

UNIVERSIDAD DE MURCIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
FACULTAD DE BIOLOGIA



**IDENTIFICACION Y ORGANIZACION DE LOS COMPONENTES  
CELULARES DEL TIMO DE LUBINA (*Dicentrarchus labrax L.*)**

Memoria que presenta **D. MARCELINO  
AVILES TRIGUEROS** para optar al Grado de  
Doctor en Biología por la Universidad de  
Murcia.

Murcia, Abril 1993



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
MURCIA · ESPAÑA

D. JUAN A. QUESADA CARPIO, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: "IDENTIFICACION Y ORGANIZACION DE LOS COMPONENTES CELULARES DEL TIMO DE LUBINA (Dicentrarchus labrax L.)" ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Ciencias Biológicas D. MARCELINO AVILES TRIGUEROS, para optar al Grado de Doctor, hallándose concluida y reuniendo, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor científicos requeridos, autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Murcia, a uno de Abril de mil novecientos noventa y tres.

Fdo. JUAN A. QUESADA CARPIO



PROF. DRA. BLANCA AGULLEIRO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
MURCIA - ESPAÑA

Dña. BLANCA AGULLEIRO DIAZ, Catedrática de Biología Celular y  
Directora del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Murcia.

**CERTIFICA:**

Que de acuerdo con la normativa vigente para estudios de Tercer  
Ciclo, la Tesis Doctoral titulada: "IDENTIFICACION Y ORGANIZACION DE  
LOS COMPONENTES CELULARES DEL TIMO DE LUBINA (Dicentrarchus  
labrax L.)", que ha sido realizada por el Licenciado en Ciencias Biológicas D.  
MARCELINO AVILES TRIGUEROS y de la que es director el Prof. Dr. JUAN  
A. QUESADA CARPIO, reúne las condiciones precisas para ser presentada y  
defendida.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente  
certificado en Murcia, a uno de Abril de mil novecientos noventa y tres.

*B. Agulleiro*

---

Fdo. BLANCA AGULLEIRO DIAZ

*Ninguna ciencia, en cuanto a  
ciencia, engaña; el engaño está en  
quien no la sabe.*

*Miguel de Cervantes*

*A Pedro, mi padre.*

*Nadie puede realizar un trabajo tan vasto como éste sin estar en deuda con numerosas personas. Por supuesto, es imposible nombrarlas a todas, pero sí me gustaría citar a quienes me han ayudado como compañeros, amigos o simplemente como amables consejeros. Así, deseo expresar mi más sincero agradecimiento:*

*- Al director de esta Tesis Doctoral, Prof. Dr. Juan A. Quesada Carpio, él sabe bien la parte que le corresponde en este trabajo.*

*- A todos los miembros del Departamento, Blanca, Pepe, M<sup>a</sup> Engracia, M<sup>a</sup> Teresa, Teresita, Alfonsa y Cati, por apoyar la realización de este trabajo y por sus continuos consejos y estímulos.*

*- Al personal del Servicio de Microscopía Electrónica, en especial a Paquita y Maruja por su amable y cordial trato.*

*- Al Servicio de Cultivos Celulares o lo que es lo mismo a Toñi y Pepe CC por su paciencia al dejarnos colapsar el servicio (y bajar la centrifuga a 4°C) cada vez que aparecíamos y por los cafés.*

*- Al Servicio de Hematología del Hospital General Universitario de la Comunidad Autónoma de Murcia, por permitirnos usar el citómetro de flujo y en concreto a M<sup>a</sup> Carmen Rosillo por su desinteresada ayuda y grata compañía.*

*- A Germán Echevarría y Benjamín García por su amabilidad y buena disposición a suministrar, discutir y contrastar datos desinteresadamente y a Mar Torralba por ayudarme a digerir la sistemática de peces.*

*- Al Departamento de Bioquímica, en particular a Alvaro, por permitir el uso de su espléndida infraestructura, en especial la Informática, siempre que fue necesario.*

*- A Pepe Villalba por su amistad y por ser el paciente responsable de mi afición, no siempre bien comprendida, por la Informática.*

*- A mis compañeras/os de Departamento, (Dra.) Pili, (Dra.) Marian, Inés, Antonio, Mariano y Juan de Dios, y al resto de colegas del Tercer Ciclo de la Facultad de Biología por su apoyo y buen humor para compartir las dificultades.*

*- A mis compañeras, Marisa, junto a la que he compartido muchos años de trabajo y a quien recuerdo con especial cariño, y Visi, hacia quien no tengo palabras de agradecimiento por su inestimable ayuda, constante estímulo, incansable apoyo, comprensión y buen humor, gracias de todo corazón.*

*- A la Srta. Dña. Concepción Valdivia Martín que me ha ayudado, como siempre, más de lo que ella pueda llegar a imaginar; por todo eso y mucho más, muchísimas gracias.*

*- A mi familia, por su confianza y por tratar de comprender lo que he estado haciendo todos estos años, y en especial a mi madre por su infinita paciencia.*  
**GRACIAS.**

## -INDICE-

<b>I. INTRODUCCION.</b> .....	1
1. INTERES ECONOMICO DE LA LUBINA. ....	4
2. OBJETIVOS .....	7
<b>II. REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	9
1. BIOLOGIA DE LA LUBINA .....	10
2. EVOLUCION FILOGENETICA DEL TIMO DE PECES .....	18
2.1. Superclase agnatha .....	21
2.1.1. Orden myxiniformes .....	22
2.1.2. Orden petromyzoniformes .....	23
2.2. Superclase gnathostomata .....	25
2.2.1. Clase chondrichthyes .....	25
2.2.2. Clase osteichthyes .....	28
3. EL TIMO DE PECES TELEOSTEOS .....	44
3.1. Localización .....	45
3.2. Histología .....	47
3.2.1. Cápsula epitelial .....	54
3.2.2. Zona externa .....	57
3.2.3. Zona interna .....	63
3.2.4. Cápsula conectiva .....	84
3.3. Vascularización .....	88
3.4. Involución tímica .....	90
3.4.1. Involución tímica relacionada con la edad .....	91
3.4.2. Cambios cíclicos tímicos .....	94
3.4.3. Cambios estacionales tímicos .....	95
3.4.4. Efectos hormonales .....	96
3.5. Subpoblaciones de linfocitos en timo de teleósteos .....	96
3.5.1. Marcadores de superficie en timocitos .....	97
3.5.2. Heterogeneidad funcional en timocitos .....	102
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b> .....	109
1. ANIMALES .....	110
2. OBTENCION DE MUESTRAS .....	112
2.1. Procesado de muestras para microscopía óptica .....	113
2.2. Procesado de muestras para microscopía electrónica de transmisión .....	120



2.3. Procesado para microscopía electrónica de barrido .....	123
2.4. Aislamiento de suspensiones celulares de timo .....	124
2.5. Análisis estadístico .....	129
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>133</b>
<b>1. ESTUDIO CON MICROSCOPIA OPTICA .....</b>	<b>134</b>
1.1. Anatomía del timo .....	134
1.2. Estudio histológico .....	135
1.2.1. Cápsula epitelial .....	137
1.2.2. Zona externa .....	140
1.2.3. Zona interna .....	146
1.2.4. Cápsula conectiva .....	150
1.2.5. Vascularización .....	152
<b>2. ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION .....</b>	<b>172</b>
2.1. Cápsula epitelial .....	172
2.1.1. Epitelio tímico .....	172
2.1.2. Región subepitelial .....	177
2.2. Zona externa .....	220
2.2.1. Células epitelio reticulares .....	221
2.2.2. Células linfoides .....	226
2.2.3. Macrófagos .....	228
2.3. Zona interna .....	258
2.3.1. Células epitelio reticulares .....	259
2.3.2. Células linfoides .....	260
2.3.3. Macrófagos .....	261
2.3.5. Células mucosas .....	262
2.3.6. Células interdigitadas .....	263
2.3.7. Células mioides .....	265
2.3.8. Granulocitos .....	267
2.3.9. Areas mielopoyéticas .....	267
2.3.10. Areas de necrobiosis .....	276
2.4. Tejido conectivo asociado al timo .....	316
2.4.1. Cápsula conectiva .....	316
2.4.2. Trabéculas .....	320
2.5. Vascularización .....	321
<b>3. ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO .....</b>	<b>337</b>
3.1. Cápsula epitelial .....	337

3.1.1. Epitelio tímico .....	337
3.1.2. Zona subepitelial .....	339
3.2. Zona externa .....	340
3.3. Zona interna .....	342
3.4. Cápsula conectiva .....	343
<b>4. AISLAMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DE TIMO .....</b>	<b>361</b>
4.1. Citometría de flujo .....	361
4.2. Microscopía electrónica .....	375
<b>V. DISCUSION .....</b>	<b>380</b>
1. ANATOMIA .....	381
2. HISTOLOGIA .....	381
2.1. Cápsula epitelial .....	387
2.2. Zona externa .....	392
2.3. Zona interna .....	402
2.4. Cápsula conectiva y trabéculas .....	418
3. VASCULARIZACION .....	420
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>422</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>428</b>

**-INDICE DE TABLAS Y FIGURAS-**

Figura 1 .....	17
Figura 2 .....	41-43
Figura 3 .....	132
Lámina I (Figs. 4, 5) .....	154
Lámina II (Fig. 6) .....	156
Lámina III (Figs. 7, 6) .....	158
Lámina IV (Figs. 9-12) .....	160
Lámina V (Figs. 13-15) .....	162
Lámina VI (Figs. 16, 17) .....	164
Lámina VII (Figs. 18-20) .....	166
Lámina VIII (Figs. 21, 22) .....	168
Lámina IX (Fig. 23) .....	170
Lámina X (Fig. 24) .....	194
Lámina XI (Fig. 25) .....	196
Lámina XII (Figs. 26, 27) .....	198
Lámina XIII (Fig. 28) .....	200
Lámina XIV (Figs. 29-31) .....	202
Lámina XV (Fig. 32) .....	204
Lámina XVI (Figs. 33-35) .....	206
Lámina XVII (Fig. 36) .....	208
Lámina XVIII (Fig. 37) .....	210
Lámina XIX (Figs. 38-42) .....	212
Lámina XX (Figs. 43, 44) .....	214
Lámina XXI (Fig. 45) .....	234
Lámina XXII (Fig. 46) .....	236
Lámina XXIII (Fig. 47) .....	238
Lámina XXIV (Fig. 48) .....	240
Lámina XXV (Fig. 49) .....	242
Lámina XXVI (Figs. 50, 51) .....	244
Lámina XXVII (Figs. 53, 54) .....	246
Lámina XXVIII (Fig. 55) .....	248
Lámina XXIX (Figs. 56-60) .....	250
Lámina XXX (Figs. 61, 62) .....	252
Lámina XXXI (Figs. 63-65) .....	254

Lámina XXXII (Fig. 66) .....	256
Lámina XXXIII (Fig. 67) .....	278
Lámina XXXIV (Fig. 68) .....	280
Lámina XXXV (Fig. 69) .....	282
Lámina XXXVI (Figs. 70-73) .....	284
Lámina XXXVII (Fig. 74) .....	286
Lámina XXXVIII (Figs. 75-77) .....	288
Lámina XXXIX (Fig. 78) .....	300
Lámina XL (Figs. 79-81) .....	302
Lámina XLI (Figs. 82, 83) .....	304
Lámina XLII (Fig. 84) .....	306
Lámina XLIII ((Figs. 85-89) .....	308
Lámina XLIV (Figs. 90-94) .....	310
Lámina XLV (Fig. 95) .....	312
Lámina XLVI (Fig. 96) .....	314
Lámina XLVII (Fig. 97) .....	325
Lámina XLVIII (Figs. 98-100) .....	327
Lámina XLIX (Figs. 101, 102) .....	329
Lámina L (Figs. 103-105) .....	331
Lámina LI (Fig. 106) .....	333
Lámina LII (Figs. 107, 108) .....	335
Lámina LIII (Figs. 109, 110) .....	345
Lámina LIV (Figs. 111, 112) .....	347
Lámina LV (Figs. 113, 114) .....	349
Lámina LVI (Fig. 115) .....	351
Lámina LVII (Figs. 116, 117) .....	353
Lámina LVIII (Figs. 118, 119) .....	355
Lámina LIX (Figs. 120-122) .....	357
Lámina LX (Figs. 123, 124) .....	359
Lámina LXI (Fig. 125) .....	367
Lámina LXII (Fig. 126) .....	369
Lámina LXIII (Fig. 127) .....	371
Lámina LXIV (Fig. 128) .....	373
Lámina LXV (Figs. 129, 130) .....	378
Tabla I .....	15

Tabla II .....	16
Tabla III .....	34-35
Tabla IV .....	36-40
Tabla V .....	53
Tabla VI .....	106-108
Tabla VII .....	131
Tabla VIII .....	366
Tabla IX .....	377

## ABREVIATURAS:

CER: Célula epitelio reticular.

CFU-C: Unidad formadora de colonia-granulocítica.

CFU-E: Unidad formadora de colonia-eritroide.

CFU-S: Unidad formadora de colonia-bazo.

Con A: Concanavalina A.

FTS: Factor tímico sérico.

GALT: Tejido linfoide asociado al tracto digestivo.

H: Cadena pesada de inmunoglobulina.

Ig: Inmunoglobulina.

L: Cadena ligera de inmunoglobulina.

LPS: Lipopolisacaridos.

PAS: Acido peryódico de Schiff.

PFC: Células formadoras de placa hemolítica.

PHA: Fitohemaglutininas.

RE: Retículo endoplasmático.

REL: Retículo endoplasmático liso.

RER: Retículo endoplasmático rugoso.

sIg: Inmunoglobulina de superficie.

## **I. INTRODUCCION**

---

La inmunología de peces está teniendo en los últimos años un enorme auge tanto en estudios básicos como en aplicaciones prácticas. Recientes investigaciones indican que el sistema inmunitario de peces tiene gran significado filogenético para veterinaria e inmunología clínica.

Por otra parte, la práctica, cada vez mayor, de cultivos intensivos de peces teleósteos ha planteado diversos problemas patológicos que limitan notablemente la productividad y por tanto la rentabilidad de las empresas de acuicultura.

En este contexto, creemos necesario conocer en detalle las características morfofuncionales del sistema inmunitario de peces y en particular el de las especies de interés económico, para establecer las bases que permitan el diagnóstico, prevención y control de las enfermedades que restringen la producción de estos cultivos. Sin olvidar, las aportaciones que de estos estudios puedan derivarse para contribuir al desarrollo de la Inmunología.

Las investigaciones sobre el sistema inmunitario de peces han sido realizadas preferentemente en especies dulceacuícolas de interés económico,



---

siendo considerablemente menores los datos sobre especies marinas. En general, se asume que el sistema inmunitario de peces tiene funciones análogas al de mamíferos, pero en contrapartida presenta interesantes excepciones debido a la óptima adaptación al medio acuático. El sistema inmunitario de peces teleósteos está integrado por el timo, bazo, riñón cefálico y tejido linfoide asociado al tracto digestivo (GALT); no hay médula ósea ni ganglios linfáticos y, además, existen grandes diferencias interespecíficas (van Muiswinkel y cols., 1991).

Durante los últimos años las investigaciones sobre la respuesta inmunitaria de peces, han renovado el interés por el timo, por ser un órgano linfoide primario (Ellis, 1977; 1989; Tamura y Honma, 1977; Grace y Manning, 1980; Manning, 1981; Tatner y Manning, 1983a; Bly, 1985) y responsable de la inmunidad celular (Chilmonczyk, 1983); que está localizado superficialmente a diferencia del resto de vertebrados, característica importante desde el punto de vista de la Inmunología Evolutiva. El timo de peces, al igual que el de todos los vertebrados, crea el microambiente para la diferenciación y maduración de células linfoides específicas (Jordan y Crouse, 1980; Manning, 1981; Ellis y cols., 1989) y tiene papel clave en la aparición de la competencia inmunológica (Miller, 1961; Good y cols., 1962; Cooper y Hildeman, 1965; Cooper, 1973). Sin embargo, todavía hay controversia sobre existencia, en peces, de linfocitos equivalentes a las células T de vertebrados superiores (Avtalion y cols., 1975; Stolen y Mäkelä, 1975; Etlinger y cols., 1976; Clem y cols., 1977; Ruben y cols.,

---

1977; Warr y cols., 1977; van Muiswinkel y Cooper, 1982; Warr y Marchalonis, 1982; Caspi y cols., 1984; Miller y Clem, 1984; Sizemore y cols., 1984; Warr y cols., 1984; Miller y cols., 1985; Tatner, 1985; Ellsaesser y cols., 1988; Rowley y cols., 1988).

Según se deduce de lo expuesto anteriormente y del estudio detallado de la bibliografía, en la actualidad se discute la funcionalidad del timo de peces y se aprecian diferencias morfológicas interespecíficas.

Todas estas indicaciones sugieren la necesidad de estudios específicos y detallados del timo de teleósteos para poder comprender con precisión el funcionamiento del órgano.

## **1. INTERES ECONOMICO DE LA LUBINA.**

La Acuicultura en el Mundo supone solamente una producción total de 14 millones de toneladas de pescado, el 80% de las cuales se produce en los países asiáticos. Esta cantidad significa un bajísimo porcentaje respecto al volumen total de capturas.

En el marco de la Comunidad Europea (C.E.) la Acuicultura tiene

---

una producción relativamente baja, ya que frente a un valor de 7.000 millones de ecus de la pesca obtenida en caladeros tradicionales, la Acuicultura supone sólo 1.200 millones de ecus, lo que representa aproximadamente un 17%.

En España, la Acuicultura está lejos de la media europea, con la excepción del mejillón, del que tradicionalmente ha sido un gran productor. En consecuencia, de un consumo de pescado fresco de aproximadamente 540.000 toneladas, sólo un 4% (fundamentalmente trucha) es producido en piscifactorías y las dos terceras partes proceden de caladeros exteriores. Lo que significa que en España el esfuerzo ha estado centrado en explotar al máximo los caladeros propios y en desarrollar una política de acuerdos exteriores de pesca; mientras que países sin caladeros y con altos niveles de demanda de pescado han desarrollado su Acuicultura.

Las crecientes dificultades para seguir pescando en los caladeros tradicionales y el escaso desarrollo de la Acuicultura han sido algunas de las razones que han aconsejado acometer importantes inversiones en la C.E.

Durante el quinquenio 1985-1990 las inversiones totales en Acuicultura en España ascendieron a 22.400 millones de pesetas. Esto ha supuesto el despegue de una actividad industrial destinada a atender a medio y largo plazo una parte importante de la demanda, que actualmente depende de las importaciones. Pero, por el momento, los resultados han tenido una baja incidencia en el mercado de productos pesqueros (la producción piscícola ha

pasado de 417 toneladas en 1985 a 2.753 toneladas en 1991).

El Programa de Orientación Plurianual de la C.E. de 1992-1996 (Reglamento C.E.E. 4028/86) pretende una explotación óptima y controlada de los recursos naturales, un mejor abastecimiento de los mercados y la absorción de una mano de obra excedentaria ante la obligada reducción de la flota; lo que implica la necesidad de una mejora cuantitativa y cualitativa de la Acuicultura.

Para los próximos cinco años este programa contempla sólo siete especies, entre las que está incluida la lubina; siendo el objetivo aumentar su producción en España desde 92 toneladas (en 1991) a 3.200 toneladas.

Esta especie tiene su hábitat idóneo en el Mediterráneo y por tanto el programa comunitario favorece la ubicación de futuros proyectos en los países ribereños y especialmente en España, que por sus condiciones climáticas presenta unas perspectivas muy favorables para la expansión de estos cultivos. Siendo, además, la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia una de las regiones óptimas para abordar con éxito proyectos de este programa.

