitaria celular adquirida

En los vertebrados, los linfocitos son células altamente diferenciadas que responden, mediante una variedad de mecanismos, a los distintos estímulos inmunológicos. Fueron denominadas por White (1963) como células inmunocompetentes. Los linfocitos se producen en los órganos linfoides primarios y son la base de la respuesta inmunitaria. Una característica importante de los linfocitos en los mamíferos es la presencia de dos tipos celulares con funciones diferentes: los linfocitos T, producidos en el timo, que tienen responsabilidad en la

inmunidad celular y que también cooperan con la segunda clase de linfocitos, los linfocitos B, que son los responsables de la producción de anticuerpos. Los linfocitos circulan a través del cuerpo de los vertebrados y se congregan en órganos, en los que se filtran por los fluidos corporales.

En los peces, la existencia de linfocitos T y B ha sido descrita desde hace tiempo por diversos autores (Yocum y col., 1975; Ruben y col., 1977; Abelli y col., 1997). Secombes y col. (1983), Pilström y Bengten (1996) y Dos Santos y col. (1997) mediante el uso de anticuerpos monoclonales y sobre la base de la expresión de las inmunoglobulinas de membrana (Igm), y Passer y col. (1997) y Kherer y col. (1998) mediante ensayos de proliferación inducida por mitógenos específicos -mitógeno del carmín (PWN), la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (ConA)-, demostraron la presencia en los peces de dos subpoblaciones de linfocitos que son equivalentes a los tipos T y B de los mamíferos. Además, esta presencia ha sido confirmada mediante el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la PCR cuantitativa en tiempo real, el análisis de las librerías de ADNc, etc. usando cebadores o sondas diseñados a partir de las secuencias conservadas de los marcadores de los linfocitos T y B de los mamíferos y los anfibios, como son los receptores de las células T (TCRs), los genes activadores de la recombinación (Rag 1 y 2), los genes de las inmunoglobulinas (Ig μ), entre otros, gracias a las cuales también se ha podido estudiar con precisión su origen y localización durante la ontogénesis. Así, durante el desarrollo del pez, los linfocitos T son las primeras células linfoides que aparecen: en primer lugar en el timo y posteriormente, ya fuera del mismo, los linfocitos T fueron primero encontrados en la región del intestino y las branquias, seguidos por el riñón anterior y posteriormente en el bazo; por su parte, los linfocitos B son originados primero en el riñón anterior (Danilova y col., 2004; Langenau y col., 2004; Zapata y col., 2006).

Los linfocitos B de los peces han sido definidos, igual que los de los mamíferos, como los linfocitos que expresan inmunoglobulinas en su superficie y secretan anticuerpos específicos en respuesta a estímulos antigénicos. No obstante, las características físicas, la distribución, el tipo de respuesta y el anticuerpo que producen estas células les hacen diferir de los que presentan los mamíferos (Kaatari, 1992; Schroeder y col., 1998). Aún así, las funciones de los linfocitos de los peces son análogas a las que llevan a cabo ambos tipos de células en otros vertebrados.

Los linfocitos del rodaballo están caracterizados por poseer un gran núcleo que ocupa prácticamente la totalidad de la célula. Un estrecho borde de citoplasma agranular basofílico rodea el núcleo. Se han identificado y clasificado linfocitos grandes y pequeños en función de sus diámetros y las cantidades relativas de citoplasma; los linfocitos grandes se encuentran raramente, constituyendo el 1% de la población linfocitaria. La ultraestructura de los linfocitos de los rodaballos es similar a la de los mamíferos (Burrows y col., 2001) (Figuras 16A, B).

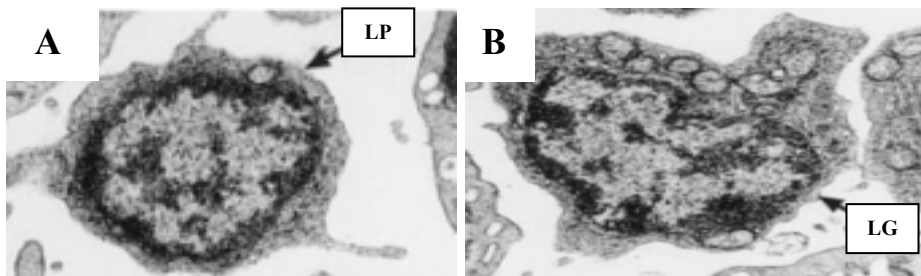


Figura 16. Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de los linfocitos pequeños (LP) (A) y grandes (LG) (B) del rodaballo (Burrows y col., 2001).

Respuesta inmunitaria humoral adquirida

Las inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos son un grupo de glucoproteínas presentes en el suero y en los líquidos intersticiales de todos los vertebrados.

Cuando el sistema inmunitario entra en contacto con moléculas extrañas inmunogénicas, se producen Igs que se unen específicamente al antígeno como consecuencia final de la activación del sistema inmunitario.

La unidad estructural básica (monómero) consta de cuatro cadenas polipeptídicas glucosiladas, dos pesadas (H: aproximadamente 22 kD) y dos ligeras (L: 50-70 kD) iguales entre sí, que están unidas por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente que le confieren estabilidad a la molécula, siendo la longitud de las primeras aproximadamente el doble que la de las segundas.

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras están formadas por dos regiones. La primera de ellas, el extremo amino, compuesta por unos 100-120 aminoácidos terminales que definen la región variable (V) y que representa la porción del anticuerpo que se va a unir con el antígeno. La segunda región la forman los extremos carboxiterminales de ambas cadenas, que definen las diferentes clases de cadenas pesadas o los tipos de cadenas ligeras (isotipos), y se denomina región constante (C). Tanto las cadenas pesadas como las ligeras poseen grupos de aminoácidos unidos por puentes disulfuro intracatenarios; estos segmentos repetidos en las cadenas ligeras y pesadas se conocen como dominios. La cadena ligera tiene dos dominios, uno corresponde a la región variable (V_L) y otro a la constante (C_L). La cadena pesada tiene un dominio en la región variable (V_H) y tres o cuatro en la constante dependiendo de la clase de inmunoglobulina que consideremos (tres en las IgG, IgA e IgD y cuatro en las IgM e IgE), denominándose C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} cuando aparece este último. La región variable recibe este nombre debido a que la secuencia de aminoácidos difiere de una Ig a otra de un mismo individuo, dependiendo del antígeno reconocido por la misma. Por el contrario, la secuencia de cambios en la región constante es muy baja dentro de los individuos de la misma especie.

La variabilidad que se encuentra en los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras no está distribuida de un modo uniforme en toda la longitud de

estas regiones. Algunos segmentos polipeptídicos cortos muestran una gran variabilidad y se les denomina regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), pues determinan la forma del centro activo que permite el reconocimiento y la unión al antígeno. Están presentes en número de tres en la región variable de las cadenas pesadas y ligeras (CRD1, CRD2 y CRD3). Las inmunoglobulinas presentan un patrón común de su estructura tridimensional que es compartida por los dominios constantes y variables de las cadenas pesadas y ligeras, llamado patrón de plegamiento básico, en donde las regiones variables de ambas cadenas se encuentran plegadas. Así, las CDRs se colocan juntas para formar una superficie de unión con el antígeno llamada paratopo.

Otra región interesante de la cadena pesada de las Igs es la región bisagra, responsable de la flexibilidad de la molécula y que permite que los dos lugares de unión al antígeno que posee cada monómero puedan operar independientemente. Esta región consiste en un segmento corto de aminoácidos rico en prolina y cisteína localizado entre los dominios C_{H1} y C_{H2} .

Algunas Igs -isotipos A (dímero) y M (pentámero)- poseen un polipéptido glucosilado denominado cadena J (posee un 12% de azúcares y un peso molecular de aproximadamente 15 kD) producido por la misma célula que sintetiza la Ig y que une mediante puentes disulfuro los extremos constantes de los monómeros que constituyen estas Igs. La presencia de cadenas J se ha identificado en diversidad de animales, incluidos los peces, demostrándose su presencia en los peces cartilagosos (Hagiwara y col., 1985; Hohman y col., 2003) y en algunos peces óseos (Sánchez y col., 1989).

Aparte de lo señalado anteriormente, todas las Igs presentan restos azucarados (oligosacáridos) en su estructura. Dependiendo de la clase de Ig de que se trate, existe un lugar de glucosilación (enlaces N-glucosídicos) muy conservado en la región constante (Fc) y otro lugar (enlaces O-glucosídicos) menos conservado evolutivamente en la porción variable (Fab) de las mismas. El porcentaje que

representa este componente glucídico en las Igs humanas varía entre un 2% y un 14%.

En la actualidad se conocen con bastante exactitud datos sobre genes y secuencias proteínicas de las inmunoglobulinas de toda clase de vertebrados, desde los más primitivos peces mandibulados (placodermos) hasta los vertebrados superiores, incluyendo los teleósteos, los anfibios, los reptiles y las aves.

La Ig predominante en la sangre de los teleósteos es del tipo IgM de los mamíferos. Está constituida por una cantidad equimolar de cadenas pesadas (70-81 kD) y ligeras (22-32 kD) dispuestas en una unidad básica que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (Wilson y Warr, 1992; Crosbie y Nowak, 2002; Jang y col., 2004). La IgM presenta una estructura tetramérica $(H_2L_2)_4$ en los teleósteos (Palenzuela y col., 1996; Bengten y col., 2006) y pentamérica $(H_2L_2)_5$ en los peces cartilagosos (Dooley y Flajnik, 2006), aunque se encontraron formas monomérica en rayas y tiburones (Dooley y Flajnik, 2006), y en algunos teleósteos (Ambrosius y col., 1982).

En el caso concreto del rodaballo, la Ig del suero sanguíneo aislada y caracterizada pertenece al tipo IgM, poseyendo una estructura tetramérica con un peso molecular de 820-835 kD. Las cadenas pesadas presentan un peso de 78 kD mientras que las ligeras lo presentan de 27 kD (Estévez, 1993; Estévez y col., 1994, 1995).

Según su actividad biológica, las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden clasificarse en: anticuerpos aglutinantes, producidos frente a antígenos particulados en los que induce la formación de agregados, probablemente menos tóxicos y más fáciles de fagocitar; anticuerpos precipitantes, que precipitan antígenos de naturaleza soluble, y son importantes como antitoxinas; y anticuerpos neutralizantes, que neutralizan la acción del agente patógeno mediante su unión a la membrana (De Kinkelin y col., 1991). Ha sido demostrada la producción de anticuerpos de inmovilización/aglutinación en varias especies de peces, como el

pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Wang y Dickerson, 2002), el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Hatanaka y col., 2005) y el pez globo tigre japonés (*Takifugu rubripes*) (Hatanaka y col., 2007) frente a antígenos de superficie de diferentes parásitos (ciliados, monogénidos, etc.).

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

Todas las especies de mamíferos, aves y anfibios anuros poseen un sistema genético llamado complejo principal de histocompatibilidad. Los productos codificados por este sistema son glucoproteínas de la membrana celular que se dividen en dos grandes grupos según su estructura: moléculas de clase I y moléculas de clase II. Aunque el MHC fue identificado por su papel en el rechazo de trasplantes, se sabe ahora que las proteínas codificadas en esta región del genoma participan en diversos procesos del reconocimiento inmunológico, incluyendo la comunicación entre las distintas células del sistema linfóide, y la comunicación entre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno.

Las moléculas del MHC de clase I son glucoproteínas que se encuentran en la mayor parte de las células del organismo, mientras que las moléculas de clase II se encuentran en las células presentadoras de antígeno profesionales (los monocitos/macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas), aunque también pueden estar presentes en las células endoteliales, y en las epiteliales y los fibroblastos bajo ciertas condiciones (Martí y Jaraquemada, 2007).

La finalidad del MHC está relacionada con la respuesta de los linfocitos T (Neefjes y Momburg, 1993). La función de las moléculas del MHC es la unión intracelular de fragmentos polipeptídicos de antígenos extraños y de proteínas propias degradadas, que son transportadas hacia la membrana plasmática. Estos complejos, formados por el MHC y el péptido, sirven como potenciales ligandos y son reconocidos por el receptor de superficie (TCR) de los linfocitos T circulantes. Generalmente, los linfocitos T_H (células helper, ayudantes o cooperadoras) se

activan por el antígeno (péptidos extraños producidos por la degradación de patógenos extracelulares) presentado en asociación con las moléculas del MHC de clase II, mientras que los linfocitos Tc (citotóxicos) son activados por el antígeno (péptidos extraños producidos por la degradación de patógenos intracelulares) presentado en asociación con las moléculas del MHC de clase I (Marieb, 2004). Así, el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T queda restringido por el MHC ya que estas células sólo reconocen al péptido antigénico si se encuentra presentado junto con el MHC.

Las células presentadoras de antígeno profesionales captan el antígeno exógeno por endocitosis (pinocitosis o fagocitosis) mediada o no por receptor. Posteriormente es procesado y expresado en la superficie de las células en asociación con las moléculas del MHC de clase II, siendo presentado a las células T_H para su reconocimiento.

Tanto los peces óseos como los peces cartilagosos presentan moléculas del MHC de las clases I y II (Stet y col., 2003; Glover y col., 2007; Schaschl y Wegner, 2007; Peatman y col., 2008).

En los mamíferos, una etapa crítica tanto en la respuesta humoral adquirida como en la respuesta mediada por células es la liberación de citocinas por los linfocitos T, que además es dependiente de la apropiada presentación de los péptidos por las moléculas de clase II del MHC sobre macrófagos, células dendríticas y células B (Rohn y col., 1996). En los peces, se ha sugerido que los monocitos/macrófagos, los melanomacrófagos, los linfocitos (T y B), las células epiteliales, las células dendríticas y los granulocitos pueden funcionar como células presentadoras de antígeno profesionales (Vallejo y col., 1992a; Rodríguez y col., 1995; Koppang y col., 2003; Cuesta y col., 2006).

Las moléculas de clase II son centrales para el sistema inmunitario adaptativo porque guían el desarrollo y la activación de las células T_H. El desarrollo de estas funciones requiere que los genes que codifican las moléculas del

MHC II se transcriban de acuerdo a un estricto patrón específico de tipo celular y cuantitativamente modulado (Reith y col., 2005). Este complejo patrón de la expresión de los genes está controlado casi exclusivamente por un factor regulador conocido como el transactivador de clase II (CIITA) (Ting y Trowsdale, 2002; Reith y col., 2005). Recientemente, Casals y col. (2007) han observado que el LPS también ejerce un mecanismo regulador en el control de la expresión genética del MHC II.

Mientras se produce la expresión constitutiva sobre las células presentadoras de antígeno profesionales, algunos factores solubles pueden modular la expresión de las moléculas de clase II del MHC en esas células o inducir su expresión en células que no poseen moléculas de clase II (Glimcher y Kara, 1992; Ting y Trowsdale, 2002; Casals y col., 2007; Martí y Jaraquemada, 2007). En los peces, se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) junto con el lipopolisacárido (LPS) modulan la expresión de las moléculas de clase II del MHC en los macrófagos de la trucha arco iris (Knight y col., 1998), mientras que tanto el lipopolisacárido como la IL-1 β recombinante modulan su expresión en la lubina (Buonocore y col., 2007). El lipopolisacárido también modula la expresión tanto de la clase I como de la II en el salmón atlántico (Koppang y col., 1999).

Desde que Hashimoto y col. (1990) lograron aislar genes del MHC de la carpa, se han conseguido aislar y secuenciar un importante número de genes MHC de diferentes peces, así como caracterizar su estructura (van Lierop y col., 1998; Cuesta y col., 2006; Buonocore y col., 2007; Cuesta y col., 2007; Hao y col., 2007). Zhang y Chen (2006) han secuenciado el MHC II del rodaballo, así como analizado la organización genómica, el polimorfismo molecular y su expresión.

Factores que alteran la respuesta inmunitaria***Temperatura***

Los procesos fisiológicos de los animales poiquiloterms están influidos por la temperatura. En los peces, se ha demostrado que los cambios en la temperatura del agua alteran la respuesta inmunitaria, pudiendo producir inmunosupresión y aumentando la susceptibilidad frente a los patógenos (Nath y col., 2006; Ndong y col., 2007; Verma y col., 2007).

Ha sido observado que las altas temperaturas pueden causar una disminución de la explosión respiratoria, la actividad fagocítica, la fracción de linfocitos, la resistencia a patógenos, etc. (Houston y col., 1996; Ndong y col., 2007; Verma y col., 2007), mientras que una reducción en la temperatura del agua, aparte de las consecuencias expuestas para las altas temperaturas, pueden provocar una disminución de los niveles de ARNm y de proteína del MHC II, de la activación del complemento, de la síntesis de anticuerpos, entre otros (Tort y col., 1999; Alishahi y Buchmann, 2006; Nath y col., 2006).

El efecto de la temperatura sobre los anticuerpos es conocido desde hace tiempo (Bisset, 1948), y las bajas temperaturas pueden provocar un retraso en su producción (Mikkelsen y col., 2006) e incluso llegar a la inhibición total de su síntesis (Guz y Kozińska, 2006). Los límites de temperatura en los que se produce la respuesta inmunitaria están relacionados con la temperatura óptima a la que se desarrolla cada especie.

Las fluctuaciones en la temperatura del agua son un fenómeno estacional, y algunas infecciones e infestaciones presentan variaciones estacionales que están correlacionadas con cambios en la temperatura del agua (Öztürk y Altunel, 2006; Rauque y col., 2006; Kitamura y col., 2007; Lamková y col., 2007).

Estrés

Se sabe que las condiciones de estrés pueden tener una gran influencia en la salud de los peces, de manera que suponen un gran riesgo en la aparición y el desarrollo de un elevado número de enfermedades infecciosas (Small y Bilodeau, 2005; Fridell y col., 2007; Lefebvre y col., 2007). Los peces que se mantienen en cultivo intensivo están sujetos a varios factores estresantes, como la manipulación, el transporte, el confinamiento, los bajos niveles de oxígeno en el agua, los tratamientos, etc., los cuales provocan cambios fisiológicos en los individuos que desembocan en la inducción de una inmunosupresión y un incremento de la susceptibilidad a la infección (Dror y col., 2006; Jørgensen y Buchmann, 2007; Welker y col., 2007).

La respuesta general al estrés en los peces está caracterizada por la rápida liberación de hormonas del estrés, como el cortisol y las catecolaminas, y la posterior movilización de las reservas de energía, como la glucosa, en un intento de restablecer la homeostasis (Welker y col., 2007).

Polución

El incremento de contaminantes que se depositan en el agua (por ejemplo, metales, metales pesados, semimetales, pesticidas) como consecuencia de la actividad humana puede producir una alteración de la respuesta inmunitaria de los peces, observándose tanto en la respuesta innata como en la adaptativa (Prabakaran y col., 2006; Girón-Pérez y col., 2007; Nayak y col., 2007), y por lo tanto aumentar la susceptibilidad frente a las infecciones.

Respuesta inmunitaria de los peces frente a los parásitos

El sistema inmunitario de los peces está bien desarrollado y, en condiciones normales, es eficiente en la protección frente a las enfermedades. Sin embargo, cuando los peces son cultivados en gran número y padecen estrés debido

a la presencia de factores adversos para su normal desarrollo (masificación, manipulación, inadecuadas temperatura y concentración de oxígeno, etc.), el riesgo de sufrir una enfermedad aumenta, como es el caso de las infecciones parasitarias que continúan dificultando el progreso de la producción en la acuicultura. A pesar de que se han realizado algunos esfuerzos para la caracterización de los mecanismos de defensa de los peces frente a los parásitos, dichos estudios están perjudicados por la carencia de modelos convenientes de laboratorio, siendo preciso el uso de infecciones naturales bajo condiciones mal controladas (Buchmann y col., 2001; Jones, 2001; Wiegertjes y col., 2005).

Los estudios de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa de los peces frente a los parásitos han sido desarrollados usando diversos sistemas hospedador-parásito *in vivo* e *in vitro*. Estos trabajos muestran que la respuesta innata, y concretamente el complemento y las actividades de las células citotóxicas no específicas (NCC) están entre los mecanismos más importantes de la respuesta inmunitaria (Graves y col., 1985a, b; Jones, 2001; Holland y Lambris, 2002; Boshra y col., 2006; Muñoz y col., 2006; Chistiakov y col., 2007). La efectividad de otros factores de la respuesta innata como la fagocitosis (Woo, 1996; Muñoz y col., 2000b; Karagouni y col., 2005), la liberación de ROS y RNS (Muñoz y col., 2000a; Saeij y col., 2003; Scharsack y col., 2003a, 2004; Karagouni y col., 2005; Sitjà-Bobadilla y col., 2006), entre otros, así como la expresión de genes relevantes de esta respuesta como son los de la iNOS (Lindenstrøm y col., 2004), el C3 (Saeij y col., 2003) o las citocinas (IL-1 β , IL-8, TGF- β , TNF- α) (Holland y col., 2003; Lindenstrøm y col., 2003; Saeij y col., 2003; Lindenstrøm y col., 2004) dependen del sistema empleado en la investigación, lo mismo que sucede en el estudio de la respuesta inmunitaria adaptativa frente a los parásitos.

En la respuesta adaptativa se ha observado la participación de anticuerpos específicos (Sitjà-Bobadilla y col., 2004; Joerinka y col., 2007; Sitjà-Bobadilla y col., 2007) y la expresión de genes importantes, como el del complejo principal de

histocompatibilidad de clase II (MHC II) (Wegner y col., 2006; Ottová y col., 2007).

Es conocido que algunos parásitos presentan la capacidad de evadir el sistema inmunitario mediante diversos mecanismos, como son la inmunosupresión, la inmunomodulación, las estrategias antigénicas (muda y variación antigénica), una alta y rápida proliferación, etc. Por ejemplo, en los rodaballos infectados con parásitos intracelulares, como el microsporidio *Tetramicra breviflum*, se ha observado que estos últimos suprimen parcialmente la explosión respiratoria de los fagocitos del pez (Leiro y col., 2001). También se ha encontrado disminuida la explosión respiratoria, así como la actividad fagocítica, en la dorada infectada por el mixosporidio *Polysporoplasma sparis* (Karagouni y col., 2005). Durante la criptobiosis aguda en salmónidos producida por *Cryptobia (Trypanoplasma) salmositica* se produce una disminución significativa de los componentes del complemento (Woo, 2003). La respuesta por anticuerpos y la producción de inmunoglobulinas está disminuida en el lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*) parasitado por el microsporidio *Glugea stephani* (Laudan y col., 1987). La secreción o excreción por los parásitos de sustancias que modulan la secreción de factores inmunitarios por parte del pez se ha observado en el salmón atlántico parasitado por el copépodo *Lepeophtheirus salmonis* (Fast y col., 2007); así, la producción de prostaglandinas (inhiben la estimulación inducida por LPS del gen de la IL-1 β), junto con otras sustancias aún no determinadas, se ha demostrado que presenta efectos de inmunomodulación en el hospedador. Un rápido desarrollo del mixosporidio *Enteromyxum scophthalmi* en el rodaballo provoca muertes a los 40 días de la exposición, sin tener tiempo para la producción de anticuerpos específicos (Sitjá-Bobadilla y col., 2006).

Los estudios inmunológicos junto con los parasitológicos nos ayudan a comprender la inmunidad frente a los parásitos, y nos proporcionan datos para la prevención y el control en la acuicultura.

Respuesta inmunitaria de los peces frente a los ciliados

Son conocidos diversos ciliados que parasitan peces marinos y de agua dulce, bien de forma obligada (por ejemplo *Cryptocaryon irritans*, *Brooklynella hostilis*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Chilodonella hexasticha* o *Chilodonella piscicola*) bien de manera oportunista (*Helicostoma Buddenbrooki*, *Euplotes* sp., *Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena corlissi* o *Balantidium ctenopharyngodoni*, entre otros) (Dickerson, 2006; Basson y Van As, 2006). Los escuticociliados *Uronema marinum*, *Uronema nigricans*, *Philasterides dicentrarchi*, *Pseudocohnilembus persalinus* y *Miamiensis avidus* se encuentran entre estos últimos, siendo parásitos oportunistas de diferentes especies marinas (la lubina, el atún de aleta azul del sur, el rodaballo y el lenguado japonés) (Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Sterud y col., 2000; Kim y col., 2004a, b; Jung y col., 2005). Sin embargo, la respuesta inmunitaria de los hospedadores a las especies parásitas no ha sido objeto generalizado de estudio, con la consiguiente limitación en el conocimiento de este aspecto de la parasitación. Las investigaciones se basan, prácticamente en su totalidad, en el parásito obligado de agua dulce *Ichthyophthirius multifiliis*; no obstante, se han realizado trabajos sobre el parásito oportunista de especies de agua dulce *Tetrahymena pyriformis* y acerca del parásito obligado de peces marinos *Cryptocaryon irritans*.

Respuesta inmunitaria innata

Ha sido observado que las células citotóxicas no específicas (NCC) actúan en la respuesta frente a ciliados, como el parásito obligado *Ichthyophthirius multifiliis* o el oportunista *Tetrahymena pyriformis* (Graves y col., 1985a, b). También se ha demostrado la presencia de infiltrados celulares en el lugar de la infección, que incluyen neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células granulares eosinófilas, macrófagos y linfocitos, teniendo (por lo menos en parte) un papel en la respuesta inflamatoria que se produce frente a la infección (Buchmann y col.,

2001). Han sido observados también en los peces infectados por escuticociliados infiltrados de macrófagos, neutrófilos y linfocitos (Dragesco y col., 1995; Munday y col., 1997; Sterud y col., 2000; Jee y col., 2001; Padrós y col., 2001; Jung y col., 2007).

Existe una clara evidencia de que el sistema del complemento está envuelto en la respuesta inmunitaria frente a los ciliados, en concreto *I. multifiliis* (Buchmann y col., 2001). Sigh y col. (2004a) observaron un moderado incremento en los niveles de expresión del componente C3 del complemento en la trucha arco iris, lo que sugiere que el complemento está involucrado en las reacciones inmunitarias frente a este ciliado. Recientemente, se ha realizado un estudio en el que se demuestra que la expresión del sistema del complemento en la carpa (*Cyprinus carpio*) está regulada por la infección producida por el ciliado, debiendo investigarse la caracterización funcional de los diferentes componentes del complemento en relación a la infección (González y col., 2007b).

Aparte de las NCC y del complemento, otros componentes de la respuesta innata participan en los procesos de protección, habiéndose observado un incremento en la expresión de los genes de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8, TNF- α y quimiocina CXCa que puede ser crucial para el reclutamiento de células inmunitarias relevantes necesarias para el inicio de las reacciones encaminadas a eliminar la infección (Sigh y col., 2004b; González y col., 2007a), y de las enzimas iNOS y arginasa 2, sugiriendo la activación de las células inmunitarias en el lugar de la infección (González y col., 2007a). La expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α también se encuentra incrementada en la infección producida por *P. dicentrarchi* en el rodaballo (Leiro y col., 2006; Paramá y col., 2007a).

Respuesta inmunitaria adaptativa

La producción de anticuerpos específicos está implicada en la respuesta inmunitaria, protegiendo al pez frente al ciliado parásito (Wang y Dickerson, 2002; Xu y col., 2006; Yambot y Song, 2006; Luo y col., 2007; Swennes y col., 2007). La estimulación de la expresión del gen del MHC II también ha sido observada en el caso de la trucha arco iris infectada por el ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* (Sigh y col., 2004a).

Los ciliados también presentan la capacidad de evadir el sistema inmunitario de los peces. Por ejemplo, *Ichthyophthirius multifiliis* presenta variación antigénica en sus proteínas de superficie (Dickerson y Clark, 1998). Este ciliado también evita la respuesta del pez mediante un comportamiento de evasión del hospedador, el cual es provocado por el entrecruzamiento de sus antígenos de superficie a los anticuerpos del pez que podría activar (o revertir) el desencadenante normal del desarrollo que regula la transmisión entre los trofontes (asociados al pez), y los tomontes y los terontes (formas libres) del parásito (Clark y col., 1996). El escuticociliado *Uronema marinum* posee actividad neutralizadora contra los ROS producidos intracelularmente, además de secretar sustancias citotóxicas que destruyen los fagocitos del hospedador (Kwon y col., 2002). En un estudio reciente, se ha observado que la fosfolipasa C que hidroliza la fosfadilcolina (PC-PLC) aislada de este ciliado parece ser capaz de suprimir la liberación de ROS por los fagocitos del lenguado japonés gracias al daño que produce en su membrana celular (Seo y col., 2005). Los parásitos capaces de evadir la acción de las NCC están en clara ventaja, como el parásito oportunista *Tetrahymena pyriformis* que presenta un antígeno que inhibe la actividad de estas células (Leary, 1994). Paramá y col. (2007a, b) en estudios *in vitro* han demostrado que *Philasterides dicentrarchi* induce la apoptosis de los leucocitos del rodaballo a través de la producción de cisteín proteasas, las cuales también producen la inhibición de la quimiotaxis de los leucocitos.

Objetivos

Las infecciones causadas por escuticociliados histiófagos oportunistas son un problema en el cultivo de peces planos, como el rodaballo, a nivel mundial (Dyková y Figueras, 1994; Sterud y col., 2000; Álvarez-Pellitero y col., 2004a; Ramos y col., 2007). Nuestro equipo de investigación detectó dos brotes de escuticociliatosis entre el verano de 1999 y la primavera de 2000 en una piscifactoría de la costa sudeste de Galicia (NO de España). En el primer brote, la infección afectó a rodaballos (de un peso superior a 500 g) en sólo dos tanques. En el segundo brote, la infección afectó a seis tanques que contenían peces con un amplio rango de pesos (de 150 a 1.500 g). Ambos brotes provocaron mortalidades de 20-30 peces/día, con picos de mortalidad de más de 100-150 peces/día. En varios de los tanques afectados, la mortalidad total fue del 100%, mientras que en otros fue observada una remisión a las 6-8 semanas del comienzo del brote. Los dos tanques afectados en el primer brote formaban parte de un sistema de recirculación, mientras que algunos tanques del segundo brote recibían el agua directamente del mar, sin recirculación y sin compartir agua. Ambos brotes estuvieron precedidos de periodos de aumento en la temperatura del agua por encima de los 20 °C.

Las impregnaciones con plata permiten observar las características morfológicas, y las infraciliaturas somática y oral de los especímenes impregnados, empleándose para hacer investigaciones sistemáticas y morfogenéticas; no obstante, una observación completa y precisa del ciliado sólo puede realizarse mediante el uso de las microscopías electrónicas de barrido y de transmisión.

Aparte de los caracteres morfológicos y morfogenéticos en los que se han basado la taxonomía y la filogenia habitualmente, las técnicas moleculares, y más concretamente el análisis de la secuencia del gen SSUrRNA, han sido utilizadas para la determinación de las relaciones filogenéticas de gran variedad de grupos de escuticociliados. En algunos casos los datos moleculares han corroborado los

estudios basados en los caracteres morfológicos y morfogenéticos, mientras que en otros casos no ha sido así.

La necesidad de grandes cantidades de ciliados puros a la hora de realizar diferentes estudios hacen preciso disponer de un medio de cultivo *in vitro* axénico, para cuya realización hay que considerar diferentes parámetros como el pH, la salinidad, los nutrientes, entre otros.

En la actualidad, las vías de entrada de los escuticociliados en los peces son escasamente conocidas, así como han sido pocos los estudios realizados con el objetivo de determinar tales vías. Además, se desconoce el proceso por el que los escuticociliados de vida libre se transforman en parásitos.

Las infecciones por escuticociliados de peces en cultivo están incrementándose en años recientes, de modo que la búsqueda de medidas de control efectivas es una prioridad para evitar las pérdidas económicas que provocan. Hasta el momento, sólo pueden eliminarse los ciliados mientras se encuentran fuera del hospedador mediante tratamientos quimioterapéuticos preventivos, no habiéndose encontrado aún un tratamiento una vez que el ciliado ha penetrado en él. Es por ello preciso el desarrollo de medidas inmunoproliféricas para el control de estas infecciones.

La respuesta inmunitaria de los peces depende en gran medida del sistema inmunitario innato. Sin embargo, existen ciliados, incluidos los escuticociliados, con la capacidad de modular dicho sistema (la fagocitosis, la liberación de ROS y RNS, etc.), lo que hace necesario el estudio de los efectos que provocan los escuticociliados en este sistema de defensa.

En base a las premisas expuestas anteriormente, nos hemos planteado abordar en el presente trabajo los objetivos que se detallan a continuación:

1. Realizar una descripción del ciliado responsable de estos brotes de escuticociliatosis en el rodaballo, junto con el estudio de los signos clínicos y la patología asociados a la enfermedad.

2. Hacer un detallado estudio ultraestructural del ciliado responsable con el ánimo de identificar caracteres morfológicos adicionales que puedan emplearse para lograr un diagnóstico más preciso.

3. Investigar las relaciones filogenéticas de este escuticociliado con otros del orden Philasterida causantes de infecciones en peces planos (*Miamiensis*, *Philasterides*, *Pseudocohnilembus*, *Uronema*) en base a la secuencia del gen SSUrRNA.

4. Obtener un método de cultivo axénico para el mantenimiento puro del ciliado que nos permita disponer permanentemente y en cantidades suficientes del organismo de modo rápido y sencillo.

5. Desarrollar procedimientos de infección experimental, y estudiar las posibles rutas de entrada del escuticociliado en el rodaballo y su adaptación al parasitismo.

6. Caracterizar las fracciones antigénicas candidatas para la producción futura de vacunas frente al ciliado.

7. Observar la capacidad moduladora del parásito sobre la respuesta inmunitaria innata del rodaballo.

Material y Métodos

Animales de experimentación

Rodaballos

Todos los rodaballos empleados en este trabajo, tanto los sanos como los infectados, han sido obtenidos de una sola piscifactoría situada en Galicia (Noroeste de España). Antes de los experimentos, los peces fueron aclimatados a las condiciones de nuestro acuario con recirculación de agua y aireación constantes (18 ± 1 °C, pH 6.5 ± 0.5 , salinidad 28-30‰). Los rodaballos fueron alimentados diariamente con comida semiseca estándar.

Ratones

Los ratones utilizados en los experimentos tenían entre 6 y 8 semanas de edad. Perteneían a la cepa consanguínea BALB/c y fueron adquiridos a la empresa Harlan OLAC Ltd. (Oxon, Inglaterra). Los ratones fueron mantenidos en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia con iluminación de 8:00 a 20:00 (12 horas luz:12 horas oscuridad) y temperatura de 22-24 °C en grupos de 6. Los animales tuvieron acceso libre a comida semiseca estándar y a agua fresca.

Ciliados

Los ciliados *Philasterides dicentrarchi* fueron aislados por abdominocentesis, bajo condiciones asépticas, del fluido ascítico contenido en la cavidad abdominal de los rodaballos infectados y mantenidos bajo condiciones de cultivo en laboratorio. En un primer momento, tales condiciones fueron las descritas por Bernard y Fenchel (1996). Los ciliados fueron mantenidos a 18 °C en frascos de cultivo para tejidos (Iwaki) de 50 ml con agua de mar en la que fueron hervidos dos granos de trigo, y *Listonella anguillarum* (= *Vibrio anguillarum*) como fuente de comida. Con este objetivo fue realizado el cultivo en laboratorio de esta especie, tras el que las bacterias fueron recogidas por centrifugación,

resuspendidas en suero salino fisiológico (SSF) estéril y autoclavadas a 121 °C durante 15 minutos antes de añadir las al medio de cultivo de los ciliados. Posteriormente, sin embargo, los ciliados fueron mantenidos en un cultivo axénico en medio L-15 completo estándar (ver más adelante **Preparación de un cultivo axénico**). Los ciliados fueron subcultivados semanalmente.

Aprobación ética

Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con las regulaciones europeas sobre la protección de animales (Directiva 86/609), la Declaración de Helsinki y/o la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio como se adoptó y promulgó por los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU. (Publicación NIH n° 85-23, revisado en 1996). Todos los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Santiago de Compostela.

Microscopía de contraste de fases y tinción May Grünwald-Giemsa

Diferentes órganos y tejidos fueron diseccionados (incluido el cerebro) de peces recién sacrificados, y examinados en preparaciones por microscopía de contraste de fases con la intención de detectar ciliados. A los rodaballos con ascitis en la cavidad corporal les fue realizada una abdominocentesis, y el fluido ascítico aspirado fue examinado en busca de parásitos. Cuando había ascitis, el paquete visceral fue lavado exhaustivamente con suero salino antes del examen para evitar la aparición de falsos positivos causados por la contaminación de las vísceras con ciliados procedentes del fluido ascítico. En todos los casos, analizamos también una muestra de sangre obtenida de la vena caudal. En algunos casos, examinamos frotis de fluido ascítico y de sangre teñidos con May Grünwald-Giemsa. Para

realizar esta tinción, los frotis fueron secados sobre los portaobjetos al aire, fijados con metanol durante 2 minutos y secados al aire. Fueron teñidos con May-Grünwald comercial (Merck) diluido 1/2 en tampón Giemsa (ácido cítrico 100 mM + fosfato bisódico 200 mM, pH 5.75) durante 5 minutos, lavados con tampón Giemsa y secados al aire. A continuación, fueron teñidos con Giemsa comercial (Merck) diluido 1/5 en tampón Giemsa durante 10 minutos, aclarados en tampón Giemsa, secados al aire y visualizados con el objetivo de inmersión. Después de la visualización, los portaobjetos fueron bien lavados sumergiéndolos en xileno.

Impregnación con nitrato de plata

Para el estudio de las infraciliaturas somática y oral, en coincidencia con la fase exponencial o de meseta del cultivo, los ciliados fueron concentrados mediante centrifugación a 650 g durante 5 minutos y después fueron impregnados por el método del nitrato de plata de Chatton-Lwoff descrito por Foissner (1991). Para ello, los ciliados fueron goteados en Fluido de Champy (la relación material:fijador fue 1:2) y fijados durante 30 minutos. Tras este tiempo, fue eliminado el fijador por centrifugación y cuidadosa aspiración, y fueron fofijados los ciliados en fluido de Da Fano durante 5 minutos, eliminándose el fijador por centrifugación. Realizamos un total de cuatro lavados de 5 minutos hasta que el color de la suspensión fue el del fluido de Da Fano. Portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados (para ello fueron limpiados con alcohol y flameados) fueron colocados sobre una placa calefactora (35-45 °C), colocamos un pequeño fragmento de gelatina (2-4 mm de diámetro) en el centro del portaobjetos caliente y dejamos que se fundiera. Para que la gelatina no formase precipitados de plata turbios, fue almacenada a 4 °C durante al menos una semana antes de usarla. Rápidamente, añadimos una gota del concentrado de ciliados de igual tamaño o más pequeña que la gelatina fundida y fueron retirados los portaobjetos de la placa calefactora. Para distribuir bien los parásitos en la gelatina empleamos una aguja de entomología. Para los ciliados

pequeños ($< 100 \mu\text{m}$), como es el caso presente, la gota fue extendida por los portaobjetos hasta que la capa de gelatina tuvo el grosor adecuado. Inmediatamente, transferimos los portaobjetos a una cámara húmeda que fue introducida a 4°C durante 5 minutos para que la gelatina solidificase, lo que fue comprobado con una aguja bajo el estereomicroscopio. Pasados los 5 minutos, lavamos los portaobjetos con agua destilada fría a chorro durante 3 segundos (este paso es esencial y determina la calidad e intensidad de la impregnación), y a continuación, fueron transferidos a una solución fría de nitrato de plata y mantenidos en ella durante 1 hora, tras la que fueron lavados con agua destilada fría a chorro durante 1-3 minutos. Rápidamente, fueron sumergidos en 1-4 cm de agua destilada fría en una placa de Petri con fondo blanco e irradiados durante 30 minutos utilizando una lámpara de luz UV colocada 10-30 cm por encima de la placa hasta que la gelatina se volvió marrón dorada. Durante la irradiación movimos la placa hacia adelante y hacia atrás, y cambiamos el agua a los 2-3 minutos de la irradiación para impedir la precipitación de la plata. Tras los 30 minutos, la infraciliatura resaltaba en marrón oscuro sobre la gelatina marrón clara y el citoplasma no estaba teñido. Los portaobjetos fueron transferidos a etanol frío de 30° y posteriormente a etanol frío de 70° manteniéndolos durante 10 minutos en cada uno de ellos. La deshidratación fue completada en dos pases sucesivos de etanol absoluto de al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Fueron aclarados los portaobjetos en xileno (2 pases de 10 minutos) y finalmente montados en Entellan.

Los dibujos de las estructuras corticales los realizamos con la ayuda de una cámara lúcida.

Tinción del aparato nuclear (DAPI)

El aparato nuclear fue visualizado por el método de Coppellotti (1990). Para ello, fueron concentrados los ciliados por centrifugación (650 g durante 5

minutos), fijados en glutaraldehído al 2.5% (v/v) en agua de mar durante 1 hora, y parte de las células recolectadas extendidas en un portaobjetos las dejamos secar. A continuación, los ciliados fueron fijados en una solución de etanol absoluto durante 5 minutos, incubados durante 20 minutos con una solución acuosa de 0.4 µg/ml de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente en oscuridad, lavados con agua destilada con mucha precaución, y dejamos secar los portaobjetos al aire. Seguidamente, dispusimos un cubreobjetos sobre las células teñidas utilizando como medio de montaje un 10% (v/v) de tampón fosfato salino (PBS; 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 4.3 mM de Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mM de KH₂PO₄, pH 7.3) y un 90% (v/v) de glicerol. El examen y la medición del aparato nuclear fueron realizados con un microscopio Axioplan Zeiss (Jena, Alemania) equipado con un juego de filtros DAPI (BP 365/12; FT 395; LP 397).

Examen histológico

Para su realización, fijamos los tejidos inmediatamente tras la muerte de los rodaballos para reducir al máximo los posibles artefactos debidos a la autólisis de los tejidos. Para ello, los tejidos fueron fijados en formol al 10% tamponado durante 12-24 horas, eliminamos el resto de fijador lavando las muestras en PBS (2 lavados de 5 minutos) y las muestras fueron deshidratadas a través de pases sucesivos en soluciones de etanol de concentración creciente (70°, 80°, 96° y tres pases de 100°) de 1 hora de duración cada uno de ellos. La deshidratación fue realizada en frascos de base ancha y con agitación, puesto que el agua es más densa que el etanol y tiende a quedarse en la proximidad de los tejidos, dificultando el proceso. Este paso fue crítico para el resto del proceso porque si la muestra no estaba bien deshidratada, quedarían restos de agua en los tejidos y no se hubiesen impregnado bien de parafina. A continuación, las piezas fueron extraídas del etanol absoluto y sumergidas inmediatamente en xileno, comprobando cada 5 minutos el grado de aclarado de las muestras. Esto fue mejor observado visualizándolas sobre

un fondo negro. Así, cuando las muestras estuvieron totalmente aclaradas no observamos ninguna zona opaca en el centro de las mismas. Este proceso tardó aproximadamente 5-10 minutos debido a que las muestras estaban bien deshidratadas. Para completar el aclarado, las muestras fueron sumergidas por segunda vez en xileno durante otros 5-10 minutos. Una exposición prolongada al xileno puede endurecer los tejidos y dificultar posteriormente el corte de las muestras; por ello redujimos el tiempo de aclarado al mínimo posible. Una vez aclaradas las piezas, fueron impregnadas con parafina Paraplast Plus mediante 3 pases en parafina de 1 hora cada uno en una estufa a 64 °C. Tras la impregnación, procedimos a la inclusión en parafina. Ésta fue realizada en el interior de la estufa manteniendo la puerta lo más cerrada posible para evitar el enfriamiento y la solidificación de la parafina. Empleamos pinzas para manipular las muestras, y cuando se enfriaron, fueron calentadas con un mechero de alcohol. Para realizar la inclusión, la parafina líquida fue vertida en los moldes de inclusión, fueron colocadas las muestras debidamente orientadas (normalmente con la zona de interés hacia abajo) en los moldes, colocamos encima de éstos unos casetes de plástico perforado adecuadamente etiquetados, y presionamos hasta que la parafina atravesó las perforaciones del mismo. Los moldes fueron sacados de la estufa con cuidado de no inclinarlos, ya que mientras la parafina está líquida la muestra puede desorientarse, y enfriados a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron cortadas secciones de 2-5 μm con un microtomo motorizado Jung 2065 Supercut (Leica Instruments, Heidelberg, Alemania) y teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) para su posterior examen por microscopía óptica. Para ello, procedimos a desparafinar e hidratar las muestras a través de pases sucesivos en soluciones de xileno, etanol de concentración decreciente y agua destilada (2 pases de xileno, 2 pases de etanol 100°, etanol 96°, etanol 80°, agua destilada) de 5 minutos cada uno, excepto el del agua destilada que fue de 10 minutos. A continuación, realizamos un proceso de tinción y diferenciación, tiñendo con hematoxilina de Mayer durante 12-15

minutos, lavando con agua corriente durante 10 minutos, tiñendo con eosina acuosa al 1% durante 3-5 minutos y lavando con agua corriente durante 5 minutos. Seguidamente, las muestras fueron deshidratadas y aclaradas a través de pases sucesivos en soluciones de etanol de concentración creciente y xileno -2 pases de etanol de 96° (uno de 1 minuto y otro de 3 minutos), 2 pases de etanol de 100° y 2 pases de xileno de 5 minutos cada uno de ellos-. Para finalizar, procedimos al montaje con medio permanente Entellan.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los ciliados de la ascitis fueron concentrados por centrifugación (650 g durante 5 minutos) y fijados en glutaraldehído al 2.5% (v/v) en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.2 durante 1 hora, tras la que realizamos 5 lavados de 4 minutos en tampón cacodilato 0.1 M. Las muestras fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y deshidratadas a través de una serie de etanol de concentración creciente (30°, 50°, 75°, 95° y 3 cambios de 100°). Los cambios fueron de 5 minutos cada uno. Una vez deshidratadas, las muestras fueron desecadas a punto crítico, montadas sobre los portaobjetos y recubiertas con una mezcla de oro-paladio. Posteriormente, examinamos los ciliados en un microscopio Leica 440 Stereoscan (Leica, Cambridge, Reino Unido).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los ciliados en cultivo fueron recogidos mediante centrifugación a 650 g durante 5 minutos. Las células fueron fijadas durante 12 horas a 4 °C en glutaraldehído al 2.5% (v/v) en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.2. Posteriormente, realizamos 2 lavados de 4 minutos en tampón cacodilato 0.1 M y las muestras fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% (p/v) tamponado en tampón cacodilato durante 1 hora a 4 °C. Tras este tiempo, hicimos 3 lavados de 15

minutos cada uno en tampón maleato-NaOH 0.05 M, pH 5.2 y los ciliados fueron introducidos en una solución fresca de uranilo (acetato de uranilo al 2% en tampón maleato, pH 4.2) durante 2 horas a 4 °C. Esta solución debe ser centrifugada (10.000 g durante 10 minutos) o filtrada por 0.2 µm antes de su uso.

Los ciliados fueron deshidratados a través de pases sucesivos en acetona (25%, 50%, 75%, 95% y tres cambios de acetona 100%) de 5-10 minutos cada cambio. La acetona empleada debe ser de grado reactivo y de muy buena calidad. Posteriormente, las muestras fueron infiltradas con una mezcla de resina Spurr y acetona 1:1 (v/v) durante 12 horas a 4 °C, tras lo que fueron embebidas en resina Spurr pura durante 12 horas a 4 °C, y a continuación, en Spurr nueva durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para preparar esta resina, mezclamos en el mismo orden y cantidad los siguientes compuestos:

- 10 g de VCD (ERL 4206) (Dióxido de vinilo ciclohexano. Spi-chem).
- 7 g de DER 736 (Poliglicol diepóxido/resina epoxi. Spi-chem).
- 26 g de NSA (Nonenil anhídrido succínico. Spi-chem).
- 0.4 g de DMAE (2-Dimetilaminoetanol).

Para finalizar este procesamiento, las muestras fueron embebidas en Spurr fresca previamente vertida en moldes de silicona perfectamente secos y colocadas en una estufa a 70 °C durante 12 horas. Una vez que polimerizó la resina, extrajimos los bloques con la muestra en su interior y los tallamos para efectuar los cortes semi o ultrafinos.

Las secciones semifinas fueron cortadas con un ultratomo (Reichert-Jung, Ultracut E, Austria) y teñidas posteriormente para su visualización al microscopio óptico. Para ello, fueron recogidos con un pincel varios cortes semifinos (0.5-1 µm) y colocados sobre una gota de agua bidestilada previamente vertida sobre un portaobjetos. El agua fue evaporada con ayuda de un mechero de alcohol, teniendo cuidado de no calentarla en exceso para evitar que hirviese. Una vez evaporada totalmente el agua fueron añadidas unas gotas de colorante (azul de toluidina al

1%), manteniéndolo durante 30-60 segundos y calentando esporádicamente en el mechero. El exceso de colorante fue eliminado mediante un lavado exhaustivo con agua corriente. A continuación, el portaobjetos fue bien secado en el mechero. Esta preparación fue observada al microscopio y cuando fue verificado que la tinción era satisfactoria, realizamos un montaje permanente empleando líquido de montaje Entellan.

El colorante empleado en la tinción de los cortes semifinos consistió en una mezcla de 1 g de azul de toluidina y 1 g de borato sódico diluidos en 100 ml de agua bidestilada. Una vez disuelto el colorante, fue filtrado a través de papel de filtro.