La viabilidad de su reproducción en cautividad, posterior cultivo larvario y engorde, de forma extensiva e intensiva, hasta talla comercial permiten el cultivo de la lubina a escala industrial, de manera que pueda ser económicamente rentable.

Pero la productividad, y por tanto la rentabilidad, de este sector industrial está en gran medida condicionada y limitada por diversos problemas

---

patológicos, cuya solución pasa por un mejor conocimiento del sistema inmunitario y por ende del timo de esta especie, que desempeña un papel fundamental en la defensa específica.

## 2. OBJETIVOS.

El presente trabajo se enmarca dentro de una de las líneas de investigación que se desarrollan en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia sobre el sistema inmunitario de peces teleósteos. Siendo esencial el conocimiento previo de las características estructurales del timo para la realización de futuras investigaciones inmunológicas.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo primordial de nuestro trabajo de investigación es el estudio histológico y citológico del timo de lubina (Dicentrarchus labrax L.), para profundizar en el conocimiento de la complicada arquitectura del microambiente tímico y en las interacciones estructurales de los diferentes componentes celulares del timo. Pretendemos aportar nuevos datos cuyo análisis contribuya, en la medida de lo posible, a

profundizar en los estudios filogenéticos y morfofuncionales del timo, para su mejor conocimiento y resolución de los problemas planteados.

## **II. REVISION BIBLIOGRAFICA**

### 1. BIOLOGIA DE LA LUBINA.

Por su posición sistemática la lubina, Dicentrarchus labrax (Linneo, 1758), que también recibe los siguientes sinónimos: Labrax lupus (Cuvier, 1828) y Morone labrax (Whitehead y cols., 1986), es un pez Teleósteo, Perciforme, perteneciente a la familia Serranidae según los taxonomistas clásicos, como indican Whitehead y cols. (1986); mientras que estos últimos autores incluyen a esta especie en la familia Moronidae y también al género Dicentrarchus sp. Este género comprende dos especies Dicentrarchus labrax (Linneo, 1758) y D. punctatus (Bloch, 1792).

La mayor parte de los especímenes de D. labrax presentan hasta la edad de un año, y excepcionalmente hasta los dos años, punteaduras sobre fondo plateado en el dorso y en los flancos, que se pueden extender por debajo de la línea lateral (Whitehead y cols., 1986). Aunque un pequeño número de juveniles puede no presentar estas punteaduras (Barnabé, 1976). Los adultos presentan color plateado, azulado o verdoso en el dorso y carecen de punteaduras, que si persisten en el estadio adulto de D. punctatus (Whitehead



y cols., 1986). Los estudios bioquímicos, y sobre todo el control de la reproducción (Barnabé y René, 1972), han demostrado que D. labrax es una especie en sentido estricto.

En cuanto a su área total de distribución, esta especie es costera y de carácter errático, se encuentra en el Atlántico desde el trópico de Cáncer (costas de Mauritania) hasta aproximadamente los 60° de latitud Norte (Mar de Irlanda, Mar del Norte y Mar Báltico) y está presente en todo el Mar Mediterráneo y Mar Negro (Whitehead y cols., 1986) (Fig. 1). Es una especie que posee una gran ubicuidad, llegando a penetrar en lagunas costeras y desembocaduras de ríos en los que puede remontar varios kilómetros (Barnabé, 1991).

Los factores que determinan los cambios de distribución en esta especie, que explota medios de características muy diversas, no son bien conocidos. Es muy euriterma, los individuos juveniles y adultos se puede encontrar en invierno en aguas a temperaturas de 5-6°C y en verano en áreas cuyas aguas alcanzan los 27-28°C. En cuanto a la salinidad del medio, la lubina es muy eurihalina y se puede encontrar en agua prácticamente dulce, salobre, marina o hipersalina (hasta 90‰). Todos los estadios de lubina se pueden encontrar en fondos de poca profundidad, incluso los especímenes grandes (durante la noche). Los adultos se encuentran hasta profundidades de 40-50 m y a veces, incluso, hasta a 90 m. La lubina, al ser una especie muy ubicua, se

---

puede encontrar igual en sustratos de fondos arenosos que en zonas rocosas o con algas, también puede frecuentar los fondos fangosos y es capaz de enterrarse en los fondos blandos (Whitehead y cols., 1986). Al ser una especie que frecuenta las aguas turbias de los estuarios y litorales arenosos, la lubina abunda en puertos contaminados. Aunque existen pocos datos que permitan definir cuales son los límites de contaminación que toleran, se sabe que su tolerancia a los contaminantes aumenta con la edad (Barnabé, 1991). Es una especie a la que le gustan las aguas agitadas. Constatándose que los períodos de tempestad se corresponden con las épocas de alimentación más intensa. La intensidad luminosa, aparentemente, tiene poco efecto sobre su distribución (Barnabé, 1991).

Según Barnabé (1991), existe una distribución diferencial dentro de sus áreas de distribución. Las puestas tienen lugar en las zonas rocosas litorales (Barnabé, 1976), en la desembocadura de los ríos (Dieuzeide y cols., 1954) o en los estuarios (Kennedy y Fitzmaurice, 1972). Pudiéndose encontrar reproductores en puesta hasta profundidades de al menos 30 a 40 m. Los huevos y las larvas se encuentran en el meroplancton litoral, abarcando desde la superficie hasta unos 30 m de profundidad. Los juveniles se encuentran en primavera en la zona costera, en estanques o estuarios, y en otoño es cuando abandonan este medio para ir a mar abierto. Aunque estas migraciones son de poca amplitud. Los adultos abandonan los estanques mediterráneos entre

octubre y diciembre (Barbané, 1976; Bou Ain, 1977) y presentan una mayor movilidad, que se incrementa con el tiempo (Kennedy y Fitzmaurice, 1972). Fuera del período de puesta se encuentra en todos aquellos lugares en los que se pueda proveer de alimento.

Todos estos factores determinan unas características dominantes de comportamiento en la lubina; según Barnabé (1991), este pez euritermo, eurihalino, depredador durante toda su vida y de desplazamientos restringidos obedece a dos imperativos biológicos principales: la obtención de alimento y la reproducción.

La maduración sexual y la reproducción parecen exigir unas condiciones ambientales (temperatura y oxígeno) intangibles que de hecho determinan su zona de distribución geográfica. Las temperaturas de los lugares de reproducción poseen un rango de amplitud menor, preferentemente de 10°C a 12,5°C, que las de los habitat normales, sin importar cual sea la latitud. Mientras que el nivel de oxígeno en los lugares de puesta es casi siempre cercano a la saturación (Barnabé, 1991).

Las lubinas del Mar Mediterráneo alcanzan la madurez sexual a una talla y edad inferiores a las lubinas atlánticas (Tablas I y II). La maduración sexual es más dependiente de la talla que de la edad, independientemente del área de distribución, siendo los machos más precoces (Barnabé, 1991). Es interesante hacer notar que en ciertos habitats, como algunos estanques costeros

---

(p. ej. los de Thau y Arcachon en la costa atlántica francesa), la maduración sexual no se lleva a término (Stequert, 1972; Barbané, 1976), sin embargo ha sido obtenida en cautividad (Barbané, 1980).

En cuanto a la reproducción en lubina los sexos están separados, a pesar de pertenecer a una familia (Serranidae) en la que el hermafroditismo es frecuente, y su fisonomía presenta algunas características diferenciales según el sexo (Barnabé, 1991).

La reproducción tiene lugar en condiciones de ciclo nictimeral muy diverso dependiendo de la latitud (Barnabé, 1991). La freza es anual y existe una única estación de puesta, que de acuerdo con la latitud se produce en invierno desde diciembre a marzo, con un óptimo en enero en el Mar Mediterráneo, en abril y mayo en Bretaña (Francia) y hasta junio en las Islas Británicas (Whitehead y cols., 1986; Barnabé, 1991).

Tabla I. Talla y edad en la primera maduración sexual de Dicentrarchus labrax de diversas regiones (Bou Auin, 1977) (Tomado de Barnabé, 1991).

LUGAR	MACHOS		HEMBRAS	
	Talla <sup>1</sup>	Edad <sup>1</sup>	Talla <sup>1</sup>	Edad <sup>1</sup>
Islas Británicas	33,7	4-7	37,7	5-8
Arcachon <sup>2</sup>	31,9-37,2	4	42,5	6
Séte <sup>3</sup>	28-30	2	37,1-40	3
Túnez	23,2-25,5	2-3	31,4-32,6	4-5

- (1) Talla (longitud total) y edad se expresan en cm y años, respectivamente.

- (2) Costa francesa atlántica.

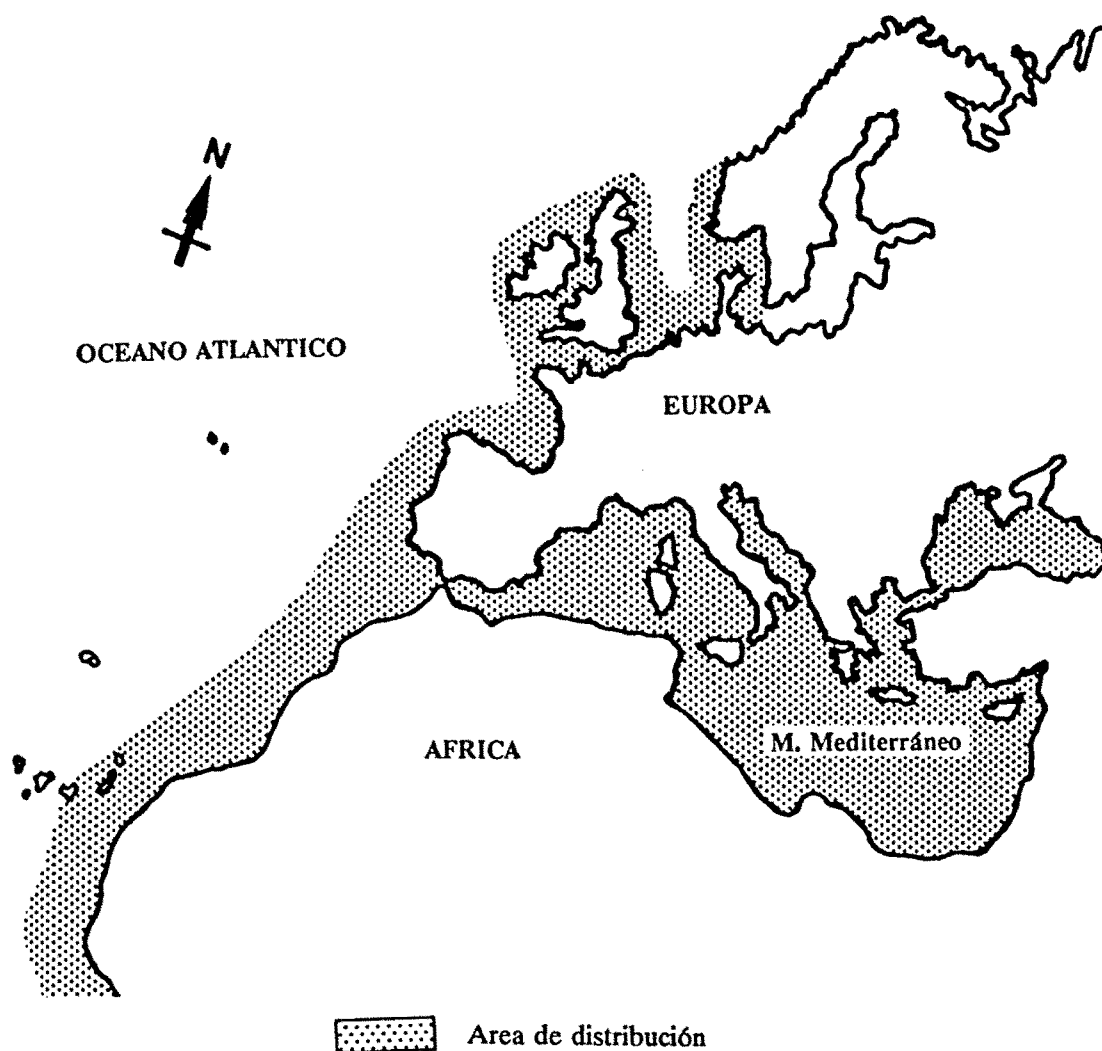
- (3) Costa francesa mediterránea.

Tabla II. Comparación de la longitud total (cm) en Dicentrarchus labrax de diversas regiones a diferentes edades (Modificada de Barnabé, 1991).

LUGAR	EDAD		
	1 año	2 año	3 años
<b>Irlanda:</b>			
- ♂	7,1	16,1	22,1
- ♀	8,2	16,1	23,4
<b>Bretaña<sup>1</sup>:</b>			
- ♂,♀	10,2	19,1	-
- ♂	-	-	28,0
- ♀	-	-	30,3
<b>Vendée<sup>1</sup>:</b>			
- estanque	9,4	18,2	27,0
- mar	9,4	18,2	25,8
<b>Arcachon<sup>1</sup></b>	11,2	20,3	26,2
<b>Sète<sup>2</sup>:</b>			
- ♂,♀	17,4	28,3	-
- ♂	-	-	36,8
- ♀	-	-	39,1
<b>Marsella<sup>2</sup></b>	11,1	21,0	27,0
<b>Marruecos</b>	14,5	23,0	29,0
<b>Egipto</b>	13,2	18,5	22,0

(<sup>1</sup>) Costa francesa atlántica. (<sup>2</sup>) Costa francesa mediterránea.

Figura 1. Mapa de distribución de Dicentrarchus labrax (L.).



## 2. EVOLUCION FILOGENETICA DEL TIMO DE PECES.

Los peces son el grupo de vertebrados más grande, con aproximadamente 20.000 especies conocidas, aunque el número total puede estar alrededor de 30.000 (Bone y Marshall, 1982). La clasificación taxonómica de los peces está en un continuo proceso de revisión. Según Nelson (1969), los agnatos son una superclase separada de la superclase gnatostomados que incluye a todos los vertebrados mandibulados en un grupo común, subdividido en Elasmobranchiomorfa (peces cartilagosos) y Teleostoma (peces óseos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos). Sin embargo, las clasificaciones más aceptadas del filum de los vertebrados lo dividen en dos superclases; los agnatos o vertebrados sin mandíbula, representada sólo por los peces sin mandíbula, y los gnatostomados o vertebrados con mandíbula, integrada por el resto de vertebrados. En esta última superclase, los peces gnatostomados se separan de los tetrapodos al emplazarlos en el grado Pisces dividido en dos clases, condriictios (peces cuyo esqueleto está compuesto mayoritariamente por tejido cartilaginoso) y osteíctios (peces con esqueleto predominantemente óseo) (Bone



y Marshall, 1982).

La clasificación taxonómica que seguiremos (Tablas III y IV) la hemos adoptado a partir de dos clasificaciones taxonómicas modernas de peces; la de Rojo (1988) para agnatos y, dentro de gnatostomados, condrictios y la de Colbert y Morales (1991) para osteictios, salvo teleósteos que usaremos la clasificación más detallada de Rojo (1988); ambas clasificaciones están aceptadas y consensuadas entre los taxonomistas y sistemáticos, y se corresponden ampliamente con las seguidas en los estudios inmunológicos y/o hematológicos de peces. Pero la filogenie de los peces no está completamente aclarada (Moy-Thomas y Miles, 1971). Además, desde una perspectiva inmunológica el número de especies que han sido estudiadas son muy pocas, centrándose principalmente en teleósteos de interés económico y, por otra parte, los trabajos referidos a las clases primitivas y/u ordenes arcaicos son escasísimos o nulos, por lo que actualmente existen notables lagunas en el conocimiento de la filogenie del sistema inmunitario de peces.

En invertebrados, los mecanismos de defensa son inespecíficos y consistentes en procesos de fagocitosis, encapsulación y liberación de factores humorales no específicos. En vertebrados, además de estos mecanismos inespecíficos, se desarrolla una respuesta inmunitaria específica y con memoria basada en la presencia de linfocitos y en la producción de inmunoglobulinas. Este sistema específico de defensa aparece por primera vez en peces, siendo por

tanto un grupo clave para el conocimiento de la evolución de los procesos inmunológicos (McCumber y cols., 1982; Zapata, 1983).

Aunque las diferentes clases de peces muestran una considerable variación en el desarrollo del sistema inmunitario, se acepta como norma general que los peces más evolucionados, los osteíctios, muestran un mayor desarrollo del sistema inmunitario que los condriictios, y en estos últimos está claramente más evolucionado que en los primitivos agnatos. Sin embargo, dentro de estas clases se puede encontrar un marcado grado de variabilidad estructural entre los diferentes ordenes e, incluso, especies (Fänge, 1982; McCumber y cols., 1982).

Es precisamente en la filogenie de peces donde se observa por primera vez la aparición de precursores o esbozos tímicos hasta llegar a constituir un órgano claramente diferenciado con características comunes y diferenciales del timo de otros vertebrados (Manning, 1981).

Seguidamente, pretendemos esbozar la evolución filogenética del tejido linfoide tímico de los peces, revisando los conocimientos que actualmente existen sobre las diferentes especies de peces estudiadas.

### 2.1. SUPERCLASE AGNATHA.

Los integrantes de esta superclase son los únicos descendientes vivos de los ostracodermos (vertebrados que no tenían mandíbula y estaban, externamente, fuertemente acorazados), que son considerados los primeros vertebrados equivalentes a peces y aparecen en el registro fósil a finales del periodo Cámbrico, hace aproximadamente unos 500 millones de años (Bone y Marshall, 1982). Los agnatos aparecieron hace unos 490 millones de años y durante el Silúrico y principios del Devónico (hace 435-395 millones de años) constituyeron el grupo más numeroso entre los vertebrados (Colbert y Morales, 1991). Según Hardisty (1979), los agnatos tienen numerosas especializaciones morfológicas y fisiológicas adquiridas a lo largo de su evolución, durante unos 300 millones de años, por lo que los agnatos actuales no son solamente una forma "primitiva" de pez.

Esta superclase está representada en la actualidad por una única clase, Cephalaspidomorphi, que incluye la subclase Cyclostomata integrada por dos ordenes, Myxiniformes y Petromyzoniformes, que son los vertebrados actuales más primitivos.

Los ciclóstomos no poseen un verdadero timo (Zapata, 1983; Fänge, 1984; Ardavin y Zapata, 1988; Rowley y cols., 1988; Zapata y Cooper,

1990).

### 2.1.1. ORDEN MYXINIFORMES.

Filogenéticamente son los vertebrados más primitivos, por lo que ocupan una posición clave para comprender la evolución de la respuesta inmunitaria (Page y Rowley, 1982; Zapata, 1983).

Según la mayoría de autores, los Myxiniformes (Myxine sp. y Eptatretus sp.) carecen de timo (Papermaster y cols., 1964; Good y cols., 1966; Riviere y cols., 1975; Cohen, 1977); aunque en Eptatretus stoutii Riviere y cols. (1975) describen acúmulos de células semejantes a linfocitos en el complejo muscular del velo de estos animales, sugiriendo que podrían representar la estructura primitiva de un órgano equivalente al timo o prototimo (Fig. 2a). Sin embargo, Zapata (1983) indica que estas células se parecen a las células satélite del músculo esquelético y, por otra parte, Fänge (1984) argumenta que no existe ninguna evidencia experimental para apoyar esta suposición. Por tanto, el problema de la presencia o no, de una estructura equivalente al timo en Myxiniformes permanece sin resolver.

### 2.1.2. ORDEN PETROMYZONIFORMES.

La información sobre el sistema inmunitario de las lampreas (Lamprera sp. y Petromyzon sp.) es escasa, especialmente en relación con la estructura y función de las células y órganos inmunocompetentes, en parte debido a su largo y complejo ciclo vital. Algunos autores han estudiado los cambios ultraestructurales que afectan a los órganos linfohematopoiéticos a lo largo de su vida y su significado inmunológico (Zapata, 1983). Desde el punto de vista de la inmunología comparada es de especial interés la presencia, en estado larvario (amocetes), de acúmulos linfoides difusos subepiteliales en la faringe, localizados dorsal y ventralmente respecto a las aberturas branquiales (Fig. 2b) (Page y Rowley, 1982; Rojo, 1988), en posición equivalente a la que ocupa el timo en los peces mandibulados y con estructuras semejantes al timo de Gnatostomados (Gerard, 1933; Finstad y cols., 1964; Good y cols., 1962, 1966; Fänge, 1982), aunque otros autores expresen su reserva al respecto (Sterba, 1953; Percy y Potter, 1977; Page y Rowley, 1982; Ardavin y cols., 1984, Ardavin y Zapata, 1988; Rowley y cols., 1988). Los estudios ultraestructurales de estos acúmulos linfoides, emplazados en los intersticios de una trama pobremente desarrollada de células reticulares o equivalentes a ellas, indican que son sinusoides sanguíneos y/o linfáticos. Estos sinusoides están delimitados por un endotelio y en su interior hay macrófagos, células plasmáticas, plasmablastos y

principalmente linfocitos y linfoblastos, en contacto con la circulación sanguínea general (Sterba, 1953; Page y Rowley, 1982; Page, 1983; Ardavin y cols., 1984; Ardavin y Zapata, 1988; Rowley y cols., 1988). Con el envejecimiento, estos acúmulos linfoides involucionan (Salkind, 1915; Rowley y cols., 1988), desapareciendo en adulto los acúmulos localizados ventralmente (Rojo, 1988); pero esta característica, aunque es similar a lo que sucede con el timo de otros vertebrados (Manning, 1981; Kendall, 1981a), tiene poco interés filogenético ya que en las lampreas todos los tejidos hematopoyéticos involucionan y/o desaparecen durante la metamorfosis (Rowley y cols., 1988).

Estas áreas de la región faríngea de agnatos representarían, al menos en algunos estadios de su vida y dependiendo de los cambios sufridos por estos acúmulos y los tipos celulares descritos en ellos, centros linfohematopoyéticos o regiones filtradoras de sangre, (Sterba, 1953; Page y Rowley, 1982; Ardavin y cols., 1984; Ardavin y Zapata, 1988). Por otro lado, varios autores (Manning y Turner, 1976; Fujii, 1982; Page y Rowley, 1982; Ardavin y Zapata, 1988) sugieren que este órgano está relacionado con la captura de antígenos, por estar separado sólo por el epitelio faríngeo del medio ambiente externo, donde los microorganismos y detritus son abundantes. Por todo lo anteriormente dicho, se puede concluir que los acúmulos linfoides no tienen características propias de precursores tímicos (Sterba, 1953; Manning y Turner, 1976; Percy y Potter, 1977; Page y Rowley, 1982; Ardavin y Zapata,

1988; Rowley y cols., 1988; Zapata y Cooper, 1990).

## **2.2. SUPERCLASE GNASTHOSTOMATA.**

Aunque es imposible situar con precisión la aparición de los primeros gnastostomados, se considera que aparecieron después de los agnatos, con los que probablemente tuvieron ancestros comunes. Los primeros gnastostomados datan del Silúrico inferior (hace 430 millones de años).

### **2.2.1. CLASE CHONDRICHTHYES.**

La clase Chondrichthyes comprende dos subclases, Holocephali y Elasmobranchii. Los condictios o peces cartilaginosos evolucionaron junto a los osteíctios, probablemente a partir de diferentes ancestros y en una época relativamente similar, hace aproximadamente unos 410 millones de años durante el periodo Devónico. A lo largo del periodo Carbonífero (hace 360-290 millones de años) los peces cartilaginosos tuvieron una gran expansión; pero desde entonces han sido rápidamente sobrepasados por los peces con esqueleto óseo,

que actualmente predominan en el medio acuático (Bone y Marshall, 1982).

En la escala filogenética los condriictios son el primer grupo de vertebrados con un timo claramente definido (McCumber y cols., 1982; Zapata, 1983; Fänge, 1984; Mattisson y cols., 1990) y con notables diferencias interespecíficas (Zapata, 1983).

#### 2.2.1.1. Subclase Holocephali.

Esta subclase comprende solamente el orden Chimeriformes.

En peces Chimeriformes (Chimaera sp. e Hydrolagus sp.) (Fig. 2c) se ha descrito la presencia de un timo grande y lobulado, con una clara diferenciación entre corteza y médula, que persiste en ejemplares adultos sin una marcada involución y probablemente en estado funcional (Good y cols., 1966; Fänge y Sundell, 1969; Fänge, 1977, 1982, 1987). Los estudios ultraestructurales realizados en Chimaera monstrosa describen la médula tímica como una zona rica en células reticulares y linfocitos de todos los tamaños, sin corpúsculos de Hassall y con células reticulares degeneradas que pueden agruparse en disposición concéntrica formando quistes epiteliales (Zapata, 1983; Mattisson y Fänge, 1986), que algunos autores consideran similares morfológicamente a corpúsculos de Hassall (Fänge y Sundell, 1969).



### 2.2.1.2. Subclase Elasmobranchii.

Actualmente esta subclase está subdividida en numerosos ordenes (Ver Tabla III), que anteriormente estaban incluidos en sólo dos ordenes: Squaliformes y Rajiformes.

En elasmobranquios los órganos linfoides son timo, bazo, órgano epigonal y órgano de Leydig (Figs. 2d y 2e) (Fänge, 1982; Zapata, 1983).

El timo de los elasmobranquios es interno y se localiza bilateralmente en la parte dorsal de cada uno de los arcos branquiales, formando una cadena de nódulos (Rojo, 1988), dando por tanto un aspecto multilobulado. El parénquima tímico está bien desarrollado, presentando numerosos linfocitos de diferentes tamaños en los intersticios de una malla de células reticulares (Good y cols., 1966; Zapata, 1980, 1983; Fänge, 1984, 1987; Pulsford y cols., 1984; Zapata y Cooper, 1990).

La estructura del timo y el grado de involución son variables en las diferentes especies que integran los ordenes de esta subclase (Fänge, 1977; Rowley y cols., 1988). Así, la corteza y médula tímicas están poco (Scyliorhinus canicula; Pulsford y cols., 1984) o claramente diferenciadas, presentando además cavidades quísticas epiteliales y células mioides (Good y cols., 1966; Zapata, 1980). Los corpúsculos de Hassall sólo han sido identificados, con microscopía óptica, ocasionalmente en algunos elasmobranquios (Beard, 1900, 1903; Good

y Papermaster, 1964; Good y cols., 1966; Fänge y Sundell, 1969), pero no aparecen en el timo de Raja clavata y Torpedo marmorata (Zapata, 1980).

Por otro lado y aunque según Hammar (1911), el timo de la mayoría de elasmobranquios sufre involución asociada al envejecimiento, hay controversia sobre la existencia o no de ella. Así, en algunas especies como Scyliorhinus canicula (Pulsford y cols., 1984), Squalus sp., Etmopterus sp. (Fänge, 1984) y otros tiburones más evolucionados (Good y cols., 1966) el timo parece involucionar, mientras que en Batidoimorpha sp., Raja sp. (Good y cols., 1966; Fänge, 1977) y algunos tiburones primitivos, como Heterodontus francisci, (Good y cols., 1966) el timo persiste como un órgano desarrollado a edades tardías.

Es de resaltar, por primera vez en la escala filogenética, la presencia en el timo de Raja naevus de linfocitos con inmunoglobulinas superficiales (Ellis y Parkhouse, 1975).

### 2.2.2. CLASE OSTEICHTHYES.

Actualmente, los osteictios son el grupo más numeroso de peces. Todos sus subgrupos aparecen casi simultáneamente en el periodo Devónico medio (hace 410 millones de años), pero es durante la era Mesozoica (250-67 millones de años) cuando experimentan una rápida evolución que dará

nacimiento a los teleósteos actuales (Bone y Marshall, 1982).

La clase de los peces osteofictios está subdividida en dos grandes subclases: Sarcopterygii y Actinopterygii.

En esta clase, además del timo y del bazo ya observados en condriictios, aparecen el riñón, el tejido linfoide asociado al tracto digestivo (GALT), el tejido mieloide pericárdico y el tejido mieloide meníngeal como principales órganos linfomieloideos bien desarrollados (Fänge, 1986; Rowley y cols., 1988).

#### **2.2.2.1. Subclase Sarcopterygii.**

De esta subclase que fue un grupo dominante en el pasado, en la actualidad sobreviven escasas especies incluidas en dos ordenes Crossopterygii y Dipnoi.

En el presente, el orden Crossopterygii está exclusivamente representado por el suborden Coelacanthini, de donde probablemente evolucionaron los primeros vertebrados terrestres. El orden Dipnoi se corresponde con los peces pulmonados.

##### **2.2.2.1.1. Orden Crossopterygii.**

Aparecieron en el periodo Devónico inferior y se extinguieron en

el Carbonífero inferior, a excepción del suborden Coelacanthini representado por Latimeria chalumnae (Fig. 2f) (Rojo, 1988). A pesar de la gran importancia filogenética y su posición clave en la escala evolutiva se conoce poco sobre su sistema inmunitario (Fänge, 1982; 1984; Zapata, 1983).

Solamente, en ejemplares adultos de Latimeria sp., ha sido descrito el timo como un órgano bien desarrollado y lobulado que no muestra involución con la edad (Du Pasquier, 1973); sin embargo, Millot y cols. (1978) indican la existencia de involución.

#### 2.2.2.1.2. Orden Dipnoi.

Son escasos los estudios realizados sobre el sistema linfohematopoyético de los dipnoos (Jordan y Speidel, 1931; Mimura y Mimura, 1977; Rafn y Wingstrand, 1981).

En concreto, el timo sólo ha sido descrito en Lepidosiren paradoxa (Fig. 2g) como un órgano bien desarrollado con una clara diferenciación entre corteza y médula, y que no muestra síntomas involutivos, persistiendo como tal en los ejemplares adultos (Mimura y Mimura, 1977).

#### 2.2.2.2. Subclase Actinopterygii.

Los actinopterigios aparecieron durante el Devónico medio y se

fueron imponiendo progresivamente durante el Carbonífero hasta convertirse en el grupo dominante (Bone y Marshall, 1982). La subclase Actinopterygii comprende tres infraclases: Chondrostei, Holostei y Teleostei.

#### 2.2.2.2.1. Infraclase Chondrostei.

La infraclase Chondrostei está representada por dos ordenes: Polypteriformes y Acipenseriformes.

No hemos encontrado datos bibliográficos sobre el sistema inmunitario del orden Polypteriformes (Fig. 2h), representado sólo por algunas especies que sobreviven en Africa.

El orden Acipenseriformes tienen un gran tamaño corporal y una gran longevidad, sobreviviendo a muchos ataques de virus, bacterias y parásitos. Por lo tanto deben de tener unos mecanismos de defensa, basados en los tejidos productores de leucocitos, eficientemente desarrollados. Los principales tejidos linfomioides son el timo, bazo, riñón, las masas linfoides intestinales y los tejidos mieloides meningeal y pericárdico (Fig. 2i) (Fänge, 1986).

El timo, en condrosteos, aparece como un órgano bien desarrollado, lobulado, con corteza y médula bien diferenciadas (Sokolova, 1912; Good y cols., 1966; Zapata, 1983; Fänge, 1986), que en algunas especies se localiza internamente (Zapata y Cooper, 1990). Los estudios ultraestructurales en Acipenser transmontanus muestran la presencia, además de los componentes

celulares típicos del parénquima tímico, de células mioides, mucosas y macrófagos, así como eritrocitos y granulocitos dispersos por el parénquima; no observándose corpúsculos de Hassall (Fänge, 1986). Sin embargo, en Polyodon spathula se describen con microscopía óptica primitivos corpúsculos de Hassall (Good y cols., 1966).

En Acipenser sp. no hay involución tímica (Sokolova, 1912; Fänge, 1984, 1986), mientras que en Polyodon spathula si se aprecian síntomas involutivos (Good y cols., 1966).

#### 2.2.2.2.2. Infraclase Holostei.

En la actualidad sólo está representada por dos órdenes: Lepisosteiformes y Amiiiformes.

Los estudios realizados sobre el sistema inmunitario en Holósteos son escasos (Fänge, 1984).

En Amia calva (Fig. 2k) el timo está bien desarrollado y es lobulado, pero la diferenciación entre corteza y médula no está bien definida (Good y cols., 1966) y es menos patente que en condrósteos y elasmobranquios (Zapata, 1983); por el contrario en los Lepisosteiformes (Fig. 2j) Lepisosteus platyrhinus (McKinney, 1981; Marchalonis, 1977) y en Sphenodon punctatum (Marchalonis y cols., 1969) el timo no es identificable; aunque actualmente se asume que el timo está presente en todos los vertebrados, excepto agnatos

(Zapata y Cooper, 1990).

#### **2.2.2.2.3. Infraclase Teleostei.**

Los teleósteos se supone que están relacionados filogenéticamente con los condrósteos, a través de antecesores extinguidos de los teleósteos actuales.

En teleósteos, ninguna uniformidad puede ser encontrada en la histología de los órganos linfoides. Además, debido al enorme número de especies vivas, las variaciones morfológicas observadas indican la influencia de procesos adaptativos secundarios más que especializaciones específicas de significado morfofuncional. En todos los casos, los órganos linfoides de teleósteos comprenden timo, bazo, riñón y tejido linfoide asociado al tracto digestivo (GALT) (Fig. 21) (van Muiswinkel y cols., 1978; Fänge, 1982; Zapata, 1983).

El timo de teleósteos será ampliamente estudiado en el siguiente apartado de este trabajo.

Tabla III. Clasificación de los peces actuales. Adaptada y modificada de Rojo (1988) y Colbert y Morales (1991).

---

**SUPERCLASE**

CLASE	<u>Subclase</u>	Infraclasse	Orden	Suborden
<b>AGNATHA</b>				
<b>CEPHALASPIDOMORPHI</b>				
	<u>Cyclostomata</u>		Myxiniiformes	(32)
			Petromyzoniiformes	(31)
<b>GNATHOSTOMATA</b>				
<b>CHONDRICHTHYES</b>				
	<u>Holocephali</u>		Chimeriiformes	(25)
	<u>Elasmobranchii</u>		Hexanchiiformes	(602)
			Squaliiformes	
			Pristiophoriiformes	
			Rajiiformes	
			Pristiiformes	
			Torpediniiformes	
			Myliobatiformes	
			Squantiiformes	
			Heterodontiformes	
			Orectolobiformes	
			Lamniiformes	
			Carcharhiniiformes	

(Continua)

- 
- Entre peréntesis se indica el número de especies que integran cada grupo (Fänge, 1982).
  - (\*) Las subdivisiones de la infraclasse Teleostei están recogidas en la tabla IV.



Tabla III (Continuación). Clasificación de los peces actuales.

Adaptada y modificada de Rojo (1988) y Colbert y Morales (1991).

**SUPERCLASE**

CLASE	Subclase	Infraclase	Orden	Suborden
OSTEICHTHYES	<u>Sarcopterigii</u>		Crossopterigii	
			Coelacanthini	(1)
			Dipnoi	(6)
	<u>Actinopterygii</u>			
		Chondrostei		
			Polypteriformes	(11)
			Acipenseriformes	(25)
		Holostei		(8)
			Lepisosteiformes	
			Amiiformes	
		Teleostei(*)		(18.007)

- Entre peréntesis se indica el número de especies que integran cada grupo (Fänge, 1982).
- (\*) Las subdivisiones de la infraclase Teleostei están recogidas en la tabla IV.

Tabla IV. Clasificación de los peces Teleósteos actuales. Adaptada y modificada de Rojo (1988).

INFRACLASE			
	Superorden	Orden	Suborden
<b>TELEOSTEI.</b>			
<b>DIVISION I</b>	<b>Elopomorpha</b>	<u>Elopiformes</u>	Elopidei Albuloidei
		<u>Anguilliformes</u>	Anguilloidei
	<b>Clupeomorpha</b>	<u>Notacanthiformes</u>	
		<u>Clupeiformes</u>	Denticipitoidei Clupeoidei
<b>DIVISION II</b>	<b>Osteoglossomorpha</b>	<u>Osteoglossiformes</u>	Osteoglossoidei Notopteroidei
		<u>Mormyriiformes</u>	
<b>DIVISION III</b>	<b>Protacanthopterygii</b>	<u>Salmoniformes</u>	Salmonoidei Argentinoidei Galaxoidei Esocoidei Stomiatoidei Alepocephloidei Myctophoidei

(Continúa)

Tabla IV (Continuación). Clasificación de los peces Teleósteos actuales. Adaptada y modificada de Rojo (1988).

INFRACLASE	Superorden	<u>Orden</u>	Suborden
		<u>Cetomimiformes</u>	Cetomimoidei Atelepoidei Mirapinnatoidei Giganturoidei
		<u>Gonorynchiformes</u>	Gonorynchoidei Chanoidei
	<b>Ostariophysii</b>	<u>Cypriniformes</u>	Characoidei Gymnotoidei Cyprinoidei
	<b>Paracanthopterygii</b>	<u>Siluriformes</u>	
		<u>Percosiformes</u>	Amblyopsoidei Aphredoderoidei Percopsoidei
		<u>Batrachoiformes</u>	
		<u>Gobiesociformes</u>	
		<u>Lophiiformes</u>	Lophoidei Antennarioidei Ceratioidei
		<u>Gadiformes</u>	Muraenolepoidei Gadoidei Ophidioidei

(Continúa)

Tabla IV (Continuación). Clasificación de los peces Teleósteos actuales. Adaptada y modificada de Rojo (1988).

INFRACLASE			
	Superorden	Orden	Suborden
			Zoarcoidei Macrouroidei
	Atherinomorpha	<u>Atheriniformes</u>	Exocoetoidei Cyprinodontoidei Atherinoidei
	Acanthopterygii	<u>Beryciformes</u>	Stephanoberycoidei Polymixioidei Berycoidei
		<u>Zeiformes</u>	
		<u>Lampridiformes</u>	Lampridoidei Veliferoidei Trachipteroidei
		<u>Gasterosteiformes</u>	Gasterosteroidei Aulostomoidei Syngnathoidei
		<u>Channiformes</u>	
		<u>Synbranchiformes</u>	Synbranchoidei
		<u>Scorpaeniformes</u>	Scorpaenoidei Hexagrammoidei Platycephaloidei Cottoidei

(Continúa)

Tabla 2 (Continuación). Clasificación de los peces Teleósteos actuales. Adaptada y modificada de Rojo (1988).