Tras seleccionar las zonas de los cortes semifinos que se consideraron más apropiadas realizamos los cortes ultrafinos (60-80 nm), que fueron recogidos en rejillas previamente lavadas mediante sonicación o inmersión en acetona seguida de etanol. El exceso de alcohol que pudiese haber quedado fue eliminado apoyando el canto sobre un papel de filtro y las rejillas fueron colocadas oblicuamente con un ángulo aproximado de 60° hasta su completo secado. Para teñir los cortes, fueron colocadas sobre una placa de Petri tantas gotas de una solución alcohólica de acetato de uranilo como rejillas teñimos. Para la preparación del acetato de uranilo, fueron diluidos 3 g de acetato de uranilo en 100 ml de etanol de 30° (preparado con agua bidestilada estéril filtrada por 0.2 μm). Esta solución fue filtrada posteriormente por 0.2 μm . Cada rejilla fue colocada sobre una gota de acetato de uranilo durante 10 minutos, tras los que fueron lavadas exhaustivamente con etanol de 30° y colocadas sobre papel de filtro para una completa eliminación del etanol. Posteriormente, fueron colocadas en una placa de Petri varias lentejas de sosa y tantas gotas de citrato de plomo como rejillas teñimos. Inmediatamente después, fue necesario tapar la placa para evitar que el citrato de plomo estuviera mucho tiempo en contacto con el CO₂ del aire y así evitar la precipitación del colorante. El citrato de plomo fue preparado a partir del producto purificado comercial siguiendo

el método de Fahmy (1967). Las rejillas fueron colocadas sobre las gotas de citrato de plomo y teñidas durante 10 minutos. Finalizado este periodo de tiempo, las rejillas fueron lavadas rápidamente con NaOH 0.02 N y, a continuación, con agua destilada (tanto el agua destilada como la sosa deben estar libres de carbonatos, para lo que ambas soluciones fueron autoclavadas previamente). Las rejillas fueron secadas sobre un papel de filtro y, a continuación, introducidas durante 10 minutos en una estufa a 37 °C para asegurarnos un secado completo.

Una vez secos, los cortes fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM12 (Philips, Eindhoven, Holanda) a un voltaje de aceleración de 80-100 kV.

Extracción del ADN

Los ciliados en cultivo (10^6 células/ml) fueron recogidos por centrifugación a 650 g durante 5 minutos y lavados dos veces con tampón PBS. A continuación, fue extraído el ADN total de las células usando el Dneasy Tissue Kit (Qiagen, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue alicuotado y guardado a -20 °C hasta que lo empleamos para hacer la PCR.

Amplificación por PCR, clonación y secuenciación del gen SSUrRNA

La amplificación del ADN mediante PCR la realizamos como fue descrito previamente por Leiro y col. (2000b). Fue amplificada una parte del gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad pequeña (SSUrRNA) del ciliado *Philasterides dicentrarchi* usando como cebador directo el 5'-GAGAAACGGCTACCACATCTA-3' (PSSU1) y como cebador reverso el 5'-CAGGTAAAGAGCCTACTCCA-3' (PSSU2). La mezcla de reacción de la PCR (100 µL) contenía tampón de la reacción (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1.5

mM de MgCl₂, pH 9.0), 0.2 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (Roche), 0.4 mM de cada cebador, 3 unidades de rTaq polimerasa (Roche) y 50 ng del ADN genómico del ciliado como molde. La PCR fue realizada en un termociclador automático Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, EE.UU.) con las siguientes condiciones: inicialmente 5 minutos a 94 °C, después 35 ciclos (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C), y finalmente, tras los 35 ciclos, una fase de extensión de 10 minutos a 72 °C. Separamos una alícuota de 25 µl de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1% en tampón Tris-borato-EDTA (TBE; 45 mM de Tris-base, 45 mM de H₃BO₃, 1 mM de EDTA, pH 8) teñido con bromuro de etidio, que fue visualizado en un transiluminador de intensidad variable 3120 UV (Spectroline, EE.UU.).

El resto de productos de la PCR (350 pb) fue purificado por el dispositivo Microcon-PCR (Millipore, EE.UU.) y clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega, EE.UU.) empleando el kit y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante como fue descrito previamente (Leiro y col., 2002b). Así, tras el ligamiento del fragmento de ADN al vector, las células DH_{5α} fueron transformadas por electroporación en un electroporador Gene Pulser II (Bio-Rad, EE.UU.), usando cubetas Gene Pulser[®]/*E. coli* Pulser[™] con una separación de 0.1 cm a un voltaje de 1.8 kV, una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 2000 Ω. Las células transformadas fueron seleccionadas en base a la sensibilidad al antibiótico y a la presencia de actividad β-galactosidasa, mediante α-complementación. Para ello, fueron cultivadas en placas con medio agar-LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina, junto con 50 µl de una solución de 20 mg/ml del compuesto cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal) y 20 µl de un inductor de la síntesis de la β-galactosidasa llamado isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) 0.5 M extendidos sobre la superficie. Una vez crecidas las colonias, fueron seleccionadas las blancas, que son aquellas en las que el plásmido contiene el ADN insertado, y puestas a crecer en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) toda la

noche a 37 °C con agitación. El ADN plasmídico fue purificado usando el Plasmid Mini Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para confirmar la presencia y el tamaño del fragmento clonado, éste fue amplificado por PCR usando los cebadores T7 y SP6, los cuales flanquean la región de inserción del plásmido pGEM-T Easy, bajo las siguientes condiciones de termociclado: 5 minutos a 94 °C, después 35 ciclos (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C), y finalmente, tras los 35 ciclos, una fase de extensión de 10 minutos a 72 °C. Los productos de la PCR amplificados fueron analizados en un gel de agarosa para verificar la presencia de la banda del tamaño correcto. El fragmento del gen SSUrRNA clonado en el vector fue secuenciado en direcciones complementarias usando el Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (CEQ™ DTCS Kit, Beckman Coulter, EE.UU.) y cargado en el secuenciador automático CEQ™ 2000 DNA Analysis System (Beckman Coulter, EE.UU.).

Análisis filogenéticos

La secuencia obtenida del fragmento del gen SSUrRNA de *Philasterides dicentrarchi* de rodaballos de la piscifactoría gallega fue comparada con las secuencias equivalentes de otros parásitos relacionados (observar Tabla 3: Resultados). Las secuencias fueron alineadas empleando el programa CLUSTAL W (Higgins y col., 1994) y editadas con el editor Jalview Multiple Alignment Editor V1.8 Sites; los huecos fueron excluidos.

El cálculo de distancias entre las secuencias se puede realizar empleando diferentes algoritmos, que suponen distintos modelos de sustitución de nucleótidos. En nuestro trabajo empleamos el Modelo de Kimura 2-parámetros puesto que asumimos que la proporción de los cuatro nucleótidos es la misma (1/4 para cada uno) y que la tasa de transiciones es distinta a la tasa de transversiones (Kimura, 1980) en las moléculas que hemos seleccionado.

Para la construcción de los árboles filogenéticos a partir de matrices de distancia, empleamos el método del vecino más próximo (neighbour-joining: NJ) (Saitou y Nei, 1987). Este método agrupa a las dos secuencias más próximas y después añade progresivamente los otros taxones más alejados. No obstante, el método va construyendo, en cada paso del análisis, nuevas matrices de distancia transformadas a partir de la matriz original, de modo que la divergencia entre cada par de secuencias está ajustada en base a la divergencia promedio de ellas con respecto al resto de los taxones. Este método es muy utilizado por la simplicidad de su cálculo y porque permite el análisis de tasas desiguales de evolución. En nuestro estudio empleamos el programa informático MEGA 3.1 (Kumar y col., 2004).

La fiabilidad de la inferencia filogenética puede comprobarse mediante análisis estadísticos, y la prueba empleada para evaluar la fiabilidad de un árbol filogenético obtenido por el método basado en la distancia es el muestreo repetitivo (test de Bootstrap) (Felsenstein, 1985). En este procedimiento, una muestra aleatoria de nucleótidos reemplaza al grupo original de datos y esa muestra aleatoria es usada para la construcción de un nuevo árbol filogenético. Este proceso se repite un gran número de veces (100-1000) y se calcula la proporción de réplicas en la que determinadas secuencias aparecen agrupadas. Si la proporción de réplicas para un determinado agrupamiento de secuencias es grande (por ejemplo mayor de 0.70), se considera que este grupo de secuencias es estadísticamente significativo (Hillis y Bull, 1993).

Preparación de un cultivo axénico

Los ciliados fueron concentrados por centrifugación del fluido ascítico a 650 *g* durante 5 minutos y posteriormente lavados dos veces por resuspensión/centrifugación en medio L-15 incompleto (ver sección **Preparación de los medios de cultivo**). Una alícuota de la suspensión resultante fue fijada con glutaraldehído (concentración final del 0.25%), y los ciliados en la muestra fijada

fueron contados en un hemocitómetro de Neubauer. En vista de este conteo, la densidad de la suspensión fue ajustada a 5×10^4 células/ml en medio L-15 incompleto.

Esta suspensión fue empleada para la infección de los peces. Para ello, fueron anestesiados durante 1-2 minutos con 0.3 ml/l de 2-fenoxietanol (Sigma-Aldrich) rodaballos sanos con un peso de 30-40 g y les inyectamos intraperitonealmente 200 μ l de la solución a cada pez (10^4 ciliados). Los peces fueron mantenidos en tanques de 50 l. Tras 1-2 semanas, la mayoría de los rodaballos mostraron una marcada ascitis.

Este paso de cultivo *in vivo* fue realizado con la intención de emplear los mismos parásitos aislados en los posteriores ensayos *in vitro* y para minimizar los posibles efectos de la aclimatación previa de los parásitos a las particulares condiciones *in vitro* (pH, salinidad, temperatura, fuente de alimento, etc.) en el posterior comportamiento en cultivo.

Antes de cada experimento de cultivo axénico, los parásitos de la ascitis fueron extraídos por abdominocentesis de peces infectados experimentalmente, y juntados. El fluido ascítico que mostraba evidente contaminación de células del hospedador no se usó. El fluido ascítico fue lavado varias veces mediante centrifugación/resuspensión en medio L-15 incompleto, y posteriormente mantenido durante 3-4 días a 18 °C a concentraciones de 10^5 células/ml en frascos de cultivo de tejidos de 75 cm² con tapón con ventilación (Iwaki) conteniendo 15 ml de medio L-15 incompleto. Este paso de incubación, en el que la proliferación no fue observada, fue realizado con la intención de minimizar la posibilidad de interferencia de componentes derivados del rodaballo en los ensayos inmunológicos posteriores. Tras la incubación, los ciliados fueron concentrados por centrifugación, lavados en medio L-15 incompleto, contados en un hemocitómetro de Neubauer, y cultivados a la concentración requerida para cada ensayo (ver sección **Experimentos de cultivo *in vitro***).

Preparación de los medios de cultivo***Medio L-15 incompleto***

El medio L-15 (Leibovitz) conteniendo L-glutamina fue obtenido de Sigma-Aldrich, y preparado según las instrucciones del suministrador. Tras esterilizarlo mediante filtración (0.22 μm), añadimos 100 unidades/ml de penicilina G, 0.1 mg/ml de sulfato de estreptomycin y 0.25 mg/ml de anfotericina B (10 ml/l de solución antibiótica antimicótica 100x, Sigma-Aldrich). El pH final fue ajustado a 7.2.

Solución lipídica

La solución lipídica fue preparada disolviendo en agua bidestilada estéril 1.6 mg/ml de L- α -lecitina de yema de huevo deshidratada (L- α -fosfatidilcolina, Sigma-Aldrich) y 0.8 mg/ml de Tween-80 (polioxietileno sorbitán monooleato, Sigma-Aldrich), tal como fue descrito por Soldo y Merlin (1972).

Medio L-15 completo estándar (salinidad del 10%)

Para preparar 1 l de medio, cada vial de medio L-15 (Leibovitz) concentrado (Sigma-Aldrich) fue disuelto en 640 ml de agua bidestilada estéril, y añadimos 90 mg de adenosina, 90 mg de histidina, 90 mg de uridina, 150 mg de guanosina y 5 g de glucosa (todos de Sigma-Aldrich). Posteriormente, añadimos 250 ml de la solución lipídica (ver apartado anterior) y la mezcla fue esterilizada por filtración (0.22 μm). Tras filtrar, y en condiciones estériles, el medio fue suplementado con 100 ml de suero fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich; concentración final del 10%) previamente inactivado por incubación durante 30 minutos a 56 °C. Finalmente, fueron añadidos también 10 ml de solución antibiótica antimicótica 100x.

En los experimentos que realizamos para identificar el pH óptimo del medio, éste fue ajustado a 6.2, 7.2 u 8.2 con NaOH 1 N o HCl 1 N y los medios

fueron esterilizados posteriormente por filtración usando filtros de jeringuilla Millex-GS (0.22 μm ; Millipore, EE.UU.). En los otros experimentos, el pH fue 7.2.

Medio L-15 completo salino (salinidad del 27‰)

Este medio fue preparado del mismo modo que el medio L-15 completo estándar, pero con la adición de NaCl (Sigma-Aldrich) para alcanzar el 27‰ de salinidad. Fue medida la salinidad con un conductímetro Multiline P4 equipado con una célula de conductividad TetraCon[®] 325 (WTW, Alemania). En los experimentos para identificar el pH óptimo del medio, el pH fue ajustado como hemos descrito para el medio L-15 completo estándar.

Experimentos de cultivo *in vitro*

En todos los experimentos fueron empleadas placas de poliestireno estériles de 24 pocillos (Iwaki) con 0.5 ml de medio por pocillo (relación superficie:volumen 4 cm^2/ml). Tras cultivar las placas con *P. dicentrarchi*, fueron introducidas en incubadores de baja temperatura (Selecta, España) a la temperatura seleccionada para cada experimento (13, 18 ó 23 °C). Los ciliados fueron contados a las 24, 48, 72, 120, 168, 216 y 264 horas tras el cultivo. Antes de contarlos, los ciliados de cada pocillo fueron fijados durante 10 minutos con glutaraldehído (concentración final del 0.25%). Los ensayos que detallamos a continuación fueron realizados por triplicado.

Determinación de la dosis óptima para el cultivo

Para determinar la dosis óptima para el cultivo, evaluamos el crecimiento de cultivos sembrados con 20, 200, 2.000, 5.000, 10.000 ó 20.000 células/ml. Estos experimentos fueron realizados en medio L-15 completo estándar (salinidad del 10‰, pH 7.2) a 18 °C.

Determinación de la temperatura, el pH y la salinidad óptimos

Para determinar la temperatura, el pH y la salinidad óptimos, evaluamos el crecimiento en seis medios diferentes: medio L-15 completo estándar (salinidad del 10‰) a pH 6.2, 7.2 u 8.2, y medio L-15 completo salino (salinidad del 27‰) también a pH 6.2, 7.2 u 8.2. El cultivo se realizó con 500 ciliados/ml (en base a los resultados del experimento anterior). La incubación se hizo a 13, 18 ó 23 °C, que se corresponden aproximadamente con el rango anual observado en las piscifactorías gallegas afectadas por la escuticociliatosis.

Determinación de los requerimientos nutricionales

Para calcular la influencia del FBS y de los lípidos (lecitina y Tween 80) en la proliferación *in vitro* de *P. dicentrarchi*, los ciliados fueron cultivados a una concentración de 500 ciliados/ml en seis medios diferentes, todos con una salinidad del 10‰ y un pH 7.2: (a) Medio L-15 incompleto, (b) medio L-15 conteniendo lípidos sin FBS, (c) medio L-15 conteniendo FBS sin lípidos, (d) medio L-15 conteniendo FBS y lecitina, (e) medio L-15 conteniendo FBS y Tween 80, y (f) medio L-15 conteniendo FBS, Tween 80 y lecitina (medio L-15 completo estándar).

Exposición de los datos

En todos los experimentos, la constante de la tasa de crecimiento en fase exponencial ($k = \ln(N_2/N_1)/(t_2-t_1)$; Sterud, 1998) y la densidad máxima fueron estimadas para cada grupo de condiciones y para cada réplica.

Métodos de estudio de la infección experimental y las posibles rutas de entrada del ciliado en el rodaballo

El peso corporal de los peces estaba en el rango de 20 a 40 g, a excepción de los peces que fueron utilizados en el ensayo de la inoculación nasal, cuyo peso oscilaba entre 400 y 500 g. Antes de los experimentos, los peces fueron aclimatados a las condiciones de nuestro acuario durante 15 días. En todos los casos, los peces fueron mantenidos en tanques de 50 l excepto para los ensayos de inmersión, en los que fueron usados tanques de 15 l.

Fueron estudiadas siete rutas de infección: oral, nasal, rectal, intraperitoneal, intramuscular, periorbital y branquial/dérmica (inmersión). En todos los ensayos fueron usados dos grupos de 10 peces (experimental y control). Antes de la inoculación, los rodaballos fueron anestesiados durante 1-2 minutos con 0.3 ml/l de 2-fenoxietanol (Sigma-Aldrich).

Para la inoculación oral, los peces recibieron por intubación gástrica 400 μ l de solución salina fisiológica (SSF) que contenían 10^6 ciliados.

Para la inoculación nasal y rectal, las dosis respectivas fueron de 1.2×10^5 ciliados en 100 μ l de SSF y de 5×10^4 ciliados en 200 μ l de SSF. Estas dosis fueron administradas usando una jeringuilla hipodérmica con una bola de parafina en la punta para minimizar el daño en los tejidos.

La inoculación intraperitoneal fue intentada primero por inyección en la cavidad abdominal de 200 μ l de SSF que contenían 5×10^4 ciliados; sin embargo, posteriormente en los ensayos para la optimización de la dosis, fueron empleadas dosis de 5×10^4 , 10^4 , 2×10^3 y 4×10^2 ciliados.

La inoculación intramuscular fue llevada a cabo por inyección en la musculatura dorsal de 100 μ l de SSF que contenían 7.5×10^3 ciliados.

Para la inoculación periorbital, se inyectaron 20 μ l de SSF que contenían 1.5×10^3 ciliados en el músculo periorbital.

Los grupos control recibieron una inoculación de SSF sin ciliados.

Los ensayos para la infección experimental por inmersión (inoculación branquial/dérmica) fueron llevados a cabo con la adición de 10^6 ciliados/l a tanques de 15 l que contenían los peces. Se realizaron cuatro ensayos: dos con inmersión durante 24 horas y otros dos con inmersión durante 48 horas. En uno de los ensayos de 24 horas y en otro de 48 horas, las branquias y el opérculo fueron erosionados previamente rozando con un escalpelo, mientras que en los dos ensayos restantes no fue realizada la abrasión. Durante el periodo de contacto, paramos la recirculación del agua. Tras la exposición, fueron transferidos los peces a tanques nuevos con agua libre de ciliados y recirculación. Los grupos control fueron mantenidos en tanques separados sin ciliados.

Todos los peces fueron mantenidos en sus tanques durante 3 semanas tras la inoculación. Los peces que se mantuvieron vivos al final de este periodo fueron matados con una sobredosis de anestésico, y las muestras de fluido ascítico (obtenidas por abdominocentesis tras lavado peritoneal con SSF), de sangre (de la vena caudal), y las secciones histológicas de las branquias, los ojos y los órganos internos (cerebro, intestino, riñón, hígado y bazo) fueron examinadas en busca de ciliados.

Análisis de la respuesta quimiotáctica del ciliado

Los rodaballos (20-40 g) que fueron infectados lo fueron mediante la inoculación intraperitoneal de 200 μ l de solución salina fisiológica (SSF) que contenían 10^4 ciliados. Antes del sangrado de los rodaballos sanos e infectados (ver sección **Quimioatrayentes empleados**), los peces infectados fueron mantenidos en sus tanques durante una semana tras la inoculación.

Los ciliados de un matraz de 150 ml ($1-2 \times 10^5$ células/ml) fueron recogidos por centrifugación a 650 g durante 5 minutos, resuspendidos en medio L-15 incompleto y centrifugados nuevamente en las mismas condiciones que antes.

Repetimos este paso 2 veces. Cultivamos los ciliados durante 24 horas en medio L-15 incompleto. Estos procesos fueron realizados en condiciones de esterilidad.

Quimioatrayentes empleados

Para obtener la sangre de los rodaballos, los peces normales e infectados fueron sangrados mediante la punción de la vena caudal. Tras la adición de la heparina (4 mg/ml, 1 volumen de heparina a 10 volúmenes de sangre), la sangre fue centrifugada a 1.000 g durante 5 minutos, y posteriormente resuspendida en medio L-15 incompleto a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. El suero de rodaballo (de peces normales e infectados; SRN y SRI respectivamente) fue separado por centrifugación de la sangre coagulada a 2.000 g durante 10 minutos.

Las células del bazo y del riñón fueron obtenidas como fue previamente descrito por Leiro y col. (1995, 1996, 2000a). Para ello, los bazos y los riñones fueron extraídos mediante disección tras la anestesia de los rodaballos durante 1-2 minutos con 0.3 ml/l de 2-fenoxietanol (Sigma-Aldrich). A continuación, los órganos fueron disgregados mediante frotación a través de una malla de acero en medio L-15 incompleto y, tras la homogeneización de la suspensión celular mediante varios pasos por una pipeta Pasteur, la muestra fue filtrada a través de una malla acrílica de 80 μm de tamaño de poro para eliminar el tejido no disgregado. Las células fueron ajustadas en medio L-15 incompleto a una concentración de 2.5×10^6 células/ml.

La bacteria *Listonella anguillarum* ATCC 19264 fue cultivada en placas de medio agar tripticosa soja (DIFCO) conteniendo un 1% de NaCl. Las bacterias fueron recogidas por lavados con medio L-15 incompleto, y la concentración bacteriana fue ajustada a una concentración de 2.5×10^6 células/ml en medio L-15 incompleto.

Ensayos quimiotácticos

El ensayo en placa de cultivo con tubos capilares usado para la investigación de las respuestas quimiotácticas de *P. dicentrarchi* se muestra esquemáticamente en la Figura 17. El ensayo fue realizado en placas estériles de 96 pocillos de fondo plano (Sterilin, Reino Unido) usando un tubo capilar de vidrio con forma de U invertida (longitud total: 34 mm; sección interna: 1 mm; así, volumen interno total: 27 μ l) para conectar dos pocillos (A y B). Para ello, fueron introducidos en los pocillos de las placas los tubos capilares, y fueron añadidas a cada pocillo las cantidades siguientes y en el orden en el que se especifica a continuación. En primer lugar, fueron añadidos cuidadosamente a cada pocillo B 200 μ l de una suspensión o una solución del quimioatrayente candidato previamente diluido en medio L-15 incompleto (ver sección anterior), de modo que los tubos capilares se llenaron por capilaridad, y seguidamente fueron añadidos a cada pocillo A 200 μ l de una suspensión de trofozoítos a una concentración de 6×10^4 células/ml (observar la Figura 17).

La adición de la suspensión de trofozoítos a los pocillos A fue realizada sobre la platina del microscopio invertido para evitar mover la placa e inducir el transvase de ciliados del pocillo A al B. Fue comprobado que los pocillos B estaban libres de ciliados moviendo muy lentamente el brazo del microscopio. Hay que hacer notar que el tubo capilar se extiende a través de un capilar vacío que no tiene importancia funcional en el ensayo. La placa fue incubada durante 4 horas a 20 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo, fue evaluada la viabilidad en base a la movilidad de los ciliados usando un microscopio invertido con iluminación de contraste de fases. En primer lugar, fueron retirados los tubos capilares de cada pocillo recogiendo el medio de su interior por aspiración con una pipeta, y recogidos los ciliados de cada pocillo B. Los ciliados de ambos fueron introducidos en tubos eppendorf, donde fueron fijados con glutaraldehído al 1% y a continuación centrifugados a 650 g durante 5 minutos. Finalmente, fue retirada la

práctica totalidad del sobrenadante dejando sólo 20 μl para resuspender el precipitado y el número de células fue determinado empleando un hemocitómetro de Neubauer.

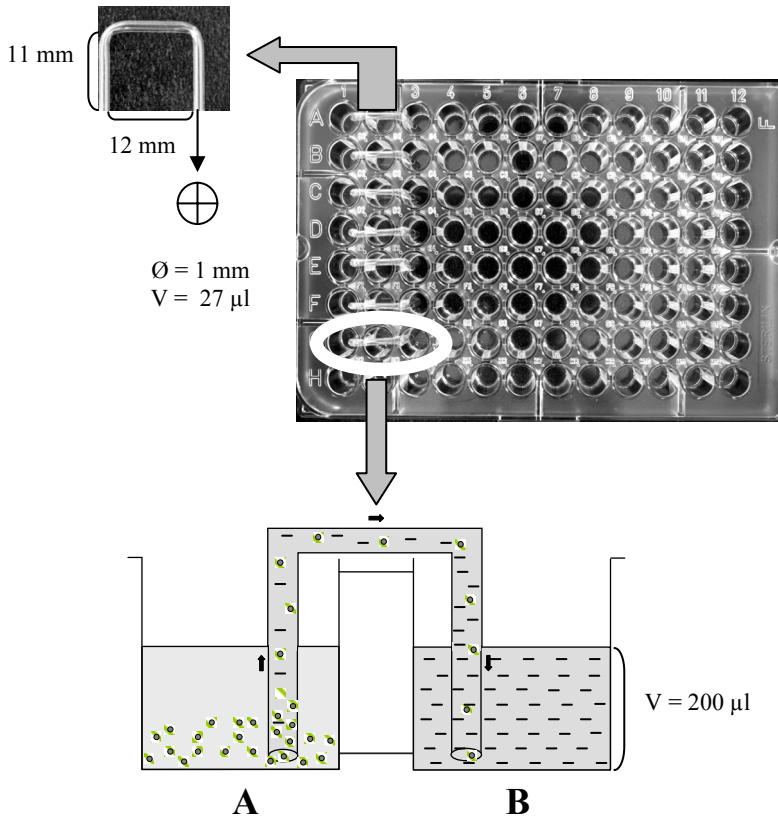


Figura 17. Representación esquemática del ensayo en placa con tubos capilares empleado para estudiar la quimiotaxis de los trofozoítos de *P. dicentrarchi*. Cada ensayo individual usó tres pocillos: el pocillo A conteniendo 200 μl de suspensión de ciliados, el pocillo B conteniendo 200 μl de la solución o la suspensión quimioatrayente, y un tercer pocillo que se deja vacío entre A y B. Los pocillos A y B fueron unidos mediante un tubo capilar con forma de U invertida que permite la migración de los ciliados.

Preparaciones antigénicas, vacunación y ensayos de protección

Preparaciones antigénicas

Lisado de ciliados (LC)

Los ciliados de 2 matraces de 150 ml ($1-2 \times 10^5$ células/ml) fueron recogidos por centrifugación a 650 g durante 5 minutos a 4° C, resuspendidos en medio L-15 incompleto y centrifugados nuevamente en las mismas condiciones que antes. Repetimos este paso 2 veces. A continuación, fueron resuspendidos en 10 ml de PBS conteniendo 0.1 mM de pepstatina A (inhibidor de aspartil proteasas), 0.02 mM de L-trans-epoxisuccinil-leucil-amido (4-guanidino) butano (E-64) (inhibidor de cisteín proteasas), 1 mM de fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF) (inhibidor de serín proteasas) y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (inhibidor de metaloproteasas) (todos de Sigma-Aldrich), y lisados ultrasónicamente en un sonicador Branson W-250 (Branson Ultrasonic Corporation, EE.UU.) sobre hielo: hicimos 8 ciclos de sonicación de 10 pulsos cada uno usando un 50% de *duty cycle* e intensidad de salida de 4. Entre cada ciclo dejamos reposar 1 minuto en hielo y fue importante que la punta del sonicador llegase bien abajo en el tubo para que existiese también rotura en el fondo. Comprobamos que no quedaron ciliados por romper observando una pequeña alícuota del homogeneizado al microscopio de contraste de fases. El lisado resultante (LC) fue alicuotado y guardado a -80 °C.

Extracto crudo (EC)

Este extracto fue obtenido por centrifugación de la muestra del lisado de ciliados (LC) a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante (EC) fue alicuotado y congelado a -80 °C.

Fracción antigénica ciliar (AC)

Los ciliados *P. dicentrarchi* fueron desciliados empleando un método similar al que describieron Dickerson y col. (1989). Para ello, los ciliados procedentes del cultivo axénico (150 ml; $1-2 \times 10^5$ ciliados/ml) fueron concentrados mediante centrifugación a 650 g durante 5 minutos a 4 °C. El sedimento de ciliados fue resuspendido rápidamente en 5 ml de tampón de desciliación -12.5 mM de acetato sódico, 6% v/v de etanol y 3 mM de fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF), pH 7.5- previamente mantenidos en hielo, y los ciliados fueron pasados a un tubo de 20 ml colocado sobre hielo. A continuación, rápidamente y en todos los casos en hielo, la suspensión fue pasada 10 veces por una jeringuilla de 5 ml con una aguja hipodérmica de 18-gauge y fue comprobada la desciliación con el microscopio de contraste de fases (40x). La suspensión resultante fue pasada a un tubo de 15 ml y centrifugada a 1.000 g durante 7 minutos a 4 °C en una centrifugadora con cestillos basculantes. Fue cogido el sobrenadante conteniendo los cilios, con cuidado de no coger zona mucosa del fondo del tubo, transferido a otro tubo de 15 ml y vuelto a centrifugar a 1.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Los cilios del sobrenadante resultante fueron concentrados por centrifugación a 16.000 g durante 15 minutos a 4 °C, tras los que fue rechazado el sobrenadante. Los precipitados ciliares resultantes (la fracción antigénica ciliar, AC) fueron resuspendidos en 2 ml de tampón de estabilización enfriado en hielo (5 mM de MgSO₄, 0.5 mM de EDTA, 100 mM de KCl, 10 mM de HEPES, pH 7.4) y centrifugados a 16.000 g durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, el sedimento ciliar fue resuspendido en 0.5 ml de tampón de estabilización frío, alicuotado y guardado a -80 °C.

Proteínas integrales de la membrana (PM)

Las proteínas asociadas a la membrana de los ciliados fueron extraídas por separación de fases en una solución de Tritón X-114 siguiendo un método similar

al que describieron Bordier (1981) y Dickenson y col. (1989). Concretamente, fueron centrifugados 150 ml de cultivo axénico de ciliados ($1-2 \times 10^5$ ciliados/ml) a 650 g durante 5 minutos a 4 °C, fue eliminado por vacío el sobrenadante del cultivo, fueron resuspendidos los ciliados en 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 enfriado en hielo, y rápidamente fue pasada la suspensión a un tubo de 15 ml colocado en hielo. A continuación, fue añadido 1 ml de tampón de extracción (300 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, 2% v/v de Tritón X-114, pH 7.5) enfriado en hielo, mezclamos bien e incubamos en hielo durante 10 minutos. El contenido fue repartido en 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml para eliminar los elementos del citoesqueleto por centrifugación a 16.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes fueron transferidos cuidadosamente a otros 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml y calentados durante 5 minutos a 37 °C. Al final de este periodo, la solución apareció turbia como resultado de la condensación micelar del detergente. La muestra fue dividida en tubos de 0.5 ml (200 µl/tubo) que contenían 300 µl de un *colchón* de sacarosa (6% p/v de sacarosa en 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 0.06% v/v de Tritón X-114, pH 7.5) que fueron mantenidos sumergidos parcialmente en agua a 37 °C. La adición de la muestra fue hecha de forma muy suave para no alterar el *colchón* de sacarosa. Posteriormente, fueron separadas las fases detergente y acuosa por centrifugación a 300 g durante 4 minutos a temperatura ambiente en una centrifugadora con cestillos basculantes, tras la cual la fase detergente apareció como un sedimento turbio en el fondo del tubo. Los sobrenadantes (fase acuosa) que descansaban sobre el *colchón* de sacarosa fueron extraídos evitando alterar dicho *colchón* y mezclados en tubos de 1.5 ml colocados en hielo. A continuación, fue repetida la extracción añadiendo a la mezcla acuosa Tritón X-114 hasta alcanzar una concentración final del 0.5% (v/v) (7 µl para cada 1200-1400 µl de mezcla) y fue mantenida la mezcla en hielo durante 2 minutos. Nuevamente fue calentada a 37 °C durante 5 minutos y luego, tras la condensación micelar, distribuida entre los tubos originales que contenían el *colchón* de sacarosa

y el sedimento (fase detergente) que fue separado en la primera extracción. Los tubos fueron centrifugados nuevamente a 300 g durante 4 minutos a temperatura ambiente, fueron aspirados el sobrenadante y el *colchón* de sacarosa de los tubos, dejando la fase detergente del fondo de los tubos (aproximadamente 30-50 μ l de volumen por tubo). Las proteínas contenidas en la fase detergente fueron precipitadas, añadiendo 9 volúmenes de acetona fría (aproximadamente 360 μ l/tubo), resuspendiendo en un agitador e incubando en hielo durante 30 minutos. Al finalizar los 30 minutos, las proteínas precipitadas fueron aisladas mediante centrifugación a 16.000 g durante 15 minutos a 4 °C, fue aspirada la acetona y el sedimento fue desecado por vacío en un concentrador Speed Vac (Savant, EE.UU.) durante 12-24 horas. Al final, los extractos obtenidos fueron resuspendidos en 1 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, alícuotados y guardados a -80 °C.

Ciliados fijados en formalina (CFF)

Los ciliados en cultivo axénico (150 ml; $1-2 \times 10^5$ ciliados/ml) fueron recogidos por centrifugación a 650 g durante 5 minutos, resuspendidos en formalina al 1% en PBS y fijados durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras este periodo, los ciliados fueron centrifugados con las mismas condiciones antes expuestas y lavados 3 veces por centrifugación y resuspensión en PBS (650 g, 5 minutos). Finalmente, fueron resuspendidos los ciliados en PBS, contados en un hemocitómetro de Neubauer y la concentración de la suspensión fue ajustada a la densidad de ciliados apropiada para los experimentos de inmunización (ver más adelante).

Determinación de la concentración proteínica

El contenido proteínico de las diferentes preparaciones antigénicas que fueron usadas, excepto para los ciliados fijados en formalina, fue determinado por el método de Bradford (1976), usando el reactivo comercial BioRad Protein Assay

(BioRad Laboratories, Alemania). Para hacer la curva de calibrado empleamos seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) como proteína estándar.

Inmunización, obtención de los sueros e infección de los rodaballos

Inmunización

Rodaballos jóvenes sanos de 30-40 g de peso fueron inmunizados con (a) una relación 1:1 (v/v) de una emulsión de adyuvante completo de Freund (ACF; Sigma-Aldrich) y lisado de ciliados (grupo D, $n = 19$), (b) lisado de ciliados sin ACF (grupo E, $n = 19$), (c) ciliados fijados en formalina en PBS (grupo F, $n = 19$), (d) sólo PBS como control negativo (grupo G, $n = 19$). Cada rodaballo fue inmunizado con una inyección intraperitoneal de 200 μ l de la correspondiente emulsión, solución o suspensión. Los peces de los grupos D y E recibieron 400 μ g de antígeno cada uno, mientras que los peces del grupo F recibieron 3×10^5 ciliados fijados en formalina/pez. El día 30 postinoculación, los peces de cada grupo recibieron una inyección intraperitoneal de recuerdo con la dosis antigénica inicial (sólo PBS en el grupo G). En el grupo D, la inyección de recuerdo fue lisado de ciliados sin ACF. En todos los casos, los peces fueron mantenidos en tanques de 50 l con aireación y recirculación de agua constantes (agua de mar, salinidad del 28-30‰, temperatura 17-18 °C) durante los experimentos.

Obtención de los sueros

Nosotros analizamos 10 sueros de rodaballos jóvenes sanos (30-40 g) (grupo A), 5 de rodaballos adultos (0.7-1 kg) que mostraban escuticociliatosis en el momento de la extracción sanguínea (grupo B), y otros 5 de rodaballos adultos (0.7-1 kg) que sobrevivieron a brotes naturales de escuticociliatosis (grupo C). En los dos últimos grupos, el agente causante de la enfermedad fue identificado como *P. dicentrarchi*.

Además de estos sueros, todos los peces de los experimentos de inmunización descritos con anterioridad (grupos D, E, F y G) fueron sangrados para obtener una pequeña muestra de suero el día 0 (justo antes de la inoculación), el día 30 (justo antes de la dosis de recuerdo) y el día 60 (justo antes de la infección). Estos sueros fueron analizados mediante ensayos de inmovilización/aglutinación, ELISA y *Western blot* para observar el progreso de la respuesta anti-*Philasterides* (ver sección **Ensayos para la cuantificación y la caracterización de la respuesta inmunitaria adaptativa**).

En todos los casos la sangre fue extraída de la vena caudal y el suero guardado a -80 °C.

Infección

Treinta días tras la inyección de recuerdo, es decir, sesenta días tras la primera inmunización, los peces de los grupos D, E, F y G fueron infectados intraperitonealmente con 200 µl/pez de medio L-15 incompleto conteniendo 5×10^5 ciliados infectivos procedentes del cultivo axénico. En ausencia de inmunidad, este protocolo mató todos los peces en 3 semanas (ver Tabla 8: Resultados). Los peces fueron observados diariamente en busca de signos clínicos de infección y mortalidad. A los peces que murieron durante el experimento y a los que lograron sobrevivir 4 semanas tras la infección, les realizamos una necropsia para confirmar la presencia o la ausencia de ciliados en los órganos y los tejidos.

Inmunización y obtención de los sueros de los ratones

Fueron conseguidos sueros policlonales de ratón frente al lisado de ciliados (suero anti-LC), a la fracción antigénica ciliar (suero anti-AC) y frente a las proteínas integrales de la membrana (suero anti-PM). En cada caso, fueron inoculadas 6 hembras de ratón BALB/c mediante una inyección intraperitoneal con 200 µl/ratón de una emulsión preparada con la correspondiente preparación

antigénica y ACF (relación 1:1 v/v). La cantidad total de proteína administrada a cada ratón fue de 50 µg para el lisado de ciliados, y de 20 µg para el antígeno ciliar y las proteínas de la membrana. Los ratones fueron reinoculados el día 28 con la misma dosis de antígeno, igualmente por inyección intraperitoneal, pero en esta ocasión sin ACF. Los ratones fueron sangrados el día 0 (suero preinmune: control negativo) y nuevamente el día 14 postrecordatorio. Los sueros fueron almacenados a -80 °C hasta el análisis.

Ensayos para la cuantificación y la caracterización de la respuesta inmunitaria adaptativa

Ensayo de inmovilización/aglutinación

Los ciliados en cultivo fueron lavados 3 veces en medio L-15 incompleto por centrifugación a 650 g durante 5 minutos y posterior resuspensión, y ajustados a una concentración de 10^5 ciliados/ml antes de ser incubados con los diferentes sueros de ratón y rodaballo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Iwaki). Para ello, todos los sueros fueron inactivados por calor (56 °C durante 30 minutos) y ensayados por duplicado con diluciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640 en medio L-15 incompleto (100 µl/pocillo). Tras añadir 10 µl de ciliados a los pocillos que contienen los sueros (10^3 ciliados/pocillo), las placas fueron incubadas a 18 °C y controladas cada 5 minutos durante 2 horas para observar las respuestas de inmovilización/aglutinación. Para ello, fue empleado un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Japón). En todos los casos, fue incluido un control negativo de ciliados en medio L-15 incompleto, en ausencia de suero. El título de cada suero fue la última dilución en la cual observamos reacción de aglutinación.

ELISA doble indirecto

Para la detección de anticuerpos de rodaballo contra el extracto crudo (EC) y la fracción antigénica ciliar (AC) de *P. dicentrarchi*, fueron testados los sueros usando un ELISA doble indirecto similar al descrito por Estévez (1993). Para el EC, el fondo de los pocillos de las placas de ELISA (Iwaki) fue cubierto directamente con antígeno diluido apropiadamente en tampón de acoplamiento $\text{CO}_3\text{Na}_2/\text{CO}_3\text{HNa}$ 50 mM (carbonato sódico 0.015 M/bicarbonato sódico 0.035 M, 0.05% p/v de azida sódica, pH 9.6) durante una noche a 4 °C. Donde se iba a analizar la AC, el fondo de los pocillos fue incubado previamente con 100 μl /pocillo de una solución 0.01 mg/ml de poli-L-lisina en agua durante 2 horas a 37 °C, tras las que fueron lavados 3 veces con tampón Tris salino (TBS; 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7.4). A continuación, fue cubierto el fondo de los pocillos con antígeno diluido apropiadamente en tampón de acoplamiento $\text{CO}_3\text{Na}_2/\text{CO}_3\text{HNa}$ 50 mM y dejamos incubar durante una noche a 4 °C, procediendo a lavar a continuación 5 veces con TBS. Finalmente, fueron añadidos 100 μl /pocillo de una solución de glutaraldehído al 0.25% en TBS y dejamos incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. En ambos casos (EC y AC), fueron añadidos 100 μl de tampón de acoplamiento/pocillo conteniendo 1 μg de antígeno (1 μg de antígeno/pocillo). Tras el acoplamiento, las placas fueron lavadas 5 veces con TBS que contenía un 0.05% de Tween-20 (TBS-T₁) y bloqueadas durante 2 horas a 37 °C con TBS que contenía un 0.2% de Tween-20 (TBS-T₂) al que le fue añadido un 5% de leche desnatada. A continuación, fue añadido el anticuerpo primario (dilución 1:50, 100 μl /pocillo) en tampón TBS-T₂ conteniendo un 1% de leche desnatada, y dejamos incubar durante 2 horas a 37 °C. Entre cada paso, fueron efectuados 5 lavados de las placas con TBS-T₁. Los anticuerpos unidos fueron reconocidos usando el anticuerpo monoclonal anti-rodaballo UR3 obtenido en ratón (Estévez y col., 1994) diluido 1:1000 en TBS-T₂ que contenía un 1% de leche desnatada (100 μl /pocillo), dejando incubar durante 2 horas a 37 °C

tras las que fueron lavadas las placas cinco veces con TBS-T₁. A continuación, fueron añadidos 100 µl/pocillo de una dilución 1:2000 en tampón TBS-T₂ suplementado con un 1% de leche desnatada de un suero policlonal anti-inmunoglobulinas totales de ratón obtenido en conejo y conjugado con peroxidasa (DAKO; Dakopatts, Glostrup, Dinamarca). Después de incubar las placas durante 1 hora a 37 °C, fueron lavadas con TBS-T₁ (5 lavados) y TBS (5 lavados). Para el revelado, fueron añadidos a cada pocillo 100 µl de un sustrato enzimático que contenía ortofenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) a una concentración 0.4 mg/ml en tampón fosfato-citrato 50 mM, pH 5 (fosfato bisódico 200 mM + ácido cítrico 100 mM) al que le fue añadida agua oxigenada (0.4 µl/ml). La reacción fue detenida a los 30 minutos por la adición de 25 µl de ácido sulfúrico 3 N, y la unión fue cuantificada como la absorbancia a una densidad óptica (D.O.) de 492 nm en un lector de ELISA (Multiscan RC, Labsystems).

Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Las SDS-PAGE fueron realizadas en la unidad Hoefer[®] Mighty Small II SE250 (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas fueron reducidas y desnaturalizadas calentándolas a 100 °C durante 5 minutos en tampón de la muestra reductor (125 mM de Tris-HCl, 4% de SDS, 20% v/v de glicerol, 200 mM de DTT, 0.02% de azul de bromofenol, pH 6.8). Las electroforesis fueron realizadas durante 50 minutos a 200 V en tampón de recorrido (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS, pH 8.3) empleando geles de poliacrilamida al 12.5%. Después de realizada la electroforesis, las proteínas fueron fijadas con una solución preparada a tal efecto (25% de isopropanol, 10% de ácido acético) durante 15-30 minutos, fueron teñidas las bandas proteínicas con azul Coomassie G-250 durante 30 minutos y fue desteñido el gel en la solución preparada para ese fin (7% de ácido acético, 5% de metanol). La solución fue renovada 2-3 veces durante 12-24

horas hasta que el fondo del gel fue completamente transparente, sin tonos azulados. La aplicación de agitación aceleró los procesos.

Como marcadores de peso molecular usamos los estándar de bajo rango preteñidos para SDS-PAGE suministrados por Bio-Rad (111, 73, 47.5, 33.9, 28.8 y 20.5 kD).

Electrotransferencia e inmunorreconocimiento antigénico por anticuerpos (Immunoblot, Western blot)

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 45 μm (membranas PVDF Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) durante 35 minutos a 15 voltios y un valor límite en amperaje de 0.5 A usando un tampón de transferencia (48 mM de Tris-HCl, 39 mM de glicina, 0.0375% de SDS, 20% de metanol, pH 9.2) (Kyhse-Andersen, 1984). La membrana fue teñida con Ponceau S (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos para verificar la correcta transferencia de los fragmentos antigénicos y localizar los marcadores de peso molecular. Tras la tinción, la membrana fue lavada con agua bidestilada abundantemente hasta que el fondo fue prácticamente blanco. Cuando el revelado de la transferencia no se hizo inmediatamente, la membrana fue secada y almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Las membranas de PVDF que contenían las proteínas transferidas fueron cortadas en tiras (cada una contenía las proteínas de un canal electroforético) y los sitios reactivos remanentes sobre la membrana fueron bloqueados en tampón TBS que contenía un 0.2% de Tween-20 (TBS-T₂) y leche desnatada al 5%, durante 2 horas a temperatura ambiente. La adición del anticuerpo primario (suero de ratón o rodaballo) fue hecha en TBS-T₂ a la dilución adecuada (1:50, 1ml), y las tiras fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. En el caso de los sueros de rodaballo, fue empleado un anticuerpo secundario: una dilución 1:500 del anticuerpo monoclonal anti-rodaballo UR3 obtenido en ratón (Estévez y col., 1994)

en TBS-T₂ durante 1 hora a temperatura ambiente. El tampón en el que fueron diluidos los anticuerpos primario y secundario fue suplementado con un 1% de leche desnatada. Entre cada uno de los pasos, las tiras fueron lavadas con TBS-T₁. A continuación, las tiras fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente en una dilución 1:800 de un suero policlonal anti-inmunoglobulinas totales de ratón obtenido en conejo y conjugado a peroxidasa (DAKO; Dakopatts, Glostrup, Dinamarca). La incubación fue realizada en tampón TBS-T₂ con un 1% de leche desnatada. Finalmente, las tiras fueron lavadas, primero con TBS-T₁ (3 lavados) y posteriormente con TBS (2 lavados), y reveladas durante 3 minutos con un sustrato enzimático que contenía un 0.06% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich), un 0.03% de NiCl₂ y un 0.003% de H₂O₂. Una vez revelados los antígenos, la reacción fue parada lavando exhaustivamente con TBS y procedimos a fotografiar las tiras.

Métodos para determinar la capacidad moduladora del ciliado sobre la respuesta inmunitaria innata del rodaballo

Los peces fueron aclimatados durante al menos 15 días en tanques de 10 l. Las muestras de sangre fueron extraídas de los peces anestesiados con 0.3 ml/l de 2-fenoxietanol (Sigma-Aldrich) mediante punción de la vena caudal. El suero fue separado por centrifugación a 2.000 g durante 10 minutos, y almacenado a -20 °C hasta que fue empleado.

Para matar los ciliados, fueron congelados a -70 °C y descongelados rápidamente en un baño de agua a temperatura ambiente.

Estímulos, fármacos y productos químicos

Las células de *Kluyveromyces lactis* (cepa NRRL-41140) fueron cultivadas en extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 2% (medio YPD; Difco,

EE.UU.) a 30 °C con una tasa de crecimiento de 0.07/h, lavadas posteriormente con agua destilada y finalmente congeladas en seco.

La solución *stock* (2 mg/ml) de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y congelada en oscuridad a -80 °C hasta que fue empleada.

La solución *stock* de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich) fue preparada a 10 µg/ml en medio de Eagle modificado por Dulbecco sin rojo fenol (DMEM; Sigma-Aldrich) y almacenada en oscuridad a -20 °C hasta su utilización.

El medio tioglicolato (Merck, Alemania) fue preparado a una concentración del 3% (p/v) en PBS, autoclavado a 121 °C durante 10 minutos y guardado a temperatura ambiente hasta su uso.

El análogo de la arginina *N*^G-monometil-L-arginina monoacetato (L-NMMA; Calbiochem, EE.UU.), el ácido L-ascórbico (Merck) y la azida sódica (Merck) fueron preparados a una concentración 100 mM en DMEM, y almacenados hasta su uso a -20 °C en oscuridad.

La L-glutamina, la sulfanilamida y la naftilendiamina hidrocloreuro fueron obtenidas de Sigma-Aldrich

Estimulación y aislamiento de los leucocitos inflamatorios peritoneales

Las células inflamatorias fueron estimuladas por una inyección intraperitoneal de los peces con 1 ml de medio tioglicolato al 3%, conteniendo en algunos casos 5×10^3 ó 10^5 trofozoítos vivos de *P. dicentrarchi* o 10^5 trofozoítos muertos. Tras cinco días, los peces fueron anestesiados como ha sido indicado anteriormente y fue prolongada la anestesia hasta la muerte. Los leucocitos peritoneales fueron recogidos como fue descrito por Leiro y col. (2001). Para ello, humedecemos la región abdominal de los rodaballos con alcohol de 70° y fueron inyectados con 5-10 ml (dependiendo del tamaño de los peces) de la solución

salina balanceada de Hank (HBSS) sin rojo fenol, que contiene Ca^{2+} y Mg^{2+} , usando una jeringuilla de 10 ml con una aguja de 22-gauge a través de la pared peritoneal. Usando la misma jeringuilla y la misma aguja, fue retirado suavemente el fluido peritoneal de los peces y juntado en tubos de centrifugadora de polipropileno de 50 ml colocados en hielo. La concentración celular fue determinada usando un hemocitómetro de Neubauer y ajustada con HBSS a una concentración de 10^6 células/ml mediante centrifugación a 500 g durante 15 minutos a 4 °C. Alícuotas de 100 μl de la suspensión celular fueron añadidas a los pocillos de las placas de cultivo de 96 pocillos (Corning, EE.UU.) y las dejamos incubar durante 1 hora a 23 °C para permitir la adhesión. Las células que no se adhirieron fueron eliminadas realizando dos lavados con 200 μl /pocillo de HBSS. A continuación, fue añadido el azul tripano (0.4% en PBS) a los pocillos y dejamos incubar la placa durante 3 minutos a temperatura ambiente, tras los que fue contado el número de células viables (no teñidas) y no viables (teñidas). Más del 97% de las células adherentes fueron viables; la mayoría de esas células eran neutrófilos y macrófagos.