INFRACLASE	Superorden	<u>Orden</u>	Suborden
		<u>Dactylopteriformes</u>	
		<u>Pegasiformes</u>	
		<u>Perciformes</u>	
			Percoidei
			Mugiloidei
			Sphyraenoidei
			Labroidei
			Trachinoidei
			Notothenioidei
			Blennioidei
			Icosteioidei
			Ammodytoidei
			Callionymoidei
			Gobioidei
			Kurtoidei
			Acanthuroidei
			Scombroidei
			Stromateoidei
			Anabantoidei
			Luciocephaloidei
			Mastacembeloidei
		<u>Pleuronectiformes</u>	
			Psettidoidei
			Pleuronectoidei
			Soleoidei
		<u>Tetraodontiformes</u>	
			Balistoidei
			Tetreodontoidei

(Continúa)

La clasificación de la especie objeto de este estudio Dicentrarchus labrax (L.) (Lubina) es la siguiente:

Infraclase Teleostei

Superorden Acanthopterygii

Orden Perciformes

Suborden Percoidei

Familia Serranidae

Género Dicentrarchus

Especie D. Labrax

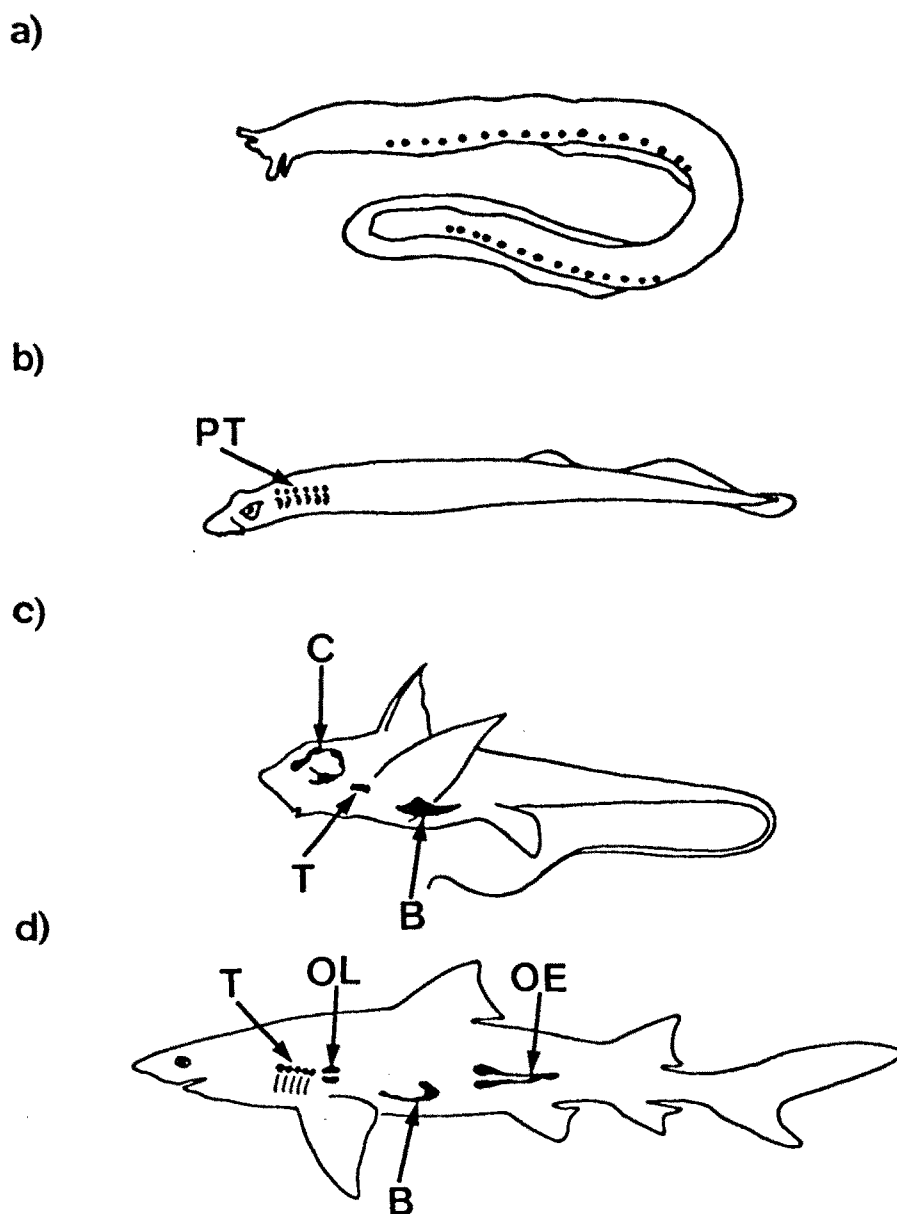


Figura 2. Localización de los principales órganos linfoides de peces, con especial referencia al timo. a) Myxiniformes (*Mixine* sp.), b) Petromyzoniformes (*Petromyzon* sp.), c) Holocephali (*Chimaera* sp.), d) Elasmobranchii (*Squalus* sp.). (c y d modificados de Fänge, 1982). (B: bazo, C: tejido linfomieloide craneal, GALT: tejido linfoide asociado al tracto digestivo, OE: órgano epigonal, OL: órgano de Leydig, PC: tejido linfoide pericárdico, PT: prototimo, R: tejido linfomieloide renal, RC: riñón cefálico, RM: riñón medio, T: timo).

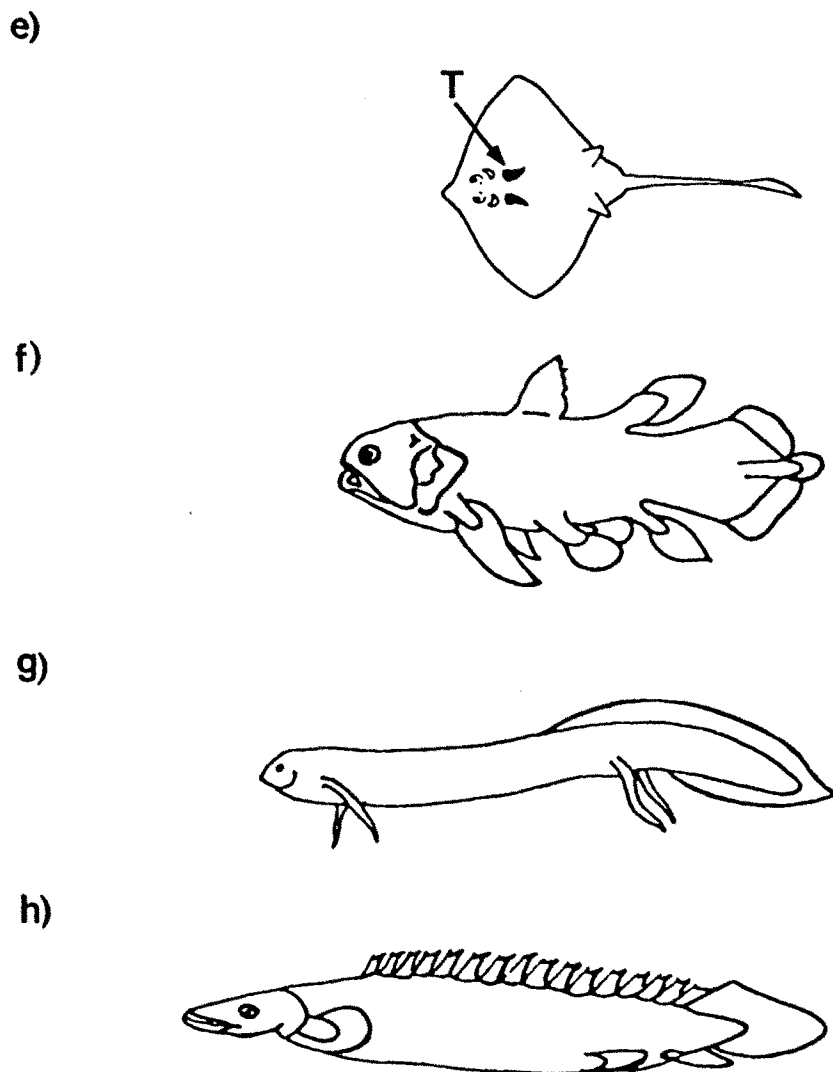


Figura 2 (Continuación). Localización de los principales órganos linfoides de peces, con especial referencia al timo. e) Elasmobranchii (*Raja* sp.), f) Crossopterigii (*Latimeria* sp.), g) Dipnoi (*Lepidosiderin* sp.), h) Polypteriformes (*Polypterus* sp.). (e modificado de Fänge, 1982). (B: bazo, C: tejido linfomieloide craneal, GALT: tejido linfoide asociado al tracto digestivo, OE: órgano epigonal, OL: órgano de Leydig, PC: tejido linfoide pericárdico, PT: prototimo, R: tejido linfomieloide renal, RC: riñón cefálico, RM: riñón medio, T: timo).



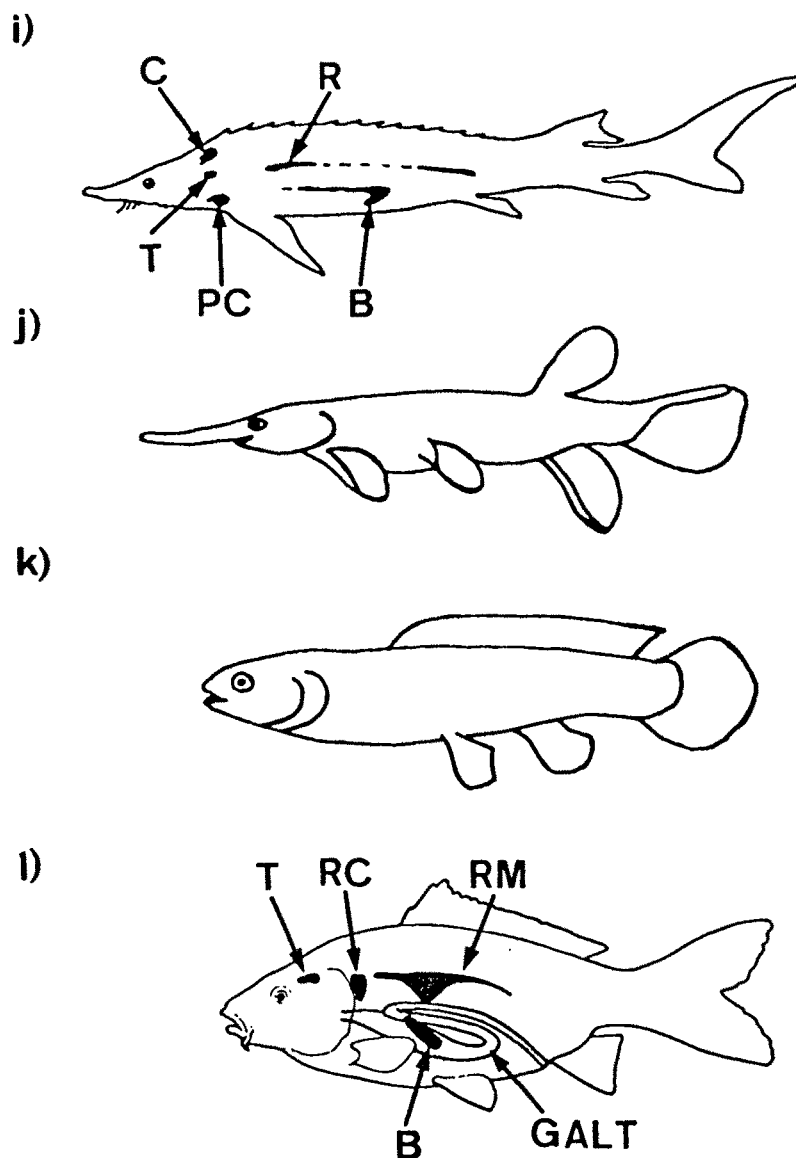


Figura 2 (Continuación). Localización de los principales órganos linfoides de peces, con especial referencia al timo. i) Acipenseriformes (*Acipenser* sp.), j) Lepisosteiformes (*Lepisosteus* sp.), k) Amiiformes (*Amia* sp.), l) Teleostei (*Cyprinus* sp.). (i modificado de Fänge, 1982; l modificado de Lamers, 1985). (B: bazo, C: tejido linfomieloide craneal, GALT: tejido linfoide asociado al tracto digestivo, OE: órgano epigonal, OL: órgano de Leydig, PC: tejido linfoide pericárdico, PT: prototimo, R: tejido linfomieloide renal, RC: riñón cefálico, RM: riñón medio, T: timo).

### 3. EL TIMO DE PECES TELEOSTEOS.

De entre los diferentes grupos de peces es el timo de teleósteos el más estudiado. Son numerosas las investigaciones realizadas desde mediados del siglo pasado en diversas especies de peces teleósteos referidas a la anatomía, histogénesis e histología de este órgano (Stannius, 1850; Maurer, 1886; Schaffer, 1893; Hammar, 1909; Maximow, 1912; Salkind, 1915; Burne, 1927; Deansley, 1927; Lagabrielle, 1938; Lele, 1933; von Hagen, 1936). Estas primeras descripciones son insuficientes para explicar la participación del timo en los procesos inmunológicos (Chilmonczyk, 1985), por lo que hay necesidad de conocer mejor la organización de los tejidos linfoides y sus elementos celulares en teleósteos. Con tal información, sería posible elucidar el papel de los tejidos linfoides en el desarrollo de las funciones inmunológicas, así como los cambios estructurales resultantes de la inmunización y las respuestas inmunitarias.

Más recientemente, las diversas investigaciones sobre la ontogenie del timo de teleósteos, tanto en especies ovíparas (Hafter, 1952; Sailendri, 1973; Ellis, 1977; Botham y cols., 1980; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning,

1981; Schneider, 1983; Chilmonczyk, 1985; Castillo y cols., 1987, 1990, 1991; O'Neill, 1989a, b, c; Razquin y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991), como vivíparas (Engen, 1968; Tamura y cols., 1981; Bly, 1985) y ovovivíparas (Nakanishi, 1991); así como los estudios estructurales realizados en diferentes especies a nivel microscópico óptico (Rizkalla, 1969; Mulcahy, 1970; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Zapata, 1981; Groman, 1982; Chilmonczyk, 1983; Cooper y cols., 1983; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; Castillo y cols., 1987, 1990, 1991; O'Neill, 1989a, b, c; Razquin y cols., 1990) y ultraestructural (Manning, 1981; Zapata, 1981; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989a; Castillo y cols., 1991) han puesto de manifiesto notables diferencias morfológicas interespecíficas e, incluso, intraespecíficas (Gorgollón, 1983; Nakanishi, 1986).

### 3.1. LOCALIZACION.

El timo de peces teleósteos es un órgano par y bilateral, situado en la comisura dorsal de la cavidad branquial, linfoide, epitelio reticular y primario (Hafter, 1952; Finstad y cols., 1964; Papermaster y cols., 1964; Sailendri

y Muthukkaruppan, 1975b; Cooper y cols., 1983; Schneider, 1983; Zapata, 1983; Lamers, 1985; Tatner, 1985; Castillo y cols., 1987, 1990, 1991; Rowley y cols., 1988; Ellis, 1989; Ellis y cols., 1989; Zapata y Cooper, 1990). En la mayoría de los teleósteos el timo se localiza superficialmente, justo debajo del epitelio faríngeo en estrecha asociación y continuidad con él (Friedman, 1962; Engen, 1968; Rizkalla, 1969; Mulcahy, 1970; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; Zapata, 1981; Groman, 1982; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985; Cooper y cols., 1983; Gorgollón, 1983; Fänge, 1984; Bly, 1985; Castillo y cols., 1987, 1990, 1991; Ellsaesser y cols., 1988; O'Neill, 1989a, b, c; Razquin y cols., 1990; Zapata y Cooper, 1990; Chantanachookhin y cols., 1991). Es de especial mención el caso de Syciases sanguineus que, generalmente, tiene un timo externo relacionado con el epitelio faríngeo; sin embargo, algunos ejemplares presentan, además de un timo externo pobremente desarrollado, un gran timo interno que aparece relacionado con el epitelio faríngeo únicamente por medio de delgados puentes de parénquima tímico, al igual que sucede en el holósteo Amia calva (Hill, 1935) (Gorgollón, 1983); también es destacable el caso de Lophius piscatorius (Burne, 1927; Fänge y Pulsford, 1985) y L. budegassa (Picchio, 1933; Fänge y Pulsford, 1985), especies en las que el timo se sitúa alejado de la cavidad branquial y sin contacto con el epitelio faríngeo.

En algunos teleósteos también se ha observado una acumulación

extratímica de tejido linfoide en las proximidades del timo. Estos acúmulos extratímicos no están relacionados con el timo y presenta una organización histológica distinta (Hammar, 1909; Salkind, 1915; Hafter, 1952; Sailendri, 1973; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Gorgollón, 1983; Bly, 1985). En Tilapia mossambica consisten en agregados linfoides con dos regiones diferenciables; una con linfocitos pequeños estrechamente empaquetados rodeando un acúmulo central de eritrocitos y la otra región presenta células linfoides grandes distribuidas homogéneamente (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b). Estas estructuras parecen ser semejantes en su contenido celular a las acumulaciones extratímicas descritas en anfibios (Cooper, 1967; Manning y Horton, 1969). Mientras que en Syciases sanguineus se caracterizan por presentar los mismos tipos celulares, linfocitos, macrófagos y células monocíticas y equivalentes a histiocitos, de los espacios perivasculares de las trabéculas pero más densamente organizados (Gorgollón, 1983).

### 3.2. HISTOLOGIA.

El timo es un órgano linfoide epitelio reticular (primario) limitado externamente por el epitelio faríngeo e internamente por una cápsula de tejido

conectivo, similar a la de vertebrados superiores (Oláh y cols., 1975), que le separa de los estratos musculares de la cavidad branquial (Hafter, 1952; Friedman, 1962; Engen, 1968; Rizkalla, 1969; Mulcahy, 1970; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; Zapata, 1981; Groman, 1982; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985; Cooper y cols., 1983; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Castillo y cols., 1987, 1990; 1991; O'Neill, 1989a, b, c; Razquin y cols., 1990; Zapata y Cooper, 1990; Chantanachookhin y cols., 1991). La cápsula conectiva limita y envuelve completamente los timos de Lophius piscatorius (Burne, 1927; Fänge, 1982; Fänge y Pulsford, 1985) y L. budegassa (Picchio, 1933; Fänge y Pulsford, 1985) separándolos y aislándolos del epitelio de la cavidad branquial.

La cápsula de tejido conectivo emite trabéculas, de grosor y profundidad variables (Zapata, 1981; Groman, 1982; Castillo y cols., 1987, 1990, 1991; O'Neill, 1989a, b, c; Zapata y Cooper, 1990), hacia el interior del parénquima tímico, pudiendo en algunas especies llegar a dar un aspecto lobulado al timo (Burne, 1927; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Tamura y Honma, 1977; Botham y Manning, 1981; Chilmonczyk, 1983; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c; Zapata y Cooper, 1990; Chantanachookhin y cols., 1991).

El estroma de soporte está constituido por una trama de células epitelio reticulares (CER) y sus prolongaciones, que se relacionan entre sí

mediante estructuras de unión, formando un citoretículo. Según Castillo y cols. (1987, 1990) y Razquin y cols. (1990), usando técnicas histoenzimáticas, y Castillo y cols. (1991), mediante el estudio ultraestructural, la heterogeneidad de la población de CER del timo de teleósteos parece ser mayor que la observada por otros autores (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985) y similar a la observada entre las CER del timo de vertebrados superiores (van de Wijngaert y cols., 1984). La estructura histológica del timo de teleósteos es similar en la mayoría de ellos, presentando zonas adyacentes análogas a la corteza y médula tímicas de vertebrados superiores, pero sin una clara delimitación entre ellas (Tamura y Honma, 1970; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Grizzley y Rogers, 1976; Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Manning, 1981; Zapata, 1981; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983; Cooper y cols., 1983; Ellsaesser y cols., 1988; Zapata y Cooper, 1990), a diferencia de lo observado en vertebrados superiores y elasmobranquios (Good y Papermaster, 1964; Zapata, 1980; Zapata y Cooper, 1990).