Ensayo de la fagocitosis

La actividad fagocítica fue ensayada por el método fluorométrico descrito previamente (Leiro y col. 2000a) usando la levadura *K. lactis* acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma). Para acoplar el FITC, las células de levadura fueron resuspendidas a una concentración de 10^9 células/ml en tampón carbonato sódico-bicarbonato 50 mM, pH 9.5 conteniendo 150 mM de NaCl y 40 mg de FITC. Tras la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, la suspensión de levaduras fue centrifugada a 10.000 g durante 5 minutos varias veces, desechando cada vez el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en PBS, hasta que la fluorescencia en el sobrenadante llegó a cero. Para el ensayo, fueron añadidas alícuotas de 100 μl de HBSS conteniendo 10^6 células de levadura marcadas con FITC y (dependiendo del experimento) un 10% de suero de

rodaballo normal (SRN) o de suero de rodaballo infectado (SRI) a cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos, a los cuales fueron acoplados los leucocitos peritoneales de rodaballo (10^5 por pocillo) como ha sido descrito previamente (**Estimulación y aislamiento de los leucocitos inflamatorios peritoneales**), y fueron incubadas bajo las condiciones óptimas para la fagocitosis -temperatura (22 °C), tiempo de incubación (140 minutos) y 5% de CO₂- descritas anteriormente por Leiro y col. (1995). Tras la incubación, los pocillos fueron lavados varias veces con PBS, y las células fueron solubilizadas por adición de 100 µl de Tris-HCl, pH 8.5 conteniendo un 0.2% de dodecil sulfato sódico (SDS). La fluorescencia fue medida en un lector de fluorescencia para placas (Bio-Tek Instruments, Reino Unido) con un filtro de excitación de 490 nm y de emisión de 525 nm.

Ensayos de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Cuantificación de la liberación extracelular de ROS

El reactivo fluorogénico OxyBURST[®] Green H₂HFF BSA (Molecular Probes, Holanda) fue usado para la detección de la liberación extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales (Ryan y col., 1990) de rodaballo. Este reactivo está compuesto de seroalbúmina bovina (BSA) acoplada a dihidro-2',4,5,6,7,7'-hexafluorofluoresceína (H₂HFF), que se vuelve fluorescente al oxidarse. La BSA es una proteína grande, de modo que el reactivo no atraviesa la membrana celular, asegurando la detección sólo de los oxidantes extracelulares. Para el ensayo, fueron incubados 100 µl de leucocitos (10^6 células/ml) con 10 µg/ml de OxyBURST[®] Green H₂HFF BSA durante 2 minutos a 23 °C tras ser estimulados por la adición de 10 µg/ml de PMA. En algunos ensayos, el medio contenía un 10% de SRN o de SRI, o ácido L-ascórbico (1 mM) (para inhibir la producción extracelular de ROS). La emisión de fluorescencia fue determinada en un lector de fluorescencia para placas (Bio-Tek Instruments, Reino Unido) con un filtro de excitación de 488 nm y

de detección de 530 nm durante 55 minutos. Los resultados son expresados como el incremento de la fluorescencia (unidades arbitrarias) por minuto.

Cuantificación de la liberación intracelular de ROS

Para la detección de la producción intracelular de ROS por los leucocitos peritoneales de rodaballo, nosotros usamos el amino-reactivo fluorogénico OxyBURST[®] Green H₂DCFDA succinimidy ester (Molecular Probes, Holanda). Tras la conjugación a aminos, los acetatos de este reactivo son eliminados mediante tratamiento con hidroxilamina para producir el conjugado H₂DCF. Como la mitad del H₂DCF no es fluorescente hasta que se oxida a diclorofluoresceína cuando las partículas conjugadas son interiorizadas dentro de la vacuola fagocítica, este reactivo es particularmente apropiado para detectar la explosión respiratoria intracelular en las células fagocíticas (Cao y col., 1993) de rodaballo. Para marcar la levadura *K. lactis*, fueron añadidos 100 µl del reactivo OxyBURST[®] Green H₂DCFDA succinimidy ester (10 mg/ml en DMSO) a una suspensión de 10 mg de levaduras en 1 ml de tampón borato 0.05 M, pH 8.3, y fueron incubadas durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente con agitación continua suave. Para eliminar los acetatos, fueron añadidos a la mezcla anterior 0.1 ml de hidroxilamina 1.5 M, pH 8.5, y dejamos incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y posteriormente toda la noche a 4 °C sin agitación. Para finalizar, el conjugado fue separado del reactivo que no reaccionó mediante repetidas centrifugaciones en PBS a 10.000 g durante 3 minutos hasta que la fluorescencia del sobrenadante cayó hasta cero. Las levaduras fueron guardadas en oscuridad a 4 °C en PBS que contenía un 0.01% de azida sódica. Para el ensayo, los leucocitos (100 µl, 10⁶ células/ml) fueron incubados con las levaduras *K. lactis* marcadas (previamente centrifugadas a 10.000 g durante 3 minutos para eliminar la azida sódica) a una relación leucocito:levadura 1:85 durante 1 hora a 23 °C. En algunos ensayos el medio contenía un 10% de SRN o de SRI, o azida sódica (1 mM) (para

inhibir la producción intracelular de ROS). La emisión de fluorescencia fue determinada en un lector de fluorescencia para placas (Bio-Tek Instruments, Reino Unido) con un filtro de excitación de 488 nm y de detección de 530 nm durante 55 minutos. Los resultados son expresados como el incremento de la fluorescencia (unidades arbitrarias) por minuto.

Ensayo de la producción de nitrito

Alícuotas de 100 μ l de los leucocitos peritoneales de rodaballo que fueron preestimulados *in vivo* por la inyección de 10^5 trofozoítos de *P. dicentrarchi* en medio tioglicolato al 3%, fueron incubadas en placas de cultivo de 96 pocillos (Corning, EE.UU.) a 23 °C en atmósfera de CO₂ (5%) durante 48 horas en DMEM sin rojo fenol que contenía 2 mM de L-glutamina y 100 ng/ml de LPS. En algunos pocillos, fueron incluidos en el medio el análogo de la arginina L-NMMA (250 μ M), que compete con ella en la síntesis de NO[•], o un 10% de SRN o de SRI.

La producción de nitrito en el sobrenadante de los cultivos fue ensayada por la reacción de Griess (Green y col., 1982), mediante la medición de la cantidad total de óxido nítrico inorgánico (NO[•]). Las alícuotas (100 μ l, 10^6 células/ml) fueron incubadas con un volumen igual de reactivo de Griess (1% de sulfanilamida y 0.1% de naftilendiamina hidrocloreuro en H₃PO₄ al 2.5%) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente fue medida la absorbancia a 530 nm en un lector de ELISA (Titertek Multiscan, Flow Laboratories, Finlandia). La concentración de nitrito fue calculada con referencia a una curva patrón obtenida usando NaNO₂ (1-200 μ M en medio de cultivo).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el presente estudio han sido analizados mediante:

- Análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test de Tukey-Kramer para múltiples comparaciones.
- El test de la t de Student para dos comparaciones.

El grado de significación (α) seleccionado para las estimaciones estadísticas es 0.05.

Resultados

Descripción del ciliado y patología

Descripción del ciliado

Los ciliados son alargados y fusiformes, con un extremo anterior (apical) puntiagudo y un extremo posterior (antiapical) redondeado, una vacuola contráctil posterior y un cilio caudal más largo que los cilios somáticos en el polo antiapical (Figuras 18A, B; las medidas se muestran en la Tabla 2). En mitad del cuerpo presentan un macronúcleo globular y un micronúcleo asociado (Figura 18C). Los organismos son altamente elásticos en su totalidad, permitiéndoles penetrar y moverse con facilidad a través de los tejidos del hospedador y de los vasos sanguíneos. En general, los ciliados de los rodaballos enfermos muestran abundantes células detriticas dentro de sus vacuolas digestivas, en muchos casos compatibles con eritrocitos (Figura 18D). Las infraciliaturas somática y oral se muestran en las Figuras 18E, F y 19A, B. La ciliatura somática está constituida por 13 ó 14 cinetias bipolares formadas por 24 a 36 cinétidas, que son bicinétidas en las 2/3 partes anteriores del cuerpo. Una línea meridiano-directora no ciliada se encuentra localizada entre la primera y la última cinetia, y comienza justo posteriormente al escútica (4 a 6 cinétidas no cilíferas) y se fusiona con la primera cinetia en el extremo posterior. El citoprocto se puede distinguir en el extremo subterminal de este meridiano-director. En el extremo antiapical presentan una fibra circular polar que conecta todos las cinetias excepto la última, circundando el complejo cuerpo-basal polar. Otra fibra de la última cinetia continúa, pasando a través del complejo cuerpo-basal polar, hasta su contacto con la fibra circular polar a nivel de las cinetias 7 u 8. El poro de la vacuola contráctil se abre en el extremo posterior de la segunda cinetia.

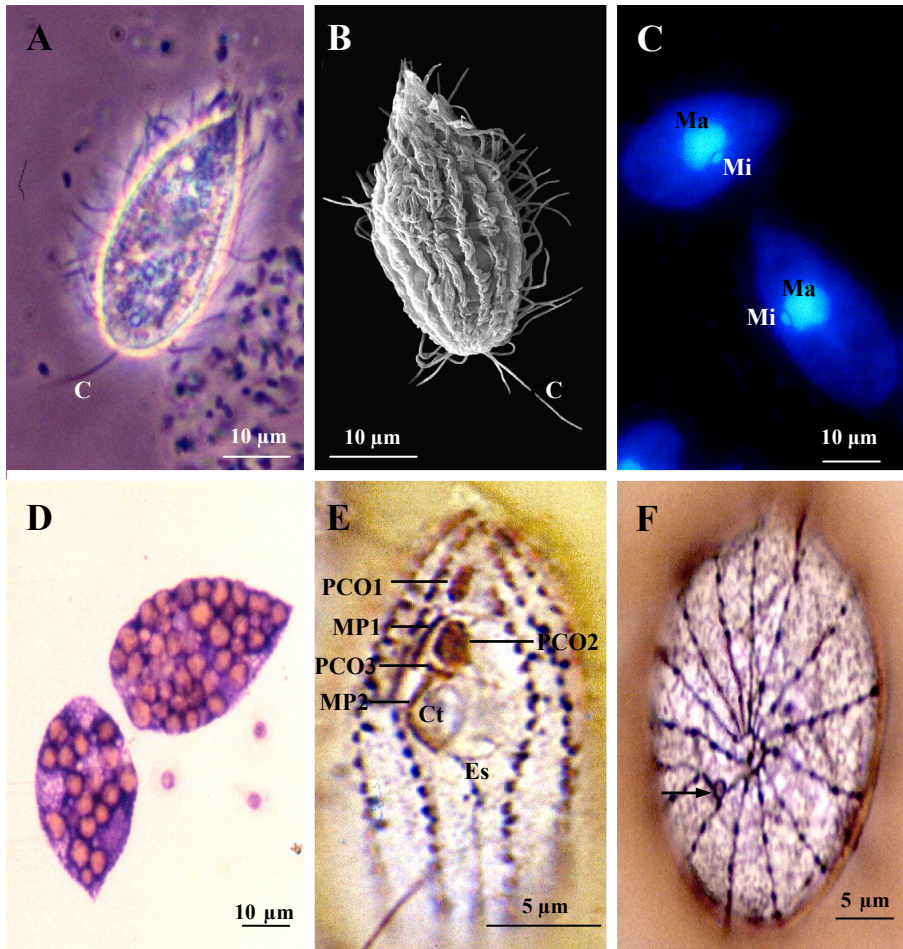


Figura 18. Características morfológicas de *Philasterides dicentrarchi* de rodaballos en cultivo. (A) Ciliado observado bajo microscopía de contraste de fases, que muestra el largo cilio caudal (c) en el extremo posterior. (B) Microfotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido del ciliado con el cilio caudal (c). (C) Aparato nuclear del ciliado compuesto por el macronúcleo (Ma) y el micronúcleo (Mi) teñidos con DAPI. (D) Frotis de ascitis que contiene ciliados teñidos con Giemsa. Observar las abundantes células rojas sanguíneas en los ciliados. (E) Ciliado tras la impregnación con nitrato de plata que muestra el aparato bucal compuesto por la membrana paraoral (MP) con sus 2 partes MP1 y MP2 separadas por un estrecho espacio, las 3 policinétidas orales (PCO1, PCO2 y PCO3) y el citostoma (Ct), así como el escutica (Es). (F) Detalle del extremo posterior de un ciliado impregnado con nitrato de plata. Puede observarse la fibra polar circular en el centro y el poro (flecha) de la vacuola contráctil en la base de la segunda cinetia somática.

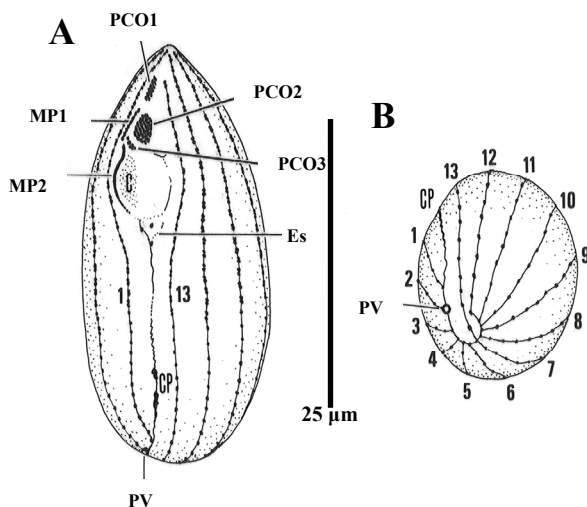


Figura 19. Dibujos esquemáticos de *Philasterides dicentrarchi*, que causa escuticociliatosis en los rodaballos en cultivo, tras la impregnación con nitrato de plata. (A) Infraciliaturas somática y oral del ciliado en vista longitudinal. Las cinetias 1 y 13 están numeradas. (B) Detalle de la infraciliatura somática y las líneas argentofílicas en el extremo posterior del ciliado. Las cinetias están numeradas de la 1 a la 13. C: citostoma; CP: citoprocto; PCO1, 2, 3: policinétidas orales 1, 2 y 3; MP1, 2: partes 1 y 2 de la membrana paraoral; Es: escutica; PV: poro de la vacuola contráctil.

La cavidad bucal ocupa entre la mitad y el tercio anterior del cuerpo (la media de la relación longitud de la cavidad bucal/longitud corporal es de 0.43; el rango varía entre 0.35 y 0.48). El aparato bucal está formado por la membrana paraoral, compuesta por dos partes (MP1 y MP2) separadas por un estrecho espacio, y tres policinétidas orales (PCO1, PCO2 y PCO3). La MP1, con 8 cinetosomas dispuestos en línea ligeramente curva, se extiende hacia atrás una pequeña distancia desde poco antes del extremo anterior de la PCO2 hasta aproximadamente la mitad de la PCO3. La MP2, con múltiples cinetosomas dispuestos en línea curva, se extiende desde el extremo posterior de la PCO3 hasta el final de la cavidad bucal, rodeándola. La PCO1 es alargada con dos filas longitudinales de 5-6 cinetosomas, la PCO2 tiene forma trapezoidal con cuatro filas longitudinales de 5-6 cinetosomas, y la PCO3 es ancha y corta, ligeramente curva, con 1-2 filas transversales de cinetosomas.

La división de produce en condición activa por fisión homotetogénica monotómica: en ninguna fase, ni durante la infección ni durante el cultivo *in vitro*, fue observada la formación de quistes. Las etapas iniciales de la estomatogénesis observadas en algunos ciliados revelaban cambios importantes en la organización y el número de cinetosomas en la MP2, y en el área del escútica (los datos no se muestran).

Tabla 2. Datos biométricos de los ciliados impregnados con nitrato de plata obtenidos de los rodaballos con escuticociliatosis. Las medidas están expresadas en μm .

MP: membrana paraoral; PCO: policinétidas orales.

Carácter	Media	D.E.	Mín	Máx
Longitud corporal	33.6	4.2	25	43
Anchura corporal	19.5	3	15	28
Longitud del cilio caudal ^a	10.7	1.1	8.7	13
Dist. polo apical-ext. post. MP2 ^b	15	1.7	11	18
Dist. polo apical-ext. ant. PCO1	3.4	0.6	2.5	5
Longitud de la PCO1	2.6	0.3	2	3
Anchura de la PCO1	1	0.1	1	1.3
Longitud de la PCO2	3	0.1	2.7	3.5
Anchura de la PCO2	2	0.2	1.5	2.5
Longitud de la PCO3	0.9	0.1	0.7	1
Anchura de la PCO3	1.7	0.1	1.5	2
Distancia entre PCO1 y PCO2	1.3	0.2	1	1.7
Distancia entre PCO2 y PCO3	0.4	0.1	0.3	0.7
Longitud de la MP1	3.9	0.2	3.5	4.5
Longitud de la MP2	5	0.5	4	6
Diámetro largo del macronúcleo	7	1	5	9
Diámetro corto del macronúcleo	5.4	0.7	4	7
Diámetro largo del micronúcleo	2.1	0.3	2	3
Diámetro corto del micronúcleo	1.4	0.5	1	2

^a Medidas en ciliados fijados (glutaraldehído al 2.5%) no teñidos.

^b Longitud de la cavidad bucal.

Signos clínicos y patología

Durante el primer brote infeccioso, observamos que los rodaballos mostraban abundantes úlceras cutáneas hemorrágicas que se extendían a la musculatura subyacente (especialmente en el área del opérculo). Exámenes microscópicos de los frotis de la superficie de estas úlceras revelaban la presencia de numerosos ciliados. Sin embargo, debe recalarse que estas úlceras fueron

observadas sólo en unos pocos rodaballos durante el primer brote y no fueron observadas posteriormente. No fueron detectadas infecciones bacterianas compatibles con estas úlceras. Los peces moribundos mostraban un oscurecimiento cutáneo, y en muchos casos alteraciones temporales de la conducta natatoria (incluyendo movimientos repetitivos como el levantamiento de la cabeza fuera del agua, o nadar de arriba a abajo, en círculos o girando verticalmente). Muchos peces mostraban distensión abdominal debida a la acumulación de fluido ascítico en la cavidad corporal. El examen microscópico del fluido ascítico, obtenido por abdominocentesis, reveló la presencia de abundantes ciliados (> 200 por campo de microscopio con un objetivo 10x). En muchos casos, fue observada exoftalmia severa uni o bilateral. El examen de los ojos afectados revelaba una acumulación de líquido edematoso en la región periorbital, el cual asimismo contenía abundantes ciliados. El examen de muestras frescas de sangre de la vena caudal de los rodaballos moribundos indicaba en muchos casos una infección sistémica, con numerosos ciliados que contenían eritrocitos ingeridos. Los fluidos branquiales también presentaban ciliados en la mayor parte de los peces a punto de morir o muertos recientemente. En las biopsias branquiales observamos una gran cantidad de ciliados moviéndose a través de las arterias de los filamentos branquiales y a través de las redes capilares de las laminillas secundarias. Algunos ejemplares presentaban infección generalizada, observándose ciliados en las preparaciones de la mayoría de los órganos y los tejidos examinados (no sólo en la piel, los ojos, las branquias y la sangre, sino también en el tracto intestinal, el hígado, los riñones, el bazo, la musculatura, etc.). Observamos que muchos ciliados mostraban división activa. Algunos peces mostraban diferentes grados de reblandecimiento y licuación cerebral; así, el examen del tejido cerebral fresco de estos peces volvió a revelar la presencia de una gran cantidad de ciliados.

Dentro del cerebro (Figuras 20A, B, C) los ciliados estaban ampliamente distribuidos en (1) las meninges que cubren el telencéfalo, el mesencéfalo y el diencéfalo, (2) el techo óptico de los lóbulos ópticos del mesencéfalo, en asociación con focos de congestión vascular y destrucción tisular (especialmente en el estrato gris periventricular y en el estrato fibroso periventricular), (3) el acueducto mesencefálico y el tercer ventrículo, y (4) el nervio óptico (en el tejido conectivo perineural y en el haz de fibras nerviosas que inervan el cerebro). La presencia de ciliados en las meninges fue asociada típicamente con un incremento en la vascularización y la congestión vascular, los edemas y la acumulación de infiltrado celular inflamatorio (principalmente monocitos y linfocitos), especialmente en las áreas que mostraban las mayores densidades de ciliados. En algunos casos, fueron observados también ciliados en el epitelio glandular de la adenohipófisis (Figura 20D), rodeados por un halo de necrosis. Los exámenes histopatológicos revelaron daño cerebral de este tipo en individuos que mostraban alteraciones del comportamiento natatorio.

La presencia de ciliados en el intestino (Figura 20E) fue observado que provocaba inflamación edematosa con engrosamiento de la pared intestinal. Los ciliados estaban concentrados principalmente en las láminas propia y submucosa, entre las fibras de tejido conectivo y en los vasos sanguíneos. En los casos más graves, los ciliados reemplazaban casi totalmente el tejido conectivo que soporta la mucosa epitelial de las vellosidades. En las capas serosa y muscular, que asimismo mostraban edema, también fueron observados ciliados, aunque en menor densidad, asociados generalmente con los vasos sanguíneos. En ningún caso fueron observados ciliados en el epitelio columnar. En el tejido pancreático exocrino, los ciliados estaban mayoritariamente concentrados en los tejidos conectivos perivasculares, aunque algunos también estaban asociados con necrosis del epitelio de las glándulas acinares (Figura 20F).

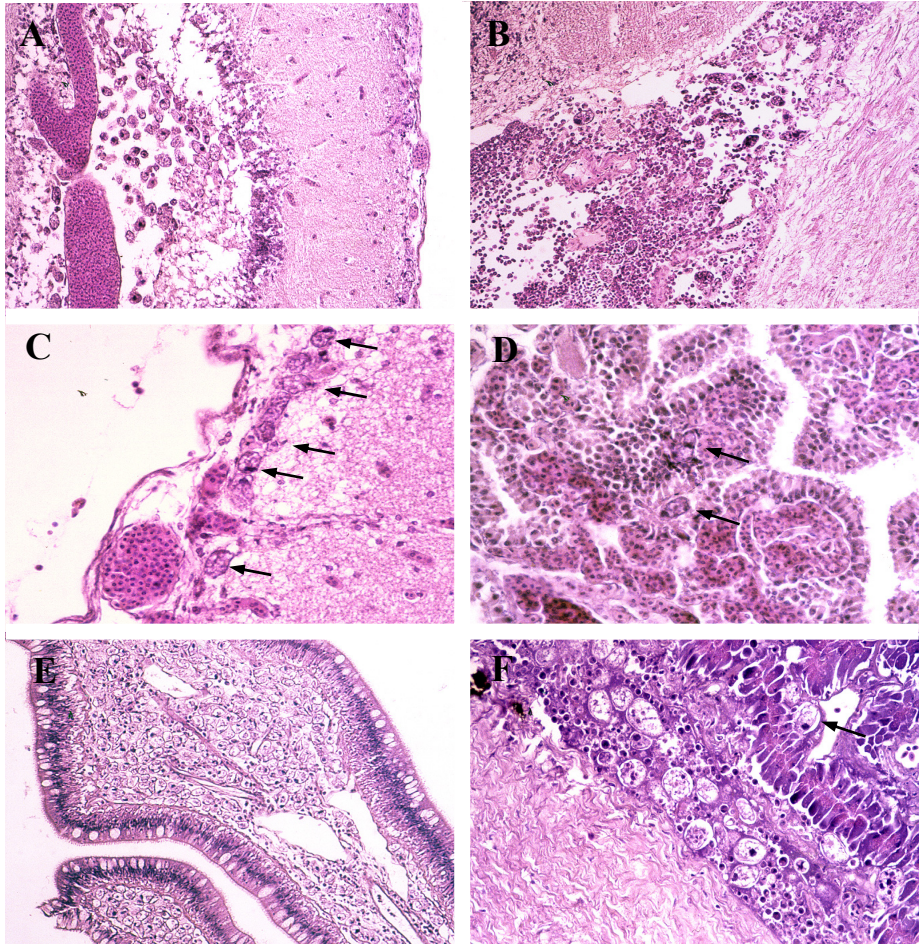


Figura 20. Cambios patológicos microscópicos observados en el cerebro (A, B, C), la adenohipófisis (D), el intestino (E) y el tejido pancreático exocrino (F) de los rodaballos infectados con *Philasterides dicentrarchi*. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina. (A) Cambios necróticos de licuación en el estrato gris periventricular y en el estrato fibroso periventricular del techo óptico del mesencéfalo (122x). Observar los vasos congestionados en el techo óptico así como en las meninges. (B) Meningitis severa asociada con numerosos ciliados en la unión entre el mesencéfalo y el diencéfalo (122x). Los ciliados están rodeados por tejido inflamatorio con infiltración linfocítica y monocítica. (C) Cambios edematosos en las meninges causados por los ciliados (flechas) (244x). (D) Dos ciliados (flechas) que invaden el epitelio glandular de la adenohipófisis (244x). (E) Cambios edematosos severos observados en los pliegues intestinales (122x). Observar que la lámina propia ha sido prácticamente reemplazada por los ciliados. (F) Infiltración celular perivascular que rodea los ciliados en el tejido pancreático exocrino (244x). Puede observarse un ciliado solo (flecha) asociado con un halo necrótico en las glándulas acinares.

En el hígado (Figuras 21A, B), los ciliados aparecían en prácticamente todos los tejidos: (1) en los tejidos conectivos vascular y perivascular, asociados a vasculitis necrotizante, incluyendo el que circunda los conductos biliares, (2) en la luz de las venas y los capilares, y (3) en el parénquima, donde causaban focos necróticos severos. Los ciliados fueron observados también en los tejidos conectivos vascular y perivascular, y en la sangre de otros órganos, incluidos el bazo y los riñones. En algunos peces, fueron encontrados ciliados rodeados de infiltrado monocítico y bajo las membranas serosas que envuelven los órganos internos.

El examen histológico de las branquias (Figuras 21C, D) reveló la presencia de ciliados en los epitelios laminar e interlaminar, y en los vasos sanguíneos. La presencia de ciliados en el epitelio fue asociada con la hiperplasia. En algunas ocasiones, fueron observados ciliados fuera de las branquias que contenían eritrocitos ingeridos.

En algunos casos, los ciliados fueron observados en los tejidos endo y perimisial de la musculatura somática, aunque en determinadas ocasiones aparecían dentro de las fibras musculares, asociados con focos necróticos (Figura 21E), y dentro de las fibras nerviosas. En el tejido adiposo (Figura 21F), los ciliados fueron capaces de penetrar en el interior de los adipocitos y fueron observados adheridos a la cara interior de la membrana plasmática.

En los ojos exoftálmicos, fueron observados cambios edematosos en el tejido periorbital que estaban asociados con la presencia de ciliados. En algunos casos los ciliados fueron detectados en el tejido glandular de la coroides.

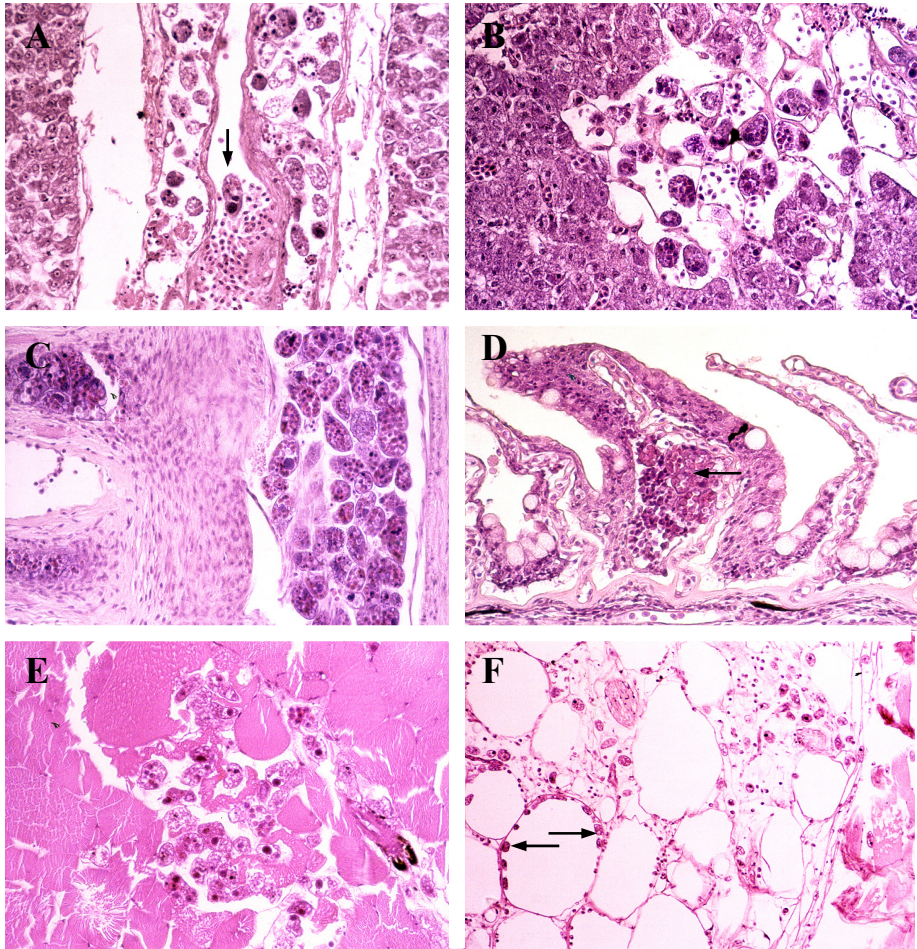


Figura 21. Cambios patológicos microscópicos observados en el hígado (A, B), las branquias (C, D), la musculatura (E) y el tejido adiposo (F) de los rodaballos infectados con *Philasterides dicentrarchi*. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina. (A) Vasculitis causada por la acumulación de numerosos ciliados en el tejido conectivo vascular de una vena hepática (234x). Observar la presencia de un parásito solo (flecha) en la luz. (B) Necrosis severa del parénquima hepático causada por el ciliado (234x). (C) Numerosos parásitos en la luz del sistema arterial aferente branquial (234x). (D) Cambios hiperplásicos en el tejido epitelial de una laminilla secundaria branquial, causados por la presencia de varios ciliados (flecha) (234x). (E) Cambios necróticos en las fibras musculares (234x). (F) Ciliados en el tejido adiposo (124x). Observar la localización intracelular de los ciliados (flechas) en algunos adipocitos.

Estudio ultraestructural y análisis filogenéticos

Ultraestructura del ciliado

El sistema de membranas de superficie de *P. dicentrarchi* comprende 3 componentes: la membrana externa (limitante) (M), la membrana alveolar externa (MAE), y la membrana alveolar interna (MAI) (Figura 22A). Entre la MAE y la MAI puede observarse claramente un espacio alveolar (A) de tamaño variable (Figura 22A). El axonema ciliar muestra 9 dobletes de microtúbulos periféricos y un doblete central (Figura 22A). La figura 22A también muestra en perspectiva longitudinal un cinetosoma que forma parte de la ciliatura somática, del cual surge un cilio asociado al saco parasomal. En las secciones longitudinales (Figura 22B) y en las secciones ultrafinas, se puede observar la ciliatura somática constituida por dicinétidas en las dos terceras partes anteriores del cuerpo. El sistema microtubular comprende microtúbulos subpeliculares localizados directamente bajo la superficie celular (Figura 22C) o asociados con cinetosomas en el epiplasma y al final de los sacos alveolares (Figura 22D).

El macronúcleo o núcleo somático presenta forma globular y contiene gránulos de cromatina dispersados por todo el nucleoplasma, con nucleolos granulares localizados hacia la periferia del macronúcleo (Figuras 23A, B). El micronúcleo o núcleo generativo está estrechamente asociado con el macronúcleo, y se encuentra localizado cerca de uno de los poros nucleares de este último (Figura 23C). El micronúcleo contiene cromatina compacta, localizada a escasa distancia de la doble membrana nuclear, la cual está puntuada por poros nucleares (Figura 23C).

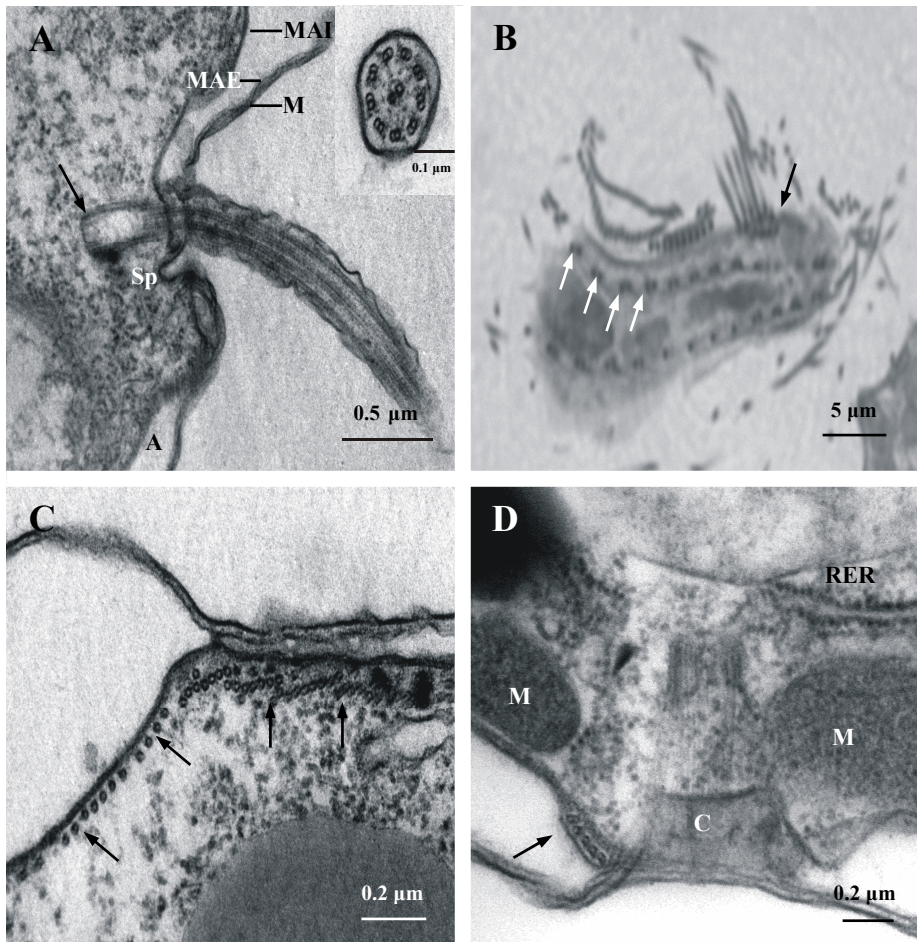


Figura 22. Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de *Philasterides dicentrarchi*. (A) Sección longitudinal del cilio acompañado por el saco parasomal (Sp) y la presencia en la base del cilio de un cinetosoma (flecha). Puede observarse el sistema de membranas de superficie, compuesto por la membrana externa (M), la membrana alveolar externa (MAE) y la membrana alveolar interna (MAI), con el espacio alveolar (A) entre la MAE y la MAI. *Recuadro*: sección transversal del axonema ciliar con el patrón $9 \times 2 + 2$. (B) Sección longitudinal semifina de un fragmento de *P. dicentrarchi*. Puede observarse una de las cinetias formada por dos cinétidas (dicinétidas; flechas blancas) en las dos terceras partes anteriores del cuerpo. En la parte anterior se pueden observar los cilios orales (flecha negra). (C) Sección longitudinal de una fila de microtúbulos subpelliculares (flechas) colocados debajo de la corteza. En el interior de la célula se pueden observar numerosos ribosomas libres. (D) Microtúbulos transversos localizados en el epiplasma entre la mitocondria (M) y el cinetosoma (C) con el que están asociados (flecha). RER: retículo endoplasmático rugoso.

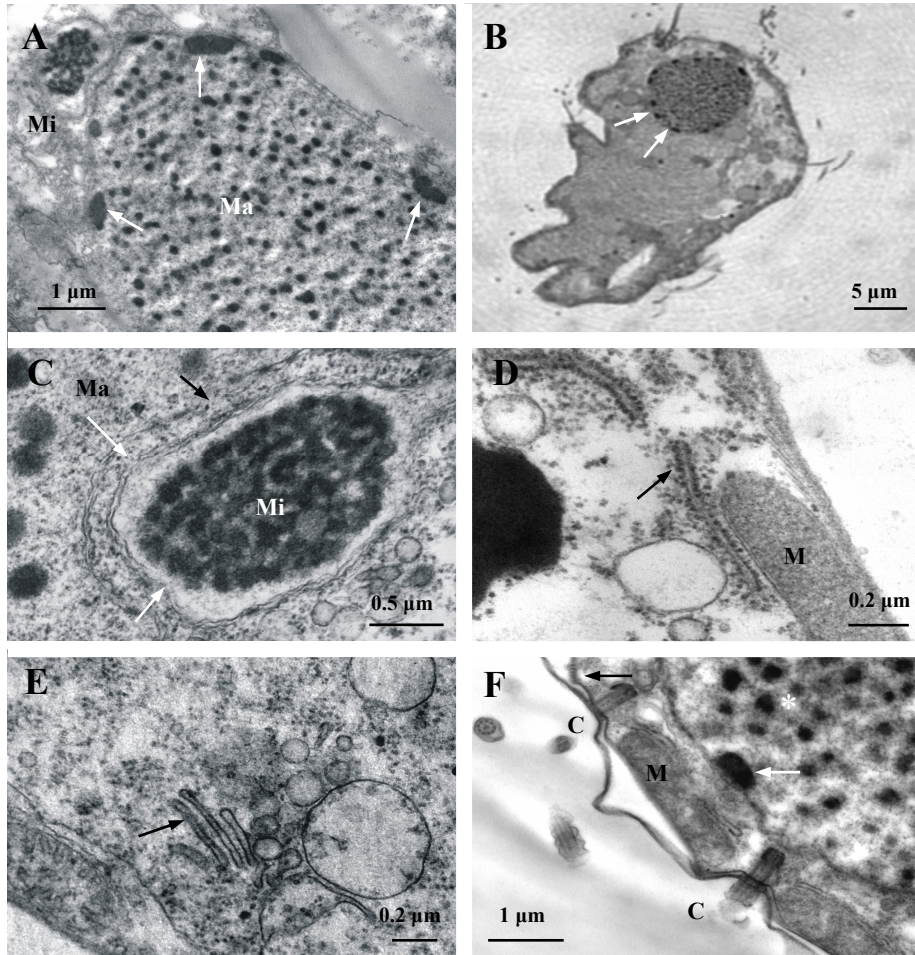


Figura 23. Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de *Philasterides dicentrarchi*. (A) Sección ultrafina que muestra el macronúcleo (Ma) y el micronúcleo (Mi) de *Philasterides dicentrarchi*. Los nucleolos (flechas) se pueden observar en la periferia del macronúcleo mientras que los gránulos de cromatina están dispersados por toda esta estructura. El micronúcleo muestra la cromatina más compacta. En esta microfotografía no se observa conexión entre los dos núcleos. (B) Sección transversa semifina que muestra los nucleolos (flechas) en la periferia del macronúcleo. (C) Poros nucleares en el micronúcleo (flechas blancas) y en el macronúcleo (flecha negra). (D) El retículo endoplasmático rugoso (flecha) se puede observar debajo de una mitocondria cortical (M). (E) Pequeños sáculos apilados tipo Golgi (flecha) en la parte interna del cuerpo del ciliado. (F) Las mitocondrias (M) están localizadas entre los cinetosomas (C). Pueden observarse microtúbulos en una pequeña protuberancia (flecha negra) en asociación con los cinetosomas. En el macronúcleo se pueden observar los nucleolos periféricos (flecha blanca) y los gránulos de cromatina (asterisco).

Las mitocondrias se encuentran bajo la corteza celular, paralelas a la superficie cortical (Figuras 23D, F), entre los cinetosomas (Figura 23F); sólo raramente fueron observadas mitocondrias en el interior del citoplasma. El retículo endoplasmático rugoso se encuentra localizado generalmente en la proximidad de las mitocondrias (Figura 23D). Cerca de las mitocondrias también fueron observadas estructuras similares a pequeños dictiosomas, posiblemente formando parte del aparato de Golgi (Figura 23E).

Los extrusomas de *P. dicentrarchi* muestran dos morfologías diferentes: esférica y fusiforme (Figuras 24A, B). Los extrusomas esféricos, localizados debajo de la superficie celular y en contacto directo con la membrana plasmática, están rodeados por una membrana y tienen un contenido amorfo con un diámetro aproximadamente de 1.1 μm (Figuras 24A, C). La fusión de los extrusomas esféricos con la membrana plasmática y la liberación de su contenido al exterior da lugar a una capa mucilaginosa fina sobre la superficie celular (Figura 24C). Los extrusomas fusiformes tienen una longitud aproximadamente de 1.6 μm , un contenido compacto y están dispuestos perpendicularmente a la membrana plasmática (Figura 24B).

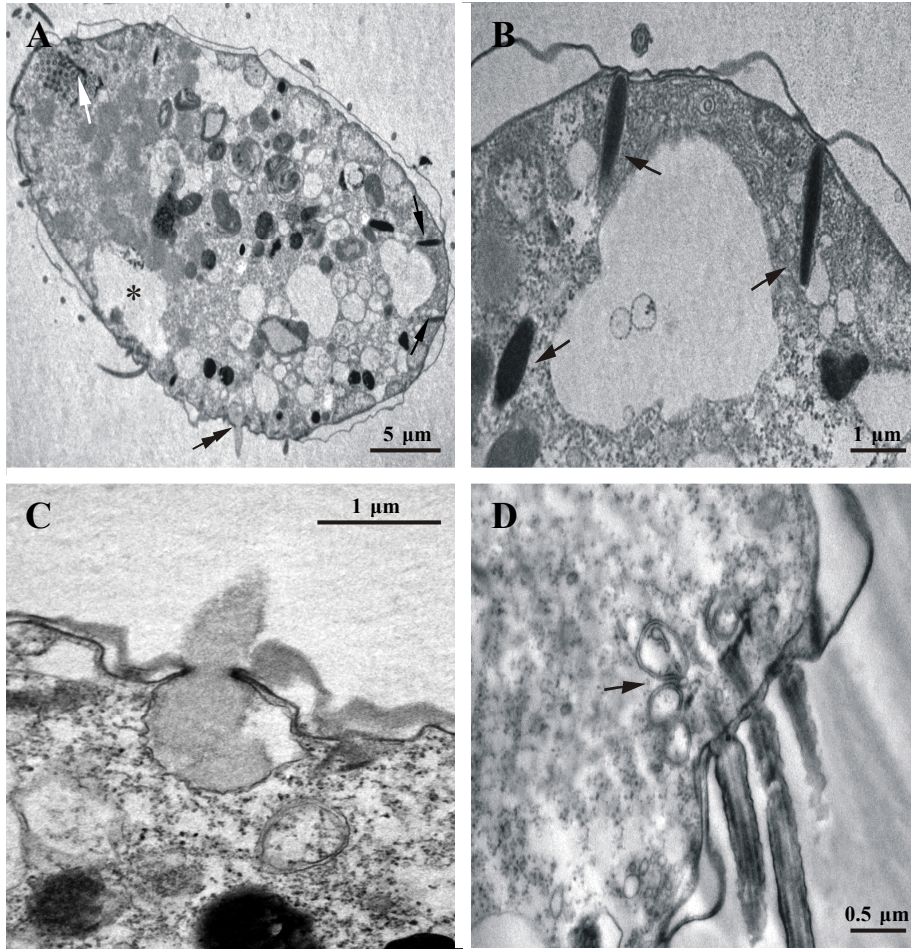


Figura 24. Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de *Philasterides dicentrarchi*. (A) Sección longitudinal de *Philasterides dicentrarchi* que muestra las vacuolas digestivas (asterisco) y los microtúbulos orales (flecha blanca) en la parte anterior del cuerpo. Los extrusomas se pueden observar en la superficie celular (flechas negras), esparcidos entre las mitocondrias. En la parte inferior de la figura, se puede observar la exocitosis de un extrusoma esférico (flecha doble). (B) Detalle de los extrusomas fusiformes (flechas) en la parte posterior del cuerpo, que muestran un contenido electrondenso; dos de los extrusomas están fusionados con la membrana celular y el tercero está localizado internamente. (C) Exocitosis de un extrusoma esférico, que muestra la fusión del extrusoma con la membrana celular. (D) Sección longitudinal de los cinetosomas de una policinétida oral, que muestra las vesículas asociadas que forman parte del citostoma (flecha).

Análisis filogenéticos

La PCR interna del ADN extraído de los ciliados *P. dicentrarchi* aislados del rodaballo usando los cebadores PSSU1 y PSSU2 amplificó un producto de 350 pb. El análisis de la secuencia confirmó que el producto de *P. dicentrarchi* era ADN_r 18S, que se corresponde con los nucleótidos 386-734 del gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad pequeña (SSUrRNA) de *P. dicentrarchi* publicada (GenBank; número de acceso AY642280), difiriendo de su secuencia en las posiciones 649, 660, 678 y 705. El fragmento de 350 pb de la secuencia de *P. dicentrarchi* fue alineado con las secuencias genéticas de otras especies de Philasterida en la base de datos BLAST, y el árbol filogenético fue generado con el algoritmo de NJ (neighbour-joining; vecino más próximo). La identidad entre la secuencia del gen SSUrRNA de los *P. dicentrarchi* aislados del rodaballo y las otras secuencias se encuentra en un rango del 85 al 99% (Tabla 3). Las mayores identidades nucleotídicas fueron observadas con las especies aisladas del lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), llamadas *Miamiensis avidus* (99%) y *Philasterides dicentrarchi* (98%). Las menores identidades nucleotídicas fueron observadas con *Entodiscus borealis* (85%) y *Uronema marinum* (86%) (Tabla 3).

El árbol de topología óptima obtenido por el método de neighbour-joining (vecino más próximo) se muestra en la Figura 25. Como puede observarse, los análisis colocan el *P. dicentrarchi* aislado del rodaballo en una rama con el *M. avidus* y el *P. dicentrarchi* aislados del lenguado japonés, con un valor secuencial del remuestreo (Bootstrap) del 100%.

Tabla 3. Especies de ciliados incluidos en los análisis filogenéticos, que muestran sus números de acceso a la base de datos GenBank para sus secuencias del gen SSUrRNA y el porcentaje de identidad nucleotídica con la secuencia parcial del gen SSUrRNA de *Philasterides dicentrarchi* aislado por nosotros del rodaballo en cultivo.

(c) secuencia completa; (p) secuencia parcial.

Especies	Número de acceso GenBank	Secuencia de ADN	Identidad nucleotídica (%)
<i>Philasterides dicentrarchi</i> (Lenguado)	AY642280	Gen SSUrRNA (c)	98
<i>Miamiensis avidus</i>	AY550080	Gen 18S rRNA (p)	99
<i>Parauronema longum</i>	AY212807	Gen 16S rRNA (p)	91
<i>Entorhipidium pilatum</i>	AY541689	Gen SSUrRNA (p)	91
<i>Entorhipidium triangularis</i>	AY541690	Gen SSUrRNA (p)	91
<i>Entorhipidium tenue</i>	AY541688	Gen SSUrRNA (p)	91
<i>Plagiopyliella pacifica</i>	AY541685	Gen SSUrRNA (p)	90
<i>Dextiostrichides pangi</i>	AY212805	Gen SSUrRNA (p)	96
<i>Thyrophylax vorax</i>	AY541686	Gen SSUrRNA (p)	89
<i>Uronema marinum</i>	Z22881	Gen SSUrRNA (p)	86
<i>Uronema elegans</i>	AY103190	Gen 16S-like rRNA (p)	93
<i>Entodiscus borealis</i>	AY541687	Gen SSUrRNA (p)	85
<i>Metanophrys similis</i>	AY314803	Gen SSUrRNA (c)	89
<i>Pseudocohnilembus marinus</i>	Z22880	Gen SSUrRNA (p)	89
<i>Pseudocohnilembus hargasi</i>	AY833087	Gen 18S rRNA (c)	88
<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>	AY835669	Gen 18S rRNA (c)	90
<i>Anophryoides haemophila</i>	U51554	Gen 18S rRNA (c)	90
<i>Mesanophrys carcini</i>	AY103189	Gen 16S rRNA (p)	86
<i>Cohnilembus verminus</i>	Z22878	Gen SSUrRNA (p)	93
<i>Cardiostomatella vermiforme</i>	AY881632	Gen 16S rRNA (p)	93
<i>Plagiopyliella pacifica</i>	AY541685	Gen SSUrRNA (p)	90

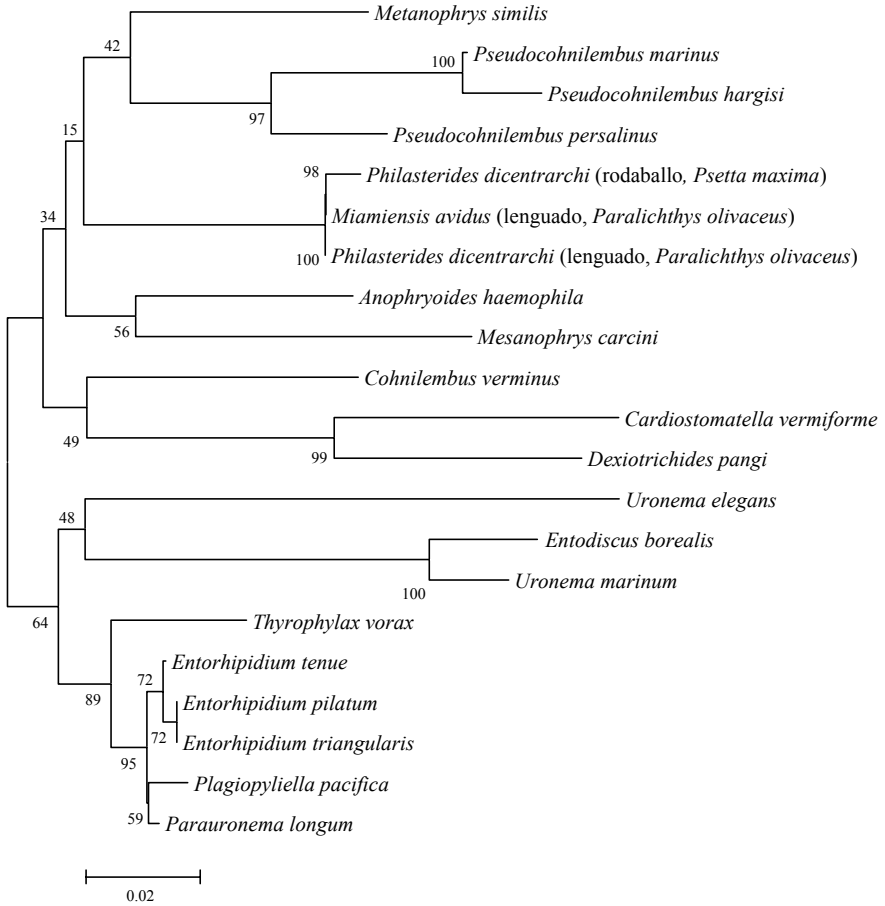


Figura 25. Relaciones filogenéticas de diversas especies del orden Philasterida como se infiere por el análisis de las secuencias del gen SSUrRNA empleando el método de neighbour-joining (vecino más próximo). Los valores del remuestreo (Bootstrap) para 1000 réplicas están indicados en cada nodo. La barra de escala indica una distancia de 0.02.