La organización y distribución de las zonas tímicas del parénquima varia en las diferentes especies de teleósteos estudiadas e incluso dentro de una misma especie a lo largo de la histogénesis del órgano (Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; O'Neill, 1989a, b, c). Así, encontramos especies como Leucopsarion petersi (Tamura y Honma, 1974), Salmo salar (Ellis, 1977), Cynolebius adloffii, Nothobranchius guentheri (Cooper y cols., 1983), Lophius

piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) y Trematomus newnesi (O'Neill, 1989c) en las que no se diferencian zonas dentro de su parénquima tímico en ningún estadio de desarrollo, ni en estado adulto; pero en Lophius piscatorius aparecen densos acúmulos de linfocitos, similares a corteza alternando con áreas similares a médula (Fänge y Pulsford, 1985). Aunque, en otros teleósteos, existe una clara zonación, como ha sido observada en el timo de Ictalurus punctatus (Grizzle y Rogers, 1976; Ellsaesser y cols., 1988), Rutilus rutilus (Zapata, 1981), Morone saxatilis (Groman, 1982), en el timo interno de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), Zoarces viviparus (Bly, 1985), Sebastiscus marmoratus (Nakanishi, 1986), Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1987), Harpagifer antarcticus (O'Neill, 1989a, c), Dicentrarchus labrax, Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b, c), Notothenia neglecta, Nototheniops larseni, Merlangius merlangus (O'Neill, 1989c), Pagrus major, Paralichthys olivaceus y Seriola quiqueradiata (Chantanachookhin y cols., 1991) especies en las que se han descrito dos zonas equivalentes a la corteza y médula tímicas de vertebrados superiores, pero sin una clara delimitación entre ellas. Otros autores consideran la existencia de tres zonas diferenciables en el timo de las distintas especies, Salmo fario (Deansley, 1927), Anguilla vulgaris (von Hagen, 1936), Astyanax mexicanus (Hafter, 1952), Clarias lazera (Rizkalla, 1969), Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b), Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983; 1985; Castillo y cols., 1990, 1991), timo externo de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983),



estudiadas por ellos; aunque recientemente Zapata y Cooper (1990) han reconsiderado la existencia, previamente descrita por Zapata (1981), de dos zonas en el timo de Rutilus rutilus indicando la existencia de tres zonas equivalentes a las descritas por Gorgollón (1983) en el timo externo de Syciases sanguineus. En otros estudios se observan hasta cuatro zonas diferenciables, Esox lucius (Mulcahy, 1970) y Salmo gairdneri en donde Castillo y cols. (1990, 1991) consideran el epitelio faríngeo como otra zona. Zapata (1981) sugiere que la existencia de varias zonas en el timo de teleósteos estaría relacionada con el tamaño del órgano; sin embargo, Castillo y cols. (1990) consideran que estas diferencias pueden ser atribuidas a adaptaciones específicas de especie, variaciones estacionales y/o relacionadas con la edad, estrés, nutrición, etc., que afectan profundamente a la morfología del timo de teleósteos (Tamura y cols., 1981; Nakanishi, 1986) y de otros vertebrados poiquilotermos (Zapata y Cooper, 1990) como está aceptado actualmente.

Finalmente, hemos de indicar que en la terminología empleada para denominar las diferentes zonas que constituyen el timo existe una gran confusión, debido a la diversidad interespecífica de la organización del timo y al uso de diversos términos para denominar zonas análogas en especies diferentes.

Aunque, generalmente, sí se indica la analogía de las zonas descritas con la corteza o la médula del timo de vertebrados superiores,

---

raramente se usan esos términos para denominar las diferentes zonas del timo; sin embargo, existe una clara tendencia a usar términos que hacen referencia a su localización con respecto a la cavidad branquial.

Por tanto, para facilitar el estudio y evitar confusiones, en la **tabla V** hemos agrupado y ordenado los diferentes términos usados en cápsula epitelial, zona externa, zona interna y cápsula conectiva; que se corresponden con las denominaciones más extendidas en los estudios sobre el timo de peces teleósteos y que nosotros seguiremos a lo largo de este estudio.

Tabla V. Nomenclatura de las diferentes zonas tímicas descritas en el timo de peces teleósteos.

ESPECIE	AUTOR/ES	CAPSULA EPITELIAL	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA	CAPSULA CONECTIVA	
<u>Astyanax mexicanus</u>	Haftor (1952)	Externa	Media	Interna	Cápsula conectiva	
<u>Tilapia mossambica</u>	Sailendri y Muthukkaruppan (1975b)	Externa	Media	Interna	Cápsula conectiva	
<u>Cyprinus carpio</u>	Botham y Manning (1981)		Cortical	Medular	Cápsula conectiva	
<u>Rutilus rutilus</u>	Zapata (1981)		Corteza	Médula	Cápsula conectiva	
<u>Morone saxatilis</u>	Groman (1982)		Corteza	Médula	Cápsula conectiva	
<u>Salmo gairdneri</u>	Tatner y Manning (1982)	Membrana externa			Membrana interna	
	Chilmonczyk (1983, 1985)	Cápsula epitelial	Externa	Interna	Capa conectiva	
	Castillo y cols. (1987)		Externa	Interna	Cápsula conectiva	
	Castillo y cols. (1990, 1991)	Zona externa	Zona interna	Subcapsular	Cápsula conectiva	
	Razquin y cols. (1990)		Externa	Interna	Cápsula conectiva	
<u>Syciases sanguineus</u>	Gorgollón (1983)	Timo externo	Corteza externa	Corteza profunda	Basal o medular	Cápsula conectiva
		Timo interno	-	Central o interna	Subcapsular (1)	Cápsula conectiva
<u>Zoarces viviparus</u>	Bly (1985)		Lateral	Media	Cápsula conectiva	
<u>Lophius piscatorius</u>	Fänge y Pulsford (1985)	-	-	-	Cápsula conectiva	
<u>Oryzias latipes</u>	Ghoneum y cols. (1986)		Densa	Menos densa		
<u>Sebastiscus marmoratus</u>	Nakanishi (1986)		Corteza	Médula		
<u>Ictalurus punctatus</u>	Ellsaesser y cols. (1988)		Corteza	Médula		
<u>Harpagifer antarcticus</u>	O'Neill (1989a, c)		Externa	Interna	SECT	
<u>Dicentrarchus labrax</u>	O'Neill (1989b, c)		Externa	Interna	SECT	
<u>Pleuragramma antarcticum</u>			Externa	Interna	SECT	
<u>Merlangius merlangus</u>	O'Neill (1989c)		Externa	Interna	SECT	
<u>Notothenia neglecta</u>			Externa	Interna	SECT	
<u>Nototheniops larseni</u>			Externa	Interna	SECT	
<u>Trematomus newnesi</u>			-	-	SECT	
<u>Paralichthys olivaceus</u>	Chantanachookhin y cols. (1991)		Externa	Interna		
<u>Pragus major</u>			Externa	Interna		
<u>Seriola quiqueradiata</u>			Externa	Interna		

- ( ): No se hace referencia a esa zona. (-): Ausencia de esa zona.
- (1) También denominada zona periférica.
- SECT: Tejido subepitelial conectivo.

### 3.2.1. CAPSULA EPITELIAL.

En todos los vertebrados, el timo se forma a partir de una o varias bolsas faríngeas del endoblasto. Los esbozos o primordios tímicos se originan por proliferación del epitelio endodérmico faríngeo, entran en contacto con el epitelio ectodérmico de la hendidura faríngea y seguidamente se separan de él, emigrando y adentrándose en el tejido subyacente, tendiendo a fusionarse para formar un órgano único, aislado del epitelio (Le Douarin y Jotereau, 1981; Manning, 1981; Le Douarin y cols., 1984; Ellis, 1989; Ellis y cols., 1989; Zapata y Cooper, 1990; Kendall, 1991). En peces teleósteos la segunda, tercera y cuarta bolsas faríngeas contribuyen a formar el primordio tímico (Sailendri, 1973), que permanece asociado al epitelio faríngeo durante el estadio definitivo del órgano. Estos primordios tímicos se fusionan en un único órgano en peces teleósteos (Friedman, 1962; Rizkalla, 1969; Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; Manning, 1981; Zapata, 1981; Fänge, 1982, 1984; McCumber y cols., 1982; Tatner y Manning, 1982; Cooper y cols., 1983; Bly, 1985; Chilmonczyk, 1985; Rowley y cols., 1988; O'Neill, 1989a, b, c; Castillo y cols., 1991; Chantanachookhin y cols., 1991). En teleósteos, el timo queda limitado externamente por una capa de células del epitelio faríngeo, con células

caliciformes mucosecretoras similares a las descritas en epitelios de vertebrados (Engen, 1968; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Grace y Manning, 1980; Zapata, 1981; Tatner y Manning, 1982; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Castillo y cols., 1990; Razquin y cols., 1990). El estroma tímico se origina por proliferación de las células epiteliales que se adentran para formar los primordios, tras la invasión del epitelio por células linfoides, que estimulan la diferenciación de estas células en CER (Manning, 1981; Tatner y Manning, 1982; Chilmoczyk, 1983, 1985); sin embargo, en Salmo gairdneri, Castillo y cols. (1990, 1991) indican que las CER de la cápsula epitelial, aunque son de naturaleza epitelial, no tienen la misma procedencia.

Son muy escasos los trabajos que prestan atención a esta zona del timo de teleósteos. En Salmo gairdneri se describe un epitelio simple de células aplanadas similares a las de la cavidad branquial, con proyecciones digitiformes en su borde apical, abundantes mitocondrias y espacios intercelulares entre las células en su zona basal (Tatner y Manning, 1982). Sin embargo, en ejemplares jóvenes de Salmo gairdneri (Chilmoczyk, 1983, 1985) se describe la existencia de una cápsula epitelial o zona tímica superficial formada por una capa de células epiteliales aplanadas intercaladas con células mucosas de gran volumen que inciden en el parénquima tímico marcando un espacio subepitelial densamente poblado de linfocitos. Por tanto, las células linfoides quedan separadas del medio externo sólo por el escaso citoplasma de las células

epiteliales (Manning, 1981; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985).

En Syciases sanguineus la cápsula epitelial del timo está más diferenciada del epitelio branquial que en otros peces (Gorgollón, 1983), al igual que sucede en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990). En Syciases sanguineus las células epiteliales son principalmente cúbicas, como en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990), con microvellosidades cortas regulares en el borde apical, relacionándose lateralmente entre sí mediante uniones estrechas en la región supranuclear e interdigitaciones en la región latero-basal; el citoplasma se caracteriza por poseer numerosas cisternas de RER, pequeñas mitocondrias redondeadas, aparato de Golgi y abundantes microvesículas. Las CER de esta región son similares a las células epiteliales, pero de aspecto estrellado y con numerosos haces de tonofilamentos y entre ellas aparecen como elementos característicos células quísticas esféricas, como en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990), y corpúsculos de Hassall, además de células libres como linfocitos, células blasto, algunos granulocitos y grandes macrófagos que también se observan en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990). También aparecen células mucosas, al igual que en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990), y células de cloruro, tanto maduras como estadios transicionales, similares a las descritas en el epitelio de la cavidad branquial y de las branquias (Gorgollón, 1983).

Generalmente, se ha aceptado que el timo en teleósteos está protegido por la capa epitelial contra la estimulación antigénica; sin embargo,

la estructura de la cápsula o zona epitelial con una delgada capa de células epiteliales, que dejan entre ellas pequeños espacios intercelulares o poros superficiales (Salmo gairdneri, Chilmonczyk, 1985; Harpagifer antarcticus, O'Neill, 1989a) o la presencia de proyecciones citoplasmáticas de macrófagos entre las células epiteliales (Salmo gairdneri, Castillo y cols., 1990), no aísla totalmente a las células linfoides del parénquima tímico de la estimulación antigénica. Cuestionando por tanto la capacidad del órgano para distinguir entre lo propio y lo extraño, característica inherente al timo de vertebrados superiores. La posibilidad de un fácil acceso de patógenos y moléculas antigénicas al timo de teleósteos sugiere la existencia de procesos inmunológicos antígeno dependientes (Yoffey, 1981; Tatner y Manning, 1982; Rowley y cols., 1988; O'Neill, 1989c).

Esta idea ya fue indicada por Beard (1894) y Emmrich y cols. (1975) quienes atribuyeron al timo de teleósteos mecanismos de defensa activa contra infecciones orales y de la región faríngea, considerando que persisten las funciones de un órgano linfoide secundario, existentes en grupos filogenéticamente inferiores.

### 3.2.2. ZONA EXTERNA.

### 3.2.2.1. Localización.

La zona externa del timo de peces teleósteos, con técnicas convencionales para microscopía óptica, aparece intensamente teñida, en contraste con la menor tinción de la zona interna (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985) y puede ser considerada estructuralmente análoga a la corteza tímica de vertebrados superiores (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; O'Neill, 1989a, b, c; Zapata y Cooper, 1990; Chantanachookhin y cols., 1991). Esta está dispuesta a modo de banda o casquete entre el epitelio faríngeo o la cápsula epitelial (cuando esta zona existe) y la zona interna, sin llegar a envolverle completamente (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b). No existe ninguna estructura de separación entre esta zona y las adyacentes, cápsula epitelial y zona interna (Chilmonczyk, 1983, 1985; Castillo y cols., 1990, 1991).

### 3.2.2.2. Células epitelio reticulares.

La zona externa se caracteriza por un escaso desarrollo del citoretículo formado por las CER (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985).

Los estudios convencionales con microscopía óptica y electrónica



(Chilmonczyk, 1983, 1985) describen en Salmo gairdneri un único tipo de CER que se relacionan entre sí y con las células epiteliales faríngeas mediante desmosomas. Estas células son fusiformes con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas, núcleo ovoide eucromatínico y abundantes haces de tonofilamentos. Por otro lado Gorgollón (1983), describe un solo tipo de CER de acuerdo con Zapata (1981) no obstante, indica que las CER de la zona externa de Syciases sanguineus son similares a sus homólogas de la cápsula epitelial, pero con variaciones morfológicas y siempre relacionadas entre sí por desmosomas. Así, algunas de ellas son de gran tamaño, baja electronodensidad y con largas prolongaciones citoplasmáticas, núcleo eucromatínico con nucléolo evidente, un aparato de Golgi bien desarrollado, cisternas de RER y REL, polirribosomas, vacuolas, pequeños gránulos delimitados por membrana, cuerpos multivesiculares y tonofilamentos perinucleares; mientras que otras CER poseen citoplasma muy electronodenso, con haces compactos de tonofilamentos, algunas vesículas y pueden presentar cisternas de RE dilatadas. También describe formas transicionales entre estos dos tipos.

Recientemente, usando técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, se han descrito en la zona externa de Salmo gairdneri varios tipos de CER comparables a las descritas en vertebrados superiores (Kendall, 1980, 1981b; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; van de Wijngaert y cols., 1984). Estos estudios han sido realizados por Castillo y cols. (1990, 1991), y de

acuerdo con su localización, estructura, ultraestructura y reacción histoquímica describen los siguientes tipos: CER limitantes, CER estrelladas pequeñas u oscuras y CER grandes ovoides o claras.

Las CER limitantes, de localización similar a las descritas en otras especies de teleósteos (Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985), estarían relacionadas con la formación de la membrana basal (Castillo y cols., 1991) de forma similar a las CER tipo-1 o limitantes del timo humano (van de Wijngaert y cols., 1984).

Según Castillo y cols. (1991), las CER estrelladas pequeñas u oscuras son semejantes a las CER electronodensas descritas en el urodelo Pleurodeles waltlii (Henry y Charlemagne, 1981), a las CER oscuras de rata (Duijvestijn y Hoefsmit, 1981) y a las CER tipo-3 o intermedias y -4 u oscuras del timo humano (van de Wijngaert y cols., 1984). Este tipo celular parece estar relacionado con la secreción de factores tímicos y también establece estrechas interacciones con los timocitos.

Las CER grandes ovoides o claras son similares a las CER hipertrofiadas descritas en Lophius piscatorius por Fänge y Pulsford (1985). Castillo y cols. (1991) indican que estas células se parecen morfológicamente a las CER positivas a timulina o factor tímico sérico (FTS) descritas en el timo de Dicentrarchus labrax, y que también aparecen en Cyprinus carpio aunque con morfología diferente, (Frohely y Deschaux, 1986) y a las CER claras de roedores

(Kendall, 1981b; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981) sintetizadoras de factor tímico. Sin embargo, aunque en el timo de teleósteos no han sido descritas células secretoras, en Rutilus rutilus (Zapata, 1981) y Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) se ha indicado la existencia de células granulares, con RER y aparato de Golgi bien desarrollados y numerosas vesículas, similares a las células secretoras asociadas con la secreción hormonal en el timo de mamíferos (Clark, 1966; Schmitt y cols., 1980).

### 3.2.2.3. Células linfoides.

La zona externa se caracteriza por un predominio de las células linfoides (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; O'Neill, 1989a, b, c; Chantanachookhin y cols., 1991), principalmente linfocitos pequeños que dan las características tintoriales propias de esta zona (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985). Aparecen estrechamente empaquetados en los intersticios de las CER (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Gorgollón, 1983; O'Neill, 1989a, b, c; Chantanachookhin y cols., 1991).

Son escasas las figuras mitóticas (Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983). En Sycias sanguineus se han descrito, además, linfocitos con distinta morfología, unos muestran un citoplasma claro y escasas organelas, otros

presentan un núcleo esférico con cromatina de distribución radial (pudiendo aparecer formas transicionales entre éstos) y, finalmente, linfocitos de tamaño medio o relativamente grande, frecuentes en la unión córtico-medular con núcleo de forma variable, nucléolo bien desarrollado y abundantes polirribosomas en su citoplasma (Gorgollón, 1983). También en Salmo gairdneri se observa una densa población de linfocitos pequeños y medianos (Castillo y cols., 1990).

En Morone saxatilis (Groman, 1982) destaca la presencia de una mayor densidad de linfoblastos en esta región que en la zona interna.

#### 3.2.2.4. Macrófagos.

En la zona externa de la mayoría de las especies de teleósteos estudiadas, los macrófagos típicos o ligeramente pigmentados son escasos y de morfología similar a los descritos en otras zonas (Gorgollón, 1983; O'Neill, 1989b, c; Castillo y cols., 1990; Razquin y cols., 1990); no obstante, en algunas especies como Morone saxatilis (Groman, 1982) y Seriola quinqueradiata (Chantanachookhin y cols., 1991) son numerosos y en Salmo gairdneri contienen en su citoplasma, frecuentemente, cuerpos densos y además aparecen melanomacrófagos aislados (Castillo y cols., 1990).

### 3.2.2.5. Otros tipos y productos celulares.

Se ha descrito la presencia de células mucosas de origen epitelial en algunas especies (O'Neill, 1989b, c; Castillo y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991). También, en la zona externa del timo de Salmo gairdneri, Chilmonczyk (1983, 1985) indica la presencia de cavidades que contienen material amorfo PAS positivo que es excretado por células mucosas directamente dentro del lumen; mientras que otros autores señalan la existencia de CER quísticas (Castillo y cols., 1990; Razquin y cols., 1990).

Finalmente, aunque los granulocitos suelen aparecer dispersos por todo el parénquima, es de destacar la presencia de numerosos granulocitos eosinófilos en esta zona del timo de Morone saxatilis (Groman, 1982).

### 3.2.3. ZONA INTERNA.

#### 3.2.3.1. Localización.

La zona interna del timo de teleósteos, con técnicas convencionales para microscopía óptica, aparece menos teñida que la zona

externa (Chilmonczyk, 1983; Bly, 1985) y puede ser considerada estructuralmente análoga a la médula tímica de vertebrados superiores (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Gorgollón, 1983). Está rodeada por una banda o casquete de zona externa en la región superficial o lateral del órgano, mientras que en su parte profunda aparece delimitada por una capa de CER limitantes separadas del tejido conectivo subyacente por una membrana basal continua (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989a, b, c; Castillo y cols., 1990, 1991); a veces esta membrana basal está interrumpida permitiendo la comunicación directa entre el parénquima tímico y la cápsula conectiva, como ocurre en ejemplares adultos de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983).