Preparación de un cultivo axénico

Dosis óptima de cultivo

Las curvas de crecimiento de los seis cultivos sembrados con diferentes dosis de *P. dicentrarchi* indican un buen crecimiento incluso con la dosis más baja que ensayamos (20 ciliados/ml) (Figura 26).

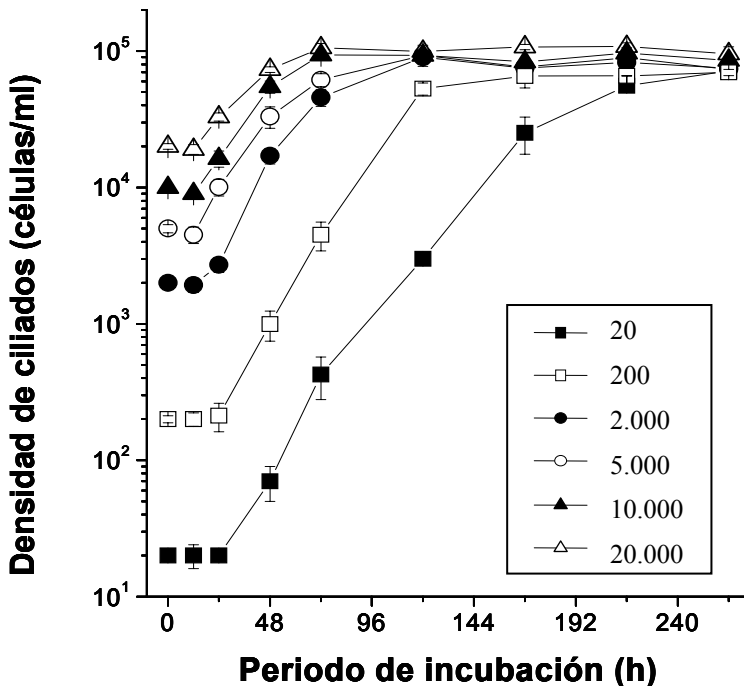


Figura 26. Curvas de crecimiento para *P. dicentrarchi* obtenidas con diferentes densidades de cultivo (20, 200, 2.000, 5.000, 10.000 y 20.000 ciliados/ml) en medio L-15 completo estándar (salinidad del 10‰, pH 7.2) a 18 °C. Cada punto representa la media \pm error estándar para tres ensayos.

Las tasas medias de crecimiento (k) observadas en los cultivos sembrados con 20 y 200 células/ml (0.053, en ambos casos) eran significativamente mayores que las obtenidas en los cultivos sembrados con 2.000 ciliados/ml o más. Por el

contrario, las densidades medias máximas alcanzadas usando 20 y 200 células/ml como dosis de cultivo (0.69×10^5 y 0.75×10^5 ciliados/ml, respectivamente) eran significativamente menores que las obtenidas tras la siembra con 2.000 ciliados/ml o más ($1.12-1.32 \times 10^5$ ciliados/ml), a pesar del hecho de que las fases meseta parecen haber sido alcanzadas. En vista de estos resultados, nosotros por consiguiente usamos una dosis de cultivo de 500 ciliados/ml para los experimentos posteriores: este valor fue seleccionado como intermedio entre 200 y 2.000 ciliados/ml, que daban curvas y parámetros de crecimiento adecuados.

La temperatura, el pH y la salinidad óptimos

Las curvas de crecimiento y los parámetros medios de crecimiento (k y densidad máxima) obtenidos bajo las diferentes condiciones de salinidad (10 y 27‰), pH (6.2, 7.2 y 8.2), y temperatura (13, 18 y 23 °C) se muestran en la Figura 27 y en la Tabla 4. A la salinidad óptima del 10‰, las tasas de crecimiento y las densidades máximas obtenidas a 23 °C fueron significativamente mayores que las obtenidas a 18 °C; no fueron observadas diferencias significativas entre las dos temperaturas a la salinidad subóptima del 27‰. Sin embargo, el crecimiento obtenido a 18 °C fue bueno, particularmente a pH 7.2 (Figura 27C), y de hecho la curva de crecimiento a 18 °C y pH 7.2 es posiblemente la más apropiada para los propósitos del cultivo, con una corta fase de latencia, una buena fase exponencial y una fase de meseta que comienza 5-7 días tras la siembra. Es más, la muerte celular fue observada desde el día 5 hacia adelante en los cultivos incubados a 23 °C y pH 6.2 (Figura 27A), que coincide con la acidificación del medio (a $\text{pH} < 5$), como consecuencia de la actividad metabólica de los ciliados. El crecimiento a 13 °C, independientemente de la salinidad y de la temperatura, prácticamente se inhibió: en ningún caso se dieron densidades mayores a 4.5×10^3 células/ml.

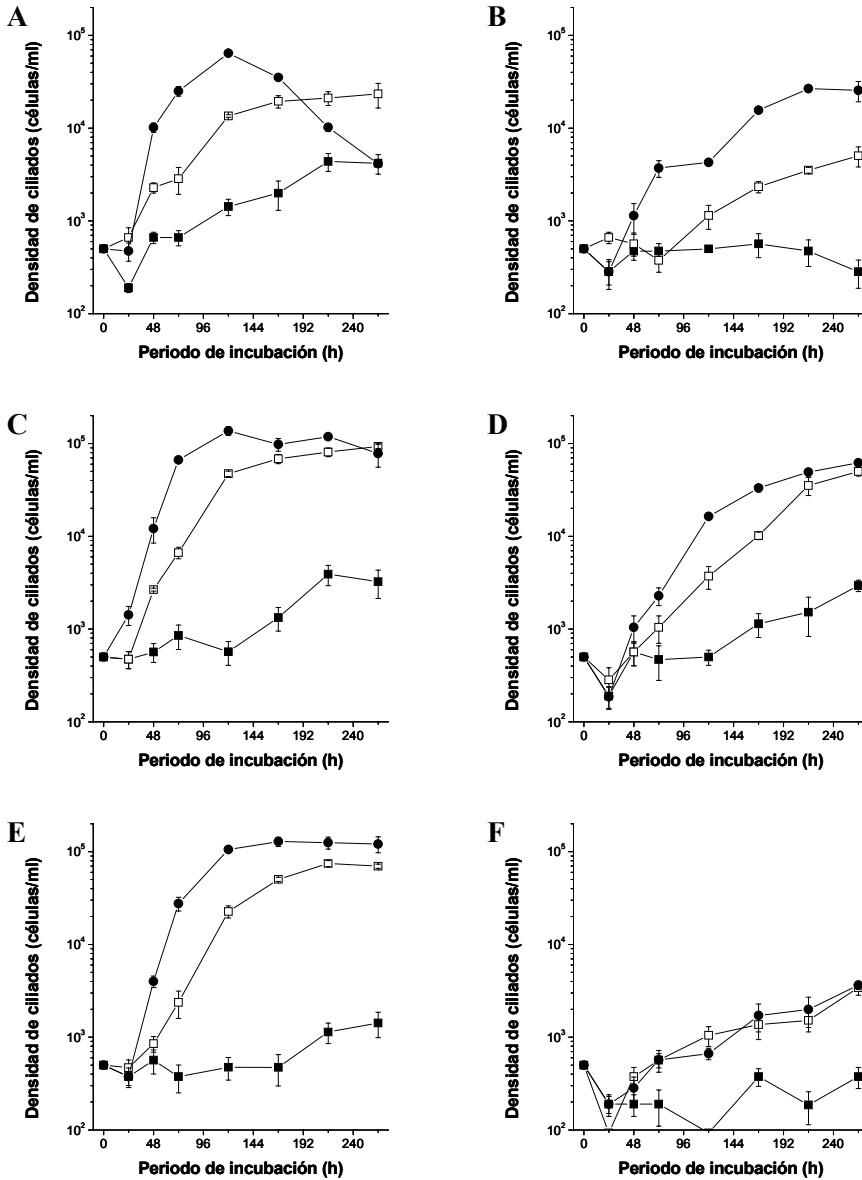


Figura 27. Influencia de la temperatura, el pH y la salinidad en el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi* en medio L-15. Cada figura muestra las curvas de crecimiento obtenidas a 13 °C (■), 18 °C (□) y 23 °C (●). El medio de cultivo fue L-15 completo estándar (10‰ de salinidad) a pH 6.2 (A), 7.2 (C) u 8.2 (E), o L-15 completo salino (27‰ de salinidad) a pH 6.2 (B), 7.2 (D) u 8.2 (F). La densidad de cultivo fue en todos los casos de 500 ciliados/ml. Cada punto representa la media \pm error estándar para tres ensayos.

Para las mismas condiciones de salinidad y temperatura, los mejores resultados de crecimiento fueron obtenidos siempre a pH 7.2, aunque las densidades máximas alcanzadas bajo las condiciones óptimas (18-23 °C y salinidad del 10‰) no fueron significativamente mayores que las obtenidas a pH 8.2. Por el contrario, el ambiente ligeramente ácido (pH 6.2) fue inadecuado para mantener el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi*.

Tabla 4. Efectos de la salinidad, el pH y la temperatura en el crecimiento *in vitro* de *Philasterides dicentrarchi*.

Salinidad	pH	<i>T</i>	<i>k</i>	Densidad máxima
10	6.2	13	0.011 a	4.473 a
		18	0.022 e	27.803 ab
		23	0.048 f	64.267 cef
10	7.2	13	0.011 a	3.903 a
		18	0.048 f	94.187 c
		23	0.068	146.100 g
10	8.2	13	0.005 ab	1.326 a
		18	0.034 g	74.387 cd
		23	0.059	137.000 g
27	6.2	13	0.002 bc	450 a
		18	0.016 ae	5.043 a
		23	0.021 de	30.913 ae
27	7.2	13	0.013 ad	2.946 a
		18	0.025 eh	50.090 bde
		23	0.032 gh	62.017 df
27	8.2	13	0.000 b	616 a
		18	0.010 ac	3.426 a
		23	0.010 ac	3.633 a

Los valores de la constante de la tasa de crecimiento (*k*) y las densidades máximas (células/ml) son los valores medios de tres réplicas ensayadas para cada grupo de condiciones. Dentro de cada columna, los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

Requerimientos nutricionales

Para evaluar la importancia del suero fetal bovino (FBS) y de la mezcla lipídica (lecitina y Tween 80) en el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi*, analizamos las curvas de crecimiento que fueron obtenidas en el medio que contenía sólo un componente (FBS o mezcla lipídica) o ninguno de estos componentes, cogiendo medio L-15 completo estándar (que contiene FBS y ambos lípidos) como control. Según puede observarse en la Figura 28, en ausencia de FBS los lípidos no tenían efectos en la promoción del crecimiento, considerando que el FBS era esencial para el crecimiento. Sin embargo, cuando los ciliados fueron incubados en medio L-15 completo estándar (medio conteniendo FBS y ambos lípidos), la densidad media máxima alcanzada (1.06×10^5 ciliados/ml) fue significativamente mayor a la obtenida en el medio que contenía sólo FBS (0.6×10^5 ciliados/ml), lo que sugiere que los lípidos promueven el crecimiento en presencia de FBS, permitiendo alcanzar mayores densidades.

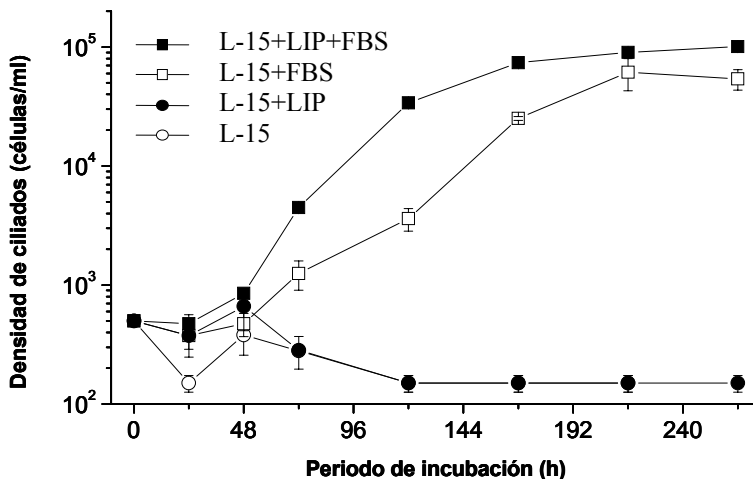


Figura 28. Influencia del suero fetal bovino (FBS) y de los lípidos (LIP = lecitina + Tween 80) en el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi*. El medio fue medio L-15 (10%, pH 7.2) con FBS y lípidos (■), sólo con FBS (□), sólo con lípidos (●) o sin FBS ni lípidos (○). La densidad de cultivo fue en todos los casos de 500 ciliados/ml; la incubación fue realizada en todos los casos a 18 °C. Cada punto representa la media \pm error estándar para tres ensayos.

Las curvas de crecimiento (Figura 29) y las tasas medias de crecimiento (0.036-0.04) que fueron obtenidas en el medio que contenía FBS en ausencia de ambos lípidos (lecitina y Tween 80), en ausencia de uno de los lípidos (lecitina o Tween 80), o en presencia de los dos (medio L-15 completo estándar) eran similares. Sin embargo, las densidades obtenidas en el medio conteniendo FBS y sólo uno de los lípidos (0.92×10^5 células/ml para el Tween 80; 0.87×10^5 células/ml para la lecitina) o ambos lípidos (0.93×10^5 células/ml) eran similares y significativamente mayores que las obtenidas en el medio que contenía sólo FBS (0.62×10^5 células/ml), confirmando el papel beneficioso de los lípidos para el crecimiento *in vitro* del ciliado. No fueron observadas diferencias significativas entre las densidades obtenidas en presencia de uno o de los dos lípidos, lo que indica que los efectos en el crecimiento no son sinérgicos.

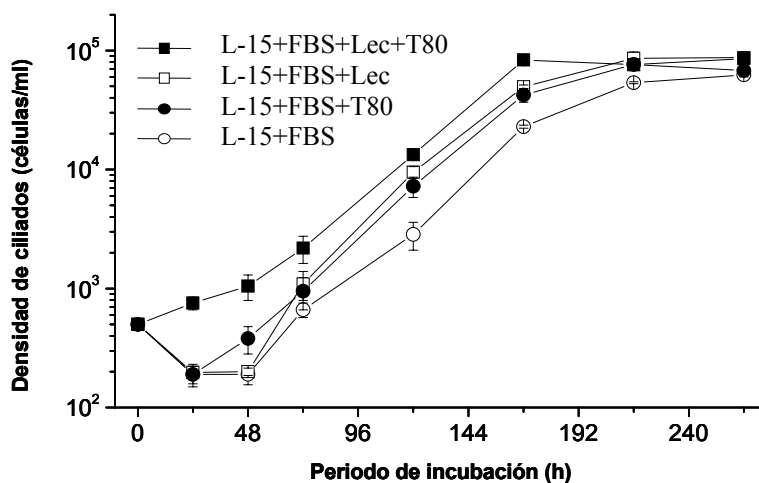


Figura 29. Influencia de los lípidos individuales (lecitina y Tween 80) en el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi*. El medio fue medio L-15 más FBS (10%, pH 7.2) con ambos lípidos (■), sólo con lecitina (□), sólo con Tween 80 (●) o sin lípidos (○). La densidad de cultivo fue en todos los casos de 500 ciliados/ml; la incubación fue realizada en todos los casos a 18 °C. Cada punto representa la media \pm error estándar para tres ensayos.

Infección experimental y estudio de las posibles rutas de entrada del ciliado en el rodaballo

Ensayos de la infección experimental

Los resultados de estos ensayos están resumidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados obtenidos de los intentos de la infección experimental de los rodaballos con *Philasterides dicentrarchi* a través de las distintas vías de inoculación ensayadas.

Modo de infección	Mortalidad (%)	Días para morir (rango)	Infección sistémica (%)	Peces con ciliados en el fluido ascítico (%)	Infección cerebral (%)
Oral	0	- ^a	0	0	0
Nasal	0	- ^a	0	0	0
Rectal	0	- ^a	0	0	0
Inmersión ^b	0	- ^a	0	0	0
Abrasión-inmersión ^b	60	15-18	60	60	60 ^c
Inyección periorbital	100	5-13	30	0	100
Inyección intramuscular	100	5-13	60	0	40 ^c
Inyección intraperitoneal	100	4-8	100	100	50 ^c

^a Los peces fueron sacrificados y examinados para la presencia de ciliados a las 3 semanas de la inoculación.

^b Los rodaballos fueron mantenidos en contacto con la suspensión de ciliados durante 24 h.

^c La infección del cerebro quedó restringida, en la mayor parte de los casos, a los capilares.

Las rutas oral, nasal y rectal, y también la inmersión durante 24-48 horas sin abrasión previa de las branquias y del opérculo, no tuvieron efecto. Sin embargo, la inmersión durante 24 horas con abrasión previa de las branquias y del opérculo daban resultados positivos en 6 de los 10 peces expuestos, que morían por escuticociliatosis sistémica entre los días 15 y 18 postinmersión. Antes de morir,

mostraban oscurecimiento de la piel. El examen microscópico revelaba la presencia en el fluido ascítico de 150-200 ciliados por campo 10x. Los ciliados también fueron encontrados en el cerebro, aunque en gran parte dentro de los vasos sanguíneos capilares (Figura 30A). A las 3 semanas postinmersión, los peces restantes fueron sacrificados, y fue observado que no estaban infectados. Los resultados de la inmersión durante 48 horas tras la abrasión fueron similares (no se muestran los datos).

Todos los peces inoculados intraperitonealmente se infectaron, y murieron entre los 4 y los 8 días tras la inoculación. La infección se extendió con gran rapidez: para el día 4, los ciliados estaban presentes en la sangre y en el cerebro (1-20 ciliados por campo 10x). Desde el día 6, la infección se generalizó a todos los órganos (las branquias, el hígado, los riñones, los ojos, el cerebro, etc.). Todos los peces desarrollaban infección sistémica y ascitis en la cavidad abdominal, aparentemente desde el día 4 hacia adelante. En los peces en los que fue observada la infección en el cerebro, los ciliados asimismo fueron encontrados fundamentalmente dentro de los capilares. En todos los casos, el examen del fluido ascítico reveló la presencia de más de 150-200 ciliados por campo 10x, muchos de ellos sufriendo división. En algunos casos, el fluido contenía sangre.

Todos los peces del grupo experimental murieron entre los 5 y los 13 días tras la inoculación intramuscular. Hasta el día 7, la infección se restringió al lugar de la inyección y al área que la rodeaba. La parasitemia fue observada por primera vez el día 7 tras la inoculación, y detectada finalmente en 6 de los 10 peces inoculados. Los ciliados no fueron observados en el cerebro hasta el día 10, coincidiendo con un incremento en la parasitemia. Fueron observados cambios inflamatorios notables en el lugar de la inyección, caracterizados macroscópicamente por hinchazón y eritema generalizado (Figura 30B), y microscópicamente por necrosis del tejido muscular (Figura 30C). En algunos casos, fueron observadas pequeñas úlceras hemorrágicas en la epidermis, junto con

hemorragia y eritema de la musculatura ventral. En los peces moribundos, la dermis se separó fácilmente de la musculatura en las áreas lesionadas.

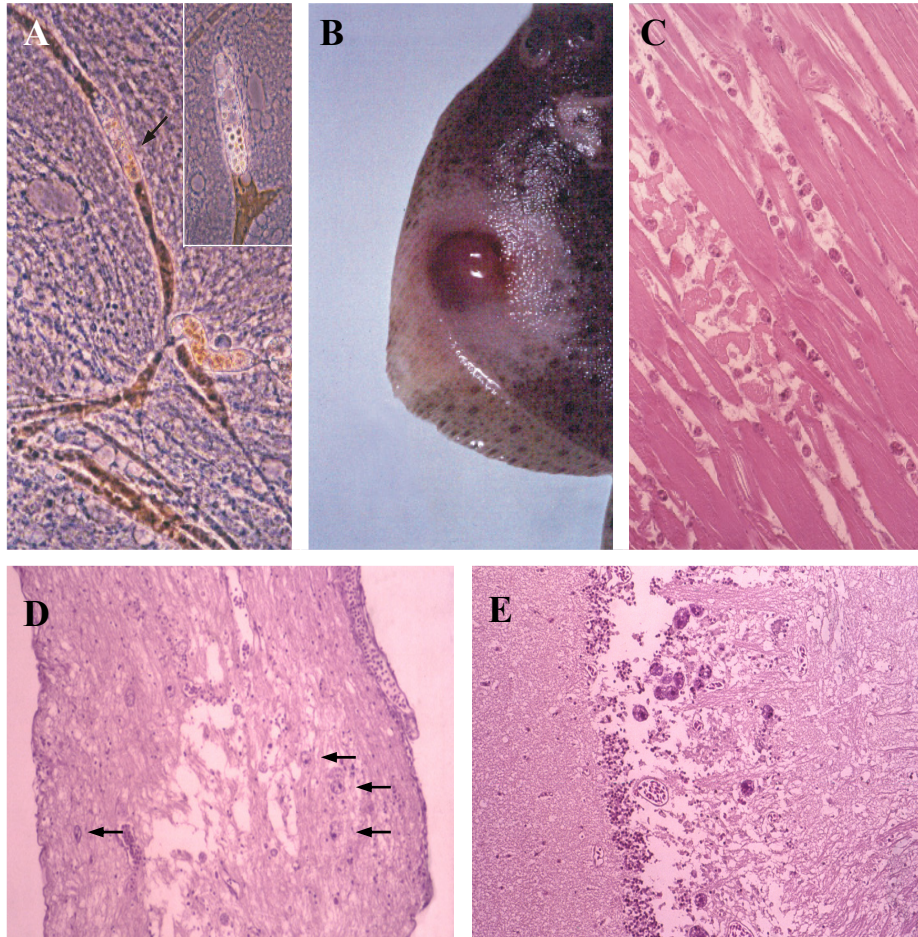


Figura 30. Patología provocada por las infecciones experimentales de *P. dicentrarchi* en los rodaballos. (A) Localización típica de los ciliados dentro de los capilares (flecha) en el cerebro (microscopía de contraste de fases, 251x). Observar la capacidad del ciliado para adaptarse al estrecho diámetro de los capilares. *Recuadro*: imagen aumentada que muestra un ciliado dentro de un vaso capilar (265x). (B) Lesión hemorrágica en la musculatura del rodaballo, observada tras la inoculación intramuscular con el parásito. La figura muestra el pequeño hinchazón hemorrágico en el punto de la inoculación, con un halo blanquecino en el músculo que lo rodea. (C) Ciliados en el tejido muscular necrótico tras la inoculación intramuscular (125x). Observar la localización de los ciliados entre las fibras musculares. (D) Fascículos nerviosos del nervio óptico, que muestran la presencia de ciliados (flechas) (125x). (E) Ciliados asociados con la necrosis del estrato gris y del estrato fibroso del techo óptico en los rodaballos infectados experimentalmente (150x) (tinción con hematoxilina y eosina).

Tras la inoculación periorbital, todos los peces murieron entre los días 5 y 13 después de la inoculación. La infección fue localizada mayoritariamente en el cerebro (100% de los peces) y en las branquias (60% de los peces). Los ciliados aparecían en el cerebro, pero no en la sangre, el día 5 postinoculación (Figura 30D). En todos los peces que murieron el día 6 o posteriores (50%), fue observado un marcado reblandecimiento y una notable licuación del cerebro, en paralelo con una abundante presencia de ciliados en el tejido (Figura 30E). La infección sistémica fue observada sólo en el 30% de los peces infectados. En la región periorbital, fue observada una acumulación de fluido edematoso que contenía abundantes ciliados. En algunos casos, fue observado enrojecimiento de los ojos y de los tejidos circundantes, junto con una moderada inflamación de la musculatura de la cabeza y exoftalmia hemorrágica.

Los resultados de estos ensayos, por lo tanto, sugerían que la administración intraperitoneal es el procedimiento más efectivo para la infección experimental. Este procedimiento (a) producía infección sistémica en todos los peces incluidos en este ensayo, (b) era fácil y rápido de realizar y (c) era menos agresivo para las superficies externas, reduciendo el riesgo de una infección secundaria. Nosotros, por lo tanto, realizamos los ensayos adicionales para optimizar la dosis de parásito en la infección experimental por esta vía. De las cuatro dosis estudiadas, las dos mayores (10^4 y 5×10^4 ciliados) producían infección sistémica en todos los peces (Tabla 6). Los peces morían entre 6 y 10 días tras la inoculación (dosis de 10^4 ciliados) o entre 5 y 15 días postinoculación (dosis de 5×10^4 ciliados). En los peces inoculados con 2×10^3 ciliados, el 60% de los peces quedaban infectados, y el número de ciliados observado en cada órgano era considerablemente menor que en los dos grupos de altas dosis; en ningún órgano fueron encontrados más de 50 ciliados por campo 10x. Los peces infectados en este grupo comenzaban a morir desde los 6 días tras la inoculación hacia adelante. A las 3 semanas postinoculación, ninguno de los cuatro peces

supervivientes mostraba ningún signo de infección. En los peces inoculados con 4×10^2 ciliados, el 40% quedaban infectados y morían entre 14 y 15 días tras la inoculación. A las tres semanas postinoculación, ninguno de los seis peces supervivientes mostraba signo alguno de infección.

Tabla 6. Evaluación de las distintas dosis de inóculo empleadas en la optimización de la infección intraperitoneal.

Dosis (células/pez)	Mortalidad (%)	Días para morir (rango)	Infección sistémica (%)	Peces con ciliados en el fluido ascítico (%)	Infección cerebral (%)
5×10^4	100	5-15	100	100	60
10^4	100	6-10	100	100	100
2×10^3	60	6-14	60	60	40
4×10^2	40	14-15	40	40	40

Respuestas quimiotácticas y adaptación al parasitismo

En un experimento preliminar, evaluamos el tiempo óptimo para el ensayo. Para su realización, empleamos como quimioatrayente el FBS (50% en medio L-15 incompleto), que forma parte del medio desarrollado en el presente trabajo para mantener los cultivos axénicos de *P. dicentrarchi*. Como se muestra en la Figura 31, los trofozoítos migraron a los pocillos que contenían FBS; el tiempo mínimo requerido para una respuesta quimiotáctica clara fue de aproximadamente 2 horas y la respuesta máxima fue observada tras 3-4 horas. Transcurrido este periodo de incubación la viabilidad de los ciliados fue del 100%, y por lo tanto nosotros empleamos un tiempo de ensayo de 4 horas en los ensayos posteriores.

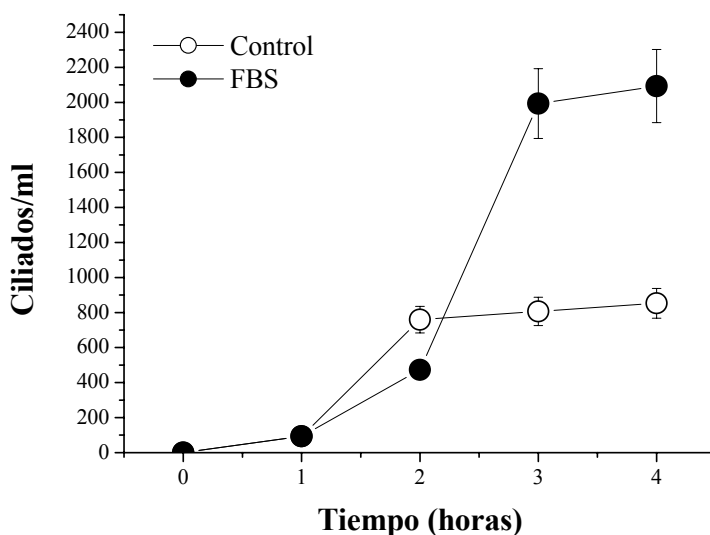


Figura 31. Periodo de tiempo (0-4 horas) de la quimiotaxis de los trofozoítos de *P. dicentrarchi* con un 50% de suero fetal bovino (FBS) como quimioatrayente. El ensayo fue realizado a 20 °C. Cada punto representa la media \pm error estándar ($n = 5$) del número de ciliados/ml dentro del tubo capilar y del pocillo B.

Este experimento preliminar también discriminó entre las diferentes concentraciones de quimioatrayente, con una evidente respuesta dependiente de la dosis sobre el rango de concentración de FBS (0-50%), y la quimioatracción estadísticamente significativa observada a concentraciones del 12.5% o superiores (Figura 32).

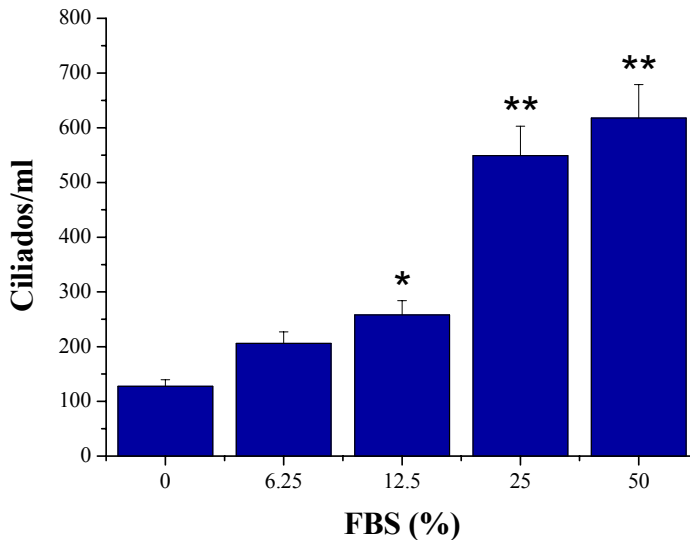


Figura 32. Actividades quimioatrayentes de diferentes concentraciones de FBS para los trofozoítos de *P. dicentrarchi*. Cada barra representa la media \pm error estándar ($n = 5$) del número de ciliados/ml dentro del tubo capilar y del pocillo B al final de las 4 horas de ensayo. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ respecto a los ciliados incubados sin FBS.

Puesto que los trofozoítos de *P. dicentrarchi* cultivados en medio L-15 completo mantienen su máxima viabilidad, a continuación realizamos ensayos para evaluar si el propio L-15 muestra actividad quimioatrayente. Como puede observarse en la Figura 33, los ciliados mantenidos en PBS migraron hacia el L-15, lo que indica que este medio contiene quimioatrayentes. Además, la migración hacia el suero de rodaballo normal (SRN) en medio L-15 fue mucho más marcada que la migración hacia el SRN en PBS.

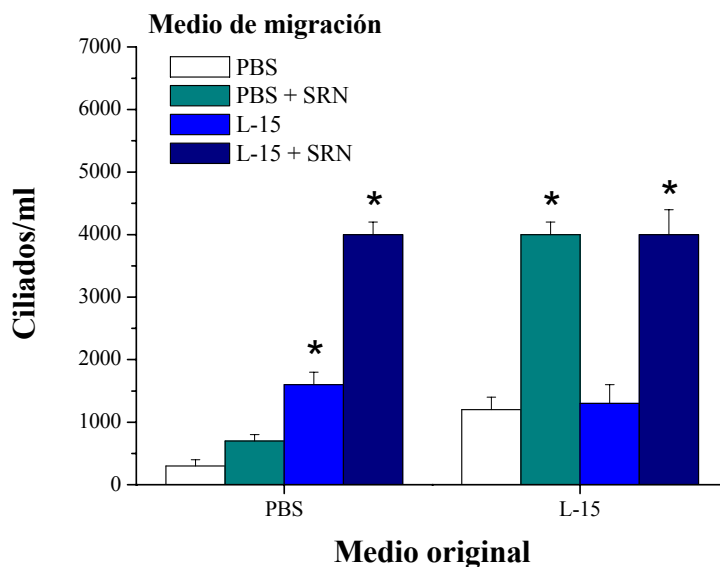


Figura 33. Actividades quimioatrayentes del medio L-15 para los trofozoítos de *P. dicentrarchi*. Al inicio de cada ensayo, el pocillo A contenía trofozoítos en PBS o medio L-15 (Medio original); el pocillo B contenía sólo PBS, sólo L-15, PBS más suero de rodaballo normal (SRN) o L-15 más SRN (Medio de migración). En los pocillos que contenían SRN, la concentración final de SRN fue del 50%. Cada barra representa la media \pm error estándar ($n = 5$) del número de ciliados/ml dentro del tubo capilar y del pocillo B al final de las 4 horas de ensayo. * $P < 0.01$ respecto al control correspondiente (Medio de migración sólo con PBS).

La Figura 34 resume los resultados de los ensayos de la actividad quimioatrayente de diferentes componentes tisulares del rodaballo (considerando estos tejidos invadidos por *P. dicentrarchi*) y de bacterias (la presa natural de *P. dicentrarchi* en el estado de vida libre). Ni las bacterias ni las células sanguíneas ni las células de otros tejidos del rodaballo tuvieron efectos quimioatrayentes significativos. Sin embargo, la sangre completa o el suero del rodaballo mostraron una fuerte actividad quimioatrayente (Figura 34). Finalmente, las actividades quimioatrayentes tanto de la sangre completa como del suero de los rodaballos infectados fueron incrementadas significativamente respecto a las de la sangre completa y del suero de los rodaballos no infectados (Figura 34).

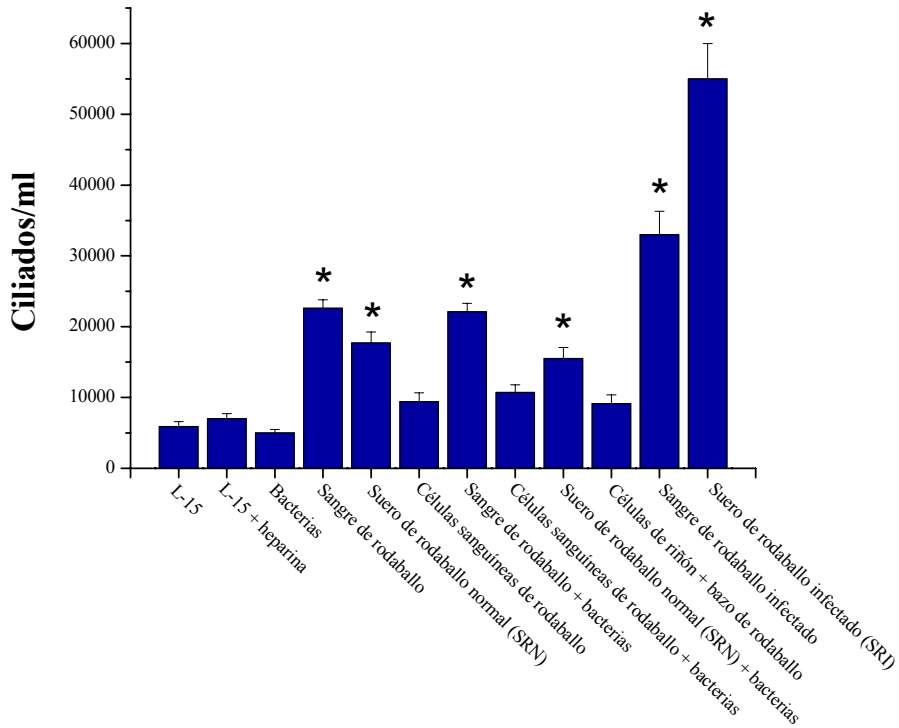


Figura 34. Actividades quimioatrayentes de la sangre del rodaballo, de las células del rodaballo y de las bacterias para los trofozoitos de *P. dicentrarchi*. Cada barra representa la media \pm error estándar ($n = 5$) del número de ciliados/ml dentro del tubo capilar y del pocillo B al final de las 4 horas de ensayo. * $P < 0.01$ respecto al control (Medio de migración sólo con L-15).

Preparaciones antigénicas e inmunización

Inmovilización/aglutinación de los ciliados por los diferentes sueros de rodaballo y reactividad de estos sueros con los antígenos de los ciliados (ELISA)

Como se muestra en la Tabla 7, todos los sueros de rodaballos que habían sobrevivido al brote natural de escuticociliatosis (grupo C) provocaban la aglutinación de *P. dicentrarchi* tras 2 horas de incubación con los ciliados (Figura 35A), mientras que sólo uno de los sueros de rodaballo con una infección activa (grupo B) provocaba la aglutinación. Como esperábamos, ninguno de los sueros de rodaballos jóvenes sanos (grupo A) reaccionaba con los ciliados *in vitro*.

Tabla 7. Actividad aglutinante de los sueros de rodaballo y ratón tras 2 horas de incubación *in vitro* con *Philasterides dicentrarchi*.

Sueros	Sueros aglutinantes/Sueros totales (%)	Título del suero ^a
Sueros de rodaballo ^b		
Grupo A	0/10 (0)	–
Grupo B	1/5 (20)	1/80
Grupo C	5/5 (100)	1/320-1/640
Grupo D (+ 30 d)	6/19 (31.5)	1/5-1/40
Grupo D (+ 60 d)	16/19 (84)	1/20-1/640
Grupo E (+ 30 d)	0/19 (0)	–
Grupo E (+ 60 d)	0/19 (0)	–
Grupo F (+ 30 d)	0/19 (0)	–
Grupo F (+ 60 d)	8/19 (42)	1/5-1/40
Grupo G (+ 30 d)	0/19 (0)	–
Grupo G (+ 60 d)	0/19 (0)	–
Sueros de ratón		
Anti-LC	–	1/160
Anti-AC	–	1/160
Anti-PM	–	1/320

^aEl título de los sueros corresponde a la última dilución ensayada en la cual fue observada reacción de aglutinación.

^bLos sueros de los rodaballos pertenecientes a los grupos experimentales D, E, F y G (ver sección Material y Métodos) fueron obtenidos a los 30 días de la primera inmunización (+ 30 d) y a los 30 días de la inyección de recuerdo (+ 60 d).

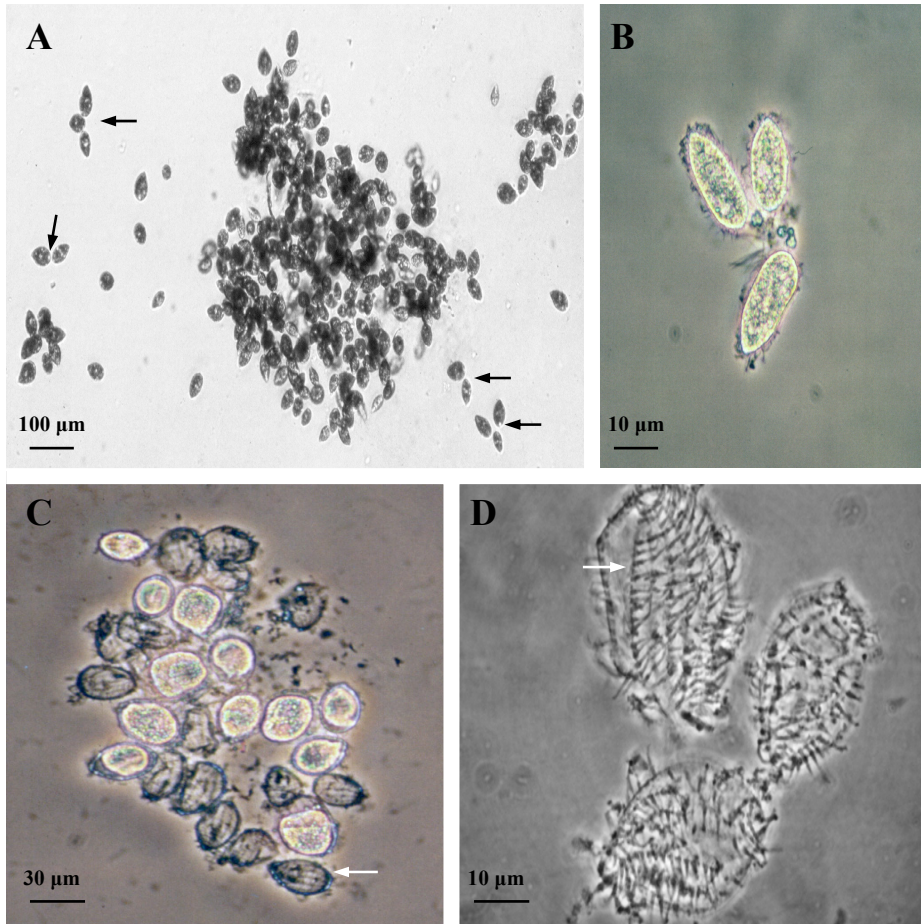


Figura 35. Inmovilización/aglutinación de *Philasterides dicentrarchi* tras la incubación con sueros inmunes. (A) Aglutinación tras 2 horas de incubación con un suero de rodaballo que sobrevivió al brote de escuticociliatosis (grupo C). Observar que algunos ciliados aún permanecen unidos antiapicalmente (flechas). (B) Detalle de 3 ciliados unidos antiapicalmente, que muestran un engrosamiento evidente de los cilios distales, posiblemente debido a la unión de las puntas de los cilios adyacentes. (C) Grupo de aglutinación obtenido con suero de ratón anti-PM, tras 9 horas de incubación. Observar la presencia de algunos ciliados dentro de sus cápsulas (muy probablemente constituidas de inmunocomplejos), así como de numerosas cápsulas vacías (flecha) de las que ha escapado el ciliado. (D) Detalle de tres cápsulas vacías que muestran cómo estas estructuras replican estrechamente la topografía de la superficie del ciliado, incluso con los cilios perfectamente formados. La flecha indica la línea de fractura a través de la que emergió el ciliado.

La reacción de aglutinación parece iniciarse principalmente en la región posterior del ciliado, especialmente el cilio caudal, de modo que en pocos minutos

de incubación se pueden observar parejas de ciliados unidos por esta estructura, pareciendo a menudo que intentan separarse mediante natación en direcciones opuestas. Tras 2 horas de incubación, la mayoría de los ciliados habían aglutinado en grandes grupos (Figura 35A), en la mayor parte de los casos reteniendo alguna movilidad de los cilios somáticos. A pesar de esta movilidad ciliar, la mayoría de los ciliados no aglutinados mostraban su capacidad natatoria reducida y un engrosamiento distal de los cilios, aparentemente debido a la adhesión de los extremos libres de los cilios adyacentes (Figura 35B). En los pequeños grupos de ciliados, como en los grupos de parejas, la aglutinación antiapical es evidente (Figuras 35A, B). En ningún caso fue observada lisis celular, incluso a las concentraciones de suero más altas estudiadas (diluido 5 veces).

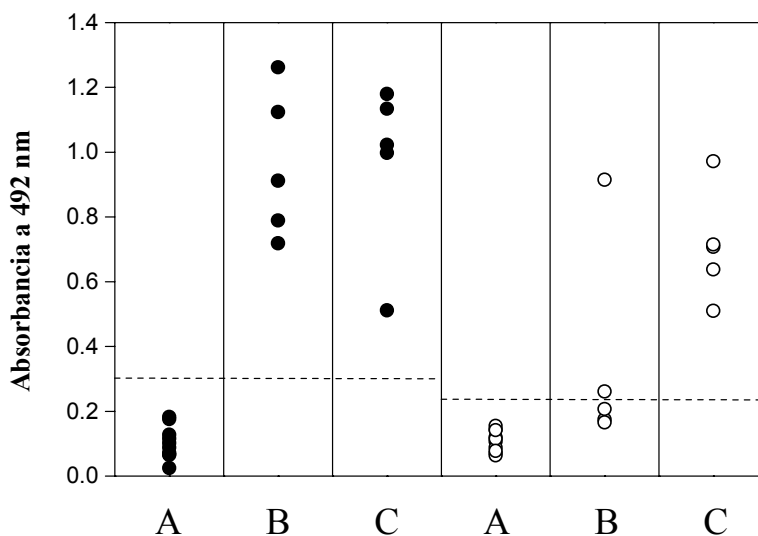


Figura 36. ELISA: reactividades de los sueros de los rodaballos jóvenes sanos (grupo A; $n = 10$), los rodaballos adultos con escuticociliatosis (grupo B; $n = 5$) y los rodaballos adultos que sobrevivieron al brote de escuticociliatosis en la piscifactoría (grupo C; $n = 5$) con el extracto crudo (●) o la fracción antigénica ciliar (○) de *Philasterides dicentrarchi*. Las líneas discontinuas representan los valores de corte (absorbancia media + 4 D.E.) para cada antígeno, obtenidas en base a los resultados para 10 sueros de rodaballos jóvenes sanos (grupo A).

Como se muestra en la Figura 36, todos los sueros de los rodaballos del grupo B mostraban una fuerte reactividad con el extracto crudo del ciliado en el ELISA, pero sólo un suero (el cual aglutinaba los ciliados *in vitro*) mostraba una fuerte reactividad con los antígenos ciliares. En contraste, todos los sueros del grupo C mostraban reactividad con el extracto crudo y con los antígenos ciliares, sin una correlación clara entre la reactividad anti-ciliar en el ELISA y el título en el ensayo de inmovilización/aglutinación.

Inmovilización/aglutinación de los ciliados por los diferentes sueros de ratón

Los sueros anti-LC, anti-AC y anti-PM de ratón inducían rápidamente la aglutinación de los ciliados. La aglutinación, inicialmente, era de nuevo antiapical, y progresaba de un modo similar al que fue observado con los sueros de rodaballo, aunque bastante más rápido. Nuevamente, ninguno de estos sueros provocaba lisis. Tras 9 horas de incubación, los pocillos que mostraban aglutinación clara tras 2 horas del inicio del ensayo mostraban (a) numerosos ciliados nadando libremente en el medio, (b) abundantes estructuras transparentes similares a cápsulas mostrando la topografía superficial precisa del ciliado, incluidos los cilios somáticos (Figuras 35C, D) y (c) ciliados moviéndose de modo giratorio dentro de algunas de esas cápsulas (Figura 35C). Una observación cuidadosa de estos últimos revelaba la capacidad de los ciliados para abandonar las cápsulas, tras aproximadamente 4-5 horas de incubación. Este fenómeno fue observado igualmente tras largos periodos similares de incubación con los sueros de rodaballo. Sorprendentemente, cuando los ciliados liberados de sus cápsulas tras 24 horas de incubación con el suero anti-PM (dilución 1:10) fueron incubados nuevamente con el mismo suero (otra vez dilución 1:10), más del 99% de los ciliados no se aglutinaron. En contraste, este suero aglutinaba rápidamente ciliados que habían sido incubados durante 24 horas en presencia de suero de ratón preinmune que no los aglutinaba.

Eficacia de los diferentes protocolos de inmunización en los rodaballos y reactividad de sus sueros con los antígenos de los ciliados (ELISA)

Habiendo confirmado que *P. dicentrarchi* expresa antígenos de inmovilización sobre su superficie que inducen la respuesta inmunitaria del rodaballo, y que estos anticuerpos asimismo protegen contra *I. Multifiliis* (otro ciliado patógeno de peces), analizamos la eficacia de diferentes protocolos de inmunización para inducir la síntesis de anticuerpos aglutinantes y generar una respuesta protectora contra la infección experimental en el rodaballo. Para este fin, los peces fueron inoculados con una inyección intraperitoneal de lisado de ciliados (con o sin adyuvante completo de Freund; ACF) o con ciliados fijados en formalina. Como se muestra en la Tabla 7, sólo la inmunización con el lisado de ciliados con ACF (grupo D) inducía niveles detectables de anticuerpos aglutinantes 30 días después de la primera inmunización (grupo D +30 días; 31.5%). La administración de la inyección de recuerdo incrementaba considerablemente el nivel de anticuerpos aglutinantes en este grupo (grupo D +60 días; 84%) y en el grupo de peces inoculados con ciliados fijados en formalina (grupo F +60 días; 42%). Sorprendentemente, el protocolo de inmunización basado en la inyección del lisado de ciliados sin adyuvante no generaba anticuerpos aglutinantes incluso tras la reinmunización.

La Figura 37 muestra las reactividades en el ELISA de los sueros de rodaballos inmunizados por los diferentes protocolos estudiados contra el extracto crudo y la fracción antigénica ciliar. Como puede observarse, los tres protocolos (especialmente la inmunización con el lisado de ciliados más ACF) inducían la síntesis de niveles detectables de anticuerpos contra el extracto crudo de los ciliados (Figura 37A).