### 3.2.3.2. Células epitelio reticulares.

La zona interna está caracterizada por la presencia de gran número de CER (Gorgollón, 1983; O'Neill, 1989a, b, c) las cuales, según O'Neill (1989a, b, c), proceden tanto del epitelio faríngeo como del tejido conectivo asociado al timo. Mientras que Chilmonczyk (1985) indica que, en Salmo gairdneri, las CER proliferan desde la capa germinal de CER que limitan internamente el órgano y migran a través del timo, a lo largo del desarrollo ontogenético del órgano, de acuerdo a una polaridad clásica, desde la base

(membrana basal) a la parte apical (epitelio faríngeo).

Los estudios convencionales con microscopía óptica y electrónica describen un sólo tipo de CER con variaciones morfológicas intraespecíficas (Gorgollón, 1983) e interespecíficas (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985). Estas variaciones las podemos resumir de la siguiente forma: en Rutilus rutilus se describe un único tipo de CER irregulares y de gran tamaño, con numerosos filamentos citoplasmáticos y prolongaciones que se unen entre sí por desmosomas (Zapata, 1981); al igual que en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) especies en las que también se describe un solo tipo de CER. No obstante, en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), se observan células sin límite definido, citoplasma claro, con pequeños gránulos o vacuolas y células oscuras que suelen encontrarse agrupados entre sí o con las células claras, e incluso con formas transicionales entre ellas, formando estructuras corpusculares. En Lophius piscatorius, además, se encuentran CER hipertróficas que pueden agruparse formando cavidades quísticas; estas células son de forma más redondeada y sin las típicas proyecciones de las CER, su núcleo se localiza excéntricamente y poseen vacuolas citoplasmáticas limitadas por microvellosidades, que contienen frecuentemente material homogéneo y/o un cilio (Fänge y Pulsford, 1985).

Aunque Chilmonczyk (1983) describe la presencia de dos tipos de CER, estrelladas y elongadas, en Salmo gairdneri; recientemente Castillo y cols.

(1990, 1991), usando técnicas microscópico ópticas histoquímicas e inmunohistoquímicas y electrónicas, describen un sólo tipo de CER, denominado CER subcapsulares. Estas células se localizan próximas a la cápsula conectiva, están estrechamente relacionadas con timocitos y linfoblastos, y muestran características secretoras semejantes a las descritas por van de Wijngaert y cols. (1984) para las CER tipo-2 o claras del timo humano (Castillo y cols., 1991). La aparición de este tipo celular durante la ontogenie del timo de Salmo gairdneri supone una reorganización del parénquima que da lugar a la aparición de la zona interna o subcapsular; el desarrollo de cordones de CER subcapsulares contribuyen a aislar esta región de la zona externa (Castillo y cols., 1990, 1991).

En algunas especies (Syciases sanguineus, Gorgollón, 1983; Lophius piscatorius, Fänge y Pulsford, 1985) las CER limitantes que se localizan en posición periférica toman formas cuboidales, columnares o aplanadas recibiendo el nombre de CER limitantes. Ultraestructuralmente estas células se caracterizan por tener un citoplasma denso con numerosos tonofilamentos. Entre las CER limitantes de Syciases sanguineus se observan, ocasionalmente, mitosis (Gorgollón, 1983).

Por otra parte Sailendri y Muthukkaruppan (1975b) en Tilapia mossambica indican la presencia de distintos tipos de CER que denominan CER, endoteliales y CER asociadas a los corpúsculos de Hassall.



### 3.2.3.3. Células linfoides.

Las células linfoides predominantes en la zona interna son los linfoblastos o timoblastos (Chilmonczyk, 1983; Castillo y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991) Además se describe la presencia de linfocitos grandes (Chilmonczyk, 1983; Castillo y cols., 1990), contribuyendo así a la menor intensidad tintorial de esta zona con microscopía óptica. En Syciases sanguineus, esta zona presenta como principal componente linfoide linfocitos de tamaño pequeño y mediano. Aunque en algunas áreas de la zona interna del timo, particularmente en la periferia de los lóbulos de los timos bien desarrollados, hay normalmente una capa más o menos extensa de linfocitos de tamaño mediano y/o células blasto; en estas áreas las células del citorretículo y otros tipos celulares son escasos, recordando más a la región subcapsular del timo de mamíferos que a una verdadera médula (Gorgollón, 1983), al igual que sucede en Salmo gairdneri en donde se describe la presencia mayoritaria de linfoblastos y linfocitos medianos dispersos por todo el parénquima de esta zona (Castillo y cols., 1990, 1991).

En Rutilus rutilus los linfoblastos aparecen homogéneamente distribuidos por todo el parénquima (Zapata, 1981); al igual que en ejemplares jóvenes de Cyprinus carpio (Schneider, 1983).

En otros teleósteos, como Morone saxatilis, hay una menor

densidad de linfoblastos y células libres (macrófagos y granulocitos eosinófilos) en la zona interna que en la externa (Groman, 1982).

#### 3.2.3.4. Células mucosas.

En el parénquima de la zona interna del timo de varias especies de teleósteos, Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), Harpagifer antarcticus (O'Neill, 1989a, c), Dicentrarchus labrax, Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b, c), Trematomus newnesi, Notothenia neglecta, Nototheniops larseni, Merlangius merlangus (O'Neill, 1989c), Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990) y en el parénquima del timo interno (no relacionado con el epitelio faríngeo) de Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), se describen células mucosas caliciformes conteniendo vacuolas acidófilas idénticas a las células del mismo tipo que forman parte de la zona epitelial tímica, que son similares a las descritas en algunos epitelios de vertebrados, como indica Gorgollón (1983), y a las células mucosas que aparecen aisladas y/o asociadas a cavidades quísticas en el parénquima de la médula de vertebrados superiores (Kendall y Frazier, 1979; Khosla y Ovalle, 1986; Raviola, 1987; Weiss, 1988; Zapata y Cooper, 1990).

Ultraestructuralmente las células presentan un citoplasma central con abundantes vacuolas de electronodensidad variable y limitadas por membrana, situándose en la región marginal el núcleo y el resto de organelas

citoplasmáticas (Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; Zapata y Cooper, 1990).

Según O'Neill (1989a, b, c), las células mucosas se originan a partir del epitelio tímico, infiltrándose hacia el interior del parénquima tímico. Este proceso aumenta con la edad del individuo, según describen Fänge y Pulsford (1985) en Lophius piscatorius. Estas observaciones están de acuerdo con las descripciones de O'Neill (1989c) quien además señala la influencia de la temperatura ambiental, siendo mayor la infiltración en ejemplares adultos de especies de aguas templadas (Costas Británicas) (Dicentrarchus labrax y Merlangius merlangus) y menor en estadios postlarvales de especies estenotermas estrictas de aguas frías (Océano Antártico) (Pleuragramma antarcticum y Trematomus newnesi).

Después de la infiltración, las células mucosas se hipertrofian y forman en asociación con las CER varios tipos de estructuras de naturaleza quística (O'Neill, 1989c). El tipo más sencillo de estas estructuras resulta de la hipertrofia de células aisladas según se ha observado en Dicentrarchus labrax, Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b, c) y Trematomus newnesi (O'Neill, 1989c). En otros casos, como Merlangius merlangus, se forman quistes por degeneración de células mucosas que quedan delimitadas por CER (O'Neill, 1989c) e incluso cavidades, que contienen restos de distinta naturaleza, limitadas por células mucosas descritas tanto en especies dulceacuícolas (Hafter, 1952;

Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Zapata, 1981) como marinas (Tamura y Honma, 1977; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989c). El aumento de la infiltración de células mucosas con la edad y la formación de estructuras quísticas es un indicativo de involución tímica (O'Neill 1989b, c), aunque también aparecen con frecuencia en timos hiperplásicos de Salmo gairdneri, que no presentan involución (MacArdle y Roberts, 1974).

### 3.2.3.5. Células epitelio reticulares quísticas.

En la zona interna o medular del timo de teleósteos aparecen CER quísticas, que pueden a veces formar estructuras quísticas multicelulares, al igual que en vertebrados superiores (Zapata y Cooper, 1990). Estas células y las estructuras derivadas de ellas han sido descritas en todas las clases de vertebrados, mamíferos (Mandel, 1968, 1970; Gorgollón y Ottone-Anaya, 1978; Oláh y cols., 1975), aves (Salkind, 1915; Raviola y Raviola, 1967; Kendall, 1980), reptiles (Salkind, 1915; Bockman y Winborn, 1967; Raviola y Raviola, 1967; Hussein y cols., 1978a, b), anfibios (James, 1939; Klug, 1967; Curtis y cols., 1972, 1979; Nagata, 1976) y peces (Hammar, 1909; Salkind, 1915; Hafter, 1952; Rizkalla, 1969; MacArdle y Roberts, 1974; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Tamura y Honma, 1977; Zapata, 1980, 1981; Groman, 1982; Savino y Santa-Rosa, 1982; Cooper y cols., 1983; Chilmonczyk, 1983; Gorgollon, 1983;

Chantanachookhin y cols., 1991) aunque en estos últimos son estructuras más raras (Manning, 1981).

Las CER quísticas presentan diferente morfología según las especies. En unos casos (Astianax mexicanus y Tilapia mossambica) se caracterizan por la presencia de numerosas vacuolas que ocupan la mayor parte del citoplasma y desplazan el núcleo a la periferia (Hafter, 1952; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b) y en otros (Salmo gairdneri) son similares a células fagocíticas, por presentar lisosomas primarios y secundarios (Chilmonczyk, 1983). A nivel intraespecífico también se observan diferencias morfológicas; así en Syciases sanguineus las CER quísticas de la zona interna, a diferencia de las presentes en la zona epitelial, son más grandes, carecen de microvellosidades luminare y algunas aparecen en estado degenerativo rodeadas por macrófagos, lo que sugiere que puedan estar sometidas a cambios cíclicos similares a los descritos para los corpúsculos de Hassall de mamíferos (Kotani y cols., 1981), aunque no se haya podido encontrar ninguna relación entre ellos (Gorgollón, 1983).

También se ha sugerido que estas CER quísticas puedan estar relacionadas con la formación de una hormona tímica, de acuerdo con las descripciones de Zapata (1981) en Rutilus rutilus y Fänge y Pulsford (1985) en Lophius piscatorius que describen células con una morfología similar a las células secretoras de hormonas tímicas en mamíferos (Clark, 1966; Schmitt y

cols., 1980), donde, mediante la incorporación de sustancias marcadas (<sup>35</sup>S-sulfato, <sup>14</sup>C-glucosamina y <sup>3</sup>H-fucosa) (Clark, 1966, 1968; Bennett, 1978) y la síntesis de material PAS positivo (Mandel, 1968, 1970), se ha demostrado que producen una hormona linfopoyética sulfatada o factor tímico (Trainin, 1974). Esta hipótesis estaría apoyada por las observaciones realizadas en ratones "nude", donde la deficiencia inmunológica coincide con la ausencia de CER quísticas en el timo (Cordier, 1974). En vertebrados superiores este tipo celular parecen proceder de las grandes CER claras que desarrollan vacuolas intracitoplasmáticas que presentan material mucoso y restos celulares (Zapata y Cooper, 1990).

#### **3.2.3.6. Corpúsculos tímicos.**

Los corpúsculos tímicos o de Hassall son estructuras típicas de la zona medular del timo de vertebrados superiores. Están formados por CER dispuestas de forma apretada y siguiendo un patrón concéntrico. Las células centrales tienden a hincharse, calcificarse y volverse necróticas, pudiendo sufrir lisis y llegar a formar una estructura quística, o pueden queratinizarse. Dentro de los corpúsculos de Hassall pueden haber linfocitos, granulocitos eosinófilos y macrófagos, usualmente en estado de degeneración, estando las CER periféricas del corpúsculo unidas al citoretículo de la médula (Weiss, 1988).

Estas estructuras se han encontrado en todas las clases de vertebrados, así se han descrito en mamíferos (Kendall, 1991), aves (Kendall, 1980) y reptiles (Zapata y Cooper, 1990), también están presentes en los tres ordenes de anfibios: apodos (Cooper, 1967), urodelos (Curtis y cols., 1979), excepto en Notophthalmus viridescens (Hightower y St. Pierre, 1971) y Ambystoma mexicanus (Klug, 1967), y en anuros (Manning, 1981; Bigaj y Plytycz, 1984). En peces la presencia de corpúsculos de Hassall es dependiente de la especie y aunque han sido descritos en varias especies muchos autores consideran que no existen, al igual que en el resto de vertebrados poiquiloterms (Zapata y Cooper, 1990). En elasmobranquios han sido descritos en varias especies (Beard, 1900; Good y Papermaster, 1964; Fänge y Sundell, 1969) pero están ausentes en el timo de Raja clavata y Torpedo marmorata (Zapata, 1980). En actinopterigios ha sido descrita su presencia en el condrósteo Polyodon spathula como un corpúsculo primitivo (Good y cols., 1966). También se ha señalado su ausencia en el timo del holósteo Amia calva (Hill, 1935) y en teleósteos la presencia de corpúsculos de Hassall es controvertida por hallarse sólo en determinadas especies y por la heterogeneidad estructural que presentan (Rowley y cols., 1988). En unas especies se describen como complejos celulares formados por aposición de dos o más CER medulares hipertróficas (Hammar, 1909; Hafter, 1952; Dulzetto, 1968). Otras veces, Salmo gairdneri (MacArdle y Roberts, 1974), Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b),

Chasmichthys gulosus, Acanthogobius flavimanus (Tamura y Honma, 1977), Morone saxatilis (Groman, 1982), Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) e Ictalurus punctatus (Elsaesser y cols., 1988) aparecen como grupos de CER que forman típicos corpúsculos de Hassall, presentes también en la zona epitelial de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983). Para Chilmonczyk (1985) no existen corpúsculos de Hassall sino que las secciones transversales de los septos conectivos pueden confundirse con los mismos; a este respecto Zapata y Cooper (1990) indican que los corpúsculos de Hassall exclusivamente aparecen en vertebrados homeotermos, y especialmente en mamíferos, y consideran que las referencias sobre su existencia en vertebrados poiquilotermos se corresponden a agrupamientos de CER medulares o quísticas más o menos modificadas. Mientras que la mayoría de los autores no han observado corpúsculos tímicos en las especies estudiadas por ellos (von Hagen, 1936; Hafter, 1952; Robertson y Wexler, 1960; Friedman, 1962; Smith y cols., 1967; Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983, 1985; O'Neill, 1989a, b, c).

Zapata (1981) describe en Rutilus rutilus sólo estructuras quísticas, mientras que Tamura y Honma (1977) en Chasmichthys gulosus y Acanthogobius flavimanus observan la presencia de formaciones quísticas, además de los corpúsculos de Hassall; así como un aumento de la red trabecular. El incremento de estas estructuras es indicativo de estados involutivos coincidiendo con lo descrito en Morone saxatilis (Groman, 1982).



En relación con el origen de los corpúsculos de Hassall la observación de estos en la zona epitelial cerca de la superficie descrita en Sycias sanguineus (Gorgollón, 1983) parece refutar la teoría de Kingsbury (1928) quien sugiere que son estructuras involutivas resultantes del crecimiento de las células epiteliales después de haber perdido su función de protección. Por otra parte el origen de los corpúsculos de Hassall pudiera ser el resultado de la obliteración de vasos sanguíneos, porque en algunos casos han sido observados dentro de la asociación de CER, según postularon Kostowiecki (1962) y Jaroslow (1967) en el timo de mamíferos.

La relación entre los complejos celulares, los corpúsculos de Hassall y las células quísticas, tanto en teleósteos como en mamíferos, permanece por elucidar. Posiblemente todas estas estructuras estén relacionadas y deban su apariencia variable a alguna función común, tal como la diferenciación de los linfocitos dentro del microambiente tímico para el reconocimiento autoantigénico; función en la que podrían participar también las células mioides (Gorgollón, 1983). Aunque la función de los corpúsculos de Hassall es desconocida, en algunos mamíferos aparentemente hay una correspondencia entre el comienzo de la competencia inmunológica humoral y la aparición de estas estructuras y el desarrollo de la autolerancia (Zapata y Cooper, 1990).

### 3.2.3.7. Células mioides.

Las células mioides son otro tipo celular posiblemente derivado del sistema epitelio reticular tímico (Rimmer, 1980). Estas células se reconocen por su gran tamaño y sus haces de miofibrillas estriadas orientadas concéntricamente alrededor del núcleo.

Desde las primeras descripciones (Mayer, 1888; Hammar, 1905), las células mioides han sido descritas en el timo de las diversas clases de vertebrados y parecen ser particularmente abundantes en algunos anfibios y reptiles (Manning, 1981). Las células mioides están presentes en el timo de peces teleósteos (Hammar, 1909; Salkind, 1915; Hafter, 1952; Rizkalla, 1969; Zapata, 1981; Cooper y cols., 1983; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c; Castillo y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991) con una morfología similar a las de otras clases de vertebrados (Salkind, 1915; Henry, 1966; Feltramp-Vroom, 1967; Raviola y Raviola, 1967; Canaday, 1968; Ito y cols., 1969; Curtis y cols., 1972; Frazier, 1973; Oláh y cols., 1975; Hanzlikova, 1979; Zapata, 1980), exceptuando Hyperprosopon argenteum (Engen, 1968), Zoarces viviparus (Bly, 1985), Harpagifer antarcticus (O'Neill, 1989a, c), Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b, c), Notothenia neglecta, Nototheniops larseni y Trematomus newnesi (O'Neill, 1989c).

Estas células aparecen en la zona interna o medular y cerca de la

unión córtico-medular de forma aislada en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983) o formando pequeños grupos como en Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) y en Paralichthys olivaceus (Chantanachookhin y cols., 1991).

En peces teleósteos, las células mioides aparecen distribuidas entre los timocitos y CER, siendo reconocibles con microscopía óptica por su gran tamaño, forma redondeada o poligonal, acidofilia y citoplasma claro. Ultraestructuralmente se caracterizan por presentar un núcleo eucromatínico y un citoplasma lleno de miofilamentos organizados en sarcómeros, retículo sarcoplasmático bien desarrollado que muestra túbulos T típicos, pequeñas mitocondrias, ribosomas libres y glucógeno (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983; Gorgollon, 1983; Fänge y Pulsford, 1985). Además, los sarcómeros aparecen definidos por típicas líneas Z tanto en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983) como en Lophius piscatorius en donde también se observan líneas M (Fänge y Pulsford, 1985). Ocasionalmente, en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y en Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), se observan células mioides que presentan miofilamentos dispuestos irregularmente. Mientras que en Lophius piscatorius también se observan células mioides jóvenes de núcleo excéntrico y citoplasma sin miofilamentos (Fänge y Pulsford, 1985).

En Lophius piscatorius las células mioides presentan grandes variaciones ultraestructurales por lo que parecen estar sometidas a un ciclo de formación, desarrollo y degeneración; observándose varias etapas de maduración

y células degeneradas fagocitadas por macrófagos (Fänge y Pulsford, 1985). Un ciclo similar ha sido descrito en la zona interna del timo de Paralichthys olivaceus (Chantanachookhin y cols., 1991) y en rata (Hanzlikova, 1979).

Según Fänge y Pulsford (1985), la riqueza de miofibrillas y mitocondrias en estas células de teleosteos indicaría una posible función mecánica; sin embargo, los grupos de células mioides no presentan ningún tipo de estructura de unión intercelular entre ellas o con otros tipos celulares tímicos y, además, no hay ninguna evidencia de inervación al igual que en el resto de vertebrados (Törö y cols., 1969; Gilmore y Bridges, 1974; Zapata y Cooper, 1990).