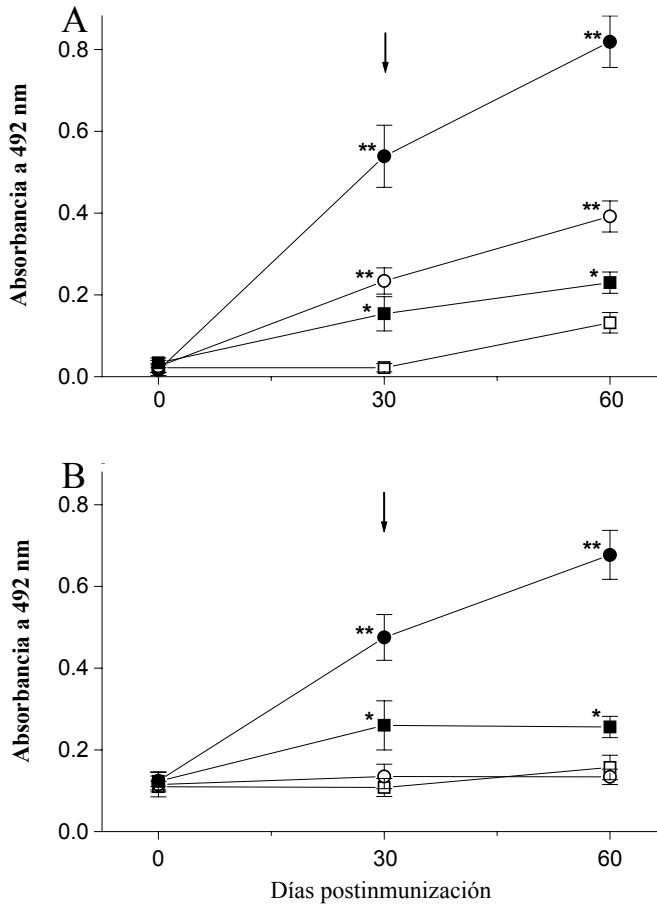


Figura 37. Curso de tiempo de la respuesta humoral anti-*Philasterides* de los peces inmunizados con el lisado de ciliados más ACF en el grupo D (●), el lisado de ciliados sin ACF en el grupo E (○) y los ciliados fijados en formalina en el grupo F (■). El grupo control son los peces inyectados con PBS en el grupo G (□). Cada punto representa la media \pm error estándar de las absorbancias obtenidas en los ensayos de 19 sueros de cada grupo contra el extracto crudo (A) y la fracción antigénica ciliar (B) de *P. dicentrarchi*. Las flechas verticales indican el momento en el que los peces recibieron la inyección de recuerdo (ver sección Material y Métodos). Los asteriscos indican una diferencia significativa ($*P < 0.05$, $**P < 0.0001$; test *t* de Student) respecto a los peces control.

Los anticuerpos contra los antígenos ciliares (Figura 37B) fueron detectados sólo en los sueros de los rodaballos inmunizados con lisado de ciliados más ACF o con ciliados fijados en formalina (grupos D y F), aunque una vez más no observamos una relación clara entre las reactividades observadas en el ELISA y

los títulos efectivos en el ensayo de inmovilización/aglutinación. En contraste, la inmunización con lisado de ciliados sin ACF (grupo E) no inducía una respuesta inmunitaria detectable, incluso tras la inyección de recuerdo. Este resultado está de acuerdo con la falta de actividad aglutinante de los ciliados de este suero (Tabla 7).

Evaluación de los diferentes protocolos de inmunización frente a la infección experimental

De los 3 protocolos de inmunización estudiados, 2 (la inyección intraperitoneal con lisado de ciliados más adyuvante, grupo D, y la inyección intraperitoneal con ciliados fijados en formalina, grupo F) conferían alguna protección tras la infección experimental (73.7% y 31.6% de individuos protegidos, respectivamente; Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de supervivencia y media de días para morir (MDM) de los rodaballos inmunizados tras la infección experimental con *Philasterides dicentrarchi*.

Grupo experimental	Preparación inyectada ^a	Supervivencia (%)	MDM ^b
Grupo D	LC + ACF	73.7 ^c	10.8**
Grupo E	LC	0	7.7
Grupo F	CFF	31.6 ^c	9.1*
Grupo G	PBS	0	6.1

Los asteriscos indican una diferencia significativa (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) respecto a los peces control inyectados con PBS (grupo G) como fue determinado con el test de la t de Student.

^a LC + ACF: lisado de ciliados con adyuvante completo de Freund; LC: lisado de ciliados; CFF: ciliados fijados en formalina.

^b MDM: media de días para morir.

^c Todos los peces supervivientes a las 4 semanas de la infección estaban libres de ciliados.

Además, en ambos casos la media de los días para morir de los peces se incrementó significativamente respecto al control. Ninguno de los peces

supervivientes mostraba signos de infección, o ciliados en la cavidad peritoneal u otros órganos o tejidos (incluida la sangre). En contraste, todos los peces que murieron tras la infección experimental (de los grupos D, E, F y G) mostraban una infección generalizada con abundante presencia de ciliados en la sangre, y en un amplio rango de órganos y tejidos.

Caracterización de los principales antígenos de *P. dicentrarchi* reconocidos por los sueros de rodaballo y ratón con capacidad de inmovilización/aglutinación

Para tal fin, fueron separados los extractos de los ciliados por SDS-PAGE y fue investigado el reconocimiento antigénico por *immunoblot*, con diferentes sueros de ratón y rodaballo aglutinantes y no aglutinantes como sondas (Figura 38).

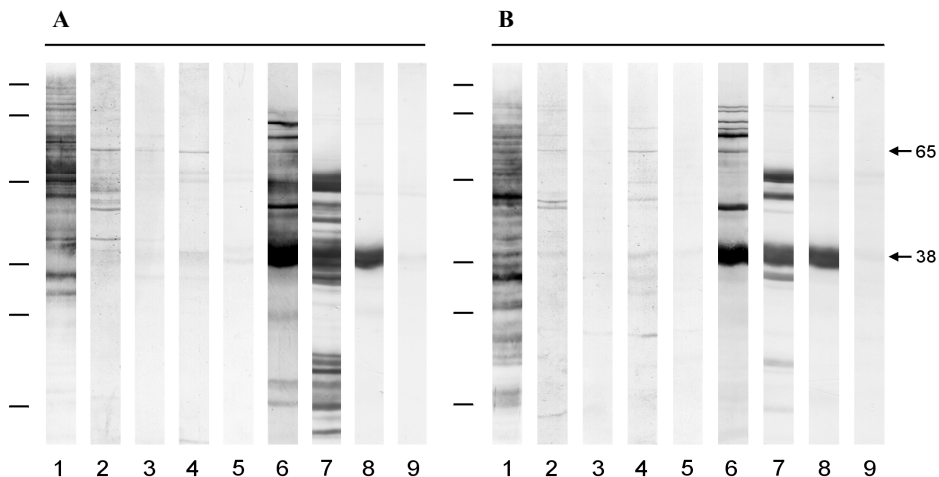


Figura 38. *Immunoblots* (*Western blots*) de los antígenos ciliares (A) y de las proteínas integrales de la membrana (B) de *Philasterides dicentrarchi* usando varios sueros de ratón y rodaballo. Canal 1: sueros aglutinantes juntados de los rodaballos que sobrevivieron al brote de escuticociliatosis (grupo C); canal 2: sueros aglutinantes juntados de los peces inyectados con el lisado de ciliados más ACF (grupo D, +60d); canal 3: sueros juntados de los peces inyectados con el lisado de ciliados sin ACF (grupo E, +60d); canal 4: sueros aglutinantes juntados de los rodaballos inyectados con los ciliados fijados en formalina (grupo F, +60d); canal 5: sueros control juntados de los peces inyectados con PBS (grupo G, +60d); canales 6, 7 y 8: sueros policlonales de ratón contra el lisado de ciliados (anti-LC), los cilios (anti-AC) y las proteínas integrales de la membrana (anti-PM) respectivamente; canal 9: suero de ratón preinmune. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12.5% bajo condiciones reductoras. Las masas moleculares relativas de los marcadores estándar (111, 73, 47.5, 33.9, 28.8 y 20.5 kD desde la parte superior a la inferior) se muestran a la izquierda de cada *immunoblot*. La posición de las bandas principales de 38 y 65 kD se indican a la derecha (flechas).

Como controles negativos usamos un suero de ratón preimmune y una unión de los sueros de los peces inyectados con PBS (grupo G). Como puede observarse en la Figura 38 (canales 6, 7 y 8), los 3 sueros de ratón reconocían fuertemente una banda de aproximadamente 38 kD tanto en la fracción AC como en la PM. Esta banda era también la única reconocida por el suero anti-PM (Figura 38, canales 8).

La tinción con azul Coomassie de los gels de la SDS-PAGE indicaba que este componente es el polipéptido principal en las fracciones AC y PM (Figura 39). La banda tenía una apariencia más bien distorsionada, y mostraba ligeras variaciones en la migración electroforética dependiendo de la cantidad de muestra en el gel.

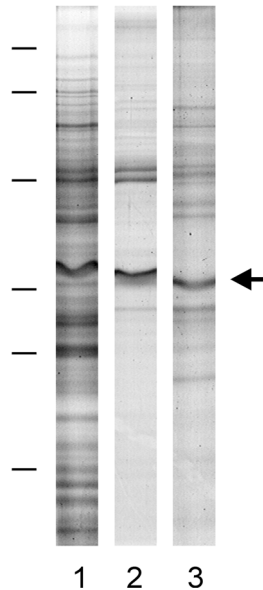


Figura 39. Análisis mediante SDS-PAGE del lisado de ciliados (canal 1), los cilios (canal 2) y las proteínas integrales de la membrana (canal 3) de *Philasterides dicentrarchi*. Las proteínas fueron separadas en gels de poliacrilamida al 12.5% bajo condiciones reductoras. Las masas moleculares relativas de los marcadores estándar (111, 73, 47.5, 33.9, 28.8 y 20.5 kD desde la parte superior a la inferior) se muestran a la izquierda. La posición de la banda principal de 38 kD se indica a la derecha (flecha).

Este antígeno de 38 kD no era el antígeno principal reconocido por ninguno de los lotes de sueros de rodaballo. De nuevo, sin embargo, los sueros que mostraban reactividad en el *immunoblot* eran aquellos que mostraban actividad en el ensayo de inmovilización/aglutinación; por ejemplo, los sueros del grupo C (Figura 38, canales 1), del grupo D (Figura 38, canales 2) y del grupo F (Figura 38, canales 4). Estos lotes de sueros reconocían una banda de aproximadamente 65 kD en las fracciones AC y PM; el único suero de ratón que reconocía esta banda era el suero anti-LC (Figura 38, canales 6).

Capacidad moduladora del ciliado sobre la respuesta inmunitaria innata del rodaballo

Efectos de la dosis y la viabilidad de *P. dicentrarchi* en la actividad fagocítica de los leucocitos peritoneales

Los efectos de la dosis de inoculación de *P. dicentrarchi* en la actividad fagocítica fueron investigados en primer lugar. Para este fin, fueron inyectados intraperitonealmente grupos de 5 rodaballos con 1 ml de tioglicolato al 3% conteniendo 5×10^3 ó 10^5 ciliados procedentes de cultivo *in vitro*. A los cinco días, fueron extraídos los leucocitos peritoneales y la actividad fagocítica fue ensayada por incubación con células *K. lactis* marcadas con FITC, en presencia o ausencia de suero de rodaballo normal (SRN) o de rodaballo infectado con *P. dicentrarchi* (SRI). Los resultados obtenidos (Figura 40A) indican que la inoculación con *P. dicentrarchi* vivos no modificaba la capacidad fagocítica de los leucocitos, independientemente de la dosis administrada. La adición de SRN al medio parece que incrementaba ligeramente la respuesta fagocítica; sin embargo, sólo la adición de SRI causaba un incremento estadísticamente significativo (Figura 40A).

Para investigar si la viabilidad de *P. dicentrarchi* afecta a la fagocitosis producida por los leucocitos peritoneales inflamatorios, realizamos un segundo experimento en el que grupos de 5 rodaballos fueron inyectados intraperitonealmente con 10^5 *P. dicentrarchi* vivos o 10^5 *P. dicentrarchi* muertos más tioglicolato. Tras 5 días, los leucocitos peritoneales fueron extraídos y ensayamos la actividad fagocítica por incubación con células *K. lactis* marcadas con FITC, en presencia o ausencia de suero de rodaballo normal (SRN) o infectado con *P. dicentrarchi* (SRI). Los resultados obtenidos (Figura 40B) indican que los leucocitos de los rodaballos inyectados con *P. dicentrarchi* muertos mostraban una actividad fagocítica significativamente mayor que los leucocitos de los rodaballos inyectados con *P. dicentrarchi* vivos.

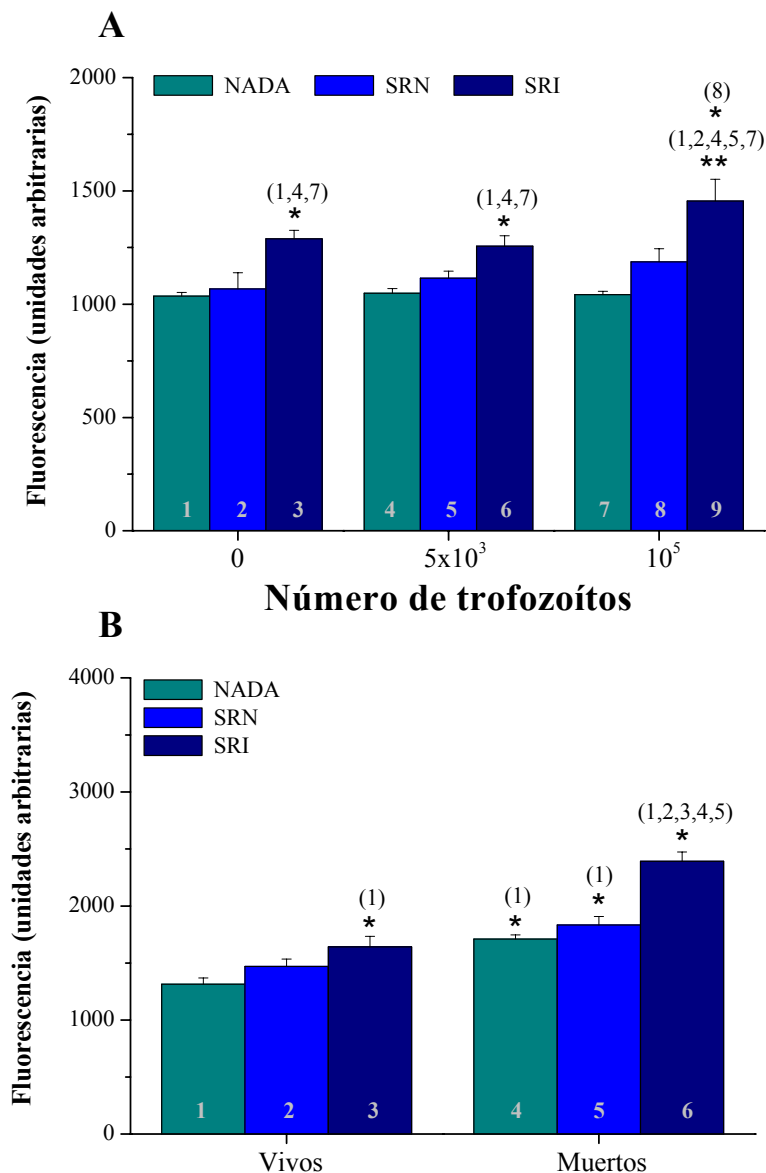


Figura 40. Efectos de la inoculación *in vivo* con trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos (dosis 0, 5×10^3 ó 10^5) (A) y de la inoculación *in vivo* con 10^5 trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos o muertos (B) más un 3% de tioglicolato en la capacidad fagocítica *in vitro* de los leucocitos peritoneales adherentes obtenidos de peces así tratados. En algunos ensayos, fue añadido al medio un 10% de suero de rodaballo normal (SRN) o de suero de rodaballo infectado (SRI). Cada barra representa la media \pm error estándar ($n = 5$) de la fluorescencia (unidades arbitrarias). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) respecto a los grupos indicados en los paréntesis; la numeración de los grupos está indicada en la base de cada barra.

Esta actividad fagocítica significativamente mayor de los leucocitos de los rodaballos inyectados con *P. dicentrarchi* muertos fue observada igualmente en los ensayos realizados en presencia de SRI (Figura 40B, comparar las barras 3 y 6).

Efectos de la dosis de *P. dicentrarchi* en la producción intracelular y extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales

Para investigar si los trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos modulan la producción intra o extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales del rodaballo, fueron empleados leucocitos de rodaballos inoculados intraperitonealmente con 1 ml de tioglicolato al 3% conteniendo 5×10^3 ó 10^5 trofozoítos vivos. Las producciones extracelular e intracelular de ROS por estos leucocitos en respuesta al PMA o a *K. lactis* respectivamente, fueron ensayadas como describimos en Material y Métodos. Los resultados de estos ensayos (Figura 41) indican que la inoculación *in vivo* con *P. dicentrarchi* vivos no tenía efecto en la producción extracelular de ROS *in vitro* en ausencia de suero de rodaballo (Figura 41A); sin embargo, en presencia de SRN la producción extracelular de ROS por los leucocitos de los rodaballos inoculados era notablemente mayor que la producción por los leucocitos de los rodaballos no inoculados (Figura 41A, comparar las barras 5 y 2).

La producción intracelular de ROS por los leucocitos de los rodaballos inoculados fue notablemente menor que la producción por los leucocitos de los rodaballos no inoculados (Figura 41B). La presencia de SRN o SRI en el medio incrementaba significativamente la producción intracelular de ROS por los leucocitos, tanto de los rodaballos inoculados como de los no inoculados (Figura 41B). El efecto estimulador del SRN en la producción intracelular de ROS por los leucocitos de los rodaballos inoculados era significativamente mayor que el efecto estimulador del SRI, no viéndose afectado por la dosis infectiva (Figura 41B, comparar las barras 5 y 6, y las barras 8 y 9).

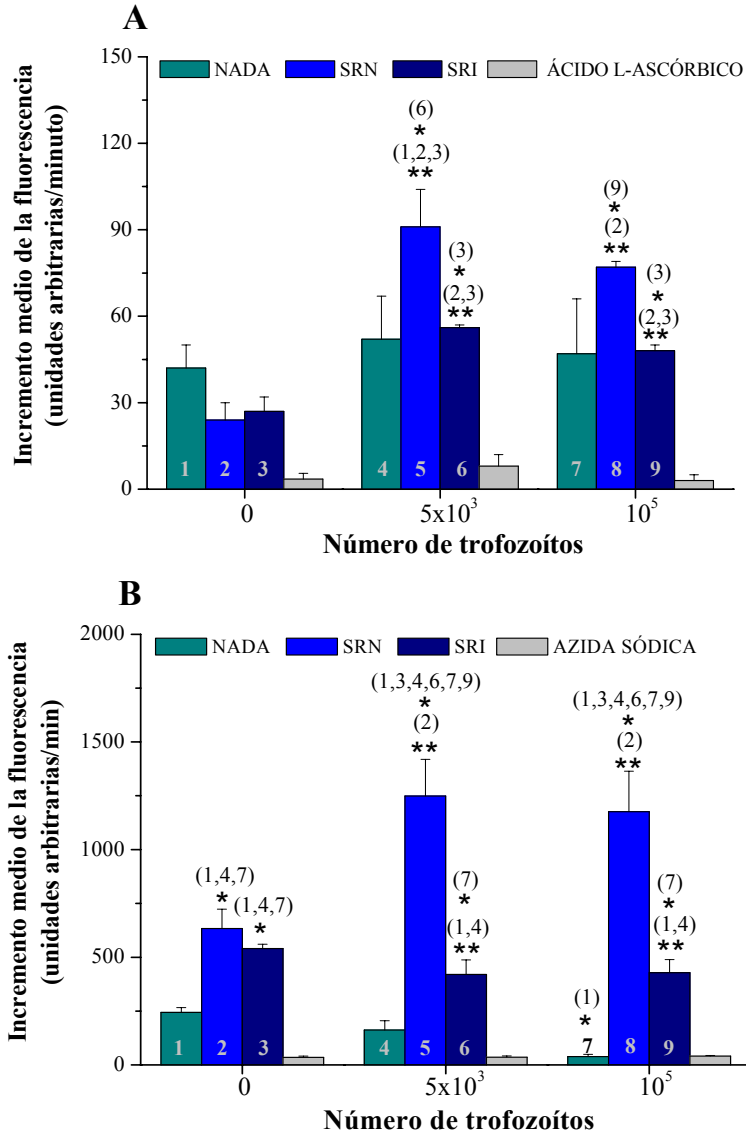


Figura 41. Producción extracelular (A) e intracelular (B) de ROS por los leucocitos peritoneales adherentes del rodabalo obtenidos tras la inoculación *in vivo* con 0, 5 x 10³ ó 10⁵ trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos más un 3% de tioglicolato. El estimulante para la producción *in vitro* extracelular de ROS fue el PMA y para la producción intracelular fue la levadura *K. Lactis*. En algunos ensayos el medio contenía un 10% de suero de rodabalo normal (SRN) o de suero de rodabalo infectado (SRI), ácido L-ascórbico (1 mM) (inhibidor de la producción extracelular de ROS) o azida sódica (1mM) (inhibidor de la producción intracelular de ROS). Cada barra representa la media ± error estándar (*n* = 5) de la fluorescencia (unidades arbitrarias). Los asteriscos indican diferencias significativas (**P* < 0.05, ***P* < 0.01) respecto a los grupos indicados en los paréntesis; la numeración de los grupos está indicada en la base de cada barra.

Efectos de la viabilidad de *P. dicentrarchi* en la producción extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales

Para estudiar si los efectos de *P. dicentrarchi* observados en la producción extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales del rodaballo están afectados por la viabilidad de los ciliados, realizamos dos experimentos. En el primero, los rodaballos fueron inoculados con 1 ml de tioglicolato al 3% conteniendo 10^5 *P. dicentrarchi* vivos o muertos, y a los cinco días fue ensayada la producción extracelular de ROS por los leucocitos de estos peces en respuesta a la estimulación con PMA, en presencia o ausencia de SRN, SRI, o ácido L-ascórbico. Los resultados obtenidos (Figura 42A) muestran que no había diferencias significativas en la producción extracelular de ROS por los leucocitos de los rodaballos infectados con *P. dicentrarchi* vivos o muertos. Cuando el ensayo fue realizado en presencia de SRN, sin embargo, la producción extracelular de ROS por los leucocitos de los rodaballos infectados con *P. dicentrarchi* vivos era marcada y significativamente mayor que la de los leucocitos de los rodaballos infectados con *P. dicentrarchi* muertos (Figura 42A, comparar las barras 2 y 5).

En el segundo experimento, los rodaballos fueron inoculados con 1 ml de tioglicolato al 3%, y a los cinco días fue ensayada la producción extracelular de ROS por los leucocitos de estos peces en respuesta a la estimulación con PMA más 10^5 *P. dicentrarchi* vivos o muertos, en presencia o ausencia de SRN, SRI, o ácido L-ascórbico. En los ensayos sin suero de rodaballo en el medio, la producción extracelular de ROS no difería entre los leucocitos estimulados con *P. dicentrarchi* vivos y los leucocitos estimulados con *P. dicentrarchi* muertos (Figura 42B, comparar las barras 1 y 4). En los ensayos con SRN y SRI en el medio, los *P. dicentrarchi* muertos inducían una producción extracelular de ROS significativamente más efectiva que los *P. dicentrarchi* vivos (Figura 42B, comparar las barras 5 y 2, y 6 con 3).

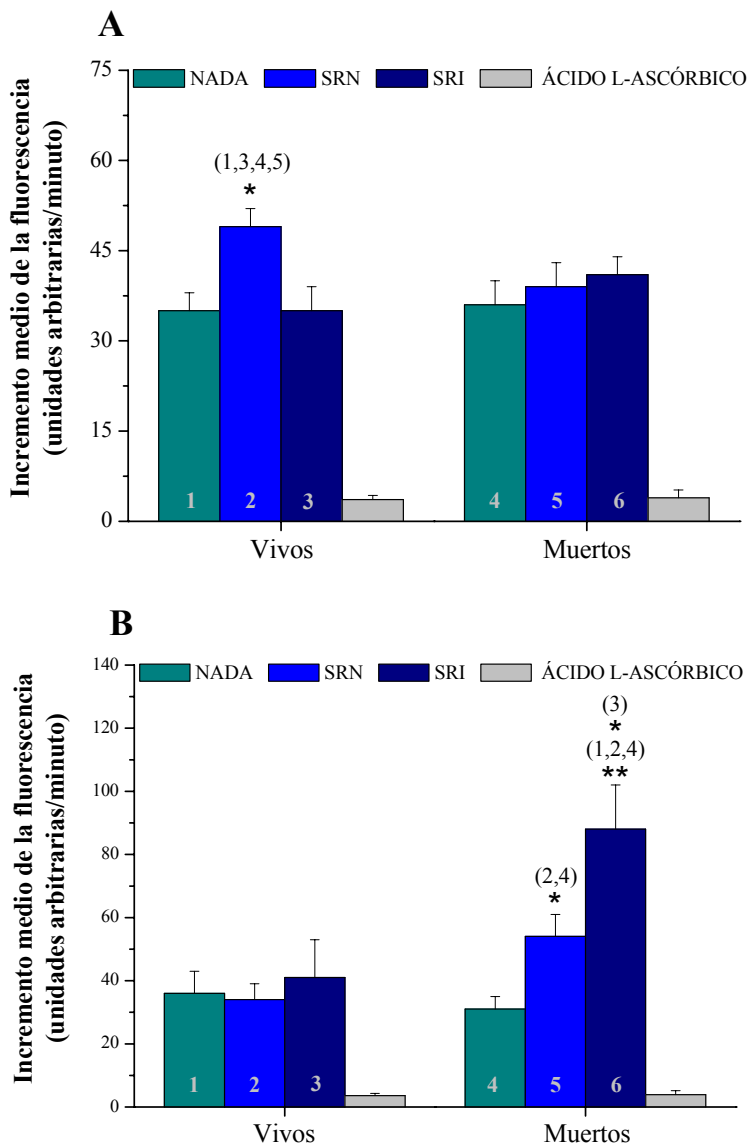


Figura 42. Producción extracelular de ROS (A) por los leucocitos peritoneales adherentes del rodaballo obtenidos tras la inoculación *in vivo* con trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos o muertos (10^5 por pez) más un 3% de tioglicolato, con la estimulación *in vitro* con PMA, o (B) por los leucocitos peritoneales adherentes del rodaballo obtenidos tras la inoculación *in vivo* con un 3% de tioglicolato, con la estimulación *in vitro* con PMA más 10^5 trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos o muertos. En algunos ensayos el medio contenía un 10% de suero de rodaballo normal (SRN) o de suero de rodaballo infectado (SRI), o ácido L-ascórbico (1mM) (inhibidor de la producción extracelular de ROS). Cada barra representa la media \pm error estándar ($n = 5$) de la fluorescencia (unidades arbitrarias). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) respecto a los grupos indicados en los paréntesis; la numeración de los grupos está indicada en la base de cada barra.

Efectos de la inoculación previa de los rodaballos con *P. dicentrarchi* en la producción *in vitro* de NO[•] por los leucocitos peritoneales

En este experimento, los peces fueron inoculados intraperitonealmente con 1 ml de tioglicolato al 3% conteniendo 10^5 trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos o muertos. Los leucocitos peritoneales fueron obtenidos a los 5 días de la inyección y estimulados *in vitro* con 100 ng/ml de LPS, añadiendo en algunos ensayos SRN, SRI o L-NMMA (inhibidor de la producción de NO[•]). Como puede observarse, los leucocitos estimulados *in vivo* con tioglicolato y *P. dicentrarchi* vivos o muertos, e *in vitro* sólo con LPS, no producían cantidades significativas de NO[•] - aproximadamente las mismas que en los ensayos con el L-NMMA, que es inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS)- (Figura 43, barras 1 y 4).

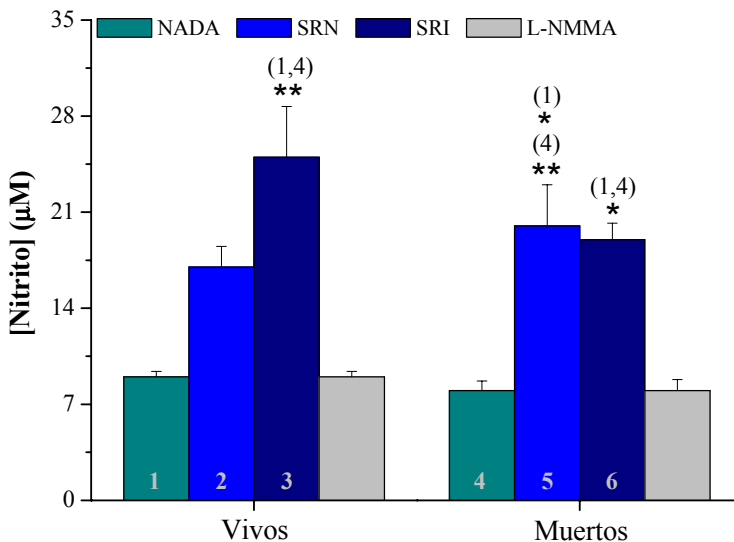


Figura 43. Efectos de la inoculación *in vivo* con 10^5 trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos o muertos más un 3% de tioglicolato en la producción de nitrito por los leucocitos peritoneales adherentes del rodaballo extraídos a los 5 días de la inoculación y estimulados *in vitro* con 100 ng/ml de LPS. En algunos ensayos el medio contenía un 10% de suero de rodaballo normal (SRN) o de suero de rodaballo infectado (SRI), o el análogo de la arginina N^G -monometil-L-arginina monoacetato (L-NMMA; 250 µM), un inhibidor de la producción de nitrito. Cada barra representa la media \pm error estándar ($n = 5$) de la fluorescencia (unidades arbitrarias). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) respecto a los grupos indicados en los paréntesis; la numeración de los grupos está indicada en la base de cada barra.

Sin embargo, los leucocitos estimulados adicionalmente *in vitro* con SRN o SRI mostraban un incremento significativo en la producción de NO^{*} (Figura 43, barras 3, 5 y 6; hacemos notar que no hay diferencias significativas entre la barra 2 y la barra 1, o entre la barra 6 y la barra 3).

Discusión

Las principales características morfológicas del escuticociliado detectadas en el presente estudio nos permitieron identificar esta especie como *Philasterides dicentrarchi* Dragesco, Dragesco, Coste, Gasc, Romestand, Raymond y Bouix, 1995. Este ciliado ha sido descrito como un parásito histiófago oportunista, que causa una enfermedad sistémica en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Dragesco y col., 1995) y en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Kim y col., 2004a). Los ciliados descritos en el presente estudio muestran sólo pequeñas diferencias con los descritos por estos autores: concretamente, nuestros ciliados mostraban de 13 a 14 cinetias somáticas -frente a las 14 o raramente 15 del de Dragesco y col. (1995) y a las 13-15 del de Kim y col. (2004a)-, y un cilio caudal más corto de 8.7-13 μm frente a las 10-23 μm del de Dragesco y col. (1995). En el caso del descrito por Kim y col. (2004a) no aparece la longitud del cilio caudal en su descripción. Nosotros no creemos que estas diferencias sean suficientes para justificar la consideración de nuestros ciliados como un taxón separado de *P. dicentrarchi*, particularmente teniendo en cuenta que la variabilidad biométrica intraespecífica es común en los ciliados (Fenchel, 1990; Wiackowski y col., 1999; Clamp, 2006).

Con anterioridad a los dos brotes de escuticociliatosis estudiados en este trabajo, se habían notificado 2 casos de infección por escuticociliados en rodaballos (*Psetta maxima*) de cultivo. En el primer caso, notificado de otra piscifactoría gallega por Dyková y Figueras (1994), la infección por ciliados fue concomitante con un brote de microsporidiosis debido a *Tetramicra brevifilum*. En este brote, la morfología de los ciliados responsables fue estudiada sólo a nivel histológico, y los autores fueron incapaces de alcanzar la identificación a nivel de especie. Sin embargo, las secciones histológicas impregnadas con protargol revelaron las siguientes características: (1) ciliados piriformes o con forma de lágrima con un extremo anterior puntiagudo, (2) de 10 a 13 cinetias somáticas, y (3) un cilio caudal no detectable. No obstante, el número de cinetias somáticas y la aparente ausencia de un cilio caudal deben ser interpretados con cuidado, puesto que la impregnación

con protargol no es adecuada para la visualización de estas estructuras. Contemplados conjuntamente, estos datos morfológicos son insuficientes para confirmar que el ciliado de Dyková y Figueras era *Philasterides dicentrarchi*. Sin embargo, los datos son ciertamente suficientes para confirmar que no se trata del género *Uronema*, que se caracteriza por un extremo anterior no puntiagudo (Thompson, 1964; Cheung y col., 1980; Coppellotti, 1990; Munday y col., 1997; Jee y col., 2001; Azad y col., 2007).

El segundo caso previo notificado de infección por escuticociliados de rodaballos en cultivo fue de una piscifactoría noruega (Sterud y col., 2000). Desafortunadamente, estos autores no proporcionaron en su publicación ninguna información del aparato bucal, por lo que la identificación a nivel de especie era imposible. Sin embargo, el Dr. E. Sterud ha confirmado personalmente a nuestro laboratorio que estos brotes de la enfermedad descritos en Noruega eran debidos al escuticociliado *Uronema marinum*, por lo que debe tenerse en cuenta que *P. dicentrarchi* no es el único agente causal de la escuticociliatosis que afecta a las piscifactorías de rodaballo en Europa.

Desde el punto de vista patológico, la infección descrita aquí es similar a la notificada por Sterud y col. (2000), aunque además de sus descubrimientos nosotros observamos que en las fases avanzadas de la infección también puede haber una acusada destrucción necrótica del parénquima hepático y una distensión abdominal severa debida a la acumulación de fluido ascítico (conteniendo abundantes ciliados) en la cavidad corporal. Esta última manifestación es también común en las lubinas infectadas con *Philasterides dicentrarchi* (Dragesco y col., 1995). Si se levanta la sospecha por los signos clínicos, el diagnóstico se puede llevar a cabo fácilmente, sin ninguna necesidad de sacrificar los peces, mediante (1) abdominocentesis, (2) una muestra de sangre de la vena caudal, y/o (3) una biopsia branquial, en todos los casos con el posterior examen de las muestras

frescas. Debe ser recalcado que en el presente estudio las ascitis estaban siempre asociadas con una abundante presencia de ciliados.

La acumulación de ciliados observada en el presente estudio en los principales vasos sanguíneos de las branquias, y particularmente en los capilares de las laminillas secundarias, puede esperarse que tenga un marcado efecto obstructivo de la red capilar de las laminillas, dificultando la captación y el transporte de oxígeno, tanto que la asfixia es posiblemente una de las principales causas de muerte de los peces afectados. En el presente estudio no realizamos ningún tipo de estudio hematológico; sin embargo, la presencia de numerosos ciliados en el torrente sanguíneo durante la fase sistémica de la infección constituye también de manera clara un grave problema, puesto que los eritrocitos son ingeridos masivamente por los ciliados. En relación con esto, se ha demostrado que la infección de la lubina por *P. dicentrarchi* causa anemia hipocrómica severa (Dragesco y col., 1995).

La capacidad de ciertos escuticociliados para introducirse y reproducirse en el sistema nervioso central, produciendo la licuación del tejido cerebral, ha sido notificada en el rodaballo (Sterud y col., 2000) y en otras especies de cultivo, incluidos el atún de aleta azul del sur (*Thunnus maccoyii*) (Munday y col., 1997) y la palometa plateada (*Pampus argenteus*) (Azad y col., 2007). En los dos últimos casos, las infecciones fueron asociadas con manifestaciones encefalíticas (edema, engrosamiento meningítico, reacción linfocítica, etc.) muy similares a las observadas en el presente estudio.

La presencia de protozoos en el torrente sanguíneo, y en los tejidos conectivos perivascular y perineural, indica que *Philasterides dicentrarchi* emplea estos tejidos como rutas para acceder a casi todos los órganos del cuerpo. En el caso anterior, es probable que los ciliados entren o salgan del torrente sanguíneo a través del endotelio vascular, favorecidos por su gran capacidad para deformarse. En relación con esto, experimentos *in vitro* en nuestro laboratorio indican que estos

ciliados son capaces de atravesar mallas con un tamaño de poro de 5 μm (resultados no mostrados). Hasta ahora, sin embargo, no sabemos si la migración transendotelial en el pez sucede de manera no directa (por ejemplo, por simple migración activa del ciliado con la ayuda de su extremo anterior puntiagudo) o de manera guiada (como consecuencia de algún tipo de interacción entre las moléculas de adhesión y sus ligandos, como en el caso de las células inmunitarias). Además, la presencia de focos necróticos alrededor del ciliado en ciertos tejidos, y la detección de parásitos dentro de adipocitos y fibras musculares, sugieren que enzimas proteolíticas como las cisteín proteasas pueden ayudar a la migración de este ciliado dentro del hospedador, así como a la degradación de sus tejidos (Paramá y col., 2004b).

En *P. dicentrarchi*, la membrana exterior (membrana limitante) no parece ser continua con la membrana ciliar, como sucede en *Ichthyophthirius multifiliis* (Chapman y Kern, 1983). En algunos ciliados, como *Paramecium*, han sido descritas conexiones transversas o septos (Allen, 1971); sin embargo, tales estructuras no han sido observadas en nuestros *P. dicentrarchi*. En las dos terceras partes anteriores del cuerpo estaban presentes las dicinétidas. La presencia de dicinétidas en la ciliatura corporal es una de las características de la subclase Scuticociliatia, en contraste con las monocinétidas generalmente observadas en la subclase Hymenostomatia (Hausmann y Hülsmann, 1996).

Philasterides dicentrarchi presenta sacos parasomales distribuidos fundamentalmente alrededor de la base de la ciliatura somática, aunque algunas veces aparecen alrededor de la ciliatura oral. Ha sido sugerido que los sacos parasomales pueden jugar un papel en la endocitosis (Orias y Rasmussen, 1976; Diaspro y col., 2002; Elde y col., 2005), en la pinocitosis (Hausmann y Hülsmann, 1996), o pueden ser simplemente pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (Allen, 1971). La presencia de microtúbulos subpeliculares localizados

bajo la superficie celular y asociados con los cinetosomas es una característica compartida por varios ciliados no escuticociliados, como *Tetrahymena* (Fleury, 1991; Fleury y Lauret, 1994), y la localización de los microtúbulos en el epiplasma es diferente de la descrita en *Uronema* sp. (Kaneshiro y Holz, 1976).

El macronúcleo y el micronúcleo de *P. dicentrarchi* son morfológicamente similares a los de *Uronema* (Kaneshiro y Holz, 1976) y están localizados en la parte central del cuerpo. Como en *Uronema*, el macronúcleo muestra gránulos de cromatina dispersados por todo el nucleoplasma, mientras que los nucleolos granulares son observados en la periferia (Kaneshiro y Holz, 1976). El micronúcleo, como el de otros escuticociliados e himenostomados, está estrechamente asociado con el macronúcleo (Gorovski, 1973; Kaneshiro y Holz, 1976). A pesar de esta proximidad, nosotros no hemos detectado conexiones entre ambos núcleos. Este descubrimiento contrasta con los notificados para *Uronema* y *Tetrahymena* (Gorovski, 1973; Kaneshiro y Holz, 1976). Además, no hemos observado nucleolos en el micronúcleo, que están asimismo ausentes en *Uronema* (Kaneshiro y Holz, 1976).

P. dicentrarchi, al igual que *Tetrahymena*, tiene numerosas mitocondrias localizadas debajo de la corteza celular y paralelas a la superficie corporal (Elliot y Bak, 1964). En contraste, las especies de *Uronema* muestran una sola mitocondria grande que ocupa la mayor parte del área subpelicular (Kaneshiro y Holz, 1976). Las mitocondrias en *P. dicentrarchi* están generalmente asociadas con el retículo endoplasmático rugoso, y nosotros también observamos estructuras compatibles con pequeños dictiosomas similares a los encontrados en *Tetrahymena thermophila* (Kurz y Tiedtke, 1993).

Philasterides dicentrarchi posee extrusomas esféricos, denominados mucocistos por Dragesco y col. (1995), así como extrusomas fusiformes localizados cerca de la membrana plasmática. Debemos hacer notar que el término mucocisto no ha sido definido claramente, y que estas estructuras son interpretadas

de diferentes maneras por varios autores (Hausmann, 1978; Kugrens y col., 1994). Las vesículas de extrusión que no pueden ser clasificadas fácilmente como mucocistos en base a la forma y/o el contenido son consideradas generalmente orgánulos corticales. Así, el término mucocisto (implicando la presencia de sustancias mucosas) debe ser usado con cuidado (Tokuyasu y Scherbaum, 1965). En el presente estudio, fue observado que los extrusomas esféricos de *P. dicentrarchi* estaban fusionados con la membrana plasmática y liberaban su contenido al exterior. Esta liberación, de acuerdo con algunos autores, puede estar inducida por estímulos mecánicos o químicos (Rosati y Modeo, 2003); sin embargo, otros autores han sugerido que la liberación puede estar provocada por el glutaraldehido usado en la fijación (Tokuyasu y Scherbaum, 1965). Además, en *Tetrahymena pyriformis* ha sido observado que la morfología y el contenido de ambos tipos de extrusomas son variables: en concreto, los extrusomas pueden mostrar morfología fusiforme antes de la liberación y morfología esférica durante la liberación (Tokuyasu y Scherbaum, 1965). Pueden ocurrir cambios similares en *P. dicentrarchi*, puesto que nosotros sólo observamos mucocistos esféricos (nunca mucocistos fusiformes) liberando su contenido al exterior.

En base a las características morfológicas de los especímenes montados y teñidos (forma celular, número de cinetias somáticas, morfología de la membrana paraoral y de las membranelas, y la posición del poro de la vacuola contráctil), Kim y col. (2004a) identificaron como *P. dicentrarchi* un ciliado obtenido de lenguados japoneses (*Paralichthys olivaceus*) con infección sistémica en Corea. Estos mismos autores usaron la PCR para amplificar el gen SSUrRNA usando dos cebadores universales de este gen (denominados U1F y U1R), obteniendo un producto de amplificación de 1760 pb que fue depositado en la base de datos GenBank con el número de acceso AY642280. Sobre la base de esta secuencia, en el presente estudio nosotros diseñamos dos cebadores internos que amplificaban un fragmento de 350 pb de nuestro *P. dicentrarchi* aislado del rodaballo, permitiéndonos hacer

comparaciones filogenéticas con secuencias previamente notificadas de especies relacionadas. Esta secuencia nucleotídica parcial que obtuvimos mostraba una alta identidad (98%) con la secuencia correspondiente del *Philasterides dicentrarchi* aislado del lenguado japonés (Kim y col., 2004a), y mayor identidad aún (99%) con la secuencia del *Miamiensis avidus* (GenBank; número de acceso AY550080), aislado asimismo de lenguados japoneses que mostraban ulceración severa y hemorragia en el músculo esquelético (Jung y col., 2005). La descripción morfológica de *M. avidus* dada por Jung y col. (2005, 2007) coincide básicamente con las descripciones de *P. dicentrarchi* del rodaballo obtenida en el presente estudio, de la lubina (Dragesco y col., 1995) y del lenguado japonés (Kim y col., 2004a). Los análisis filogenéticos moleculares confirman que el *M. avidus* del lenguado japonés está estrechamente relacionado con *P. dicentrarchi*. Estos resultados están de acuerdo con los estudios morfológicos y moleculares en los que ambos organismos son considerados sinónimos (Song y Wilbert, 2000; Jung y col., 2007). Por otra parte, estos resultados indican también que *P. dicentrarchi* no está estrechamente relacionado con otros generos de escuticociliados que han sido implicados en la escuticociliatosis de peces en cultivo, particularmente *Uronema* y *Pseudocohnilembus* (Cheung y col., 1980; Munday y col., 1997; Sterud y col., 2000; Jee y col., 2001; Kim y col., 2004b; Azad y col., 2007).

Algunos ciliados de la clase Oligohymenophorea pueden crecer en diversos medios, abarcando desde simples suspensiones bacterianas a medios axénicos químicamente definidos de gran complejidad, lo que refleja el hecho de que estos organismos son capaces de alimentarse bien de compuestos de bajo peso molecular (por captación a través de la membrana celular) o bien de bacterias, células, fragmentos de tejidos y macromoléculas (por captación y digestión en las vacuolas citoplasmáticas) (Rasmussen, 1976).

En el presente estudio hemos desarrollado un método simple de cultivo axénico que permite la producción de cantidades razonablemente grandes de *P. dicentrarchi*. Las principales ventajas de este método en comparación con otros sistemas de cultivo axénico descritos previamente son la facilidad de preparación del medio y la posibilidad de controlar el pH del medio, en vista de la inclusión de rojo fenol en el medio L-15 disponible comercialmente. En contraste, por ejemplo, el medio de cultivo propuesto por Nerad y Daggett (1992) requiere la preparación y la mezcla de una emulsión de azolectina, una solución de vitaminas que contiene biotina, ácido fólico, nicotinamida, D-pantotenato cálcico, piridoxal·HCl, riboflavina, tiamina y ácido tióctico (ácido α -lipoico), así como peptona proteosa, tripticasa, ARN de levadura y agua marina artificial. En el caso de los medios químicamente definidos, la preparación es aún más complicada, requiriendo la inclusión de soluciones de aminoácidos esenciales y sales inorgánicas: tales medios incluyen los desarrollados para *Uronema marinum* por Hanna y Lilly (1971), para *Miamiensis* sp., *Parauronema virginianum* y *Uronema nigricans* por Soldo y Merlin (1972), y para *Mesanophrys* sp. por Morado (1993). El medio utilizado en el presente estudio es mucho más simple de preparar, ya que el L-15 (una preparación químicamente definida que contiene sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas) puede ser adquirido comercialmente. El medio L-15 tiene un contenido particularmente alto de aminoácidos en comparación con otros medios de cultivo celular disponibles comercialmente, estando presente la mayoría de los aminoácidos a una concentración 5 o más veces superior que por ejemplo en el medio de Eagle modificado por Dulbecco o en el medio de Dulbecco modificado por Iscove. Los niveles altos de aminoácidos parecen ser importantes para la supervivencia y el crecimiento de los escuticociliados en cultivo, y todos los medios químicamente definidos desarrollados hasta el momento han contenido aminoácidos a altas concentraciones (0.2-1.05 g/l, dependiendo del aminoácido).

Nuestros resultados indican que la temperatura óptima para el cultivo de *P. dicentrarchi* está entre 18 y 23 °C: a 13 °C el crecimiento era insignificante o muy reducido. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que los brotes de escuticociliatosis en las piscifactorías de rodaballo de nuestra región (Galicia, Noroeste de España) investigados en el presente trabajo coinciden con temperaturas del agua superiores a los 20 °C. En el brote de escuticociliatosis estudiado recientemente en el norte de Portugal por Ramos y col. (2007), fueron observadas altas mortalidades en los meses de verano debido probablemente, según los autores, a un aumento en la temperatura del agua.

Respecto a la salinidad, nuestros resultados indican que *P. dicentrarchi* crece mejor al 10‰ que al 27‰, a pesar del hecho de que esta especie es eurihalina, como otros escuticociliados, incluyendo *Uronema marinum*, *U. nigricans* y *Mesanophrys* sp. (Hanna y Lilly, 1970; Soldo y Merlín, 1972; Morado, 1993). De hecho, los experimentos realizados en nuestro laboratorio (no se muestran los resultados) indican que *P. dicentrarchi* puede sobrevivir a salinidades entre el 4 y el 30‰. No obstante, y a pesar de esta amplia tolerancia a la salinidad, la gravedad específica (relación entre la densidad de una sustancia y la densidad del agua) del medio de cultivo parece ser un determinante importante del crecimiento de los escuticociliados marinos. Por ejemplo, *Mesanophrys* sp. que infecta al buey del pacífico (*Cancer magister*) muestra mejor crecimiento en un medio con una gravedad específica entre 1.020 y 1.040 (27-30‰), y no crece a 1.009 (12‰) (Morado, 1993). En contraste, *Uronema marinum*, *U. nigricans* y *Parauronema virginianum* muestran mejor crecimiento en medios con gravedades específicas más bajas -1.007-1.010 (10-15‰) (Soldo y Merlín, 1972; Hanna y Lilly, 1974)-, como se ha observado en el presente estudio para *P. dicentrarchi*.

La mayoría de los escuticociliados para los que se han desarrollado cultivos axénicos previamente tiene un pH óptimo entre 7.0 y 7.5 (Soldo y Merlín, 1972; Hanna y Lilly, 1974; Soldo y Merlín, 1977). Una excepción es *Mesanophrys*

sp., que tiene un pH óptimo de 6.7 (Morado, 1993). El pH óptimo de *P. dicentrarchi* está dentro del rango habitual: aunque a pH 6.2 y 23 °C observamos una rápida proliferación, bajo esas condiciones fue observada la muerte celular desde el día 5 hacia adelante. Esto fue debido a un descenso en el pH del medio por debajo del mínimo aceptable (pH 5), como resultado de la actividad metabólica del ciliado.

Es bien conocido que los lípidos, y más específicamente los fosfolípidos, estimulan el crecimiento de determinados ciliados en los medios químicamente definidos (Soldo y Merlín, 1972; Schousboe y col., 1992; Schousboe y Rasmussen, 1994). En el caso específico de las especies marinas histiófagas *Uronema nigricans* y *Miamiensis* sp., Soldo y Merlín (1972) observaron que los lípidos son esenciales para un buen crecimiento *in vitro*, y obtuvieron los mejores resultados con una combinación de Tween 80, azolectina (que tiene un alto contenido de lecitina y fosfatidilcolina) y cefalina (que tiene un alto contenido de fosfatidiletanolamina). En nuestro sistema de cultivo axénico, sin embargo, la lecitina y el Tween 80 (la cefalina no fue incluida en vista de la dificultad actual de obtener este producto, debido a preocupaciones por la salud) bien solos o en combinación, no promovían el crecimiento *in vitro* en ausencia de suero fetal bovino (FBS). Sin embargo, las densidades máximas obtenidas con FBS sin lípidos eran en todos los casos menores que las obtenidas en presencia de uno o ambos componentes: por lo tanto, los lípidos no son ni necesarios ni suficientes para el crecimiento, pero no obstante son beneficiosos.

A diferencia de las preparaciones lipídicas, el FBS -un fluido animal complejo rico en proteínas y factores de crecimiento- era absolutamente necesario para el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi*, así como para el crecimiento de las células de los vertebrados. Este suplemento fue usado asimismo en el cultivo axénico de *Mesanophrys* sp. (Morado, 1993). En el presente estudio, el FBS promovía con efectividad el crecimiento aún en cultivos sembrados sólo con 20

células/ml, lo que sugiere que nuestro método puede ser adaptado probablemente para la obtención de clones por el método de dilución limitante, como se usa en la selección de clones de hibridomas secretores para la producción de anticuerpos monoclonales (Liddell y Cryer, 1991).