En Lophius piscatorius se observan algunas células mioides también en el tejido conectivo asociado al timo, por lo que parecen ser células móviles que migrarían a través del timo, lo que ha sugerido que posiblemente jueguen un papel en la liberación de los linfocitos del timo a la circulación (Fänge y Pulsford, 1985).

Por tanto, el origen y la función de estas células no han sido elucidadas y son actualmente materia de discusión; aunque, además de las posibles funciones indicadas, podrían estar relacionadas con la involución tímica (Chilmonczyk, 1985) y con la enfermedad autoinmune "miastenia gravis" según los estudios realizados en la especie humana (Rimmer, 1980; Cooper y Tochinai, 1982; Nakamura y Ayer-Le Lievre, 1986; Zapata y Cooper, 1990).

### 3.2.3.8. Macrófagos.

Los macrófagos se encuentran distribuidos homogéneamente por todo el parénquima tímico (Zapata, 1981; Chilmoczyk, 1983; Fänge y Pulsford, 1985) aunque en algunas especies, como Sycias sanguineus (Gorgollón, 1983), son más frecuentes en la zona interna que en la externa.

Estas células son de gran tamaño y citoplasma claro con cuerpos residuales y fagolisosomas (Rizkalla, 1969; Zapata, 1981; Chilmoczyk, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c) presentando, en general, una morfología similar a la observada en los macrófagos de otros vertebrados. En Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) contienen linfocitos o células mioides en proceso de degradación.

Los macrófagos tímicos presentan distintos aspectos morfológicos dependiendo de la relación con otros tipos celulares. En Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), en donde son numerosos, aparecen rodeados de linfocitos de forma similar a la descrita en mamíferos (Lipsky y Rosenthal, 1973) y elasmobranquios (Pulsford y cols, 1984). El grado de relación entre ambos tipos celulares varia desde la aposición de las membranas plasmáticas, a la completa fusión de las superficies de ambas células. Otros macrófagos contienen uno o dos linfocitos dentro de vacuolas citoplasmáticas sugiriendo, según Fänge y Pulsford (1985) y Ellis y cols. (1989), que podrían representar la posible

degradación de estos linfocitos o incluso la maduración de ellos a células T inmunocompetentes de forma similar a lo descrito para las células "nurse" en el timo de mamíferos (Wekerle y Ketelsen, 1980; van de Wijngaert y cols., 1983). En otras especies, Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), Dicentrarchus labrax, Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b, c) y Trematomus newnesi (O'Neill, 1989c), se describen grandes macrófagos que contienen eritrocitos y abundantes gránulos de lipofuscina. En este caso su aspecto de células fagocíticas activas no excluye la posible participación de estas células en el procesamiento y presentación de antígenos (O'Neill, 1989b, c).

Finalmente en el parénquima tímico de Dicentrarchus labrax (O'Neill, 1989b, c) y Merlangius merlangus (O'Neill, 1989c) se observan agregados melanomacrófagos y melanomacrófaos aislados en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990) que podrían estar relacionados con el procesamiento antigénico de forma similar a los centros melanomacrófagos presentes en el bazo y riñón cefálico de peces teleósteos (Agius, 1985; Agius y Couchman, 1986). En Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) los centros melanomacrófagos no aparecen en el parénquima tímico sino en el tejido conectivo peritímico donde es frecuente la infiltración linfomieloide.

### 3.2.3.9. Células plasmáticas.

Las células plasmáticas aparecen en el parénquima tímico de muchos vertebrados, pero principalmente en los espacios perivasculares de las trabéculas conectivas (Zapata y Cooper, 1990). La presencia de células plasmáticas y plasmablastos en el parénquima tímico de teleósteos ha sido demostrada con microscopía electrónica en Lutjanus griseus (Hulet, 1967), Rutilus rutilus (Zapata, 1981), Cyprinus carpio (Schneider, 1983) y Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985); sin embargo, en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) no ha sido demostrada su presencia.

Además, se ha observado la presencia de células formadoras de anticuerpo, mediante el método de células formadoras de placa hemolítica (PFC), en el timo de Lutjanus griseus, Mycteroperca bonaci (Ortiz-Muñiz y Sigel, 1971), Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975a) y Oncorhynchus kitsutch (Kaattari e Irwin, 1985).

Con técnicas inmunológicas, Warr y cols. (1977) usando la reacción hapteno-portador demostraron la presencia de células portador-reactivas (equivalentes a células T) y la carencia de células hapteno-reactivas (equivalentes a células B) en el timo de Carassius auratus.

Con técnicas inmunocitoquímicas se ha demostrado la presencia de inmunoglobulinas superficiales en linfocitos tímicos de algunas especies de

teleósteos (Ver apartado II.3.5.1).

A diferencia del timo de mamíferos, donde raramente hay formación de anticuerpos, en peces al igual que en aves, reptiles y anfibios, se observan frecuentemente células plasmáticas antes y después de la inmunización (Manning, 1981). Sin embargo, en mamíferos, la producción de anticuerpos sólo tiene lugar tras la inyección directa de antígenos en el propio timo o en individuos con enfermedades tímicas como la "miastenia gravis" (Marshall y White, 1961), proceso que es atribuido a la transgresión de la barrera hematotímica o a la existencia de heridas. Según lo anteriormente expuesto, Ortiz-Muñiz y Sigel (1971) y Sailendri y Muthukkaruppan (1975a) sugieren que la presencia de células plasmáticas en el timo de teleósteos es debida a una mayor permeabilidad de la barrera hematotímica.

Por otra parte O'Neill (1989b, c) sugiere que las células plasmáticas presentes en el timo serían células inmigrantes más que clones producidos por una activación "in situ".

La existencia de células plasmáticas y formadoras de anticuerpos en el timo de peces teleósteos le da un carácter de órgano linfoide secundario lo que se podría justificar por el escaso desarrollo de estos órganos en estos animales a diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde están bien desarrollados (Manning, 1981). La función de esta población intratímica de células formadoras de anticuerpos debe de ser importante a pesar de su baja



frecuencia de aparición en el timo de vertebrados (Zapata y Cooper, 1990).

### 3.2.3.10. Granulocitos y granulopoyesis.

Los granulocitos, aunque en bajo número, son generalmente frecuentes en el timo de vertebrados, especialmente en asociación con el tejido conectivo (Chilmonczyk, 1983; Zapata y Cooper, 1990). En el timo de teleósteos aparecen distribuidos por todo el parénquima y en el tejido conectivo peritímico.

En la zona interna profunda limitante con la membrana basal del timo de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) hay una activa granulopoyesis de granulocitos heterófilos, de modo semejante a lo descrito en la región subcapsular de la corteza del timo de mamíferos (Oláh y cols., 1975; Bourgeois y cols., 1981; Kendall, 1981b) y, además, también participa el tejido conectivo peritímico en la granulopoyesis, al igual que en vertebrados superiores (Kendall, 1981b).

En el holósteo Amia calva (Hill, 1935) y en algunas especies de teleósteos (Davina y cols., 1980; Chilmonczyk, 1983; Gorgollón, 1983) los granulocitos heterófilos maduros se encuentran distribuidos uniformemente por todo el parénquima tímico y son frecuentes también en el tejido conectivo peritímico. Sin embargo, en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983) sólo aparecen granulocitos heterófilos en la zona interna profunda.

### 3.2.3.11. Infiltración eritrocítica y eritropoyesis.

En el timo de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), Astyanax mexicanus (Hafter, 1952) y Notothenia neglecta (O'Neill, 1989c) se observan eritrocitos aislados entre las células que constituyen el parénquima tímico, al igual que en otros vertebrados (Zapata y Cooper, 1990), y en la acumulación linfoide extratímica de Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b) aparece un islote central de eritrocitos. En Syciases sanguineus, según Gorgollón (1983), no se reconocen las células blasto progenitoras de la serie eritropoyética, ni aparecen estadios transicionales entre éstas y los eritrocitos; lo que sugiere que no existe eritropoyesis en el timo de esta especie. Sin embargo, en el timo de algunos vertebrados superiores, incluidos mamíferos, se describe la presencia de islotes eritropoyéticos (Kendall y Singh, 1980; Bourgeois y cols., 1981; Kendall, 1981b; Fonfria y cols., 1983; Zapata y cols., 1990).

### 3.2.4. CAPSULA CONECTIVA.

El parénquima tímico está separado por una cápsula continua de tejido conectivo de la musculatura de la cabeza de los teleósteos, similar a la observada en vertebrados superiores (Oláh y cols., 1975; Zapata y Cooper, 1990).

Friedman, 1962; Rizkalla, 1969; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; Zapata, 1981; Groman, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989c, Castillo y cols., 1990, 1991; Razquin y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991); aunque, en Syciases sanguineus, esta capa presenta interrupciones por las que el parénquima tímico se comunica directamente con el tejido conectivo (Gorgollón, 1983). El grosor de la cápsula conectiva es variable entre las diferentes especies estudiadas; así en Morone saxatilis (Groman, 1982) y Zoarces viviparus (Bly, 1985) es delgada, mientras que en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983; Castillo y cols., 1990) es muy gruesa. Además, se ha descrito un incremento de su grosor y abundancia con la edad en varias de las especies estudiadas, Chasmichthys gulosus (Tamura y Honma, 1977), Salmo gairdneri (Grace y Manning, 1980; Tatner y Manning, 1983b; Chilmonczyk, 1985), Cyprinus carpio (Botham y Manning, 1981; Schneider, 1983), Cynolebias adloffii, Nothobranchius guentheri (Cooper y cols., 1983), Harpagifer antarcticus (O'Neill, 1989a), Dicentrarchus labrax y Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b).

Dependiendo de la especie estudiada, la cápsula conectiva presenta, además de los elementos propios, otros tipos celulares específicos del tejido conectivo, como melanóforos y guanóforos en Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), histiocitos y células infiltradas procedentes del parénquima tímico, como linfocitos, linfoblastos, macrófagos pequeños y monocitos, que se

y Pulsford, 1985), histiocitos y células infiltradas procedentes del parénquima tímico, como linfocitos, linfoblastos, macrófagos pequeños y monocitos, que se distribuyen de forma difusa y variable, y están representadas principalmente por linfocitos y, ocasionalmente, estructuras semejantes a centros melanomacrofágicos en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983). En Salmo gairdneri, sin embargo, sólo se ha descrito la presencia de linfocitos infiltrados (Chilmonczyk, 1983).

El tejido conectivo se adentra en el parénquima tímico formando las denominadas trabéculas (Tatner y Manning, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989a, b, c; Castillo y cols., 1991; Razquin y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991) o septos (Chilmonczyk, 1983, 1985; Castillo y cols., 1990) que dividen al órgano en lóbulos discretos o compartimientos. En Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990) las trabéculas se ramifican en el límite entre la cápsula epitelial y la zona externa discurriendo paralelas a la superficie del epitelio tímico y en el resto del parénquima lo hacen perpendicularmente a éste. Las trabéculas están presentes en el timo de todos los teleósteos estudiados. Estas estructuras también están limitadas por una capa de CER limitantes que descansan sobre una membrana basal y separa al tejido conectivo de los timocitos, al igual que ocurre en la cápsula conectiva.

En sección transversal su estructura tiene aspecto canalicular

porque por ellas discurren los vasos sanguíneos rodeados por fibroцитos, fibras colágenas y varios tipos celulares; entre los que, generalmente, aparecen linfocitos y células linfoides en mayor o menor número en las diferentes especies estudiadas (Tamura y Honma, 1974, 1975; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985). Además, en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), también aparecen pequeños macrófagos o células monocíticas y granulocitos y, en Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), se observan células mioides en tránsito dentro de las trabéculas.

Para Chilmonczyk (1983) las trabéculas (o septos) desempeñan un papel importante en la migración de los linfocitos, que son observados con frecuencia en la zona perivascular de los septos; no debiendo considerarse sólo como meros soportes de los vasos asociados a ellas.

O'Neill (1989c), estudiando la ontogenie del timo en varias especies, indica que el desarrollo de la cápsula conectiva y trabéculas es más temprano y mayor en las especies de aguas templadas, Dicentrarchus labrax y Merlangius merlangus, que en las de aguas frías, como los estenotermos antárticos Pleuragramma antarcticum y Harpagifer antarcticus, Notothenia neglecta y Trematomus newnesi. Además, observa que las trabéculas en diversas especies comienzan a penetrar en el timo, en su intersección con el epitelio faríngeo, para finalmente en ejemplares adultos de Dicentrarchus labrax penetrar por la zona basal y dividir el órgano formando lóbulos discretos. Sugiriendo que

este proceso sería, en la evolución filogenética, el comienzo de la separación del timo del epitelio branquial, llegando a su máximo estado de aislamiento en Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) y en vertebrados superiores.

### 3.3. VASCULARIZACION.

El sistema vascular del timo de peces teleósteos ha sido menos estudiado que otras estructuras tímicas y, salvo los estudios clásicos realizados en vertebrados superiores, no hay información disponible (Zapata y Cooper, 1990).

El timo se encuentra bien vascularizado desde los primeros estadios de desarrollo (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983; Schneider, 1983; Tatner y Manning, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c), por una extensa red vascular relacionada con el sistema vascular branquial (Salkind, 1915; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b).

La vascularización tímica se origina a partir de la cápsula conectiva y penetra en el timo a través de las trabéculas conectivas, que se ramifican al mismo tiempo que los vasos sanguíneos (Tamura y Honma, 1974, 1975, 1977; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983;

Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989a, b, c). En la mayoría de las especies los capilares que abandonan las trabéculas están revestidos por CER limitantes (Zapata, 1981; Fänge y Pulsford, 1985); por tanto, con una estructura similar a la descrita en mamíferos. No obstante, en algunas especies como Dicentrarchus labrax y Pleuragramma antarcticum, los capilares abandonan las trabéculas estando sólo limitados por sus propias células endoteliales (O'Neill, 1989b, c) y también se dan situaciones intermedias, como la descrita por Chilmonczyk (1983, 1985) en Salmo gairdneri, en donde los capilares presentan una capa discontinua de CER limitantes.

Los vasos sanguíneos intratrabeculares en el timo de peces teleósteos son homólogos a los descritos en vertebrados superiores (Weiss, 1963; Kameya y Watanabe, 1965; Kostowiecki, 1967; Raviola y Karnovsky, 1972; Abe e Ito, 1974; Bearman y cols., 1978) por presentar una barrera hematotímica similar. La barrera hematotímica en teleósteos consta de célula endotelial, membrana basal del vaso, espacio perivascular (o luz del septo), membrana basal de la CER limitante y citoplasma de la CER limitante (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c). Sin embargo en Salmo gairdneri, las células endoteliales son fenestradas, disminuyendo posiblemente la efectividad de la barrera hematotímica (Chilmonczyk, 1983).

A pesar de las indicaciones derivadas de experimentos de estimulación antigénica vía sangre y de circulación de linfocitos (Ellis y De

---

Sousa, 1974; Ellis y cols., 1976; Ellis, 1980), así como de la presencia de barrera hematotímica (Zapata, 1981, 1983; Tatner y Manning, 1982) existe una gran controversia, derivada de otros estudios morfológicos, sobre el aislamiento del timo y su capacidad para diferenciar entre lo propio y extraño (Ellis, 1982; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985; Fänge, 1984; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c).

### 3.4. INVOLUCION TIMICA.

La histología del timo sufre notables modificaciones relacionadas con la edad (Manning, 1981; Cooper y cols., 1983), el ciclo reproductor, los cambios estacionales (Manning, 1981; Tamura y cols., 1981; Honma y Tamura, 1984; Honma y cols., 1985; Nakanishi, 1986), los efectos hormonales y el estrés (Manning, 1981; Chilmonczyk, 1982; Ghoneum y cols., 1986). En las especies que sufren metamorfosis, como Paralichthys olivaceus (Chantanachookhin y cols., 1991), los cambios involutivos asociados con ella pueden ser significativos en relación con la aparición de nuevos autoantígenos en este crítico periodo (Du Pasquier, 1976).



### 3.4.1. INVOLUCION TIMICA RELACIONADA CON LA EDAD.

La involución del timo con la edad ocurre en la mayoría de los vertebrados. Esta involución supone una disminución de la neolinfogénesis en el órgano sin causar deficiencias inmunológicas; porque el animal ha adquirido, durante el periodo de actividad del timo, las células con memoria capaces de reconocer los antígenos comunes en su entorno ambiental y por tanto iniciar la consecuente respuesta inmunitaria (Manning, 1981).

Los teleósteos son el primer grupo de la escala filogenética en cuyo timo se encuentran síntomas evidentes de involución asociada al envejecimiento (Kendall, 1981a).

La mayoría de autores están de acuerdo en que este proceso se caracteriza, sobretodo, por la reducción del tamaño del órgano, la disminución del número de linfocitos en relación al peso del timo y/o del cuerpo y el aumento del tejido conectivo (Hafter, 1952; MacArdle y Roberts, 1974; Tamura y Honma, 1974; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Groman, 1982; Cooper y cols., 1983; Tatner y Manning, 1983b; Bly, 1985; Ellsaesser y cols., 1988; Ellis, 1989).

La pérdida de linfocitos se produce por su migración a los órganos linfoides periféricos, manteniendo así constante la proporción relativa de estos linfocitos en el sistema inmunitario (Tatner, 1985); no observándose evidencias

de muerte masiva de timocitos (Tatner y Manning, 1983b).

Otros indicadores de la involución tímica, son la infiltración de tejido adiposo (von Hagen, 1936; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b) y de células mucosas (O'Neill, 1989b, c), la aparición de células mioides (Hafter, 1952; Rizkalla, 1969; O'Neill 1989b, c), cavidades quísticas epiteliales (Hafter, 1952; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Tamura y Honma, 1977; Zapata, 1981; Groman, 1982; Cooper y cols., 1983; Tatner y Manning, 1983b; O'Neill, 1989b, c) y corpúsculos de Hassall (Groman, 1982).

La etapa en la que el timo involuciona varía considerablemente en teleósteos (Lele, 1933; Rizkalla, 1969; Tamura y Honma, 1974), debido a la variabilidad interespecífica (Tamura y Honma, 1977; Kendall, 1981a). En general, la involución está relacionada con la madurez sexual (Tatner y Manning, 1983b; Fänge, 1984), pudiendo ocurrir antes de su inicio en teleósteos inferiores (Salkind, 1915; Deansley, 1927; Lele, 1933; von Hagen, 1936; Rizkalla, 1969; Tatner y Manning, 1983b; Ellsaesser y cols., 1988), durante la madurez sexual o después de ésta en los teleósteos superiores (Hammar, 1909; Lele, 1933; Hafter, 1952; Robertson y Wexler, 1960; Tamura y Honma, 1970; Honma y Tamura, 1972; O'Neill, 1989b, c).

Además, según O'Neill (1989a, b, c), los peces teleósteos de aguas frías muestran una reducida involución tímica con la edad cuando se comparan con especies de aguas templadas.

En algunas especies de teleósteos la involución tímica no conlleva una completa desaparición del órgano; así por ejemplo, en Astyanax mexicanus (Hafter, 1952) hay una disminución del tamaño hasta hacer imposible su observación macroscópica y, sin embargo, se detecta a nivel microscópico. En Tilapia mossambica se ha descrito su presencia hasta en ejemplares de tres años de edad (Sailendri, 1973) e igualmente en Salmo gairdneri persiste, aunque modificado ligeramente, en ejemplares de cinco años de edad (Chilmonczyk, 1985), aunque Deansley (1927) describió la completa desaparición del timo en hembras de esta especie.

En otras especies, como Salvelinus sp. (Tamura y Honma, 1977), Syciases sanguineus (Lieber, 1958; Gorgollon, 1983), Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), Gasterosteus aculeatus (Bigaj y cols., 1987), Seriola quinqueradiata y Pagrus major (Chantanachookhin y cols., 1991), no se aprecian síntomas involutivos con la edad ni con la madurez sexual, observándose sólo una ligera reducción del tamaño del órgano. Estas observaciones coinciden con lo descrito en vertebrados superiores, en donde se acepta que el timo no desaparece completamente (Andrew, 1952).

En especies anuales como Plecoglossus sp., Leucopsarion sp. (Tamura y Honma, 1977) y Oncorhynchus sp. (Robertson y Wexler, 1960) después de la freza, el timo sufre una gran regresión hasta su desaparición y poco después mueren. Este hecho sugiere una posible relación entre la

involución tímica y la muerte después de la reproducción (Tamura y Honma, 1977; Kendall, 1981a). Pero Robertson y Wexler (1962) indujeron la involución del timo de Oncorhynchus sp. mediante la castración y observaron que no morían, a diferencia de los que sufrían el desove natural. Lo que indicaría que la muerte tras la puesta no se debe sólo a la involución tímica (Kendall, 1981a).

### 3.4.2. CAMBIOS CICLICOS TIMICOS.

En varias especies se describen variaciones tímicas relacionadas con el ciclo reproductor (Tamura y Honma, 1974, 1975, 1977; Tamura, 1978, Tamura y cols., 1981; Honma y cols., 1985; Nakanishi, 1986).

Así, en ejemplares de Luciogobius guttatus (Tamura y Honma, 1974) y Chaenogobius urotaenia (Tamura y Honma, 1975) de ambos sexos el timo muestra anualmente, desde junio a julio, un incremento de su tamaño tras la puesta anual en mayo, apareciendo como un órgano grande y desarrollado; aunque hay una reducción global del peso relativo del timo con la edad. Mientras que en Sebasticus marmoratus (Nakanishi, 1986), cuya freza tiene lugar en enero, el pico de crecimiento del timo lo alcanzan en febrero los machos y en abril las hembras, teniendo el timo en ambos sexos un mínimo en septiembre.

### 3.4.3. CAMBIOS ESTACIONALES TIMICOS.

Tamura y Honma (1977), estudiando el timo de Chasmischthys gulosus, C. dolichognathus, Acanthogobius flavimanus y A. lactipes, indican que la regresión tímica no coincide necesariamente con la época de reproducción y que, por tanto, las actividades tímicas pueden estar reguladas por otros factores, como la fluctuación anual del fotoperiodo. La relación entre actividad tímica y fotoperiodo ha sido estudiada en Plecoglossus sp. (Honma y Tamura, 1972) y Astyanax mexicanus (Rasquin y Rosenbloom, 1954); observándose que la exposición a fotoperiodo corto induce la involución del timo. Luego, según Tamura y Honma (1977), debe haber una correlación entre la actividad tímica y los órganos fotorreceptores (glándula pineal) de peces, al igual que se ha descrito en vertebrados superiores (Csaba y Barath, 1975); sin embargo, en Sebastiscus marmoratus el fotoperiodo no afecta a los cambios tímicos (Nakanishi, 1986).

También en Gasterosteus aculeatus (Bigaj y cols., 1987) se observan cambios estacionales en la población de linfocitos tímicos.

#### **3.4.4. EFECTOS HORMONALES.**

El timo es un órgano diana para factores endocrinos. En teleósteos la involución estructural del timo ha sido inducida mediante tratamientos con diferentes corticosteroides (Robertson y cols., 1963; McLeay, 1973; Sufi y cols., 1980; Chilmonczyk, 1982; Ghoneum y cols., 1986) y se ha demostrado que los cambios estacionales que aparecen en los tejidos linfomieloides y en la glándula interrenal son opuestos y bastante contrastados (Tamura y Honma, 1974, 1975, 1977). Esto coincide con la relación existente en vertebrados superiores entre los cambios estacionales del timo y las variaciones en los niveles de corticosteroides en suero (Saad y cols., 1984).

#### **3.5. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN TIMO DE TELEOSTEOS.**

Las investigaciones sobre la existencia o no de subpoblaciones de linfocitos en teleósteos se han centrado en determinar la presencia de marcadores de superficie y en demostrar la posible heterogeneidad funcional de estas células.

### 3.5.1. MARCADORES DE SUPERFICIE EN TIMOCITOS.

La presencia o ausencia de inmunoglobulinas de superficie (sIg) es usada para definir las células B y T en vertebrados superiores; la existencia de sIg es considerada característica de las células B de mamíferos (Raff, 1970).

Los primeros estudios para demostrar la localización de sIg en linfocitos de peces, usando anticuerpos policlonales frente a inmunoglobulina (Ig) sérica, produjeron resultados sorprendentes, al encontrarse en timo un porcentaje elevado de células marcadas, aunque menor que en riñón cefálico, bazo y sangre periférica en donde sí era de esperar (Emmrich y cols., 1975; Cuchens y cols., 1976; Etlinger y cols., 1976; Fiebig y Ambrosius, 1976; Fiebig y cols., 1977, 1980; Warr y cols., 1977, 1979; van Loon y cols., 1982); incluso en el timo de Lepomis macrochirus los porcentajes de células marcadas fueron similares a los de riñón cefálico y bazo (Clem y cols., 1977).

Estos resultados han dado lugar a conclusiones opuestas; así Rowley y cols. (1988) sugieren la existencia de una única población de linfocitos en peces teleósteos, mientras que McCumber y cols. (1982) indican que las diferencias cuantitativas entre células marcadas o no, en la mayoría de especies estudiadas, podrían reflejar la existencia de subpoblaciones de linfocitos. Este hecho puede ser explicado por la reacción cruzada de algunos anticuerpos policlonales con los restos de carbohidratos en las glicoproteínas superficiales de

timocitos y de células equivalentes a células B de peces (Yamaga y cols., 1978a, b; McCumber y cols., 1982; DeLuca y cols., 1983). Sin embargo, no todas las reacciones anti-Ig sérica pueden ser explicadas por reacción cruzada con los restos de hidratos de carbono; ya que usando antisueros policlonales frente a las cadenas ligeras (L) de Ig sérica, carentes de restos de carbohidratos, también se observa reacción cruzada con timocitos (Fiebig y Ambrosius, 1976; Clem y cols., 1977). El estudio de las diferentes propiedades fisicoquímicas y moleculares de las cadenas polipeptídicas de las sIg de linfocitos, también, indican la existencia de subpoblaciones de linfocitos similares a células B y T en Cyprinus carpio (Fiebig y Ambrosius, 1976; Fiebig y cols., 1977), Carasius auratus (Warr y cols., 1976, 1984; Ruben y cols., 1977) y Salmo gairdneri (Warr y Marchalonis, 1982).

Warr y cols. (1976) encontraron que las Ig asociadas a la membrana en timocitos de Carasius auratus presentan cadena pesada (H) y ligera (L). Sin embargo, en Cyprinus carpio se demostró que las sIg de los timocitos son dímeros de cadenas H y carecen de cadenas L y, además, estas cadenas H no tienen todos los determinantes antigénicos específicos para la cadena  $\mu$  de la Ig M sérica, ni de las sIg de los linfocitos de riñón cefálico (Fiebig y cols., 1980, 1983); por tanto se puede decir que en Cyprinus carpio la estructura de las sIg de los timocitos son diferentes a las existentes en células equivalentes a células B y hay reacción cruzada por la presencia de determinantes antigénicos semejantes, aunque localizados en diferentes zonas de



la región constante de la cadena  $\mu$  (Ambrosius y cols., 1982). Estos autores, también ponen en evidencia que los restos de carbohidratos no juegan ningún papel importante en la reactividad cruzada entre Ig M sérica y las sIg de timocitos en Cyprinus carpio (Ambrosius y cols., 1982).

Recientemente, se han realizado estudios para detectar sIg en linfocitos de peces, empleando anticuerpos monoclonales como prueba más específica para estas macromoléculas. Con este fin se han obtenido anticuerpos monoclonales frente a Ig M sérica de Ictalurus punctatus (Lobb y Clem, 1982; Ellsaesser y cols., 1988; Ainsworth y cols., 1990), Salmo gairdneri (DeLuca y cols., 1983) u Oncorhynchus mykiss (Thuvander y cols., 1990), Cyprinus carpio (Egberts y cols., 1983; Secombes y cols., 1983) y Sparus aurata (Navarro y cols., 1993), capaces de reaccionar específicamente con sIg de una determinada población de linfocitos; también es de destacar la presencia de reacción cruzada de anticuerpos monoclonales producidos contra Ig M sérica de Oncorhynchus mykiss con la Ig M de suero de Salmo salar y S. trutta (Thuvander y cols., 1990). De acuerdo con los estudios anteriores, Razquin y cols. (1990) afirman que estas células del timo de Salmo gairdneri son células similares a células B.

La presencia de células positivas frente a anticuerpos monoclonales anti-Ig de suero en el timo de vertebrados superiores es frecuente, aunque en un bajo porcentaje (aproximadamente un 1%) (Du Pasquier y Horton, 1982; Razquin y cols., 1990). En teleósteos las células positivas a Ig M representan

como máximo un 5% y generalmente, son menos de un 2% de los linfocitos tímicos (DeLuca y cols., 1983; Secombes y cols., 1983; Ellsaesser y cols., 1988; Thuvander y cols., 1990; Navarro y cols., 1993). Además Ellsaesser y cols. (1988) indican que la noción, basada en el uso de anticuerpos policlonales, de que la población de timocitos de peces contienen un número elevado de células equivalentes a células B es errónea, como se ha puesto de manifiesto con el uso de anticuerpos monoclonales.

También, en el timo de varias especies de teleósteos se ha observado la presencia de células plasmáticas mediante el método de células formadoras de placas hemolíticas (PFC) (Ortiz-Muñiz y Sigel, 1971; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975a; Kaattari e Irwin, 1985) y mediante estudios ultraestructurales (Hulet, 1967; Zapata, 1981; Schneider, 1983; Fänge y Pulsford, 1985).

Razquin y cols. (1990) indican que, durante el desarrollo ontogénico del timo de Salmo gairdneri, la aparición de células positivas a Ig M está relacionada con la infiltración y desarrollo de las trabéculas conectivas; localizándose en el límite entre la cápsula epitelial y la zona externa del timo, en donde las trabéculas se ramifican, de modo similar a lo descrito por Sainte-Marie y cols. (1986) para las células plasmáticas en el timo de rata a nivel corticomedular. Sin embargo, Castillo y cols. (1987) indican que las células positivas a Ig M aparecen con la diferenciación de determinadas CER.

Por otro lado, el supuesto de que los timocitos de teleósteos poseen como marcadores sIg parece estar respaldado por el hecho de que la mayoría de anticuerpos monoclonales contra timocitos de Cyprinus carpio reconocen Ig sérica, mientras que sólo un pequeño porcentaje de los anticuerpos monoclonales contra Ig sérica reaccionan con timocitos (Secombes y cols., 1983). Según Lamers (1985), una posible explicación de estos datos es la presencia solamente de una parte de los determinantes antigénicos de la Ig sérica en la superficie de los timocitos de teleósteos, de acuerdo con los estudios moleculares anteriormente citados (Fiebig y cols., 1980, 1983; Ambrosius y cols., 1982). Una explicación alternativa se basa en el hecho observado por Secombes y cols. (1983) de que algunos de los anticuerpos monoclonales anti-timocitos de Cyprinus carpio, que reconocen Ig sérica, también reaccionan con ciertas poblaciones celulares del cerebro; lo que sugiere la presencia de un marcador de superficie en timocitos de teleósteos, parcialmente homólogo a Ig sérica, con propiedades similares a las del marcador Thy-1 de mamíferos (Raff, 1970). Además, esta hipótesis está apoyada por la presencia de actividad citolítica de un antisuero contra células de cerebro de Lepomis macrochirus sobre linfocitos equivalentes a células T (Cuchens y Clem, 1977).

Finalmente, la obtención de anticuerpos monoclonales contra marcadores específicos de timocitos de peces es muy difícil y estos sólo han sido conseguidos recientemente en Ictalurus punctatus (Miller y cols., 1987; Ellsaesser

---

y cols., 1988; Ainsworth y cols., 1990), aunque Ainsworth y cols. (1990) muestran reservas sobre la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos por otros autores frente a timocitos. En este sentido van Diepen y cols. (1991) han demostrado que los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a timocitos de Cyprinus carpio por Secombes y cols. (1983) son inespecíficos y sólo sirven como marcador general de leucocitos.

### **3.5.2. HETEROGENEIDAD FUNCIONAL EN TIMOCITOS.**

La heterogeneidad funcional de los linfocitos de teleósteos ha sido estudiada principalmente por medio de estudios sobre la respuesta frente a mitógenos y el efecto hapteno-portador.

#### **3.5.2.1. Respuesta frente a mitógenos.**

El efecto blastogénico de los mitógenos sobre las subpoblaciones de linfocitos está bien establecido en vertebrados superiores. Así, los lipopolisacáridos (LPS) se consideran un mitógeno de células B; mientras que la concanavalina A (Con A) y las fitohemaglutininas (PHA) estimulan predominantemente a células T (McCumber y col., 1982; Lamers, 1985; Rowley

y cols., 1988).

Los resultados de los numerosos estudios sobre mitogenicidad en linfocitos de teleósteos, aunque diferentes por la variabilidad interespecífica, son significativos y apoyan la hipótesis de la existencia de subpoblaciones especializadas de linfocitos en peces (Lamers, 1985; Rowley y cols., 1988). Sin embargo, los estudios referidos a timo son escasos.

Etlinger y cols. (1976) realizaron estudios de mitogenicidad con Con A y LPS en Salmo gairdneri y encontraron que los timocitos responden bien con el mitógeno Con A y no con LPS; mientras que en linfocitos de riñón cefálico sucedía lo contrario. Este modelo de distribución de la respuesta a mitógenos localizado en órganos, sugiere la existencia de heterogeneidad linfocítica y una distribución análoga a la descrita en vertebrados superiores (McCumber y cols., 1982). Sin embargo, Warr y Simon (1983) no pudieron reproducir los resultados de Etlinger y cols. (1976) en Salmo gairdneri y sus observaciones fueron similares a las de Cuchens y Clem (1977) en Lepomis macrochirus, donde los linfocitos procedentes de timo respondieron a los mitógenos para células B (LPS) y T (Con A y PHA); mientras que usando células de riñón cefálico detectaron heterogeneidad en la respuesta, encontrando una población que respondía a PHA y Con A, pero no a LPS (células equivalentes a T) y otra sólo a LPS (células equivalentes a B). Por tanto las poblaciones de células reactivas a mitógenos no muestran una clara

distribución por órganos.

Por otro lado, Ellsaesser y cols. (1988), en Ictalurus punctatus, observaron que timocitos negativos para un anticuerpo monoclonal frente a Ig sérica, eran positivos a un anticuerpo monoclonal específico anti-timocitos y respondían a Con A en presencia de células accesorias (monocitos) o de un factor derivado de ellas, lo que está a favor de la naturaleza T de estas células. En algunos casos, también, se observó un ligero incremento en la respuesta a LPS de los timocitos cuando se cultivan con células accesorias o su sobrenadante; lo que podría ser debido a la presencia de una pequeña población de células B-equivalentes en el timo o a la existencia de una población de células T-equivalentes que pudieran responder a LPS. En apoyo de esta última alternativa diremos que estudios previos, en esta misma especie, indican la existencia de una población minoritaria de células T en sangre periférica que responden a LPS en presencia de macrófagos (Sizemore y cols., 1984).

### **3.5.2.2. Efecto hapteno-portador.**

El sistema hapteno-portador es el método utilizado para demostrar la cooperación entre linfocitos durante la respuesta inmunitaria. Los haptenos son moléculas pequeñas incapaces de inducir la formación de anticuerpos por sí mismos; pero si se unen con una molécula portadora de mayor tamaño estos

complejos inducen la formación de anticuerpos frente al hapteno, siempre que previamente hayan sido expuestos a la molécula portadora. Este efecto del portador se explica porque las células implicadas en la respuesta inmunitaria reconocen dos partes del complejo antigénico hapteno-portador, las células T a la molécula portadora y las células B al hapteno. Luego las células T, que reconocen al portador, implicadas en esta respuesta son células T colaboradoras (McCumber y cols., 1982; Lamers, 1985; Rowley y cols., 1988).

En teleósteos el efecto hapteno-portador se ha demostrado en varias especies (Stolen y Mäkelä, 1975; Yocum y cols., 1975; McKinney y cols., 1976; Ruben y cols., 1977; Warr y cols., 1977; Weiss y Avtalion, 1977; Miller y Clem, 1984; Miller y cols., 1985), pero sólo ha sido estudiado en timocitos de Carasius auratus, observándose que no había células hapteno reactivas (células equivalentes a B), pero sí células portador reactivas (células equivalentes a T) (Ruben y cols., 1977; Warr y cols., 1977).

McCumber y cols. (1982) y Lamers (1985) indican que en base a todos estos datos se puede concluir que los peces teleósteos poseen heterogeneidad linfocítica a nivel funcional; si presuponemos que el reconocimiento del portador en peces es una función de las células T.

Finalmente, en la tabla VI se resumen las características más significativas encontradas en el timo de las especies de teleósteos estudiadas.

Tabla VI. Resumen de las características más significativas del

timo de teleósteos.

ESPECIE	AUTOR/ES	Zonas tímicas	Cápsula conectiva	Trabéculas	Lobulación	Células mucosas	Células mioides	Corpúsculos tímicos	CER quísticas	Diversidad de CER	Macrófagos	Melanomacrófagos	Granulocitos	Células secretoras	Células plasmáticas	Infiltrac. capilar	Infil. eritrocítica	Involución	Células con sig	PFC
<i>Anguilla vulgaris</i>	von Hagen (1936)	+						-												
<i>Astyanax mexicanus</i>	Haftter (1952)	+				+	+	-	+									+	+	
<i>Lutjanus griseus</i>	Hulet (1967)														+					
	Ortiz-Muniz y Sigel (1971)																			+
<i>Lepomis macrochirus</i>	Smith y cols. (1967)							-												
<i>Hyperprosopon argenteum</i>	Engen (1968)							-												
<i>Leucopsarion petersi</i>	Tamura y Honma (1970)	-																		
<i>Myctroperca bonaci</i>	Ortiz-Muñiz y Sigel (1971)																			+
<i>Tilapia mossambica</i>	Sailendri (1973)																			+
	Sailendri y Muthukkaruppan (1975a)																			+
	Sailendri y Muthukkaruppan (1975b)	+	+	+	+	+		++	+	+									+	
<i>Salmo gairdneri</i>	McArdle y Roberts (1974)								+	+										
	Etlinger y cols. (1977)																			+ 1
	Chilmonczyk (1983)	+	++	+	+	+	+	-	+	-	+		+			+				
	DeLuca y cols. (1983)																			+ 3
	Chilmonczyk (1985)	+	++	+		++	+			-										
	Castillo y cols. (1990, 1991)	+	++	+		+	+		+	++	+	+	+							
	Razquin y cols. (1990)	+		+					+	++										+ 3
(u <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Thuvander y cols. (1990)																			+ 3

Leyenda:

- ( ) Sin datos. (-) Ausencia. (+) Presencia. (++) Abundancia.
- (1) Anticuerpo policlonal frente a Ig sérica.
- (2) Anticuerpo policlonal frente a cadena L de Ig sérica.
- (3) Anticuerpo monoclonal frente a Ig sérica.
- (4) Anticuerpo monoclonal frente a