Tetrahymena thermophila no proliferó cuando fue cultivado a bajas densidades (< 750 células/ml) en un medio químicamente definido sin FBS (Wheatley y col., 1993, 1994). Sin embargo, la proliferación ocurrió cuando la densidad de cultivo fue incrementada por encima de este nivel umbral, lo que es atribuible a la secreción de factores de crecimiento por los propios ciliados, como se ha demostrado para *Tetrahymena thermophila* y *Paramecium tetraurelia* (Tanabe y col., 1990; Schousboe y col., 1998). En el presente estudio no investigamos específicamente el efecto de la densidad de cultivo en el crecimiento en ausencia de FBS; sin embargo, las densidades máximas de población final fueron obtenidas en todos los casos con densidades de cultivo de 2.000 células/ml o superiores. De hecho, cuando el cultivo fue realizado en matraces con una densidad de cultivo de aproximadamente 5.000 células/ml, fueron obtenidas densidades de población final de alrededor de $1.5-2 \times 10^5$ ciliados/ml. Esta mejora en la producción con el incremento de la densidad de cultivo puede ser atribuida a la secreción por los ciliados de factores que mostraban actividad autocrina o paracrina, y de hecho este aspecto debe ser investigado con mayor detalle.

Como se muestra en el presente estudio, *P. dicentrarchi* es un endoparásito altamente virulento que se divide rápidamente por fisión binaria, y que bajo determinadas condiciones -todavía desconocidas- entra en el cuerpo del hospedador y migra vía torrente sanguíneo y tejidos conectivos a varios órganos y tejidos. Las rutas de entrada en el hospedador se desconocen actualmente.

En estudios previos, Munday y col. (1997) propusieron que el escuticociliado *Uronema nigricans* entraba en su hospedador, el atún de aleta azul

del sur (*Thunnus maccoyii*), por la vía nasal. El punto de comienzo de la infección fue localizado en las rosetas o placas olfatorias (en el fondo de los sacos nasales, la pared membranosa se pliega, formando una estructura laminar, donde se ordenan el epitelio olfatorio y las terminaciones nerviosas. Estas estructuras se conocen con el nombre de placas o rosetas olfatorias). Desde allí, el parásito subía por el nervio olfatorio hasta el cerebro, produciendo una disfunción locomotora y finalmente la muerte. Es posible que la infección natural por *P. dicentrarchi* pueda asimismo producirse por la vía nasal. Sin embargo, nuestros intentos para la infección experimental fueron infructuosos.

En algunos casos, una vez que la infección se encuentra en estado avanzado y empiezan a producirse las primeras muertes, los ciliados son probablemente liberados al agua por los cadáveres y éstos actúan como fuente de comida para los ciliados en el agua. En esta fase del brote, la infección puede ocurrir posiblemente por varias vías, incluida la oral. Sin embargo, la infección experimental por la vía oral fue igualmente infructuosa, como sucedió en el estudio previo de este parásito en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Dragesco y col., 1995), y además especies relacionadas como *Anophryoides haemophila* ha sido observado que son incapaces de sobrevivir en el intestino del hospedador (Cawthorn, 1997). A pesar de esto, ha sido sugerida la vía oral para un escuticociliado no identificado del rodaballo (Dyková y Figueras, 1994), en vista de la presencia de ciliados en el tejido conectivo subepitelial del tracto digestivo. En el caso de *P. dicentrarchi*, la infección por la vía oral parece improbable puesto que los resultados obtenidos en este estudio indican que este parásito no sobrevive a un pH ácido. Además, la infección experimental por las otras vías ensayadas en el presente trabajo (incluida la vía intraperitoneal) que producían infección, conducía a la presencia de ciliados en casi todos los órganos y a ascitis generalizadas en la cavidad abdominal, pero en ningún caso fueron detectados ciliados en el estómago, lo que sugiere que estos

ciliados posiblemente son incapaces de resistir el ambiente ácido del estómago del hospedador.

La infección experimental por la vía rectal tampoco tuvo éxito, de igual modo que en el estudio previo de este parásito en la lubina (Dragesco y col., 1995).

Ha sido sugerido que los escuticociliados y los himenostomados histiófagos pueden entrar en los peces hospedadores vía lesiones existentes en la superficie epidérmica o branquial. Por ejemplo, ha sido publicado que el escuticociliado *Mesanophrys pugettensis* entra en el buey del Pacífico vía lesiones durante la muda (Morado y Small, 1995). Se piensa que el himenostomado *Tetrahymena corlissi* entra en el guppy o lebistes (*Poecilia reticulata*) vía epidermis (Imai y col., 2000). Asimismo se sugiere que *Uronema marinum*, *Uronema* sp., y *Miamiensis avidus* penetran en el hospedador a través de la piel y/o las branquias (Sterud y col., 2000; Azad y col., 2007; Jung y col., 2007). En el presente estudio, la infección experimental por inmersión en una suspensión de ciliados era efectiva sólo tras la abrasión de las branquias y del opérculo. Este resultado apoya claramente la opinión de que la infección natural sucede vía lesiones. Así, en las piscifactorías, el parásito puede sobrevivir en los sedimentos del fondo ricos en nutrientes, y volverse significativamente patógeno sólo cuando el pez desarrolla algún tipo de lesión superficial o algún tipo de debilitamiento de las defensas inmunológicas (probablemente como resultado del estrés ambiental). En relación con esto, Cawthorn (1997) sugiere que el escuticociliado *Anophryoides haemophila*, una vez liberado de los bogavantes muertos, puede desarrollarse en el ambiente, especialmente en aquellos ricos en nutrientes, creando así un reservorio para la infección. Cawthorn fue capaz de infectar bogavantes por inmersión en una suspensión de ciliados, y sugirió las branquias como la ruta de infección. También Jung y col. (2007) lograron infectar lenguados japoneses con *Miamiensis avidus* mediante inmersión, sugiriendo las branquias y la piel como la vía de entrada. En el caso de *P. dicentrarchi* parece posible que los ciliados puedan penetrar vía las

branquias o la piel, y después viajar por el torrente sanguíneo a otras partes del cuerpo, incluyendo la cavidad corporal donde provocan ascitis y la consiguiente distensión abdominal. En relación con esto, nuestras observaciones histológicas de ciliados que contenían eritrocitos ingeridos en el epitelio interlamina y en las laminillas branquiales, y en la superficie branquial de los peces infectados de manera natural apuntan igualmente en esta dirección, sugiriendo que las branquias pueden ser una ruta de entrada o de salida.

Las lesiones del ojo o de la piel periorbital pueden facilitar también su entrada. En nuestros ensayos de inoculación periorbital experimental fue observada la infección cerebral en todos los peces, pero la infección sistémica sólo en el 30%. Este hecho, junto con la presencia confirmada microscópicamente de ciliados en el nervio óptico, y la existencia de peces infectados de manera natural en los que sólo fueron detectados ciliados en las preparaciones de cerebro y de tejido periorbital, y la presencia frecuente en el nervio óptico y en el tejido conectivo perineural asociado de los rodaballos con el cerebro afectado, sugiere que la penetración a través de la cornea y/o la piel periorbital puede ser una de las rutas de invasión (al menos en infecciones que producen encefalitis) y que *P. dicentrarchi* es capaz de alcanzar el cerebro no sólo por el torrente sanguíneo, sino también por los tejidos nerviosos. Esto podría explicar el motivo de que muchos peces con escuticociliatosis debida a *P. dicentrarchi* muestren exoftalmia con abundantes ciliados en la región periorbital, y el cerebro sea el único órgano infectado.

La supersaturación de oxígeno que se produce a veces en los sistemas de acuicultura puede producir pequeñas lesiones de la piel, los ojos y las branquias (Speare, 1998), a través de las cuales pueden penetrar los ciliados, al menos durante las fases tempranas del brote infeccioso. En el brote de escuticociliatosis descrito por Sterud y col. (2000) que se produjo en Noruega, la enfermedad, que afectó a un importante número de rodaballos, fue observada sólo en los tanques que habían probado un nuevo sistema de cultivo (con un intercambio de agua reducido

y una oxigenación adicional del agua). Los cambios patológicos predominantes observados por estos autores fueron una encefalitis asociada con una licuación/reblandecimiento del cerebro y una palidez de las branquias por la anemia; estos hallazgos sugieren que al menos uno de los factores que predisponen a la escuticociliatosis en las piscifactorías de rodaballo puede ser una oxigenación excesiva. Además, los dos brotes descritos en el presente estudio ocurrieron tras un incremento de la temperatura por encima de los 20 °C, lo que pudo haber producido estrés y como consecuencia aumentó la susceptibilidad a la enfermedad. Varios estudios han notificado brotes similares de escuticociliatosis en peces y crustáceos que siguieron a alteraciones en la temperatura del agua (Cawthorn, 1997; Munday y col., 1997; Azad y col., 2007; Ramos y col., 2007).

Es importante apuntar que la vía de entrada puede tener efectos claros en el tipo de patología observada (por ejemplo, la encefalitis en rodaballos infectados por la vía corneal/periorbital).

De las potenciales vías de infección examinadas, la vía intraperitoneal es posiblemente la más efectiva para conseguir rápidamente infecciones de alta intensidad, de modo que puede ser usada para estudios de la patología sistémica de la escuticociliatosis o para analizar la efectividad de diferentes tratamientos frente a ella. La inoculación intraperitoneal de peces que pesaban entre 20 y 40 gramos con una dosis de 10^4 ó 5×10^4 ciliados producía un 100% de infección sistémica. El protocolo es rápido y sencillo, lo que reduce el estrés que se causa a los peces y no produce lesiones externas, disminuyendo así el riesgo de infecciones secundarias.

En la actualidad, los ensayos con tubos capilares (Leick y Helle, 1983) son los más ampliamente utilizados para el estudio de las respuestas quimiotácticas en vista de su precisión. En el presente estudio hemos desarrollado un ensayo de tubos capilares empleando placas de 96 pocillos, lo que permite realizar 32 ensayos en cada placa puesto que cada uno emplea tres pocillos (pocillo A, pocillo B y uno

vacío entre ambos); si asumimos tres réplicas por cada ensayo, esto significa que podemos analizar simultáneamente 10 candidatos a quimioatrayentes en una sola placa. Un ensayo similar, pero en este caso con dos cámaras, fue empleado para investigar los efectos de varias hormonas en la quimiotaxis de los ciliados (Köhidai y col., 1994; Csaba y col., 2000). Los tiempos de incubación óptimos empleados en ensayos de este tipo varían dentro de un rango de 15-20 minutos (Köhidai y col., 1994, 1997; Köhidai y Csaba, 1998; Köhidai y col., 2000) a 2-3 horas (Leick y Helle, 1983; Leick y Hellung-Larsen, 1985); en el presente estudio hemos encontrado que el tiempo óptimo de incubación es de 3-4 horas.

En ensayos con células de mamíferos, ha sido demostrado que el FBS a concentraciones del 10% tiene un efecto quimioatrayente significativo (Murata y col., 1999). De la misma manera, en el presente estudio encontramos que el FBS a concentraciones del 10% o superiores tuvo un fuerte efecto quimioatrayente sobre *P. dicentrarchi*. Diversos estudios previos han mostrado con claridad que el suero de cierto número de teleósteos induce quimiotaxis unidireccional por los estadios infectivos de los ciliados (Buchmann y Nielsen, 1999), y que los factores del suero del hospedador afectan al comportamiento de la penetración (Lom y Čerkosovová, 1974). Asimismo, los ciliados responden positivamente a aquellos estímulos químicos que indican la presencia de bacterias y otro tipo de alimentos en el ambiente externo (Leick y Hellung-Larsen, 1985). Los resultados de los presentes experimentos indican que la sangre y el suero del rodaballo son potentes quimioatrayentes para los trofozoítos de *P. dicentrarchi*; sin embargo, nosotros no detectamos ningún efecto quimioatrayente significativo de las otras células (incluidas las células sanguíneas) del rodaballo o de las bacterias, al menos a las concentraciones ensayadas. La actividad quimioatrayente de la sangre no coagulada (conteniendo heparina como anticoagulante) parece residir en el suero, puesto que las células solas no atraen a los trofozoítos de *P. dicentrarchi*. La diferencia en la actividad quimioatrayente entre la sangre y el suero puede ser

debida a la inactivación de los factores del complemento durante el proceso de coagulación empleado para la obtención del suero; ha sido demostrado con anterioridad que los factores del complemento presentan actividad quimioatrayente para los estadios infectivos de ciliados patógenos (Buchmann y Nielsen, 1999). Esta hipótesis está también sustentada por la actividad quimioatrayente significativamente mayor de la sangre completa y del suero de los rodaballos infectados que la de la sangre completa y del suero (respectivamente) de los rodaballos no infectados. Una posible influencia de la propia heparina puede ser descartada ya que ésta sola no mostró actividad quimioatrayente; además, estudios con algunas células de mamíferos (eosinófilos) han indicado que la heparina puede inhibir las respuestas quimiotácticas (Culley y col., 2003). La actividad quimioatrayente de la sangre para los trofozoítos de *P. dicentrarchi* puede explicar la gran susceptibilidad de los peces con lesiones dérmicas (como las microhemorragias observadas en el presente estudio) a las infecciones por este ciliado.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la inoculación de los ratones con los antígenos ciliares o las proteínas de la membrana de *P. dicentrarchi* induce la síntesis de anticuerpos en el suero que aglutinan este parásito *in vitro*. Esto confirma que *P. dicentrarchi*, como otros ciliados incluyendo *I. multifiliis*, *Tetrahymena* sp. y *Paramecium* sp. (Clark y col., 1995; Schmidt, 1996), expresa antígenos de inmovilización (antígenos-i) en su superficie. La inmovilización/aglutinación de los ciliados en presencia de sueros de rodaballos inmunizados demuestra asimismo que los rodaballos producen anticuerpos de este tipo en respuesta a la infección con este parásito. Estos anticuerpos fueron detectados sólo en los rodaballos de los grupos en los que se observó algún grado de protección contra la infección natural o experimental con *P. dicentrarchi*. Así, todos los sueros del grupo de los rodaballos que habían sobrevivido a un brote

natural de escuticociliatosis (grupo C, 100%), la mayoría de los sueros de los rodaballos inoculados con el lisado de ciliados más adyuvante (grupo D, 84%), y más de 1/3 de los sueros de los rodaballos inoculados con los ciliados fijados en formalina (grupo F, 42%) mostraban anticuerpos en el suero con actividad aglutinante *in vitro*. Estos resultados sugieren que la respuesta inducida por estos antígenos de superficie en el rodaballo puede jugar un papel importante en la protección contra la infección por este ciliado histiófago, en línea con un estudio que ha demostrado que la inoculación del pez gato con antígeno-i purificado de *I. multifiliis* induce la producción de altos niveles de anticuerpos aglutinantes en el suero y confiere una excelente protección contra la infección (Wang y Dickerson, 2002).

Respecto al posible mecanismo del efecto protector detectado en este estudio, parece probable que los anticuerpos generados contra los antígenos de superficie de *P. dicentrarchi* participan indirectamente en mecanismos de inmunidad adaptativa, por ejemplo opsonización y activación de la ruta clásica del complemento, y/o inmunidad mediada por células, puesto que ninguno de los sueros de rodaballo (o ratón) estudiados provocaban la lisis *in vitro* de los ciliados, aún a altas concentraciones (dilución 1:5). Esto contrasta con estudios previos de otros ciliados en los que se ha encontrado que los sueros inmunes inactivados por calor eran capaces de lisar ciliados cuando se probaron a altas concentraciones (Dickerson y col., 1989; Bleyman, 1996).

Los resultados de nuestros ensayos de aglutinación demuestran que, en unas pocas horas, la mayoría de los ciliados aglutinados en presencia de los sueros inmunes eran capaces de mudar sus antígenos de superficie. Este fenómeno es visible bajo el microscopio como un movimiento de los ciliados dentro de envolturas transparentes (compuestas posiblemente de inmunocomplejos entre estos antígenos y los anticuerpos aglutinantes), y el posterior *escape* desde las envolturas al medio. Los primeros individuos comienzan su *escape* dentro de las 4-

5 primeras horas del inicio de la incubación con el suero inmune, y casi todos los individuos han *escapado* en 9 horas; durante este tiempo no se produce división celular. Esta respuesta es en teoría atribuible a la renovación natural de la membrana externa; sin embargo, el hecho de que los ciliados que habían *escapado* de sus envolturas no fueran aglutinados posteriormente por el suero anti-PM, aún a altas concentraciones, indica que los antígenos de superficie originales son reemplazados por otros antígenos de superficie no reconocidos por los anticuerpos inducidos por los originales. Esta sustitución parece estar provocada específicamente por la reacción con los anticuerpos aglutinantes, puesto que el suero de ratón anti-PM reaccionaba con los ciliados incubados durante 1 hora con suero preinmune de ratón, que no contiene estos anticuerpos y de este modo no aglutina los ciliados.

La muda y la variación antigénica son dos de las principales estrategias usadas por otros protozoos parásitos para sobrevivir a las respuestas de defensa del hospedador. La primera estrategia (muda antigénica) implica el cambio y la renovación de los antígenos de superficie en respuesta al contacto con anticuerpos contra estos antígenos, y se ha observado en diferentes etapas del ciclo vital de *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium* sp. (McClaren, 1992). La segunda estrategia (variación antigénica) se define como la modificación periódica de los antígenos de superficie dentro de una única etapa del desarrollo. El caso más extraordinario de variación antigénica es quizá el de los tripanosomas africanos, que pueden expresar más de 1.000 formas diferentes de la glucoproteína de superficie variante (VSG), el componente principal de la superficie celular; mecanismos de este tipo han sido también observados en *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Leishmania* (Nash, 1990; McClaren, 1992). Nuestros resultados *in vitro* sugieren que *P. dicentrarchi* es capaz de combinar ambos tipos de mecanismos, aunque su importancia real durante la escuticociliatosis precisa ser interpretada con prudencia.

Algunos ciliados, tales como *Paramecium* sp., *Tetrahymena* sp., e *I. Multifiliis*, pueden expresar diferentes proteínas de superficie dependiendo de su origen, y/o los estímulos físicos o químicos a los que se encuentran sometidos (Bleyman, 1996; Schmidt, 1996; Dickerson y Clark, 1998). Entre las especies de *Paramecium* y *Tetrahymena*, como en otros protozoos, los antígenos-i están codificados por un grupo de diversos genes cuya expresión es mutuamente exclusiva, de modo que sólo un antígeno es expresado en un momento determinado (Bleyman, 1996).

Los estímulos que pueden inducir transformaciones fenotípicas de estos tipos incluyen cambios en la temperatura, el pH, el medio de crecimiento, la exposición a la radiación UV y a las enzimas proteolíticas, y (como se observa en el presente estudio) la exposición a anticuerpos homólogos (Lederberg, 1952; Sonnenborn, 1970; Bleyman, 1996). El hecho de que ciliados de vida libre como *Paramecium* puedan mudar/variarse sus antígenos en respuesta a anticuerpos, junto con la naturaleza facultativa de *P. dicentrarchi*, sugiere que los mecanismos de muda/variación antigénica de este tipo pueden no haberse desarrollado específicamente para defenderse contra las respuestas inmunitarias del hospedador durante la infección; sin embargo, puede haber poca duda de que la posible activación de este mecanismo durante la escuticociliatosis probablemente es beneficiosa para el parásito.

En el caso de *Paramecium* los antígenos-i están localizados en la superficie de los ciliados, formando una capa bastante gruesa (30 nm) que constituye el 30% de las proteínas ciliares y el 3.5% del total de las proteínas celulares (Schmidt, 1996). Algo similar sucede con *I. multifiliis*, en el que los antígenos-i -polipéptidos con un peso molecular de entre 40 y 60 kD unidos a la membrana plasmática a través de un anclaje glucolipídico (anclaje GPI) (Clark y col., 2001)- representan aproximadamente el 60% de las proteínas en la membrana ciliar (Dickerson y Clark, 1998). El anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI) es una modificación C-

terminal común, pero compleja, de las proteínas extracelulares en los organismos eucariotas que se produce tras la traducción. En el presente caso, el polipéptido principal en la fracción AC y en la fracción PM era un polipéptido de 38 kD que fue reconocido adicionalmente por todos los sueros de ratón con capacidad aglutinante analizados en este estudio (los sueros anti-LC, anti-AC y anti-PM). La predominancia cuantitativa de esta proteína en los diferentes componentes ciliares y en la membrana del parásito sugiere que puede ser el antígeno-i de *P. dicentrarchi*.

A diferencia de los sueros de ratón, ninguno de los lotes de rodaballo que mostraban actividad aglutinante (grupos C, D y F) teñía intensamente esta banda de 38 kD, aunque en todas las tiras incubadas con estos sueros fue observado algún reconocimiento. Una posible explicación para este resultado podría ser que los anticuerpos sintetizados por el rodaballo en respuesta a este antígeno están dirigidos principalmente contra epitopos conformacionales, que podrían ser destruidos durante la SDS-PAGE. El hecho de que los sueros de los rodaballos de los grupos C y D mostrasen una alta reactividad con los antígenos ciliares en el ELISA apunta hacia esta posibilidad. Además, al menos en el caso de *Ichthyophthirius* y *Tetrahymena*, los epitopos de los antígenos-i envueltos en la reacción de inmovilización/aglutinación parecen ser conformacionales, y por lo tanto podrían ser destruidos en la SDS-PAGE (Williams y col., 1985; Dickerson y col., 1989; Lin y Dickerson, 1992). Si sucede lo mismo con *P. dicentrarchi*, parece posible que el reconocimiento predominante del antígeno de 38 kD con los sueros de ratón sea debido a la presencia de anticuerpos contra otros epitopos estructurales resistentes a la electroforesis que son reconocidos en el ratón pero no en el rodaballo.

Nuestros resultados demuestran que la inmunización con el lisado de ciliados en presencia de adyuvante o con los ciliados fijados en formalina puede conferir un grado de protección contra la infección, manifestado no sólo en la

supervivencia de algunos rodaballos inmunizados sino también en el retraso del desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, podríamos subrayar que el procedimiento de infección experimental puesto a prueba en el presente estudio (inyección intraperitoneal de 5×10^5 ciliados/pez) quizá no sea el más apropiado para evaluar la eficacia de diferentes protocolos de inmunización puesto que como indicamos con anterioridad, la infección natural ocurre probablemente vía las branquias o la piel. Además, la infección intraperitoneal es probablemente mucho más agresiva que la infección natural, puesto que los ciliados entran en contacto inmediato con los órganos vitales en la cavidad abdominal. En otras palabras, la infección intraperitoneal podría subestimar la eficacia real de los protocolos de inmunización probados en el presente estudio.

Las infecciones parasitarias en los peces teleósteos están limitadas por los mecanismos constitutivos de la defensa innata que permiten que el hospedador sea resistente a ellas o que reducen su severidad. Los macrófagos, los neutrófilos y las células citotóxicas no específicas (NCC) juegan un papel en la respuesta inmunitaria innata (Jones y col., 2001; Cuesta y col., 2006). La fagocitosis y la posterior digestión de los patógenos está mejorada por la fijación del tercer componente del complemento (C3) a la pared celular del patógeno (Bartholomew y Shanahan, 1990). El sistema del complemento cataliza la lisis directa de los microorganismos y modula la fagocitosis, la inflamación, y las respuestas inmunitarias humoral y celular (Wimmers y col., 2003). La fagocitosis es activada por la interacción entre las opsoninas que cubren la partícula que será fagocitada y los receptores específicos en la superficie del fagocito (García-García y Rosales, 2002), y ha sido demostrado claramente que el complemento de los peces puede lisar células extrañas y opsonizar organismos externos para su destrucción por los fagocitos (Holland y Lambris, 2002). Los presentes resultados indican que la inoculación de los rodaballos con *P. dicentrarchi* vivos no modificaba la actividad

fagocítica de los leucocitos peritoneales; sin embargo, la inclusión en el medio de ensayo de suero de rodaballos infectados de forma natural con *P. dicentrarchi* incrementaba significativamente la actividad fagocítica, lo que sugiere que este parásito es capaz de activar el sistema del complemento. Cuando los peces fueron inoculados con *P. dicentrarchi* muertos, la actividad fagocítica era notablemente mayor en presencia tanto de SRN como de SRI, lo que indica que el parásito vivo es capaz de modular el sistema de activación del complemento. Otros ciliados parásitos, como *I. multifiliis*, son capaces de activar la ruta alternativa del complemento, que también participa en las respuestas inmunitarias protectoras (Buchmann, 1999; Buchmann, 2001).

En estudios previos ha sido confirmado que las infecciones por parásitos intracelulares, como los microsporidios, suprimen parcialmente la explosión respiratoria de los fagocitos de los rodaballos, y que el suero de los rodaballos infectados contiene sustancias capaces de modular la producción de ROS en respuesta a las esporas de los microsporidios (Leiro y col., 2001). La población de leucocitos peritoneales del rodaballo obtenida por estimulación *in vivo* con tioglicolato (como en el presente estudio) comprende aproximadamente un 75% de macrófagos y un 25% de neutrófilos (Leiro y col., 2001). Se ha observado en mamíferos que la activación de los neutrófilos inducida por antagonistas resulta exclusivamente en la liberación extracelular de ROS, no en la producción intracelular de ROS (Bylund y col., 2003); sin embargo, los neutrófilos de rodaballo incubados con PMA liberan grandes cantidades de ROS tanto intracelular como extracelularmente, mientras que los neutrófilos de rodaballo incubados con β -1,3 glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* (Couso y col., 2001) liberan fundamentalmente ROS intracelularmente. En el presente estudio, la producción extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales inflamatorios del rodaballo estimulados *in vitro* con PMA no fue afectada significativamente por (a) la inoculación previa *in vivo* con *P. dicentrarchi*, o (b) la inclusión de suero de

rodaballo normal o infectado en el medio de ensayo. Sin embargo, la combinación de estos dos tratamientos ha tenido efectos significativos: específicamente, la producción extracelular de ROS en respuesta a la estimulación con PMA era incrementada significativamente por la inoculación previa *in vivo* con *P. dicentrarchi* más la inclusión de suero de rodaballo normal o infectado en el medio de ensayo (observar figura 41A: Resultados). El incremento fue más notable en los ensayos con suero de rodaballo normal. Estos resultados parecen sustentar la hipótesis de que este parásito activa el sistema del complemento, puesto que por ejemplo ha sido demostrado que el componente C3a del complemento es un potente activador de la explosión respiratoria en los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos de los mamíferos (Elsner y col., 1994) y de los leucocitos del riñón anterior de la trucha arco iris (Rotllant y col., 2004). No obstante, el efecto significativamente mayor del suero de rodaballo normal que el del suero de rodaballo infectado sugiere que el parásito puede inducir la producción de moléculas antioxidantes por sistemas bioquímicos en el suero de los rodaballos infectados. En estudios de la platija, el suero normal indujo sólo quimioluminiscencia de los neutrófilos peritoneales (la medida de liberación de ROS), no activación del complemento (Nash y col., 1987). Los trofozoítos viables de *P. dicentrarchi* parece que también son capaces de producir algún tipo de molécula antioxidante, como indica el hecho de que la producción extracelular de ROS por los leucocitos peritoneales de rodaballo estimulados *in vivo* con tioglicolato e *in vitro* con *P. dicentrarchi* vivos más PMA en presencia de suero de rodaballo normal o infectado era menor que la producción extracelular de ROS por las células sometidas a los mismos tratamientos pero con *P. dicentrarchi* muertos. Es bien conocido que muchos parásitos producen enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa o la glutatión peroxidasa como medio para evitar el ataque oxidativo (Kwok y col., 2004; Singh y Rathaur, 2005; Getachew y

Gedam, 2007), entre los que se encuentran también los ciliados (Lobo-da-Cunha y Azevedo, 1993).

La producción intracelular de ROS por los leucocitos peritoneales estimulados *in vivo* con tioglicolato e *in vitro* con *K. lactis* era significativamente menor en los leucocitos de los rodaballos inoculados con *P. dicentrarchi* vivos que en los leucocitos de los rodaballos no inoculados, y esta reducción fue dependiente de la dosis de parásito. La adición de suero de rodaballo normal o infectado al medio también incrementó significativamente la producción intracelular de ROS por los leucocitos, y el incremento fue significativamente mayor en presencia de suero de rodaballo normal. Estos efectos en la producción intracelular de ROS sugieren que el parásito puede tener algún tipo de mecanismo de protección contra la destrucción intracelular, induciendo por ejemplo la producción de moléculas neutralizadoras de ROS, o moléculas reguladoras como las citocinas o los factores de crecimiento que regulan la síntesis intracelular de ROS (Turpaev, 2002). El escuticociliado *Uronema marinum* puede protegerse a sí mismo contra el daño oxidativo mediado por los fagocitos del hospedador mediante la destrucción de los fagocitos y la neutralización de los ROS producidos intracelularmente (Kwon y col., 2002; Seo y col., 2005).

Ha sido demostrado que el NO[•] y sus derivados tienen efectos antimicrobianos sobre diversos tipos de patógenos (virus, bacterias, protozoos, helmintos, hongos), y pueden ser producidos por diferentes tipos de células del hospedador en el curso de la infección en todos los grupos de vertebrados, incluidos los peces (Fang, 1997; Colasanti y col., 2002; Scharsack y col., 2003b). Ciertos parásitos flagelados que infectan peces ciprínidos, tales como *Trypanosoma carassii*, no inducen el NO[•] *in vivo*, e inhiben la producción *in vitro* de NO[•] por las células fagocíticas inducida por el lipopolisacárido (LPS) (Saeij y col., 2002). En el presente estudio, los leucocitos peritoneales inflamatorios de los rodaballos inoculados *in vivo* con trofozoítos de *P. dicentrarchi* vivos o muertos y

posteriormente estimulados *in vitro* con LPS no mostraban una producción de NO[•] significativa; no obstante, fue observada una producción significativa de NO[•] cuando fue añadido suero de rodaballo normal o infectado al medio. Estos resultados indican (a) que la estimulación *in vitro* sólo con LPS -a 100 ng/ml, que activa considerablemente la producción de NO[•] por los macrófagos inflamatorios murinos (Leiro y col., 2003)- no induce la producción de NO[•] por los leucocitos peritoneales del rodaballo, (b) que la producción de NO[•] por los leucocitos peritoneales del rodaballo requiere de las citocinas presentes en el suero, y (c) que esta producción de NO[•] no fue incrementada por la infección con *P. dicentrarchi*. En un estudio previo sobre los requerimientos para la producción de óxido nítrico por los macrófagos del rodaballo, fue observado que la mayoría de estas células no parece que produzcan NO[•] en respuesta a la estimulación sólo con LPS, y que la producción significativa de NO[•] requiere de la presencia de citocinas como el factor activador de macrófagos (MAF) o los interferones alfa (INF- α) y beta (INF- β) en combinación con LPS (Tafalla y Novoa, 2000). En los mamíferos, la citocina inductora de la iNOS que mejor se conoce es el interferón gamma (INF- γ) (Paul y col., 1995); sin embargo, son conocidas varias citocinas que actúan sinérgicamente con el INF- γ (o LPS) para estimular la expresión de la iNOS, incluyendo la IL-2 y el INF- α/β (Gao y col., 1998), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la IL-7 y la IL-8 (Oliveira y col., 1998), el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIMF) (Juttner y col., 1998) y bajo ciertas condiciones de estimulación, la citocina de desactivación de macrófagos IL-10 (Jacobs y col., 2000). En la carpa, la iNOS es producida por los fagocitos estimulados con el protozoo flagelado *Trypanoplasma borreli* (Saeij y col., 2000); en muchos peces teleosteos, sin embargo, no se conoce actualmente qué citocinas están envueltas en la regulación de la expresión de la iNOS.

Conclusiones

1. Describimos brotes de infecciones por ciliados que provocan importantes mortalidades en el rodaballo de cultivo en Galicia. Estas infecciones se caracterizaron por encefalitis y meningitis severa (con diferentes grados de licuación y reblandecimiento cerebral), necrosis del parénquima hepático, edema severo de la pared intestinal, degeneración de las fibras musculares, hiperplasia del epitelio branquial y/o inflamación vascular y perivascular. El agente etiológico responsable fue identificado como *Philasterides dicentrarchi*, un escuticociliado histiófago oportunista, en base a sus características morfológicas y biométricas.

2. Los estudios ultraestructurales nos aportaron información adicional para un diagnóstico más preciso de esta escuticociliatosis; por ejemplo: la presencia de las dicinétidas en las dos terceras partes anteriores del cuerpo, los numerosos extrusomas esféricos y fusiformes localizados cerca de la membrana plasmática, las numerosas mitocondrias localizadas debajo de la corteza celular, y que el micronúcleo está estrechamente asociado con el macronúcleo, pero no conectado físicamente, en el organismo que la causa.

3. La secuencia nucleotídica del gen SSUrRNA de *P. dicentrarchi* aislado del rodaballo (*Psetta maxima*) mostró una gran homología con las de *P. dicentrarchi* y *Miamiensis avidus* procedentes de infecciones en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*). Los análisis filogenéticos realizados demostraron que ambas especies estaban estrechamente relacionadas, pudiendo considerarse una posible sinonimia entre ambas.

4. El medio de cultivo axénico L-15 completo estándar es un medio excelente para el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi* que facilita la obtención rápida y sencilla de un gran número de ciliados utilizables para el aislamiento de antígenos puros y para el desarrollo de vacunas frente a la escuticociliatosis. Además, los ciliados

obtenidos por este método retienen su capacidad infectiva, y pueden ser usados en infecciones experimentales y en la valoración de la protección para el desarrollo de vacunas.

5. Nuestros resultados parecen sustentar la hipótesis de que *P. dicentrarchi* invade el rodaballo vía la piel y/o las branquias. Comparativamente, la vía de infección más efectiva para los estudios experimentales dirigidos a evaluar los tratamientos de la enfermedad parece que sería la ruta intraperitoneal.

6. Los resultados presentes sugieren que los componentes del suero sanguíneo del rodaballo poseen propiedades quimioatrayentes para los trofozoítos de *P. dicentrarchi*, y que las respuestas quimiotácticas a estos componentes pueden jugar un papel en la detección y la invasión de los tejidos del hospedador.

7. *P. dicentrarchi* expresa antígenos de inmovilización en su superficie que son reconocidos por el sistema inmunitario del rodaballo y que podrían ser útiles para la vacunación. Sin embargo, en el desarrollo de una vacuna efectiva frente a la escuticociliatosis debería confirmarse la posible existencia de serotipos que expresen diferentes antígenos superficiales en aislamientos realizados en varios brotes de escuticociliatosis.

8. Los resultados obtenidos indican que la infección del rodaballo con el ciliado *P. dicentrarchi* conduce a una modulación de la activación del complemento y de la producción intracelular de ROS por las células fagocíticas, a un leve incremento de la producción de NO[•] por las células fagocíticas, y a un incremento de la neutralización de los ROS extracelulares.

Bibliografía

- Abelli, L.; Picchietti, S.; Romano, N.; Mastroliola, L.; Scapigliati, G. (1997). Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Fish and Shellfish Immunology*, **7**: 235-245.
- Adl, S.M.; Berger, J.D. (1996). Commitment to division in ciliate cell cycles. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43**: 77-86.
- Adl, S.M.; Leander, B.S.; Simpson, A.G.B.; Archibald, J.M.; Anderson, O.R.; Bass, D.; Bowser, S.S.; Brugerolle, G.; Farmer, M.A.; Karpov, S.; Kolisko, M.; Lane, C.E.; Lodge, D.J.; Mann, D.G.; Meisterfeld, R.; Mendoza, L.; Moestrup, Ø.; Mozley-Standridge, S.E.; Smirnov, A.V.; Spiegel, F. (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology*, **56** (4): 684-689.
- Adl, S.M.; Simpson, A.G.B.; Farmer, M.A.; Andersen, R.A.; Anderson, O.R.; Barta, J.R.; Bowser, S.S.; Brugerolle, G.; Fensome, R.A.; Fredericq, S.; James, T.Y.; Karpov, S.; Kugrens, P.; Krug, J.; Lane, C.E.; Lewis, L.A.; Lodge, J.; Lynn, D.H.; Mann, D.G.; McCourt, R.M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S.E.; Nerad, T.A.; Shearer, C.A.; Smirnov, A.V.; Spiegel, F.W.; Taylor, M.F.J.R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52**: 399-451.
- Adoutte, A.; Fleury, A. (1996). Cytoskeleton of ciliates. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann and P. Bradbury), pp. 41-49. Stuttgart: Fischer Verlag.
- Aescht, E.; Foissner, W. (1998). Divisional morphogenesis in *Blepharisma americanum*, *B. undulans*, and *B. hyalinum* (Ciliophora: Heterotrichida). *Acta Protozoologica*, **37** (2): 71-92.
- Agatha, S. (2003). Redescription of *Strombidinopsis minima* (Gruber, 1884) Lynn et al. 1991 (Protozoa, Ciliophora), with notes on its ontogenesis and distribution. *European Journal of Protistology*, **39** (3): 233-244.
- Agatha, S.; Riedel-Lorjé, J.C. (2006). Redescription of *Tintinnopsis cylindrica* Daday, 1887 (Ciliophora: Spirotricha) and unification of tintinnid terminology. *Acta Protozoologica*, **45** (2): 137-151.
- Agius, C. (1985). The melano-macrophage centers of fish: a review. En: *Fish Immunology* (Eds. M.J. Manning and M.F. Tatner), pp. 85-99. Academic Press, London.
- Aguiar, A. (2006). Estudio de la parasitofauna de *Anguilla anguilla* (L., 1758) en los ríos Ulla y Tea (Galicia, N.O. de España). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España), 247 pp.
- Aguiar, A.; Álvarez, M.F.; Leiro, J.M.; Sanmartín, M.L. (2005). Parasite populations of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in the rivers Ulla and Tea (Galicia, northwest Spain). *Aquaculture*, **249**: 85-94.
- Ai, Q.; Mai, K.; Zhang, L.; Tan, B.; Zhang, W.; Xu, W.; Li, H. (2007). Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 394-402.
- Ainsworth, A.J. (1992). Fish granulocytes: morphology, distribution and function. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 123-148.
- Aisworth, A.J.; Dexiang, C. (1990). Differences in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology*, **14**: 201-209.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004). *Biología Molecular de la Célula*, 4ª Edición. Ediciones Omega, Barcelona.

- Alishahi, M.; Buchmann, K. (2006).** Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunization of rainbow trout using live theronts. *Diseases of Aquatic Organisms*, **72** (3): 269-273.
- Allen, R.D. (1971).** Fine structure of membranous and microfibrillar systems in the cortex of *Paramecium caudatum*. *Journal of Cell Biology*, **49**: 1-20.
- Allen, R.D.; Schroeder, C.C.; Fok, A.K. (1992).** Endosomal system of *Paramecium*: coated pits to early endosomes. *Journal of Cell Science*, **101**: 449-461.
- Álvarez-Pellitero, P.; Palenzuela, O.; Padrós, F.; Sitjà-Bobadilla, A.; Rianza, A.; Silva, R.; Arán, J. (2004a).** Histophagous scuticociliatids (Ciliophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: morphology, *in vitro* culture and virulence. *Folia Parasitologica*, **51**: 177-187.
- Álvarez-Pellitero, P.; Quiroga, M.I.; Sitjà-Bobadilla, A.; Redondo, M.J.; Palenzuela, O.; Padrós, F.; Vázquez, S.; Nieto, J.M. (2004b).** *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, **62** (1-2): 133-145.
- Ambrosius, H.; Fiebig, H.; Scherbaum, I. (1982).** Phylogenetic aspects of fish immunoglobulins and lymphocyte receptors. *Developmental and Comparative Immunology*, (suppl. 2): 3-13.
- Angelidis, P.; Baudin-Laurencin, F.; Youinou, P. (1987).** Stress in rainbow trout *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Biology*, **31**: 113-122.
- Apromar (2007).** La acuicultura marina de los peces en España.
- Aranishi, F.; Hara, K.; Osatomi, K.; Ishihara, T. (1997).** Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, **117** (4): 605-611.
- Aufderheide, K.J.; Rotolo, T.C.; Grimes, G.W. (1999).** Analyses of inverted ciliary rows in *Paramecium*. Combined light and electron microscopic observations. *European Journal of Protistology*, **35** (1): 81-91.
- Authier, H.; Cassaing, S.; Coste, A.; Balard, P.; Gales, A.; Berry, A.; Bans, V.; Bessières, M.H.; Pipy, B. (2008).** Interleukin-13 primes iNO synthase expression induced by LPS in mouse peritoneal macrophages. *Molecular Immunology*, **45** (1): 235-243.
- Awe, S.O.; Olajide, O.A.; Oladiran, O.O.; Makinde, J.M. (1998).** Antiplasmodial and antipyretic screening of *Mangifera indica* extract. *Phytotherapy Research*, **12**: 437-310.
- Azad, I.S.; Al-Marzouk, A.; James, C.M.; Almatar, S.; Al-Gharabally, H. (2007).** Scuticociliatosis-associated mortalities and histopathology of natural infection in cultured silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) in Kuwait. *Aquaculture*, **262**: 202-210.
- Babior, B.M. (1978).** Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New England Journal of Medicine*, **47**: 745-751.
- Babior, B.M. (1999).** NADPH oxidase: an update. *Blood*, **93** (5): 1464-1476.
- Bakowska, J.; Nelsen, E.M.; Frankel, J. (1982).** Development of the ciliary pattern of the oral apparatus of *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Protozoology*, **29**: 366-382.

- Banchetti, R.; Erra, F. (2003).** The locomotion of living organisms. Some hints for an evolutionistic reconsideration of biology's "Foregone" topics. *Rivista di Biologia-Biology Forum*, **96** (3): 441-455.
- Bardele, C.F.; Klindworth, T. (1996).** Stomatogenesis in the karyorelictean ciliate *Loxodes striatus*: a light and scanning microscopical study. *Acta Protozoologica*, **35** (1): 29-40.
- Bardele, C.F.; Kurth, T. (2001).** Light and scanning electron microscopical study of stomatogenesis in the cyrtophorid ciliate *Chlamydodon mnemosyne* Ehrenberg, 1837. *Acta Protozoologica*, **40** (1): 49-61.
- Bartholomew, W.R.; Shanahan, T.C. (1990).** Complement components and receptors: deficiencies and disease associations. *Immunology Series*, **52**: 33-51.
- Basson, L.; Van As, J. (2006).** Trichodinidae and other ciliophorans (Phylum Ciliophora). En: *Fish Diseases and Disorders* Vol. 1, 2nd edition (Ed. P.T.K. Woo), pp. 154-182. Oxfordshire, United Kingdom.
- Bastian, N.R.; Hibbs Jr., J.B. (1994).** Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Current Opinion Immunology*, **6**: 131-139.
- Bengtén, E.; Clem, L.W.; Miller, N.W.; Warr, G.W.; Wilson, M. (2006).** Channel catfish immunoglobulins: repertoire and expression. *Developmental and Comparative Immunology*, **30**: 77-92.
- Benítez, L.; Gutiérrez, J.C. (1997).** Encystment-specific mRNA is accumulated in the resting cysts of the ciliate *Colpoda inflata*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **41** (6): 1137-1141.
- Benítez, L.; Martín-González, A.; Gutiérrez, J.C. (1991).** Protein glycosylation has an important role in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. *Cell Biology International Reports*, **15** (3): 221-228.
- Berger, J.D. (2001).** Riding the ciliate cell cycle -A thirty five year prospective. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48** (5): 505-518.
- Bermúdez, R.; Vigliano, F.; Quiroga, M.I.; Nieto, J.M.; Bosi, G.; Domeneghini, C. (2007).** Immunohistochemical study on the neuroendocrine system of the digestive tract of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), infected by *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa). *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 252-263.
- Bernard, C.; Fenchel, T. (1996).** Some microaerobic ciliates are facultative anaerobes. *European Journal of Protistology*, **32**: 293-297.
- Bisset, K.A. (1948).** The effect of temperature upon antibody production in coldblooded vertebrates. *Journal of Pathology and Bacteriology*, **60**: 87-92.
- Björnsdóttir, B.; Gudmundsdóttir, S.; Bambir, S.H.; Gudmundsdóttir, B.K. (2005).** Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), by *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* and evaluation of cross protection induced by a furunculosis vaccine. *Journal of Fish Diseases*, **28** (3): 181-188.
- Blazer, B.S. (1991).** Piscine macrophage: function and nutritional influences. A review. *Journal of Aquatic Animal Health*, **3**: 77-86.
- Bleyman, L.K. (1996).** Ciliate genetics. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann and P. Bradbury), pp. 291-324. Stuttgart: Fischer Verlag.
- Bloom, J.; Cross, F.R. (2007).** Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**: 149-160.

- Bodamer, J.E. (1986).** Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **12**: 127-140.
- Bombonato, M.T.S.; Rochel, S.S.; Vicentini, C.A.; Vicentini, I.B.F. (2007).** Morphological study of the hepatic tissue of *Leporinus macrocephalus*. *Acta Scientiarum-Biological Sciences*, **29** (1): 81-85.
- Bonaldo, A.; Thompson, K.D.; Manfrin, A.; Adams, A.; Murano, E.; Mordenti, A.L.; Gatta, P.P. (2007).** The influence of dietary β -glucans on the adaptive and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis. *Italian Journal of Animal Science*, **6** (2): 151-164.
- Bordier, C. (1981).** Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114. *Journal of Biological Chemistry*, **256**: 1604-1607.
- Boshra, H.; Li, J.; Sunyer, J.O. (2006).** Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, **20**: 239-262.
- Bownik, A.; Siwick, A.K. (2007).** Staphylococcal leukocidin LukE/LukD modulates respiratory burst activity of phagocytes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Central-European Journal of Immunology*, **32** (2): 101-104.
- Bradbury, P.C.; Song, W.; Zhang, L. (1997).** Stomatogenesis during the formation of the tomite of *Hyalophysa chattoni* (Hymenostomatida: Ciliophora). *European Journal of Protistology*, **33** (4): 409-419.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2): 248-254.
- Buchmann, K.; Lindenstrom, T.; Sigh, J. (1999).** Partial cross protection against *Ichthyophthirius multifiliis* in *Gyrodactylus derjavini* immunized rainbow trout. *Journal of Helminthology*, **73**: 189-195.
- Buchmann, K.; Nielsen, M.E. (1999).** Chemoattraction of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) theronts to host molecules. *International Journal for Parasitology*, **29** (9): 1415-1423.
- Buchmann, K.; Sigh, J.; Nielsen, C.V.; Dalgaard, M. (2001).** Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, **100**: 105-116.
- Buentello, J.A.; Gatlin, D.M. (1999).** Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture medium. *Aquaculture*, **179**: 513-521.
- Buonocore, F.; Randelli, E.; Casani, D.; Costantini, S.; Facchiano, A.; Scapigliati, G.; Stet, R.J.M. (2007).** Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II b chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **23**: 853-866.
- Burrows, A.S.; Fletcher, T.C. (1987).** Blood leucocytes of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, **67**: 214-215.
- Burrows, A.; Fletcher, T.; Manning, M. (2001).** Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. *Journal of Applied Ichthyology*, **17**: 77-84.

- Bylund, J.; Samuelsson, M.; Collins, L.V.; Karlsson, A. (2003). NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors. *Experimental Cell Research*, **282**: 70-77.
- Calvo, P.; Fernández-Aliseda, C.; Garrido, J.; Torres, A. (2003). Ultrastructure, encystment and cyst wall composition of the resting cyst of the peritrich ciliate *Opisthonecta henneguyi*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**: 49-56.
- Cameron, S.L.; O'Donoghue, P.J. (2002). The ultrastructure of *Amylovorax dehorityi* comb. nov. and erection of the Amylovoracidae fam. nov. (Ciliophora: Trichostomatia). *European Journal of Protistology*, **38** (1): 29-44.
- Cao, D.; Boxer, L.A.; Petty, H.R. (1993). Deposition of reactive metabolites onto and within living tumor cells during neutrophil-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Cellular Physiology*, **156**: 428-436.
- Casals, C.; Barrachina, M.; Serra, M.; Lloberas, J.; Celada, A. (2007). Lipopolysaccharide up-regulates MHC class II expression on dendritic cells through an AP-1 enhancer without affecting the levels of CIITA. *Journal of Immunology*, **178** (10): 6307-6315.
- Castillo, A.; Razwin, B.; Villena, A.J.; Zapata, A.G.; López-Fierro, P. (1998). Thymic barriers of antigen entry during the post-hatching development of the thymus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 157-170.
- Castro, R.; Couso, N.; Obach, A.; Lamas, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology*, **9**: 529-541.
- Castro, R.; Paramá, A.; Barja, J.L.; Leiro, J.; Sanmartín, M.L.; Lamas, J. (2007). Culture of the histophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatia) in fish tissues. *Journal of Fish Diseases*, **30** (4): 239-242.
- Cawthorn, R.J. (1997). Overview of 'bumper car' disease -Impact on the North American lobster fishery. *International Journal for Parasitology*, **27** (2): 167-172.
- Cawthorn, R.J.; Lynn, D.H.; Despres, B.; MacMillan, R.; Maloney, R.; Loughlin, M.; Bayer, R. (1996). Description of *Anophryoides haemophila* n. sp. (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a pathogen of American lobsters *Homarus americanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **24** (2): 143-148.
- Chanock, S.J.; El Benna, J.; Smith, R.M.; Babior, B.M. (1994). The respiratory burst oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 24519-24522.
- Chapman, G.B.; Kern, R.C. (1983). Ultrastructural aspects of the somatic cortex and contractile vacuole of the ciliate, *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *Journal of Protozoology*, **30**: 481-490.
- Cheung, P.J.; Nigrelli, R.F.; Ruggieri, G.D. (1980). Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliata: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. *Journal of Fish Diseases*, **3**: 295-303.
- Chistiakov, D.A.; Hellemans, B.; Volckaert, F.A.M. (2007). Review on the immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **117**: 1-16.
- Christiansen, J.S.; Dalmo, R.A.; Ingebrigtsen, K. (1996). Xenobiotic excretion in fish with aglomerular kidneys. *Marine Ecology Progress Series*, **136**: 303-304.

- Clamp, J.C. (2006).** Redescription of *Lagenophrys cochinensis* Santhakumari & Gopalan, 1980 (Ciliophora, Peritrichia, Lagenophryidae), an ectosymbiont of marine isopods, including new information on morphology, geographic distribution, and intraspecific variation. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** (1): 58-64.
- Clark, T.G.; Gao, Y.; Haertig, J.; Wang, X.; Cheng, G. (2001).** The i-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-anchored proteins. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**: 332-337.
- Clark, T.G.; Lin, T.L.; Dickerson, H.W. (1995).** Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: their role in protective immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, **5**: 113-131.
- Clark, T.G.; Lin, T.L.; Dickerson, H.W. (1996).** Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93** (13): 6825-6829.
- Coats, D.W. (1992).** Collection and cultivation of histophagous ciliates. En: *Protocols in Protozoology* (Eds. J.J. Lee and A.T. Soldo), pp. A-53.1-A-53.2. Lawrence, U.S.A.
- Coccia, E.M.; Stellacci, E.; Marziali, G.; Weiss, G.; Battistini, A. (2000).** IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation. *International Immunology*, **12**: 977-985.
- Colasanti, M.; Gradoni, L.; Mattu, M.; Persichini, T.; Salvati, L.; Venturini, G.; Ascenzi, P. (2002).** Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, **9**:131-134.
- Coppellotti, O. (1990).** Description of *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida) from the Antarctica and observations on the nuclear events in conjugation. *Polar Biology*, **10** (5): 365-371.
- Corliss, J.O. (1964).** The value of stomatogenesis in studies of ciliate phylogeny and systematics. *Journal of Protozoology*, **11**: 4.
- Corliss, J.O. (1979).** *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature*, 2nd edition. Pergamon Press, Oxford.
- Couso, N.; Castro, R.; Noya, M.; Obach, A.; Lamas, J. (2001).** Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 607-618.
- Crosbie, P.B.B.; Munday, B.L. (1999).** Environmental factors and chemical agents affecting the growth of the pathogenic marine ciliate *Uronema nigricans*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **36**: 213-219.
- Crosbie, P.B.B.; Nowak, B.F. (2002).** Production of polyclonal antisera against barramundi (*Lates calcarifer*) serum immunoglobulin derived from affinity columns containing mannan-binding protein or staphylococcal protein A. *Aquaculture*, **211**: 49-63.
- Cross, A.R. (1990).** Inhibitors of the leucocyte superoxide generatin oxidase: mechanisms of action and methods for their elucidation. *Free Radical Biology and Medicine*, **8**: 71-93.
- Cross, A.R.; Segal, A.W. (2004).** The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1657**: 1-22.

- Csaba, G.; Kovacs, K.; Köhidai, L. (2000). Effect of oxytocin and its analogues on the chemotaxis of *Tetrahymena*: evolutionary conclusions. *Acta Protozoologica*, **39** (4): 345-347.
- Cuesta, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. (1999). Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **71**: 161-171.
- Cuesta, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. (2002). Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **89**: 169-174.
- Cuesta, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. (2003). Tumoricidal activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) natural cytotoxic cells: the role played *in vitro* and *in vivo* by retinol acetate. *Fish and Shellfish Immunology*, **14**: 133-144.
- Cuesta, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. (2005). Molecular characterization of the nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**: 637-650.
- Cuesta, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. (2006). Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular Immunology*, **43**: 1275-1285.
- Cuesta, A.; Meseguer, J.; Esteban, M.A. (2007). Cloning and regulation of the major histocompatibility class I alpha gene in the teleost fish gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 718-726.
- Culley, F.J.; Fadlon, E.J.; Kirchem, A.; Williams, T.J.; Jose, P.J.; Pease, J.E. (2003). Proteoglycans are potent modulators of the biological responses of eosinophils to chemokines. *European Journal of Immunology*, **33** (5): 1302-1310.
- Da Silva Paiva, T.; Da Silva-Neto, I.D. (2007). Morphology and morphogenesis of *Strongylidium pseudocrassum* Wang and Nie, 1935, with redefinition of *Strongylidium Sterki*, 1878 (Protista: Ciliophora: Stichotrichia). *Zootaxa*, **1559**: 31-57.
- Dalmo, R.A.; Bøgwald, J.; Ingebrigtsen, K.; Seljelid, R. (1996). The immunomodulatory effect of laminaran [β (1,3-D-glucan)] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., anterior leucocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. *Journal of Fish Diseases*, **19**: 449-457.
- Dalmo, R.A.; Ingebrigtsen, K.; Bøgwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, **20**: 241-273.
- Dalmo, R.A.; Seljelid, R. (1995). The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulfated laminaran [β (1,3-D-glucan)] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. *Journal of Fish Diseases*, **18**: 175-185.
- Danilova, N.; Hohman, V.S.; Sacher, F.; Ota, T.; Willett, C.E.; Steiner, L.A. (2004). T cells and the thymus in developing zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, **28**: 755-767.
- Das, P.C.; Das, A.; Mandal, S. (1989). Antiinflammatory and antimicrobial activities of the seed kernel of *Mangifera indica*. *Fitoterapia*, **60** (3): 235-240.
- De Kinkelin, P.; Michel, C.H.; Ghittino, P. (1991). *Tratado de las Enfermedades de los Peces*. Edit. Acribia S.A. Zaragoza.

- de Puytorac, P.; Grain, J.; Legendre, P.; Devaux, J. (1984). Essai d'application de l'analyse phénétique à la classification du phylum des Ciliophora. *Journal of Protozoology*, **31**: 496-507.
- Denicola, A.; Rubbo, H.; Rodríguez, D.; Radi, R. (1993). Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemical and Biophysics*, **304**: 279-286.
- Devesa, S. (1996). Patología del rodaballo *Scophthalmus maximus* L. cultivado en Galicia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España), 215 pp.
- Diaspro, A.; Fronte, P.; Raimondo, M.; Fato, M.; DeLeo, G.; Beltrame, F.; Cannone, F.; Chirico, G.; Ramoino, P. (2002). Functional imaging of living *Paramecium* by means of confocal and two-photon excitation fluorescence microscopy. *Proceedings of SPIE -The International Society for Optical Engineering*, **4622**: 24-31.
- Díaz, S.; Martín-González, A.; Borniquel, S.; Gutiérrez, J.C. (2000). *Cyrtolophosis elongata* (Colpodea Ciliophora): some aspects of ciliary pattern, division, cortical and nuclear changes during encystment and resting cyst ultrastructure. *European Journal of Protistology*, **36** (4): 367-378.
- Díaz, S.; Martín-González, A.; Rico, D.; Gutiérrez, J.C. (2003). Morphogenesis of the division and encystment process of the ciliated protozoan *Colpoda minima*. *Journal of Natural History*, **37** (20): 2395-2412.
- Dickerson, H.W. (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). En: *Fish Diseases and Disorders* Vol. 1, 2nd edition (Ed. P.T.K. Woo), pp. 116-153. Oxfordshire, United Kingdom.
- Dickerson, H.W.; Clark, T.G. (1998). *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes. *Immunological Reviews*, **166**: 377-384.
- Dickerson, H.W.; Clark, T.G.; Findly, R.C. (1989). *Ichthyophthirius multifiliis* has membrane-associated immobilization antigens. *Journal of Protozoology*, **36**: 159-164.
- Doñate, C.; Roher, N.; Balasch, J.C.; Ribas, L.; Goetz, F.W.; Planas, J.V.; Tort, L.; MacKenzie, S. (2007). CD83 expression in seabream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response. *Fish and Shellfish Immunology*, **23**: 877-885.
- Dooley, H.; Flajnik, M.F. (2006). Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **30**: 43-56.
- Dos Santos, N.M.S.; Taverne, N.; Taverne-Thiele, A.J.; Sousa, M.D.; Rombout, J.H.W.M. (1997). Characterization of monoclonal antibodies specific for sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) IgM indicates the existence of B cell subpopulations. *Fish and Shellfish Immunology*, **7**: 175-191.
- Dragesco, A.; Dragesco, J.; Coste, F.; Gasc, C.; Romestand, B.; Raymond, J.; Bouix, G. (1995). *Philasterides dicentrarchi*, n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *European Journal of Protistology*, **31**: 327-340.
- Dror, M.; Sinyakov, M.S.; Okun, E.; Dym, M.; Sredni, B.; Avtalion, R.R. (2006). Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **109** (3-4): 279-287.
- Dyková, I.; Figueras, A. (1994). Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. *Diseases of Aquatic Organisms*, **18** (1): 5-9.

- Eddy, F.B. (2005). Role of nitric oxide in larval and juvenile fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, **142** (2): 221-230.
- Elde, N.C.; Morgan, G.; Winey, M.; Sperling, L.; Turkewitz, A.P. (2005). Elucidation of clathrin-mediated endocytosis in *Tetrahymena* reveals an evolutionarily convergent recruitment of dynamin. *PLoS genetics*, **1** (5): 514-526.
- Elliott, A.M.; Bak, I.L. (1964). The fate of mitochondria during aging in *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of Cell Biology*, **21**: 113-129.
- Ellis, A.E. (1977). The leucocytes of fish: a review. *Journal of Fish Biology*, **11**: 453-491.
- Ellis, A.E. (1982). Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. En: *Microbial Diseases of Fish* (Ed. R.J. Roberts), pp. 1-29. Academic Press, London.
- Ellis, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, **9**: 291-308.
- Ellis, A.E. (2001a). Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 827-839.
- Ellis, A.E. (2001b). The immunology of teleosts. En: *Fish Pathology* (Ed. R.J. Roberts), pp. 133-150. Harcourt Publishers Limited, London.
- Ellsaessert, C.F.; Clem, L.W. (1994). Functionally distinct high and low molecular weight species of channel catfish and mouse IL-1. *Cytokine*, **6**: 10-20.
- Elsner, J.; Oppermann, M.; Czech, W.; Kapp, A. (1994). C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leucocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood*, **83**: 3324-3331.
- Estévez, J. (1993). La respuesta inmunitaria humoral del rodaballo. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España), 82 pp.
- Estévez, J.; Iglesias, R.; Leiro, J.; Ubeira, F.M.; Sanmartín, M.L. (1992). An unusual site of infection by a microsporidian in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **13**: 139-142.
- Estévez, J.; Leiro, J.; Santamarina, M.T.; Domínguez, J.; Ubeira, F.M. (1994). Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **41**: 353-366.
- Estévez, J.; Leiro, J.; Santamarina, M.T.; Ubeira, F.M. (1995). A sandwich immunoassay to quantify low levels of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **45**: 165-174.
- Evans, D.L.; Hogan, K.T.; Graves, S.S. (1984). Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). III. Biophysical and biochemical properties affecting cytolysis. *Developmental and Comparative Immunology*, **8**: 599-610.
- Evans, D.L.; Jaso-Friedmann, L. (1992). Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 109-121.
- Evans, D.L.; Leary III, J.H.; Jaso-Friedmann, L. (2001). Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 791-805.
- Fahmy, A. (1967). An extemporaneous lead citrate stain for electron microscopy. *Proceedings of the 25th Annual EMSA Meeting*, 148-149.

- Fang, F.C. (1997).** Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation*, **99**: 2818-2825.
- Fast, M.D.; Johnson, S.C.; Eddy, T.D.; Pinto, D.; Ross, N.W. (2007).** *Lepeophtherius salmonis* secretory/excretory products and their effects on Atlantic salmon immune gene regulation. *Parasite Immunology*, **29**: 179-189.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.
- Fenchel, T. (1990).** Adaptive significance of polymorphic life cycles in Protozoa: responses to starvation and refeeding in two species of marine ciliates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **136**: 159-177.
- Fenchel, T.; Blackburn, N. (1999).** Motile chemosensory behaviour of phagotrophic protists: mechanisms for and efficiency in congregating at food patches. *Protistology*, **150** (3): 325-336.
- Fernández-Leborans, G.; Tato-Porto, M.L. (2000).** Presence of two suctorian ciliate species of the genera *Acineta* and *Pelagacineta*, epibionts on marine copepod crustaceans. *Cytobios*, **404**: 139-148.
- Fernández-Puentes, C.; Novoa, B.; Núñez, S.; Figueras, A.J.; Toranzo, A.E. (1991).** The turbot diseases in a Galicia farm (Spain): one year study. *EAS Special Publication*, **14**: 1-8.
- Fiala, I.; Dyková, I. (2003).** Molecular characterization of *Neoparamoeba* strains isolated from gills of *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **55** (1): 11-6.
- Fijan, N. (2002).** Morphogenesis of blood lineages in channel catfish. *Journal of Fish Biology*, **60**: 999-1014.
- Fleury, A. (1991).** Dynamics of the cytoskeleton during morphogenesis in the ciliate *Euplotes*. II. Cortex and continuous microtubular systems. *European Journal of Protistology*, **27**: 220-237.
- Fleury, A.; Laurent, M. (1994).** Transmission of surface pattern through a dedifferentiated stage in the ciliate *Paraurostyla*. Evidence from the analysis of microtubule and basal body deployment. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **41**: 276-291.
- Foissner, W. (1991).** Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *European Journal of Protistology*, **27**: 313-330.
- Foissner, W. (1996).** Ontogenesis in ciliated protozoa, with emphasis in stomatogenesis. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann and P. Bradbury), pp. 95-178. Stuttgart: Fischer Verlag.
- Foissner, W.; Al-Rasheid, K.A.S. (1999).** Ontogenesis in a trachelocercid ciliate (Ciliophora: Karyorelictea), *Sultanophrys arabica*, with an account of evolution at the base of the ciliate tree. *Acta Protozoologica*, **38**: 273-290.
- Foissner, W.; Müller, H.; Agatha, S. (2007).** A comparative fine structural and phylogenetic analysis of resting cysts in oligotrich and hypotrich Spirotrichea (Ciliophora). *European Journal of Protistology*, **43**: 295-314.
- Foissner, W.; Müller, H.; Weisse, T. (2005).** The unusual, lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): light and scanning electron microscopy, cytochemistry. *Acta Protozoologica*, **44**: 201-215.
- Forsburg, S.L.; Nurse, P. (1991).** Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annual Review of Cell Biology*, **7**: 227-256.

- Francis, D. (2007). The plant cell cycle -15 years on. *New Phytologist*, **174** (2): 261-278.
- Fridell, F.; Gadan, K.; Sundh, H.; Taranger, G.L.; Glette, J.; Olsen, R.E.; Sundell, K.; Evensen, Ø. (2007). Effect of hyperoxygenation and low water flow on the primary stress response and susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* L. to experimental challenge with IPN virus. *Aquaculture*, **270**: 23-35.
- Frøystad, M.K.; Rode, M.; Berg, T.; Gjøn, T. (1998). A role for scavenger receptors in phagocytosis on protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, **22**: 533-549.
- Fyda, J.; Kennaway, G.; Adamus, K.; Warren, A. (2006). Ultrastructural events in the predator-induced defence response of *Colpidium kleini* (Ciliophora: Hymenostomatia). *Acta Protozoologica*, **45**: 461-464.
- Ganassin, R.C.; Bols, N.C. (1998). Development of a monocyte/macrophage-like cell line RTS11, from rainbow trout spleen. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 457-476.
- Gao, J.J.; Filla, M.B.; Fultz, M.J.; Vogel, S.N.; Russell, S.W.; Murphy, W.J. (1998). Autocrine/paracrine IFN- α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *Journal of Immunology*, **161**: 4803-4810.
- García, D.; Delgado, R.; Ubeira, F.M.; Leiro, J. (2002). Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extracts Vimang and mangiferin. *International Immunopharmacology*, **2** (6): 797-806.
- García, D.; Escalante, M.; Delgado, R.; Ubeira, F.M.; Leiro, J. (2003). Antihelminthic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytotherapy Research*, **17** (10): 1203-1208.
- García-García, E.; Rosales, C. (2002). Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **72**: 1092-1108.
- Geiszt, M. (2006). NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovascular Research*, **71** (2): 289-299.
- Getachew, F.; Gedam, L. (2007). *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **154**: 62-69.
- Girón-Pérez, M.I.; Anne, S.; González-Jaime, F.; Casas-Solís, J.; Hernández-Coronado, M.; Peregrina-Sandoval, J.; Akiro, T.; Galina, Z. (2007). Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish and Shellfish Immunology*, **23**: 760-769.
- Gjøn, T.; Kleveland, E.J.; Moya-Falcón, C.; Frøystad, M.K.; Vegusdal, A.; Hvattum, E.; Berge, R.K.; Ruyter, B. (2007). Effects of dietary thia fatty acids on lipid composition, morphology and macrophage function of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, **148**: 103-111.
- Glamann, J. (1995). Complete coding sequence of rainbow trout MHC II β chain. *Scandinavian Journal of Immunology*, **41**: 365-372.
- Glimcher, L.H.; Kara, C.J. (1992). Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Annual Review of Immunology*, **10**: 13-49.

- Glover, K.A.; Grimholt, U.; Bakke, H.G.; Nilsen, F.; Storset, A.; Skaala, Ø. (2007).** Major histocompatibility complex (MHC) variation and susceptibility to the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **76** (1): 57-65.
- Gómez-Saladín, E.; Small, E.B. (1993).** Oral morphogenesis of the microstome to macrostome transformation in *Miamiensis avidus* strain Ma/21. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40** (3): 363-370.
- Gonda, K.; Numata, O. (2002).** P85 binds to G-Actin in a Ca²⁺/Calmodulin-dependent manner, thus regulating the initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **292**: 1098-1103.
- González, S.F.; Buchmann, K.; Nielsen, M.E. (2007a).** Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: inflammatory responses caused by the ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 641-650.
- González, S.F.; Buchmann, K.; Nielsen, M.E. (2007b).** Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **31** (6): 576-586.
- Gookin, J.L.; Allen, J.; Chiang, S.; Duckett, L.; Armstrong, M.U. (2005).** Local peroxynitrite formation contributes to early control of *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, **73** (7): 3929-3936.
- Gordon, S. (2003).** Alternative activation of macrophages. *Nature Review Immunology*, **3**: 23-35.
- Gorovsky, M.A. (1973).** Macro- and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*: a model system for studying the structure and function of eukaryotic nuclei. *Journal of Protozoology*, **20**: 19-25.
- Graves, S.S.; Evans, D.L.; Dawe, D.L. (1985a).** Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Immunology*, **134** (1): 78-85.
- Graves, S.S.; Evans, D.L.; Dawe, D.L. (1985b).** Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases*, **8**: 43-51.
- Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannebaum, S.R. (1982).** Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, **126**: 131-138.
- Greenlee, A.R.; Brown, R.A.; Ristow, S.S. (1991).** Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms. *Developmental and Comparative Immunology*, **15**: 153-164.
- Grim, J.N. (2006).** Food vacuole contents in the ciliate, *Balantidium jocularum* (Balantididae), a symbiont in the intestine of the surgeonfish, *Naso tonganus* (Acanthuridae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** (4): 269-274.
- Grolière, C.A. (1980).** Morphologie et stomatogenèse chez deux ciliés Scuticociliatida des genres *Philasterides* Kahl, 1926 et *Cyclidium* O.F. Müller, 1786. *Acta Protozoologica*, **19**: 195-206.
- Grolière, C.A.; Leglise, M. (1977).** *Paranophrys carcini* n. sp., cilié Philasterina récolté dans l'hémolymphe du crabe *Cancer pagurus* Linné. *Protistologica*, **13**: 503-507.

- Grønlien, H.K.; Berg, T.; Løvlie, A.M. (2002).** In the polymorphic ciliate *Tetrahymena vorax*, the non-selective phagocytosis seen in microstomes changes to a highly selective process in macrostomes. *The Journal of Experimental Biology*, **205**: 2089-2097.
- Gutiérrez, J.C.; Callejas, S.; Borniquel, S.; Benítez, L.; Martín-González, A. (2001).** Ciliate cryptobiosis: a microbial strategy against environmental starvation. *International Microbiology*, **4**: 151-157.
- Gutiérrez, J.C.; Díaz, S.; Ortega, R.; Martín-González, A. (2003).** Ciliate resting cyst walls: a comparative review. *Recent Research Developments in Microbiology*, **7**: 361-379.
- Guz, L.; Kozińska, A. (2003).** Influence of temperature on the immune response of carp to lipopolysaccharide and whole cell *Aeromonas bestiarum* vaccines. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **6** (3): 18-20.
- Hagiwara, K.; Kobayashi, K.; Kajii, T.; Tomonaga, S. (1985).** J-chain like component in 18S immunoglobulin of the skate *Raja kenoei*, a cartilaginous fish. *Molecular Immunology*, **22** (7): 775-778.
- Hamilton, R.D.; Preslan, J.E. (1969).** Cultural characteristics of a pelagic marine hymenostome ciliate, *Uronema* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **4**: 90-99.
- Hanington, P.C.; Belosevic, M. (2007).** Interleukin-6 family cytokine M17 induces differentiation and nitric oxide response of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, **31**: 817-829.
- Hanna, B.A.; Lilly, D.M. (1970).** Axenic culture of *Uronema marinum*. *American Zoologist*, **10**: 539-540.
- Hanna, B.A.; Lilly, D.M. (1971).** Nutrition of axenic *Uronema marinum*. *American Zoologist*, **11**: 659.
- Hanna, B.A.; Lilly, D.M. (1974).** Growth of *Uronema marinum* in chemically defined medium. *Marine Biology*, **26**: 153-160.
- Hao, H.F.; Li, X.H.; Gao, F.H.; Wu, W.X.; Xia, C. (2007).** Secondary structure and 3D homology modeling of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) major histocompatibility complex class I molecules. *Protein Expression and Purification*, **51** (1): 120-125.
- Hashimoto, K.; Nakanishi, T.; Kurosama, Y. (1990).** Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**: 6863-6867.
- Hatanaka, A.; Umeda, N.; Yamashita, S.; Hirazawa, N. (2005).** A small ciliary surface glycoprotein of the monogenia parasite *Neobenedenia girellae* acts as an agglutination/immobilization antigen and induces an immune response in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Parasitology*, **131**: 591-600.
- Hatanaka, A.; Umeda, N.; Yamashita, S.; Hirazawa, N. (2007).** Identification and characterization of a putative agglutination/immobilization antigen on the surface of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology*, **134**: 1163-1174.
- Hausmann, K. (1978).** Extrusive organelles in protists. *International Review of Cytology*, **52**: 197-276.
- Hausmann, K.; Hülsmann, N. (1996).** Selected topics of general protozoology. Comparative morphology and physiology of protozoa. En: *Protozoology* (Ed. Georg Thieme Verlag Stuttgart). New York, EE.UU.

- Hazlett, L.D.; McClellan, S.; Goshgarian, C.; Huang, X.; Thakur, A.; Barrett, R. (2005).** The role of nitric oxide in resistance to *P. aeruginosa* ocular infection. *Ocular Immunology and Inflammation*, **13**: 279-288.
- Hickman-Davis, J.M.; O'Reilly, P.; Davis, I.C.; Peti-Peterdi, J.; Davis, G.; Young, K.R.; Devlin, R.B.; Matalon, S. (2002).** Killing of *Klebsiella pneumoniae* by human alveolar macrophages. *American Journal of Physiology -Lung Cellular and Molecular Physiology*, **282**: 944-956.
- Higgins, D.; Thompson, J.; Gibson, T.; Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.
- Hillis, D.M.; Bull, J.J. (1993).** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, **42** (2): 182-192.
- Hine, P.M.; Wain, J.M. (1987).** The enzyme cytochemistry and composition of elasmobranch granulocytes. *Journal of Fish Biology*, **30**: 465-475.
- Hine, P.M.; Wain, J.M. (1989).** Observations of eosinophilic granule cells in peritoneal exudates of eels, *Anguilla australis*. *Journal of Fish Biology*, **34**: 841-853.
- Hirono, M.; Nakamura, M.; Tsunemoto, M.; Yasuda, T.; Ohba, H.; Numata, O.; Watanabe, Y. (1987).** *Tetrahymena* actin: localization and possible biological roles of actin in *Tetrahymena* cells. *Journal of Biochemistry*, **102**: 537-545.
- Hohman, V.S.; Stewart, S.E.; Rumfelt, L.L.; Greenberg, A.S.; Avila, D.W.; Flajnik, M.F.; Steiner, L.A. (2003).** J chain in the nurse shark: implications for function in a lower vertebrate. *The Journal of Immunology*, **170** (12): 6016-6023.
- Holland, J.W.; Gould, C.R.; Jones, C.S.; Noble, L.R.; Secombes, C.J. (2003).** The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD). *Parasitology*, **126**: 95-102.
- Holland, M.C.H.; Lambris, J.D. (2002).** The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, **12**: 399-420.
- Hordvik, I.; Grimholt, U.; Fosse, V.M.; Lie, O.; Endresen, C. (1993).** Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the MHC class II β chain in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*, **37**: 437-441.
- Hosein, R.E.; Williams, S.A.; Haye, K.; Gavin, R.H. (2003).** Expression of GFP-actin leads to failure of nuclear elongation and cytokinesis in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50** (6): 403-408.
- Houston, A.H.; Dobric, N.; Kahurananga, R. (1996).** The nature of hematological response in fish: studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to stimulated winter, spring and summer conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, **15**: 339-347.
- Hu, X.Z.; Song, W.B.; Warren, A. (2000).** Divisional morphogenesis in the marine ciliate *Holosticha warreni* (Ciliophora: Hypotrichida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80** (5): 785-788.
- Hu, X.Z.; Warren, A.; Song, W.B. (2004a).** Observations on the morphology and morphogenesis of a new marine hypotrich ciliate (Ciliophora, Hypotrichida) from China. *Journal of Natural History*, **38** (9): 1059-1069.

- Hu, X.Z.; Warren, A.; Suzuki, T. (2004b). Morphology and morphogenesis of two marine ciliates, *Pseudokeronopsis pararubra* sp. n. and *Amphisiella annulata* from China and Japan (Protozoa: Ciliophora). *Acta Protozoologica*, **43** (4): 351-368.
- Iftode, F.; Fleury-Aubusson, A. (2003). Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biology of the Cell*, **95** (1): 39-51.
- Iglesias, J. (1994). Research activities on turbot industrial procedures in Spain. En: *Turbot Culture: Problems and Prospects*. European Aquaculture Society, Special Publication Vol. 22 (Eds. P. Lavens and R.A.M. Remmerswaal), pp. 127-136. Gent, Belgium.
- Iglesias, R.; Paramá, A.; Álvarez, M.F.; Leiro, J.; Sanmartín, M.L. (2002). Antiprotozoals effective *in vitro* against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **49**: 191-197.
- Iida, T.; Wakabayashi, H. (1995). Respiratory burst of Japanese eel neutrophils. *Fish Pathology*, **30**: 257-261.
- Imai, S.; Tsurimaki, S.; Goto, E.; Wakita, K.; Hatai, K. (2000). *Tetrahymena* infection in guppy, *Poecilia reticulata*. *Fish Pathology*, **35**: 67-72.
- Inoue, Y.; Suenaga, Y.; Yoshiura, Y.; Moritomo, T.; Ototake, M.; Nakanishi, T. (2004). Molecular cloning and sequencing of Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) NADPH oxidase cDNAs. *Developmental and Comparative Immunology*, **28**: 911-925.
- Itou, T.; Iida, T.; Kawatsu, H. (1998). Evidence for the existence of cytochrome b558 in fish neutrophils by polyclonal anti-peptide antibody. *Developmental and Comparative Immunology*, **22**: 433-437.
- Jacobs, M.; Brown, N.; Allie, N.; Gulert, R.; Ryffel, B. (2000). Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. *Immunology*, **100**: 494-501.
- James, S.L. (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews*, **59**: 533-547.
- Jang, H.N.; Woo, J.K.; Cho, Y.H.; Kyong, S.B.; Choi, S.H. (2004). Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of flounder (*Paralichthys olivaceus*) immunoglobulin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **37** (3): 314-319.
- Jaso-Friedmann, L.; Leary III, J.H.; Evans, D.L. (1997). NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost nonspecific cytotoxic cells. *Molecular Immunology*, **34**: 955-965.
- Jaso-Friedmann, L.; Leary III, J.H.; Evans, D.L. (2000). Role of nonspecific cytotoxic cells in the induction of programmed cell death of pathogenic protozoans; participation of the fas-ligand-fas receptor system. *Experimental Parasitology*, **96**: 75-88.
- Jaso-Friedmann, L.; Leary III, J.H.; Evans, D.L. (2001). The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 701-711.
- Jee, B.Y.; Kim, Y.C.; Park, M.S. (2001). Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **47** (1): 49-55.
- Jensch Jr., B.E.; Pressinotti, L.N.; Borges, J.C.S.; Da Silva, J.R.M.C. (2006). Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Aquaculture*, **251** (2-4): 509-515.

- Jerka-Dziadosz, M.; Dosche, C.; Kuhlmann, H.W.; Heckmann, K. (1987).** Signal-induced reorganization of the microtubular cytoskeleton in the ciliated protozoon *Euplotes octocarinatus*. *Journal of Cell Science*, **87**: 555-564.
- Joerinka, M.; Groeneveld, A.; Ducrob, B.; Savelkoula, H.F.J.; Wiegertjes, G.F. (2007).** Mixed infection with *Trypanoplasma borreli* and *Trypanosoma carassii* induces protection: involvement of cross-reactive antibodies. *Developmental and Comparative Immunology*, **31**: 903-915.
- Johansen, R.; Sommerset, I.; Tørud, B.; Korsnes, K.; Hjortaa, M.J.; Nilsen, F.; Nerland, A.H.; Dannevig, B.H. (2004).** Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **27** (10): 591-601.
- Jones, S.R.M. (2001).** The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 841-852.
- Jordanova, M.; Miteva, N.; Rocha, E. (2007).** A quantitative study of the hepatic eosinophilic granule cells and rodlet cells during the breeding cycle of Ohrid trout, *Salmo letnica* Kar. (Teloestei, Salmonidae). *Fish and Shellfish Immunology*, **23**: 473-478.
- Jørgensen, T.R.; Buchmann, K. (2007).** Stress response in rainbow trout during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* and formalin bath treatment. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **37** (1): 25-28.
- Jousson, O.; Pretti, C.; di Bello, D.; Cognetti-Varriale, A.M. (2005).** Non-invasive detection and quantification of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* by real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, **65**: 251-255.
- Jung, S.J.; Kitamura, S.I.; Song, J.Y.; Joung, I.Y.; Oh, M.J. (2005).** Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64** (2): 159-162.
- Jung, S.J.; Kitamura, S.I.; Song, J.Y.; Oh, M.J. (2007).** *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **73** (3): 227-234.
- Juttner, S.; Bernhagen, J.; Metz, C.N.; Rollinghoff, M.; Bucala, R.; Gessner, A. (1998).** Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *Journal of Immunology*, **161**: 2383-2390.
- Kaattari, S.L. (1992).** Fish B lymphocytes: defining their form and function. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 161-180.
- Kaczanowska, J.; Joachimiak, E.; Kiersnowska, M.; Krzywicka, A.; Golinska, K.; Kaczanowski, A. (2003).** The fenestrin antigen in submembrane skeleton of the ciliate *Tetrahymena thermophila* is proposed as a marker of cell polarity during cell division and in oral replacement. *Protistology*, **154**: 251-264.
- Kales, S.C.; DeWitte-Orr, S.J.; Bols, N.C.; Dixon, B. (2007).** Response of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line RTS11 to the water molds *Achlya* and *Saprolegnia*. *Molecular Immunology*, **44**: 2303-2314.
- Kaneshiro, E.S.; Holz Jr., G.G. (1976).** Observations on the ultrastructure of *Uronema* sp., marine scuticociliates. *Journal of Protozoology*, **23**: 503-517.

- Kaney, A.R.; Speare, V.J. (1985). An amiconucleate mutant of *Tetrahymena thermophila*. *Experimental Cell Research*, **143** (2): 461-467.
- Karagouni, E.; Athanassopoulou, F.; Tsagozis, P.; Ralli, E.; Moustakareas, T.; Lytra, K.; Dotsika, E. (2005). The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* L. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **18**: 121-132.
- Katz, L.A. (2001). Evolution of nuclear dualism in ciliates: a reanalysis in light of recent molecular data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**: 1587-1592.
- Kedzierski, L.; Curtis, J.M.; Kaminska, M.; Jodynis-Liebert, J.; Murias, M. (2007). *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. *Parasitology Research*, **102**: 91-97.
- Kherer, S.R.; Hannan, C.M.; Raison, R.L. (1998). Identification of a subpopulation of leucocytes from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) responsive to pokeweed mitogen. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 477-487.
- Kim, S.M.; Cho, J.B.; Kim, S.K.; Nam, Y.K.; Kim, K.H. (2004a). Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **62** (3): 233-238.
- Kim, S.M.; Cho, J.B.; Lee, E.H.; Kwon, S.R.; Kim, S.K.; Nam, Y.K.; Kim, K.H. (2004b). *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **62** (3): 239-244.
- Kim, S.M.; Lee, E.H.; Kwon, S.R.; Lee, S.J.; Kim, S.K.; Nam, Y.K.; Kim, K.H. (2006). Preliminary analysis of recombinant β -tubulin of *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) as a vaccine antigen candidate against scuticociliatosis. *Aquaculture*, **260** (1-4): 21-26.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.
- Kitamura, S.I.; Ko, J.Y.; Lee, W.L.; Kim, S.R.; Song, J.Y.; Kim, D.K.; Jung, S.J.; Oh, M.J. (2007). Seasonal prevalence of lymphocystis disease virus and aquabirnavirus in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* and blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*, **266** (1-4): 26-31.
- Klein, D.; Ono, H.; O'Huigin, C.; Vincek, V.; Goldschmidt, T.; Klein, J. (1993). Extensive MHC variability in cichlid fishes of lake malawi. *Nature*, **364**: 330-334.
- Kleppe, K.; Ohtsuka, E.; Kleppe, R.; Molineux, I.; Khorana, H.G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, **56** (2): 341-361.
- Knight, J.; Stet, R.J.M.; Secombes, C.J. (1998). Modulation of MHC class II expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages by TNF α and LPS. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 545-553.
- Kodama, H.; Baba, T.; Ohishi, I. (1994). Inhibition of phagocytosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages by botulinum C2 toxin and its trypsinized component II. *Developmental and Comparative Immunology*, **18**: 389-395.

- Kodama, H.; Hirota, Y.; Nukamoto, N.; Baba, T.; Azuma, I. (1993). Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes by muramyl dipeptide. *Developmental and Comparative Immunology*, **17**: 129-140.
- Köhidai, L.; Csaba, G. (1998). Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF- α) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine*, **10** (7): 481-486.
- Köhidai, L.; Karsa, J.; Csaba, G. (1994). Effects of hormones on chemotaxis in *Tetrahymena*: investigations on receptor memory. *Microbios*, **77**: 75-85.
- Köhidai, L.; Schiess, N.; Csaba, G. (2000). Chemotactic selection of *Tetrahymena pyriformis* GL induced with histamine, di-iodotyrosine or insulin. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **126** (1): 1-9.
- Köhidai, L.; Soós, P.; Csaba, G. (1997). Effects of dipeptides containing the amino acid proline on the chemotaxis of *Tetrahymena pyriformis*. Evolutionary conclusions on the formation of hormone receptors and hormones. *Cell Biology International*, **21** (6): 341-345.
- Kolodziej, H.; Kayser, O.; Kiderlen, A.F.; Ito, H.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Foo, L.Y. (2001). Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor- α release in macrophages *in vitro*. *Planta Medica*, **67** (9): 825-832.
- Koppang, E.O.; Dannevig, B.H.; Lie, O.; Ronningen, K.; Press, C.M. (1999). Expression of the MHC class I and II mRNA in a macrophage-like cell line (SHK-1) derived from Atlantic salmon, *Salmo salar*, head kidney. *Fish and Shellfish Immunology*, **9**: 473-489.
- Koppang, E.O.; Hordvik, I.; Bjerkas, I.; Torvund, J.; Aune, L.; Thevarajan, J.; Endresen, C. (2003). Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II beta chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*, **14**: 115-132.
- Kornilova, O.A.; Bragina, E.E.; Chistiakova, L.V. (2006). The use of endobiotic ciliates from old collections in transmission electron microscopic investigations. *Parazitologiya*, **40** (2): 192-200.
- Koumans-van Diepen, J.C.; van de Lisdonk, M.H.; Taverner-Thiele, A.J.; Verburg-van Kemenade, B.M.; Rombout, J.H. (1994). Characterization of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, **18**: 45-56.
- Kugrens, P.; Lee, R.E.; Corliss, J.O. (1994). Ultrastructure, biogenesis and functions of extrusive organelles in selected non-ciliate protists. *Protoplasma*, **181**: 164-190.
- Kuhlmann, H.W.; Heckmann, K. (1985). Interspecific morphogens regulating prey-predator relationships in Protozoa. *Science*, **227**: 1347-1349.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-163.
- Kurz, S.; Tiedtke, A. (1993). The Golgi apparatus of *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**: 10-13.

- Kwok, L.Y.; Schuler, D.; Clayton, C.; Soldati, D. (2004).** The antioxidant system in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Molecular Microbiology*, **51**: 47-61.
- Kwon, S.R.; Kim, C.S.; Chung, J.K.; Lee, H.H.; Kim, K.H. (2002).** Inhibition of chemiluminescent response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes by the scuticociliate parasite *Uronema marinum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **52**: 119-122.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **10** (3-4): 203-209.
- Laing, K.J.; Grabowski, P.S.; Belosevic, M.; Secombes, C.J. (1996).** A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. *Immunology and Cell Biology*, **74** (4): 374-379.
- 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 and Shellfish Immunology*, **1**: 187-194.
- Lamas, J.; Ellis, A.E. (1994a).** Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, **4**: 201-219.
- Lamas, J.; Ellis, A.E. (1994b).** Electron microscopic observations of the phagocytosis and subsequent fate of *Aeromonas salmonicida* by Atlantic salmon neutrophils *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, **4**: 539-546.
- Lamas, J.; Santos, Y.; Bruno, D.W.; Toranzo, A.E.; Anadón, R. (1994).** Non-specific cellular responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECP). *Journal of Fish Biology*, **45**: 839-854.
- Lambris, J.D.; Lao, Z.; Pang, J.; Alsenz, J. (1993).** Third component of trout complement. *Journal of Immunology*, **151**: 6123-6134.
- Lamková, K.; Šimková, A.; Palíkova, M.; Jurajda, P.; Lojek, A. (2007).** Seasonal changes of immunocompetence and parasitism in chub (*Leuciscus cephalus*), a freshwater cyprinid fish. *Parasitology Research*, **101** (3): 775-789.
- Langenau, D.M.; Ferrando, A.A.; Traver, D.; Kutok, J.L.; Hezel, J.P.D.; Kanki, J.P.; Zon, L.I.; Look, A.T.; Trede, N.S. (2004).** *In vivo* tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 7369-7374.
- Lanners, H.N. (2003).** Posttraumatic somatic macronuclear reorganization in *Heliophrya erhardi*, Suctorina, Ciliata (with notes on regeneration of tentacles and pulsating vacuoles). *Archiv für Protistenkunde*, **147** (3-4): 259-263.
- Laudan, R.; Stolen, J.S.; Cali, A. (1987).** The immunomodulating effect of the microsporidian *Glugea stephani* on the humoral response and immunoglobulin levels in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of Fish Biology*, **31**: 155-160.
- Leary, J.H. (1994).** Partial amino-acid-sequence of a novel protozoan parasite antigen that inhibits nonspecific cytotoxic-cell activity. *Scandinavian Journal of Immunology*, **40**: 158-164.
- Lederberg, J. (1952).** Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiological Reviews*, **32**: 403-430.

- Lefebvre, F.; Contournet, P.; Crivelli, A.J. (2007). Interaction between the severity of the infection by the nematode *Anguillicola crassus* and the tolerance to hypoxia in the European eel *Anguilla anguilla*. *Acta Parasitologica*, **52**: 171-175.
- Leick, V.; Helle, J. (1983). A quantitative assay for ciliate chemotaxis. *Analytical Biochemistry*, **135** (2): 466-469.
- Leick, V.; Hellung-Larsen, P. (1985). Chemosensory responses in *Tetrahymena*: the involvement of peptides and other signal substances. *Journal of Protozoology*, **32**: 550-553.
- Leick, V.; Koppelhus, U.; Rosenberg, J. (1994). Cilia-mediated oriented chemokinesis in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **41** (6): 546-553.
- Leiro, J.; Álvarez, E.; Arranz, J.A.; Siso, M.I.G.; Orallo, F. (2003). *In vitro* effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes. *Biochemical Pharmacology*, **65** (8): 1361-1371.
- Leiro, J.; Álvarez, E.; García, D.; Orallo, F. (2002a). Resveratrol modulates rat macrophage functions. *International Immunopharmacology*, **2** (6): 767-774.
- Leiro, J.; Arranz, J.A.; Paramá, A.; Álvarez, M.F.; Sanmartín, M.L. (2004a). *In vitro* effects of the polyphenols resveratrol, mangiferin and epigallocatechin-3-gallate on the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **59** (2): 171-174.
- Leiro, J.; Cano, E.; Ubeira, F.M.; Orallo, F.; Sanmartín, M.L. (2004b). *In vitro* effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 2497-2501.
- Leiro, J.; Castro, R.; Arranz, J.A.; Lamas, J. (2007). Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology*, **7** (7): 879-888.
- Leiro, J.; Iglesias, R.; Paramá, A.; Aragort, W.; Sanmartín, M.L. (2002b). PCR detection of *Tetramicra brevifilum* (microspora) infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) musculature. *Parasitology*, **124** (2): 145-151.
- Leiro, J.; Iglesias, R.; Paramá, A.; Sanmartín, M.L.; Ubeira, F.M. (2001). Effect of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection on respiratory-burst responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) phagocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, **11**: 639-652.
- Leiro, J.; Ortega, M.; Estévez, J.; Ubeira, F.M.; Sanmartín, M.L. (1996). The role of opsonization by antibody and complement in *in vitro* phagocytosis of microsporidian parasites by turbot spleen cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **51** (1-2): 201-210.
- Leiro, J.; Ortega, M.; Sanmartín, M.L.; Ubeira, F.M. (2000a). Non-specific responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) adherent cells to microsporidian spores. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **75**: 81-95.
- Leiro, J.; Ortega, M.; Siso, M.I.G.; Sanmartín, M.L.; Ubeira, F.M. (1997). Effects of chitinolytic and proteolytic enzymes on *in vitro* phagocytosis of microsporidians by spleen macrophages of turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **59** (1-2): 171-180.
- Leiro, J.; Paramá, A.; Arranz, J.A.; Álvarez, M.F.; Sanmartín, M.L. (2006). Modulation by extracts of the scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* of turbot

- leucocyte functions and inflammatory cytokine gene expression. *Revista Ibérica de Parasitología*, **66** (1-4): 55-67.
- Leiro, J.; Siso, M.I.G.; Ortega, M.; Santamarina, M.T.; Sanmartín, M.L. (1995).** A factorial experimental design for investigation of the effects of temperature, incubation time, and pathogen-to-phagocyte ratio on *in vitro* phagocytosis by turbot adherent cells. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **112**: 215-220.
- Leiro, J.; Siso, M.I.G.; Paramá, A.; Ubeira, F.M.; Sanmartín, M.L. (2000b).** RFLP analysis of PCR-amplified small subunit ribosomal DNA of three fish microsporidian species. *Parasitology*, **120** (2): 113-119.
- Leknes, I.L. (2007).** Eosinophilic granule cells and endocytic cells in intestinal wall of pearl gouramy (Anabantidae: Teleostei). *Fish and Shellfish Immunology*, **23**: 897-900.
- Levine, N.; Corliss, J.; Cox, F.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.; Leedale, A.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.; Page, F.; Poljansky, G.; Sprague, J.; Vavra, J.; Wallace, F. (1980).** A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, **276** (1): 37-58.
- Lewis, D.H. (1985).** Vibriosis in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, **8**: 539-545.
- Li, L.; Song, W.; Warren, A.; Wang, Y.; Ma, H.; Hu, X.; Chen, Z. (2006).** Phylogenetic position of the marine ciliate, *Cardiostomatella vermiforme* (Kahl, 1928) Corliss, 1960 inferred from the complete SSrRNA gene sequence, with establishment of a new order Loxocephalida n. ord. (Ciliophora, Oligohymenophorea). *European Journal of Protistology*, **42**: 107-114.
- Liddell, J.E.; Cryer, A. (1991).** *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. Wiley, West Sussex, United Kingdom.
- Liew, F.Y. (1993).** The role of nitric oxide in parasitic diseases. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **87**: 637-642.
- Lin, S.H.; Davidson, G.A.; Secombes, C.J.; Ellis, A.E. (1998).** A morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, **53**: 560-568.
- Lin, T.L.; Dickerson, H.W. (1992).** Purification and partial characterization of immobilization antigens from *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Protozoology*, **39**: 457-463.
- Lin, X.; Song, W.; Li, J. (2007).** *Amphileptus aeschtae* nov. spec. and *Amphileptus eigneri* nov. spec. (Ciliophora, Pleurostomatida), two new marine pleurostomatid ciliates from China. *European Journal of Protistology*, **43** (2): 77-86.
- Lindenstrøm, T.; Buchmann, K.; Secombes, C.J. (2003).** *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1beta expression in rainbow trout skin. *Fish and Shellfish Immunology*, **15**: 107-115.
- Lindenstrøm, T.; Secombes, C.J.; Buchmann, K. (2004).** Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **97**: 137-148.
- Lobo-da-Cunha, A.; Azevedo, C. (1993).** Ultrastructural and cytochemical identification of peroxisomes in the ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**: 169-171.

- Lom, J.; Čerkasovová, A. (1974).** Host finding in invasive stages of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Protozoology*, **21**: 457.
- Long, H.; Song, W.; Wang, Y.; Li, J. (2007).** Morphological redescription of two endocommensal ciliates, *Entorhipidium fukuii* Uyemura, 1934 and *Madsenia indomita* (Madsen, 1931) Kahl, 1934 from digestive tracts of sea urchins of the Yellow Sea, China (Ciliophora; Scuticociliatida). *European Journal of Protistology*, **43** (2): 101-114.
- López Ruiz, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. (1992).** Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): light and electron microscopic studies. *Anatomical Record*, **234**: 161-171.
- Løvoll, M.; Johnsen, H.; Boshra, H.; Bøgwald, J.; Sunyer, J.O.; Dalmo, R.A. (2007).** The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*, **23**: 542-552.
- Luo, X.C.; Xie, M.Q.; Zhu, X.Q.; Li, A.X. (2007).** Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans*. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 427-432.
- Lynn, D.H. (1979).** Changes in the classification of several major taxa of Ciliophora on the basis of a numerical phenetic analysis. *Journal of Protozoology*, **26**: 359-366.
- Lynn, D.H.; Small, E.B. (1997).** A revised classification of the phylum Ciliophora Doflein, 1901. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, **47**: 65-78.
- Lynn, D.H.; Small, E.B. (2000).** Phylum Ciliophora Doflein, 1901. En: *An Illustrated Guide to the Protozoa* Vol. 1, 2nd Edition (Eds. J.J. Lee, G.F. Leedale and P. Bradbury), pp. 371-656. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, U.S.A.
- Lynn, D.H.; Sogin, M.L. (1988).** Assessment of phylogenetic relationships among ciliated protists using partial ribosomal RNA sequences derived from reverse transcripts. *BioSystems*, **21**: 249-254.
- Ma, H.; Choi, J.K.; Song, W. (2003a).** An improved silver carbonate impregnation for marine ciliated protozoa. *Acta Protozoologica*, **42**: 161-164.
- Ma, H.; Song, W. (2003).** Stomatogenesis of the marine ciliate *Metanophrys sinensis* (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **83** (2): 407-410.
- Ma, H.; Song, W.; Hu, X.; Warren, A. (2003b).** Morphology and stomatogenesis of *Pseudocohnilembus hargisi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **83** (2): 399-405.
- Ma, H.; Song, W.; Warren, A.; Roberts, D.; Gong, J.; Al-Rasheid, K.A.S. (2006).** Redescription of the marine scuticociliate *Glauconema trihymene* Thompson, 1966 (Protozoa: Ciliophora): life cycle and stomatogenesis. *Zootaxa*, **1296**: 1-17.
- Magnadóttir, B. (2006).** Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, **20**: 137-151.
- Maloney, M.S.; McDaniel, W.; Locknar, S.A.; Torlina, H.M. (2005).** Identification and localization of a protein immunologically related to caltractin (centrin) in the myonemes and membranelles of the heterotrich ciliate *Stentor coeruleus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52** (4): 328-338.
- Marchalonis, J.J. (1977).** *Immunity in Evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- Marieb, E.N. (2004).** *Human Anatomy and Physiology*, 6th edition. Ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.

- Markmann-Mulisch, U.; Reiss, B.; Mulisch, M. (1999).** Cell type-specific gene expression in the cell cycle of the dimorphic ciliate *Eufolliculina uhligi*. *Molecular and General Genetics*, **262** (2): 390-399.
- Martí, M.; Jaraquemada, D. (2007).** Procesamiento de antígenos. En: *Inmunologíaonline.com*.
- Martín-González, A.; Borniquel, S.; Díaz, S.; Ortega, R.; Gutiérrez, J.C. (2005).** Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biology International*, **29**: 119-126.
- McClaren, D.J. (1992).** Parasites, escape from immunity. En: *Encyclopedia of Immunology* Vol. III (Eds. I.M. Roitt and P.J. Delves), pp. 1207-1210. Academic Press, London.
- McKinney, E.C.; Haynes, L.; Droese, A.L. (1986).** Macrophage-like effector of spontaneous cytotoxicity from the shark. *Developmental and Comparative Immunology*, **10**: 497-508.
- McMillan, D.N.; Secombes, C.J. (1997).** Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish and Shellfish Immunology*, **7**: 527-541.
- Meseguer, J.; Esteban, M.A.; Agulleiro, B. (1991).** Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). An ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology*, **54**: 299-309.
- Meseguer, J.; Esteban, M.A.; Muñoz, J.; López Ruiz, A. (1993).** Ultrastructure of the peritoneal exudate cells of seawater teleosts, seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell and Tissue Research*, **273**: 301-307.
- Meseguer, J.; López Ruiz, A.; Esteban, M.A. (1994).** Melanomacrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. *Cell and Tissue Research*, **277**: 1-10.
- Messick, G.A.; Small, E.B. (1996).** *Mesanophrys chesapeakensis* n. sp., a histophagous ciliate in the blue crab, *Callinectes sapidus*, and associated histopathology. *Invertebrate Biology*, **115**: 1-12.
- Micale, V.; Perdichizzi, F. (1990).** A quantitative and histochemical study on melanomacrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. *Journal of Fish Biology*, **37** (2): 191-197.
- Mikkelsen, H.; Lindenstrøm, T.; Nielsen, M.E. (2006).** Effects of temperature on production and specificity of antibodies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the World Aquaculture Society*, **37** (4): 518-522.
- Miyake, A. (1996).** Fertilization and sexuality in ciliates. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann and P. Bradbury), pp. 243-290. Stuttgart: Fischer Verlag.
- Modeo, L.; Petroni, G.; Rosati, G.; Montagnes, J.S. (2003).** A multidisciplinary approach to describe protists: redescrptions of *Novistrombidium testaceum* Anigstein 1914 and *Strombidium inclinatum* Montagnes, Taylor, and Lynn 1990 (Ciliophora, Oligotrichia). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50** (3): 175-189.
- Modeo, L.; Rosati, G.; Andreoli, I.; Gabrielli, S.; Verni, F.; Petroni, G. (2006).** Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species:

- Chattonidium setense* (Ciliophora, Heterotrichea). *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, **82** (9): 359-374.
- Molloy, D.P.; Lynn, D.H.; Giamberini, L. (2005).** *Ophryoglena hemophaga* n. sp. (Ciliophora: Ophryoglenidae): a parasite of the digestive gland of zebra mussels *Dreissena polymorpha*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **65** (3): 237-243.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. (1991).** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacology Reviews*, **43**: 109-142.
- Moore, J.D.; Ototake, M.; Nakanishi, T. (1998).** Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the role of the skin and gills. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 393-407.
- Morado, J.F. (1993).** The morphology, morphogenesis, culture and pathogenesis of a marine facultative parasitic ciliate, *Mesanophrys* sp., of the Dungeness crab, *Cancer magister*, and its occurrence in wild crustacean populations. Tesis Doctoral. Universidad de Washington (EE.UU.), 254 pp.
- Morado, J.F.; Small, E.B. (1994).** Morphology and stomatogenesis of *Mesanophrys pugettensis* n. sp. (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a facultative parasitic ciliate of the Dungeness crab, *Cancer magister* (Crustacea: Decapoda). *Transactions of the American Microscopical Society*, **113**: 343-364.
- Morado, J.F.; Small, E.B. (1995).** Ciliate parasites and related diseases of Crustacea: a review. *Reviews in Fisheries Science*, **3** (4): 275-354.
- Morgan, B.P.; Marchbank, K.J.; Longhi, M.P.; Harris, C.L.; Gallimore, A.M. (2005).** Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunology Letters*, **97** (2): 171-179.
- Mountassif, D.; Kabine, M.; Manar, R.; Bourhim, N.; Zaroual, Z.; Latruffe, N.; El Kebbaj, M.S. (2007).** Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the *in vivo* cytotoxicity assessment of metallic pollution: impact on D-b-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*, **7**: 882-889.
- Mulisch, M. (1993).** Chitin in protistan organisms. Distribution, synthesis and deposition. *European Journal of Protistology*, **29**: 1-18.
- Mulisch, M.; Hausmann, K. (1985).** Ciliary resorption and membrane retrieval during morphogenesis in the ciliate *Eufolliculina uhligi*. *Journal of Ultrastructure Research*, **90** (2): 145-162.
- Munday, B.L.; O'Donoghue, P.J.; Watts, M.; Rough, K.; Hawkesford, T. (1997).** Fatal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-caged, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **30** (1): 17-25.
- Muñoz, P.; Álvarez-Pellitero, P.; Sitjà-Bobadilla, A. (2000a).** Modulation of the *in vitro* activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Fish and Shellfish Immunology*, **10**: 567-581.
- Muñoz, P.; Sitjà-Bobadilla, A.; Álvarez-Pellitero, P. (2000b).** Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parasitology*, **120**: 465-477.
- Muñoz, P.; Sitjà-Bobadilla, A.; Álvarez-Pellitero, P.; Meseguer, J.; Esteban, M.A. (2006).** Cell-mediated cytotoxicity is the main innate immune mechanism involved in the

- cellular defence of gilthead seabream (Teleostei: Sparidae) against *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Parasite Immunology*, **28** (12): 657-665.
- Murata, K.; Kameyama, M.; Fukui, F.; Ohigashi, H.; Hiratsuka, M.; Sasaki, Y.; Kabuto, T.; Mukai, M.; Mammoto, T.; Akedo, H.; Ishikawa, O.; Imaoka, S. (1999).** Phosphodiesterase type III inhibitor, cilostazol, inhibits colon cancer cell motility. *Clinical and Experimental Metastasis*, **17** (6): 525-530.
- Murray, H.M.; Gallant, J.W.; Douglas, S.E. (2003).** Cellular localization of pleurocidin gene expression and synthesis in winter flounder gill using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cell and Tissue Research*, **312** (2): 197-202.
- Nakao, M.; Fujiki, K.; Kondo, M.; Yano, T. (2003a).** Detection of complement receptors on head kidney phagocytes of the common carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science*, **69** (5): 929-935.
- Nakao, M.; Miura, M.; Itoh, S.; Nakahara, M.; Okumura, K.; Mutsuro, J.; Yano, T. (2004).** A complement C3 fragment equivalent to mammalian C3d from the common carp (*Cyprinus carpio*): generation in serum after activation of the alternative pathway and detection of its receptor on the lymphocyte surface. *Fish and Shellfish Immunology*, **16**: 139-149.
- Nakao, M.; Mutsuro, J.; Nakahara, M.; Kato, Y.; Yano, T. (2003b).** Expansion of genes encoding complement components in bony fish: biological implications of the complement diversity. *Developmental and Comparative Immunology*, **27**: 749-762.
- Nakayama, A.; Kurokawa, Y.; Harino, H.; Kawahara, E.; Miyadai, T.; Seikai, T.; Kawai, S. (2007).** Effects of tributyltin on the immune system of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquatic Toxicology*, **83**: 126-133.
- Nash, K.A.; Fletcher, T.C.; Thomson, A.W. (1987).** Effect of opsonization on oxidative metabolism of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) neutrophils. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **86**: 31-36.
- Nash, T.E. (1990).** Antigenic variation in *Giardia lamblia*. En: *Immune Recognition and Evasion: Molecular Aspects of Host-parasite Interaction* (Eds. L.H.T. Van der Ploeg, C.R. Cantor and H.J. Vogel), pp. 225-235. Academic Press, San Diego.
- Nath, S.; Kales, S.; Fujiki, K.; Dixon, B. (2006).** Major histocompatibility class II genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exhibit temperature dependent downregulation. *Immunogenetics*, **58** (5-6): 443-453.
- Nathan, C.F. (1992).** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*, **6**: 3051-3064.
- Nathan, C.F. (1995).** Natural resistance and nitric oxide. *Cell*, **82**: 873-876.
- Nayak, A.S.; Lage, C.R.; Kim, C.H. (2007).** Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio Rerio*). *Toxicological Sciences*, **98** (1): 118-124.
- Ndong, D.; Chen, Y.Y.; Lin, Y.H.; Vaseeharan, B.; Chen, J.C. (2007).** The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 686-694.
- Neeffjes, J.J.; Momburg, F. (1993).** Cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, **5**: 27-34.

- Nerad, T.A.; Daggett, P.M. (1992). Cultivation of scuticociliates. En: *Protocols in Protozoology* (Eds. J.J Lee and A.T. Soldo), pp. A-50.1-A-50.6. Lawrence, EE.UU.
- Neumann, N.F.; Fagan, D.; Belosevic, M. (1995). Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, **19**: 473-482.
- Neumann, N.F.; Stafford, J.L.; Barreda, D.; Ainsworth, A.J.; Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defence. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 807-825.
- Neumann, N.F.; Stafford, J.L.; Belosevic, M. (2000). Biochemical and functional characterization of macrophage stimulated factors secreted by mitogen-induced goldfish kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, **10**: 167-186.
- Nickel, R.; Ott, C.; Dandekar, T.; Leippe, M. (1999). Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *European Journal of Biochemistry*, **265**: 1002-1007.
- Nishizawa, T.; Savas, H.; Isidan, H.; Ustüngağ, C.; Iwamoto, H.; Yoshimizu, M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (4): 2373-2378.
- Novotny, M.J.; Cawthorn, R.J.; Despres, B. (1996). *In vitro* effects of chemotherapeutants on the lobster parasite *Anophryoides haemophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **24**: 233-237.
- Noya, M.; Lamas, J. (1997). Response of eosinophilic granule cells of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Teleostei) to bacteria and bacterial products. *Cell and Tissue Research*, **287**: 223-230.
- Numata, O.; Gonda, K. (2001). Determination of division plane and organization of contractile ring in *Tetrahymena*. *Cell Structure and Function*, **26**: 593-601.
- Oh, M.J.; Kitamura, S.I.; Kim, W.S.; Park, M.K.; Jung, S.J.; Miyadai, T.; Ohtani, M. (2006). Susceptibility of marine fish species to a megalocytivirus, turbot iridovirus, isolated from turbot, *Psetta maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **29** (7): 415-421.
- Olendzenski, L.C. (1999). Growth, fine structure and cyst formation of a microbial mat ciliate: *Pseudocohnilembus pusillus* (Ciliophora, Scuticociliatida). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46**: 132-141.
- Oliveira, S.H.P.; Fonseca, S.G.; Romao, P.R.T.; Figueiredo, F.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. (1998). Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. *Parasite Immunology*, **20**: 405-412.
- Orias, E.; Rasmussen, L. (1976). Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena*. IV. Growth without food vacuoles and its implications. *Experimental Cell Research*, **102**: 127-137.
- O'Tool, R.; Lundberg, S.; Fredriksson, S.A.; Jansson, A.; Nilsson, B.; Wolf-Watz, H. (1999). The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *Journal of Bacteriology*, **181** (14): 4308-4317.
- Ottinger, C.A.; Johnson, S.C.; Ewart, K.V.; Brown, L.L.; Ross, N.W. (1999). Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*)

- macrophages by a mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **123**: 53-59.
- Ottová, E.; Šimková, A.; Morand, S. (2007). The role of major histocompatibility complex diversity in vigour of fish males (*Abramis brama* L.) and parasite selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, **90** (3): 525-538.
- Öztürk, M.O.; Altunel, F.N. (2006). Occurrence of *Dactylogyrus* infection linked to seasonal changes and host fish size on four cyprinid fishes in Lake Manyas, Turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **52** (4): 407-415.
- Pacheco, F.J.; Pacheco, S.O.S.; Segreto, H.R.C.; Segreto, R.A.; Silva, M.R.R.; Egami, M.I. (2002). Development of granulocytes in haematopoietic tissues of *Rhizoprionodon lalandii*. *Journal of Fish Biology*, **61** (4): 888-898.
- Padrós, F.; Zarza, C.A.; Crespo, S. (2001). Infecciones por ciliados histiófagos en acuicultura marina: aspectos histopatológicos. En: *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas*, **4**: 500-512.
- Padrós, F.; Zarza, C.; Dopazo, L.; Cuadrado, M.; Crespo, S. (2006). Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **29** (2): 87-94.
- Page, M.; Rowley, A.F. (1983). A cytochemical, light and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L. Gray). *Journal of Fish Biology*, **22**: 503-517.
- Palenzuela, O.; Redondo, M.J.; Álvarez-Pellitero, P. (2002). Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology*, **124** (4): 369-379.
- Palenzuela, O.; Sitjà-Bobadilla, A.; Álvarez-Pellitero, P. (1996). Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **6**: 81-94.
- Panet, A.; Khorana, H.G. (1974). Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication. *Journal of Biological Chemistry*, **249** (16): 5213-5221.
- Paramá, A.; Castro, R.; Arranz, J.A.; Sanmartín, M.L.; Lamas, J.; Leiro, J. (2007a). Scuticociliate cysteine proteinases modulate turbot leucocyte functions. *Fish and Shellfish Immunology*, **23**: 945-956.
- Paramá, A.; Castro, R.; Lamas, J.; Sanmartín, M.L.; Santamarina, M.T.; Leiro, J. (2007b). Scuticociliate proteinases may modulate turbot immune response by inducing apoptosis in pronephric leucocytes. *International Journal for Parasitology*, **37** (1): 87-95.
- Paramá, A.; Iglesias, R.; Álvarez, F.; Leiro, J.; Quintela, J.M.; Peinador, C.; González, L.; Sanmartín, M.L. (2004a). *In vitro* efficacy of new antiprotozoals against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **62** (1-2): 97-102.
- Paramá, A.; Iglesias, R.; Álvarez, M.F.; Leiro, J.; Ubeira, F.M.; Sanmartín, M.L. (2004b). Cysteine proteinase activities in the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Parasitology*, **128** (5): 541-548.

- Paramá, A.; Luzardo, A.; Blanco-Méndez, J.; Sanmartín, M.L.; Leiro, J. (2005).** *In vitro* efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against the fish-pathogenic ciliate *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic organisms*, **64**: 151-158.
- Paramá, A.; Piazzon, M.C.; Lamas, J.; Sanmartín, M.L.; Leiro, J. (2007c).** *In Vitro* activity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on a scuticociliate parasite of farmed turbot. *Veterinary parasitology*, **148** (3-4): 318-324.
- Parker, J.G. (1976).** Cultural characteristics of the marine ciliated protozoan, *Uronema marinum* Dujardin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **24**: 213-226.
- Passantino, L.; Cianciotta, A.; Jirillo, F.; Carrassi, M.; Jirillo, E.; Passantino, G.F. (2005).** Lymphoreticular system in fish: erythrocyte-mediated immunomodulation of macrophages contributes to the formation of melanomacrophage centers. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **27** (1): 147-161.
- Passer, B.J.; Chen, C.H.; Miller, N.W.; Cooper, M.D. (1997).** Catfish thrombocytes express an integrin-like CD41/CD61 complex. *Experimental Cell Research*, **234**: 347-353.
- Paul, A.; Pendreigh, R.H.; Plevin, R. (1995).** Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *British Journal of Pharmacology*, **114**: 482-488.
- Paulin, J.J. (1996).** Morphology and cytology of ciliates. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann and P. Bradbury), pp. 1-40. Stuttgart: Fischer Verlag.
- Peatman, E.; Terhune, J.; Baoprasertkul, P.; Xu, P.; Nandi, S.; Wang, S.; Somridhivej, B.; Kucuktas, H.; Li, P.; Dunham, R.; Liu, Z. (2008).** Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Molecular Immunology*, **45** (2): 553-566.
- Pérez-Uz, B.; Guinea, A. (2001).** Morphology and infraciliature of a marine scuticociliate with a polymorphic life cycle: *Urocryptum tortum* n. gen., n. comb. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48** (3): 338-347.
- Pérez-Uz, B.; Hope, S. (1997).** *Urocydon cymruensis* n. sp. (Ciliophora: Uronematidae). A new scuticociliate associated with decaying seaweed from the Welsh Coast of United Kingdom. *European Journal of Protistology*, **33** (3): 316-322.
- Pilström, L.; Bengten, E. (1996).** Immunoglobulin in fish-genes, expression and structure. *Fish and Shellfish Immunology*, **6**: 243-262.
- Piñeiro-Vidal, M.; Centeno-Sestelo, G.; Riaza, A.; Santos, Y. (2007).** Isolation of pathogenic *Tenacibaculum maritimum*-related organisms from diseased turbot and sole cultured in the Northwest of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **27** (1): 29-35.
- Prabakaran, M.; Binuramesh, C.; Steinhagen, D.; Michael, R.D. (2006).** Immune response and disease resistance of *Oreochromis mossambicus* to *Aeromonas hydrophila* after exposure to hexavalent chromium. *Diseases of Aquatic Organisms*, **68** (3): 189-196.
- Press, C.; Evensen, Ø. (1999).** The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology*, **9**: 309-318.
- Purdon, C.E.; Jones, A.; Lincoln, R.F. (1972).** Cultivation trials with turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of World Mariculture Society*, **14**: 676-678.

- Qin, L.; Wang, Y.G.; Zhang, Z.; Yang, S.L. (2006).** The first report on fin rot disease of cultured turbot *Scophthalmus maximus* in China. *Journal of Aquatic Animal Health*, **18** (2): 83-89.
- Quentel, C.; Obach, A. (1992).** The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology*, **41**: 709-716.
- Quinn, M.T.; Gauss, K.A. (2004).** Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology*, **76**: 760-781.
- Quintela, J.M.; Peinador, C.; González, L.; Iglesias, R.; Paramá, A.; Álvarez, F.; Sanmartín, M.L.; Riguera, R. (2003).** Piperazine N-substituted naphthyridines, pyridothienopyrimidines and pyridothienotriazines: new antiprotozoals active against *Philasterides dicentrarchi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **38** (3): 265-275.
- Quiroga, M.I.; Redondo, M.J.; Sitjà-Bobadilla, A.; Palenzuela, O.; Riaza, A.; Macías, A.; Vázquez, S.; Pérez, A.; Nieto, J.M.; Álvarez-Pellitero, P. (2006).** Risk factors associated with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Parasitology*, **133** (4): 433-442.
- Ragan, M.A.; Cawthorn, R.J.; Despres, B.; Murphy, C.A.; Singh, R.K.; Loughlin, M.B.; Bayer, R.C. (1996).** The lobster parasite *Anophryoides haemophila* (Scuticociliatida: Orchitophryidae): nuclear 18S rDNA sequence, phylogeny and detection using oligonucleotide primers. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43** (4): 341-346.
- Raikov, I.B.; Kovaleva, V.G. (1990).** Ultrastructure of the nuclear apparatus of the lower ciliate *Remanella granulosa* Kahl (*Karyorelictida*). *Protoplasma*, **115** (1-3): 106-115.
- Ramos, M.F.; Costa, A.R.; Barandela, T.; Saraiva, A.; Rodrigues, P.N. (2007).** Scuticociliate infection and pathology in cultured turbot *Scophthalmus maximus* from the north of Portugal. *Diseases of Aquatic Organisms*, **74** (3): 249-253.
- Rasmussen, L. (1976).** Nutrient uptake in *Tetrahymena pyriformis*. *Carlsberg Research Communication*, **41**: 143-167.
- Rauque, C.A.; Semenas, L.G.; Viozzi, G.P. (2006).** Seasonality of recruitment and reproduction of *Acanthocephalus tumescens* (Acanthocephala) in fishes from Lake Moreno (Patagonia, Argentina). *Journal of Parasitology*, **92** (6): 1265-1269.
- Reddick, J.I.; Goostrey, A.; Secombes, C.J. (2006).** Cloning of iNOS in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *Developmental and Comparative Immunology*, **30**: 1009-1022.
- Reimers, K.; Abu Qarn, M.; Allmeling, C.; Bucan, V.; Vogt, P.M. (2006).** Identification of the non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 (NCCRP-1) in regenerating axolotl limbs. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **176** (7): 599-605.
- Reite, O.B. (1997).** Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish and Shellfish Immunology*, **7**: 567-584.
- Reite, O.B.; Evensen, Ø. (2006).** Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish and Shellfish Immunology*, **20**: 192-208.

- Reith, W.; Leibundgut-Landmann, S.; Waldburger, J.M. (2005).** Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews Immunology*, **5**: 793-806.
- Rey Vázquez, G.; Guerrero, G.A. (2007).** Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell*, **39** (3): 151-160.
- Robertsen, B. (1999).** Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish and Shellfish Immunology*, **9**: 269-290.
- Rodrigues, P.N.S.; Hermesen, T.T.; Rombout, J.H.W.M.; Egberts, E.; Stet, R.J.M. (1995).** Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, **19**: 483-495.
- Rohn, W.M.; Lee, Y.J.; Benveniste, E.N. (1996).** Regulation of class II MHC expression. *Critical Reviews in Immunology*, **16**: 311-330.
- Rosati, G.; Modeo, L. (2003).** Extrusomes in ciliates: diversification, distribution and phylogenetic implications. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**: 383-402.
- Roszell, L.E.; Rice, C.D. (1998).** Innate cellular immune function of anterior kidney leucocytes in the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 129-142.
- Rotllant, J.; Parra, D.; Peters, R.; Boshra, H.; Sunyer, J.O. (2004).** Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst. *Developmental and Comparative Immunology*, **28**: 815-828.
- Rough, K.M.; Nowak, B.F.; Reuter, R.E. (2005).** Haematology and leucocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. *Journal of Fish Biology*, **66** (6): 1649-1659.
- Rowley, A.F.; Hunt, T.C.; Page, M.; Mainwaring, G. (1988).** Fish. En: *Vertebrate Blood Cells* (Eds. A.F. Rowley and N.A. Ratcliffe), pp. 19-127. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ruben, L.N.; Warr, G.W.; Decker, J.M.; Marchalonis, J.J. (1977).** Phylogenetic origins of immune recognition: lymphoid heterogeneity and the hapten/carrier effect in the gold fish, *Carassius auratus*. *Cellular Immunology*, **31**: 266-283.
- Rutschman, R.; Lang, R.; Hesse, M.; Ihle, J.N.; Wynn, T.A.; Murray, P.J. (2001).** Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *Journal of Immunology*, **166**: 2173-2177.
- Ryan, T.C.; Weil, G.J.; Newburger, P.E.; Haugland, R.; Simons, E.R. (1990).** Measurement of superoxide release in the phagocytosomes of immune complex stimulated human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, **130**: 223-233.
- Saeij, J.P.; de Vries, B.J.; Wiegertjes, G.F. (2003).** The immune response of carp to *Trypanoplasma borreli*: kinetics of immune gene expression and polyclonal lymphocyte activation. *Developmental and Comparative Immunology*, **27**: 859-874.
- Saeij, J.P.; Stet, R.J.; Groeneveld, A.; Verburg van Kemenade, L.; Muiswinkel, W.; Wiegertjes, G.F. (2000).** Molecular and functional characterization of a fish inducible-nitric oxide synthase. *Immunogenetics*, **51**: 339-346.

- Saeij, J.P.; Van Muiswinkel, W.B.; Groeneveld, A.; Wiegertjes, G.F. (2002). Immune modulation by fish kinetoplastid parasites: a role for nitric oxide. *Parasitology*, **124**: 77-86.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406-425.
- Sakai, D.K. (1992). Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 223-247.
- Sakata, H.; Savan, R.; Sogabe, R.; Kono, T.; Taniguchi, K.; Gunimaladevi, I.; Tassakka, A.C.M.A.R.; Sakai, M. (2005). Cloning and analysis of non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) from common carp *Cyprinus carpio* L. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **140** (3-4): 287-294.
- Sánchez, C.; Domínguez, J.; Coll, J. (1989). Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, **12**: 459-465.
- Sanmartín, M.L.; Paramá, A.; Castro, R.; Cabalerio, S.; Leiro, J.; Lamas, J.; Barja, J.L. (2008). Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Diseases*, **31**: 135-140.
- Sanmartín, M.L.; Quinteiro, P.; Rodríguez, A.; Fernández, J.A. (1989). Some Spanish cestode fish parasites. *Journal of Fish Biology*, **34**: 977-978.
- Santamaría, D.; Barrière, C.; Cerqueira, A.; Hunt, S.; Tardy, C.; Newton, K.; Cáceres, J.F.; Dubus, P.; Malumbres, M.; Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, **448**: 811-815.
- Santarém, M.M. (1996). Respuesta inmune del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) frente a la vacunación con antígenos somáticos de *Vibrio damsela* y *Pasteurella piscicida*. Influencia de los β -glucanos. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España).
- Santarém, M.; Novoa, B.; Figueras, A. (1997). Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **7**: 429-437.
- Sasaki, Y.; Maita, M.; Okamoto, N. (2002). Rainbow trout neutrophils are responsible for nonspecific cytotoxicity. *Fish and Shellfish Immunology*, **12**: 242-253.
- Scharsack, J.P.; Kalbe, M.; Derner, R.; Kurtz, J.; Milinski, M. (2004). Modulation of granulocyte responses in three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* infected with the tapeworm *Schistocephalus solidus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **59**: 141-150.
- Scharsack, J.P.; Steinhagen, D.; Kleczka, C.; Schmidt, J.O.; Körting, W.; Michael, R.D.; Leibold, W.; Schuberth, H.J. (2003a). Head kidney neutrophils of carp (*Cyprinus carpio* L.) are functionally modulated by the haemoflagellate *Trypanoplasma borreli*. *Fish and Shellfish Immunology*, **14**: 389-403.
- Scharsack, J.P.; Steinhagen, D.; Kleczka, C.; Schmidt, J.O.; Korting, W.; Michael, R.D.; Leibold, W.; Schuberth, H.J. (2003b). The haemoflagellate *Trypanoplasma borreli* induces the production of nitric oxide, which is associated with modulation of carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte functions. *Fish and Shellfish Immunology*, **14**: 207-222.

- Schaschl, H.; Wegner, K.M. (2007). Contrasting mode of evolution between the MHC class I genomic region and class II region in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.; Gasterosteidae: Teleostei). *Immunogenetics*, **59**: 295-304.
- Schmidt, H.J. (1996). Molecular biology of ciliates. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann and P. Bradbury), pp. 325-353. Stuttgart: Fischer Verlag.
- Schousboe, P.; Christensen, S.T.; Ghiladi, M.; Rasmussen, L. (1992). Porphyrin rings and phospholipids: stimulators of cloning efficiency in certain species of *Tetrahymena*. *Journal of Protozoology*, **39**: 342-345.
- Schousboe, P.; Rasmussen, L. (1994). Survival of *Tetrahymena thermophila* at low initial cell densities. Effects of lipids and long-chain alcohols. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **41**: 195-199.
- Schousboe, P.; Wheatley, D.N.; Rasmussen, L. (1998). Autocrine/paracrine activator of cell proliferation: purification of a 4-6 kD compound with growth-factor like effects in *Tetrahymena thermophila*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **8**: 130-137.
- Schroeder, M.B.; Flaño, E.; Pilström, M.; Jorgensen, T.O. (1998). Localization of Ig heavy chain mRNA positive cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) tissues; identified by in situ hybridisation. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 565-576.
- Secombes, C.J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. En: *The Fish Immune System: Organisms, Pathogen and Environment* (Eds. G. Inawa and T. Nakanishi), pp. 63-103. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Secombes, C.J.; Cross, A.R.; Sharp, G.J.E.; García, R. (1992). NADPH oxidase-like activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, **16**: 405-413.
- Secombes, C.J.; Fletcher, T.C. (1992). The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 53-71.
- Secombes, C.J.; Van Groningen, J.J.M.; Egberts, E. (1983). Separation of lymphocyte subpopulations in carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies immunohistochemical studies. *Immunology*, **48**: 165-175.
- Seo, J.S.; Kim, M.S.; Lee, S.H.; Kim, K.H.; Lee, H.H.; Jeong, H.D. (2005). *Uronema marinum*: identification and biochemical characterization of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Experimental Parasitology*, **110**: 22-29.
- Seppola, M.; Robertsen, B.; Jensen, I. (2007). The gene structure and expression of the non-specific cytotoxic cell receptor protein (NCCRP-1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, **147** (2): 199-208.
- Sepulcre, M.P.; López-Castejón, G.; Meseguer, J.; Mulero, V. (2007). The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology*, **44**: 2009-2016.
- Shang, H.; Song, W. (2005). Separation and relationship of ten marine scuticociliates (Protozoa, Ciliophora) using RAPD fingerprinting method. *Acta Oceanologica Sinica*, **24** (3): 78-85.
- Shang, H.; Song, W.; Warren, A. (2003). Phylogenetic positions of two ciliates, *Paranophrys magna* and *Mesanophrys carcini* (Protozoa, Ciliophora,

- Oligohymenophorea), within the subclass Scuticociliatia inferred from complete small subunit rRNA gene sequence. *Acta Protozoologica*, **42**: 171-181.
- Shang, H.; Song, W.; Warren, A.; Li, L.; Chen, Z. (2006).** Phylogenetic positions of two marine ciliates, *Metanophrys similis* and *Pseudocohnilembus hargisi* (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia), inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *Progress in Natural Science* **16** (4): 373-378.
- Shang, Y.; Li, B.; Gorovsky, M.A. (2002).** *Tetrahymena thermophila* contains a conventional gamma-tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *The Journal of Cell Biology*, **158**: 1195-1206.
- Shao, C.; Hu, X.; Warren, A.; Al-Rasheid, K.A.S.; Al-Quraishy, S.A.; Song, W. (2007).** Morphogenesis in the marine spirotrichous ciliate *Apokeronopsis crassa* (Claparède & Lachmann, 1858) n. comb. (Ciliophora: Stichotrichia), with the establishment of a new genus, *Apokeronopsis* n. g., and redefinition of the genus *Thigmokeronopsis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54** (4): 392-401.
- Shao, C.; Song, W.; Warren, A.; Al-Rasheid, K.A.S.; Yi, Z.; Gong, J. (2006).** Morphogenesis of the marine ciliate, *Pseudoamphisiella alveolata* (Kahl, 1932) Song & Warren, 2000 (Ciliophora, Stichotrichia, Urostylida) during binary fission. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** (5): 388-396.
- Sharp, G.J.E.; Pike, A.W.; Secombes, C.J. (1991).** Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [Walbaum, 1972] leucocyte interactions with metacestode stages of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824), (Cestoda, Pseudophyllidea). *Fish and Shellfish Immunology*, **1**: 195-211.
- Shelbourne, J.E. (1968).** The culture of marine fish larvae, with special reference to the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Londres (Reino Unido), 143 pp.
- Shelbourne, J.E.; Nash, C.E. (1966).** Fish farming -the intensive production for human food. Sea fish culture in Britain. *Proceedings of the Nutrition Society*, **25**: 133-140.
- Shen, L.; Stuge, T.B.; Bengten, E.; Wilson, M.; Chinchar, V.G.; Naftel, J.P.; Bernanke, J.M.; Clem, L.W.; Miller, N.W. (2004).** Identification and characterization of clonal NK-like cells from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Developmental and Comparative Immunology*, **28**: 139-152.
- Shen, L.; Stuge, T.B.; Zhou, H.; Khayat, M.; Barker, K.S.; Quiniou, S.M.; Wilson, M.; Bengten, E.; Chinchar, V.G.; Clem, L.W.; Miller, N.W. (2002).** Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review. *Developmental and Comparative Immunology*, **26**: 141-149.
- Shi, X.; Jin, M.; Liu, G. (1997).** Rediscovery of *Paramecium duboscqui* Chatton & Brachon, 1933, and a description of its characteristics. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **44** (2): 134-141.
- Shigdar, S.; Cook, D.; Jones, P.; Harford, A.; Ward, A.C. (2007).** Blood cells of Murray cod *Maccullochella peelii* (Mitchell). *Journal of Fish Biology*, **70** (3): 973-980.
- Shiibashi, T.; Iida, T. (2001).** NADPH and NADH serve as electron donor for the superoxide-generating enzyme in tilapia (*Oreochromis niloticus*) neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 461-465.

- Shiibashi, T.; Iida, T.; Itou, T. (1999).** Analysis of localization and function of the COOH-terminal corresponding site of cytochrome b_{558} in fish neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**: 213-219.
- Shoemaker, C.A.; Klesius, P.H.; Plumb, J.A. (1997).** Killing of *Edwardsiella ictalury* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **58**: 181-190.
- Sigh, J.; Lindenstrøm, T.; Buchmann, K. (2004a).** The parasitic ciliate *I. multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, **27**: 409-417.
- Sigh, J.; Lindenstrøm, T.; Buchmann, K. (2004b).** Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **17**: 75-86.
- Singh, A.; Rathaur, S. (2005).** Identification and characterization of a selenium-dependent glutathione peroxidase in *Setaria cervi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331** (4): 1069-1074.
- Sitjà-Bobadilla, A.; Palenzuela, O.; Riaza, A.; Macías, M.A.; Álvarez-Pellitero, P. (2007).** Protective acquired immunity to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) is related to specific antibodies in *Psetta maxima* (L.) (Teleostei). *Scandinavian Journal of Immunology*, **66** (1), 26-34.
- Sitjà-Bobadilla, A.; Redondo, M.J.; Bermúdez, R.; Palenzuela, O.; Ferreiro, I.; Riaza, A.; Quiroga, I.; Nieto, J.M.; Álvarez-Pellitero, P. (2006).** Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporaea: Myxozoa). *Fish and Shellfish Immunology*, **21**: 485-500.
- Sitjà-Bobadilla, A.; Redondo, M.J.; Macías, M.A.; Ferreiro, I.; Riaza, A.; Álvarez-Pellitero, P. (2004).** Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **17**: 335-345.
- Small, B.C.; Bilodeau, A.L. (2005).** Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *General and Comparative Endocrinology*, **142** (1-2 spec. iss.): 256-262.
- Small, E.B. (1967).** The Scuticociliatida, a new order of the Ciliata (Phylum Protozoa, Subphylum Ciliophora). *Transactions of the American Microscopical Society*, **86**: 354-370.
- Small, H.J.; Neil, D.M.; Taylor, A.C.; Bateman, K.; Coombs, G.H. (2005).** A parasitic scuticociliate infection in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **90** (2): 108-117.
- Snoeyenbos-West, O.L.O.; Cole, J.; Campbell, A.; Coats, D.W.; Katz, L.A. (2004).** Molecular phylogeny of phyllopharyngean ciliates and their group I Introns. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **51** (4): 441-450.
- Soldo, A.T.; Merlin, E.J. (1972).** The cultivation of symbiote-free marine ciliates in axenic medium. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **19**: 519-524.

- Soldo, A.T.; Merlin, E.J. (1977).** The nutrition of *Parauronema acutum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **24**: 556-562.
- Solem, S.T.; Jørgensen, J.B.; Robertsen, B. (1995).** Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, **5**: 475-491.
- Song, W. (2000).** Morphological and taxonomical studies on some marine scuticociliates from China Sea, with description of two new species, *Philasterides armatalis* sp. n. and *Cyclidium veribonneti* sp. n. (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Acta Protozoologica*, **39**: 295-322.
- Song, W. (2005).** Taxonomic description of two new marine oligotrichous ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Journal of Natural History*, **39** (3): 241-252.
- Song, W.; Ma, H.; Al-Rasheid, K.A.S. (2003).** *Dexiotrichides pangi* n. sp. (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia), a new marine ciliate from the North China Sea. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50** (2): 114-122.
- Song, W.; Warren, A.; Roberts, D.; Shang, H.; Ma, H.; Wilbert, N.; Miao, M.; Yi, Z. (2005).** Re-evaluation of the phylogenetic position of the genus *Dexiotrichides* (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatida) inferred from stomatogenetic and molecular information for *Dexiotrichides pangi*. *Progress in Natural Science*, **15** (8): 700-707.
- Song, W.; Wilbert, N. (2000).** Redefinition and redescription of some marine scuticociliates from China, with report of a new species, *Metanophrys sinensis* nov. spec. (Ciliophora, Scuticociliatida). *Zoologischer Anzeiger*, **239**: 45-74.
- Sonneborn, T.M. (1970).** Methods in *Paramecium* research. *Methods in Cell Physiology*, **4**: 242-339.
- Sørensen, K.K.; Sveinbjørnsson, B.; Dalmo, R.A.; Smedsrød, B.; Bertheussen, K. (1997).** Isolation, cultivation and characterization of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases*, **20**: 93-107.
- Speare, D.J. (1998).** Disorders associated with exposure to excess dissolved gases. En: *Fish Diseases and Disorders Vol. 2: Non-infectious disorders*. (Eds. J.F. Leatherland and P.T.K. Woo), pp. 207-224. CABI Publishing, Oxon.
- Stafford, J.L.; Wilson, E.C.; Belosevic, M. (2004).** Recombinant transferrin induces nitric oxide response in goldfish and murine macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, **17**: 171-185.
- Stensvag, K.; Bøgwald, J.; Steiro, K.; Jørgensen, T.Ø. (1995).** *In vitro* degradation of *Aeromonas salmonicida* and *Limulus polyhemus* hemocyanin by Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, **5**: 427-439.
- Sterud, E. (1998).** *In vitro* cultivation and temperature-dependent growth of two strains of *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) from Atlantic salmon *Salmo salar* and grayling *Thymallus thymallus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **33**: 57-61.
- Sterud, E.; Hansen, M.K.; Mo, T.A. (2000).** Systemic infection with *Uronema*-like ciliates in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **23**: 33-37.
- Stet, R.J.M.; Kruiswijk, C.P.; Dixon, B. (2003).** Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fish: the road not taken. *Critical Reviews in Immunology*, **23**: 441-471.

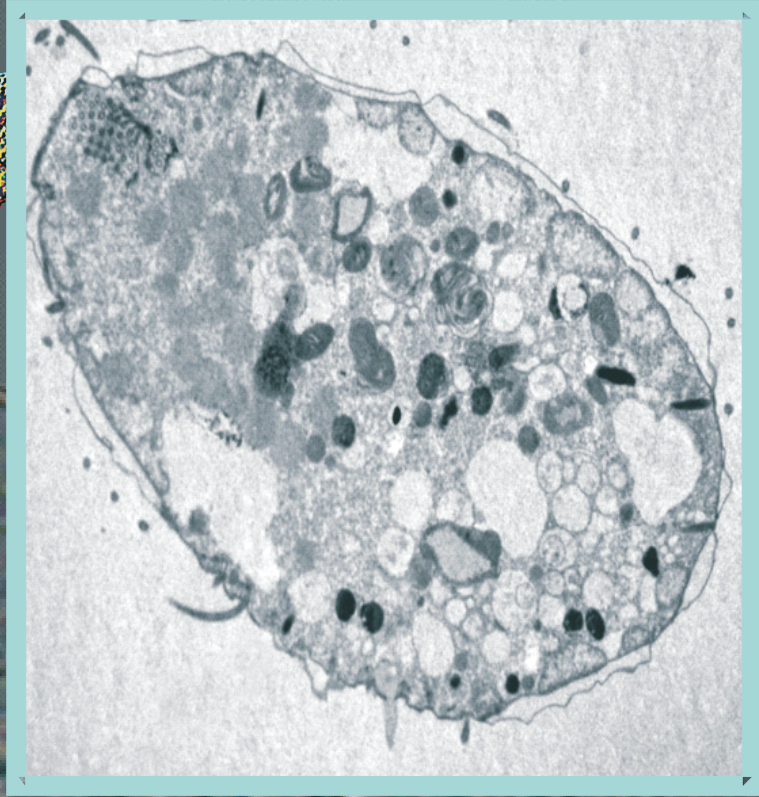
- Strüder-Kypke, M.C.; Wright, A.G.; Fokin, S.I., Lynn, D.H. (2000).** Phylogenetic relationships of the subclass Peniculia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**: 419-429.
- Suzuki, K. (1986).** Morphological and phagocytic characteristics of the peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, **29**: 349-364.
- Suzuki, Y.; Iida, T. (1992).** Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 149-160.
- Sveinbjørnsson, B.; Olsen, R.; Paulsen, S. (1996).** Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **19**: 349-355.
- Sweet, L.I.; Passino, R.D.R.; Meier, P.G.; Dmann, G.M. (1998).** Fish thymocyte viability, apoptosis and necrosis: *in vitro* effects of organochlorine contaminants. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 77-90.
- Swennes, A.G.; Findly, R.C.; Dickerson, H.W. (2007).** Cross-immunity and antibody responses to different immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 589-597.
- Tafalla, C.; Novoa, B. (2000).** Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, **24**: 623-631.
- Tanabe, H.; Nishi, N.; Takagi, Y.; Wada, F.; Akamatsu, I.; Kaji, K. (1990).** Purification and identification of a growth factor produced by *Paramecium tetraurelia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **170**: 786-792.
- Tavares-Dias, M.; De Moraes, F.R. (2007).** Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology*, **36** (1): 49-54.
- The Ciliate Resource Archive (2002).**
- Thompson, J.C. (1964).** A redescription of *Uronema marinum*, and a proposed new family Uronematidae. *Virginia Journal of Science*, **15**: 80-87.
- Ting, J.P.Y.; Trowsdale, J. (2002).** Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, **109** (2): 21-33.
- Tokuyasu, K.; Scherbaum, O.H. (1965).** Ultrastructure of mucocysts and pellicle of *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of Cell Biology*, **27**: 67-81.
- Tort, L.; Rotllant, J.; Rovira, L. (1998).** Immunological suppression in gilthead seabream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, **120** (1): 175-179.
- Tripathi, N.K.; Latimer, K.S.; Burnley, V.V. (2004).** Haematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cells morphology, cytochemistry, and ultrastructure. *Veterinary Clinical Pathology*, **33**: 74-83.
- Trush, M.A.; Wilson, M.E.; Van Dyke, K. (1978).** The generation of chemiluminescence (CL) by phagocytic cells. *Methods of Enzymology*, **8**: 462-494.
- Turpaev, K.T. (2002).** Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)*, **67**: 281-292.

- Umehara, A.; Kosuga, Y.; Hirose, H. (2003). Scuticociliata infection in the weedy sea dragon *Phyllopteryx taeniolatus*. *Parasitology International*, **52** (2): 165-168.
- Vallejo, A.N.; Miller, N.W.; Clem, L.W. (1992a). Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 73-89.
- Vallejo, A.N.; Miller, N.W.; Harvey, N.C.; Cuchens, M.A.; Warr, G.W.; Clem, L.W. (1992b). Cellular pathway(s) of antigen processing and presentation in fish APC: endosomal involvement and cell-free antigen presentation. *Developmental Immunology*, **3**: 51-65.
- van Lierop, M.J.C.; Knight, J.; Secombes, C.J.; Hermesen, T.T.; Groeneveld, A.; Stet, R.J.M. (1998). Production and characterization of an antiserum raised against recombinant rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) MHC class II beta-chain (MhcCommy-DAB). *Fish and Shellfish Immunology*, **8**: 231-243.
- Vd'ačný, P. (2007). Morphological and taxonomical studies on two soil haptorid ciliates (Ciliophora, Litostomatea): *Clavoplites haranti* sp. n. and *Enchelys terrenum* (Foissner, 1984) comb. n., and taxonomy of the family Enchelyidae Ehrenberg, 1838. *European Journal of Protistology*, **43**: 225-237.
- Verchier, Y.; Lardy, B.; Nguyen, M.V.C.; Morel, F.; Arbault, S.; Amatore, C. (2007). Concerted activities of nitric oxide synthases and NADPH oxidases in PLB-985 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **361**: 493-498.
- Verhoef, J. (1991). The phagocytic process and the role of complement in host defense. *Journal of Chemotherapy*, **3** (1): 93-97.
- Verma, A.K.; Pal, A.K.; Manush, S.M.; Das, T.; Dalvi, R.S.; Chandrachoodan, P.P.; Ravi, P.M.; Apte, S.K. (2007). Persistent sub-lethal chlorine exposure augments temperature induced immunosuppression in *Cyprinus carpio* advanced fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 547-555.
- Villamil, L.; Figueras, A.; Novoa, B. (2003a). Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **14**: 157-169.
- Villamil, L.; Figueras, A.; Toranzo, A.E.; Planas, M.; Novoa, B. (2003b). Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases*, **26**: 293-303.
- Vogelbein, W.K.; Fournie, J.W.; Overstreet, R.M. (1987). Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melanomacrophage centers in *Rivulus marmoratus*. *Journal of Fish Biology*, **31**: 145-153.
- Walsh, C.J.; Toranto, J.D.; Gilliland, C.T.; Noyes, D.R.; Bodine, A.B.; Luer, C.A. (2006). Nitric oxide production by nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) and clearnose skate (*Raja eglanteria*) peripheral blood leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, **20**: 40-46.
- Wang, T.; Ward, M.; Grabowski, P.; Secombes, C.J. (2001). Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochemical Journal*, **358** (3): 747-755.
- Wang, X.; Dickerson, H.W. (2002). Surface immobilization antigens of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9**: 176-181.

- Waterstrat, P.R.; Ainsworth, A.J.; Capley, G. (1991).** *In vitro* responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, neutrophils to *Edwardsiella ictaluri*. *Developmental and Comparative Immunology*, **15**: 53-63.
- Watson, J.D.; Crick, F.H.C. (1953).** Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**: 737.
- Watts, M.; Munday, B.L.; Burke, C.M. (2001).** Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*, **8**: 570-574.
- Wegner, K.M.; Kalbe, M.; Rauch, G.; Kurtz, J.; Schaschl, H.; Reusch, T.B.H. (2006).** Genetic variation in MHC class II expression and interactions with MHC sequence polymorphism in three-spined sticklebacks. *Molecular Ecology*, **15** (4): 1153-1164.
- Welker, T.L.; McNulty, S.T.; Klesius, P.H. (2007).** Effect of sublethal hypoxia on the immune response and susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to enteric septicemia. *Journal of the World Aquaculture Society*, **38** (1): 12-23.
- Welsh, J.; McClelland, M. (1990).** Fingerprints genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 7213-7218.
- Weyts, F.A.A.; Rombout, J.H.W.M.; Flik, G.; Verburg-van Kemenade, B.M.L. (1997).** A common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte cell line shares morphological and functional characteristics with macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, **7**: 123-133.
- Wheatley, D.N.; Christensen, S.T.; Schousboe, P.; Rasmussen, L. (1993).** Signalling in cell growth and death: adequate nutrition alone may not be sufficient for ciliates. *Cell Biology International*, **17**: 817-823.
- Wheatley, D.N.; Rasmussen, L.; Tiedtke, A. (1994).** *Tetrahymena*: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential. *BioEssays*, **16**: 367-372.
- White, R.G. (1963).** The immunologically competent cell. *Cyba Foundation Study Group*, No 6.
- Wiackowski, K.; Hryniewiecka-Szyfter, Z.; Babula, A. (1999).** How many species are in the genus *Mesanothryx* (Protista, Ciliophora, facultative parasites of marine crustaceans)? *European Journal of Protistology*, **35**: 379-389.
- Wicklów, B.J. (1997).** Signal-induced defensive phenotypic changes in ciliated protists: morphological and ecological implications for predator and prey. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **44** (3): 176-188.
- Wiegertjes, G.F.; Forlenza, M.; Joerink, M.; Scharsack, J.P. (2005).** Parasite infections revisited. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**: 749-758.
- Wilbert, N. (1975).** Eine verbesserte technik der protargolimpragnation für ciliaten. *Mikrokosmos*, **6**: 171-179.
- Wilks, S.A.; Sleight, M.A. (2004).** Lectin binding sites on *Euplotes mutabilis* (Tuffrau, 1960) and the implications for food particle selection. *European Journal of Protistology*, **40** (2): 153-162.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.
- Williams, N.E.; Doerder, F.P.; Ron, A. (1985).** Expression of a cell surface immobilization antigen during serotype transformation in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology*, **5**: 1925-1932.

- Wilson, M.R.; Warr, G.W. (1992). Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 201-221.
- Wimmers, K.; Mekchay, S.; Schellander, K.; Ponsuksili, S. (2003). Molecular characterization of the pig C3 gene and its association with complement activity. *Immunogenetics*, **54**: 714-724.
- Woo, P.T.K. (1996). Protective immune response of fish to parasitic flagellates. *Annual Review of Fish Diseases*, **6**: 121-131.
- Woo, P.T.K. (2003). *Cryptobia (Trypanoplasma) salmositica* and salmonid cryptobiosis. *Journal of Fish Diseases*, **26**: 627-646.
- Woods, M.L.; Mayer, J.; Evans, T.G.; Hibbs Jr., J.B. (1994). Antiparasitic effects of nitric oxide in an *in vitro* murine model of *Chlamydia trachomatis* infection and an *in vivo* murine model of *Leishmania major* infection. *Immunology*, **60**: 179-195.
- Xie, Q.W.; Cho, H.J.; Calacay, J.; Mumford, R.A.; Swiderek, K.M.; Lee, T.D.; Ding, A.; Troso, T.; Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, **256**: 225-228.
- Xu, D.H.; Klesius, P.H.; Panangala, V.S. (2006). Induced cross-protection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against different immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases*, **29**: 131-138.
- Yambot, A.V.; Song, Y.L. (2006). Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture*, **260**: 1-9.
- Yin, Z.; Lam, T.J.; Sin, Y.M. (1997). Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, **7**: 93-104.
- Yocum, D.; Cuchens, M.; Clem, L.M. (1975). The hapten-carrier effect in teleost fish. *Journal of Immunology*, **114** (3): 925-927.
- Young, I.S.; Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54** (3): 176-186.
- Zapata, A. (1979). Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Developmental and Comparative Immunology*, **3**: 55-65.
- Zapata, A. (1996). Structure of the lymphoid organs of elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology*, **275**: 125-143.
- Zapata, A.; Chibá, A.; Varas, A. (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. En: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment* (Eds. G. Iwawa and T. Nakanishi), pp. 1-62. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Zapata, A.; Cooper, E.L. (1990). *The Immune System: Comparative Histophysiology* (Eds. J. Wiley and sons). Chichester, London, United Kingdom.
- Zapata, A.; Díez, B.; Cejalvo, T.; Gutiérrez-de Frías, C.; Cortés, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, **20**: 126-136.
- Zarkadis, I.K.; Sarrias, M.R.; Sfyroera, G.; Sunyer, J.O.; Lambris, J.D. (2001). Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 11-24.
- Zhang, H.; Adl, S.M.; Berger, J.D. (1999). Two distinct classes of mitotic cyclins homologues, Cyc1 and Cyc2, are involved in cell cycle regulation in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46**: 585-596.

- Zhang, H.; Huang, X.; Tang, L.; Zhang, Q.J.; Frankel, J.; Berger, J.D. (2002).** A cyclin-dependent protein kinase homologue associated with the basal body domains in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1591** (1-3): 119-128.
- Zhang, Q.Y.; Tao, J.J.; Gui, L.; Zhou, G.Z.; Ruan, H.M.; Li, Z.Q.; Gui, J.F. (2007).** Isolation and characterization of *Scophthalmus maximus* rhabdovirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, **74** (2): 95-105.
- Zhang, Y.X.; Chen, S.L. (2006).** Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biotechnology*, **8** (6): 611-623.
- Zou, S.F.; Ng, S.F. (1991).** Physiological reorganization and post-traumatic regeneration in *Stylonychia mytilus*: reflections on developmental constraints and the evolutionary origin of alternative modes of asexual morphogenesis. *Journal of Protozoology*, **38** (3): 182-192.



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA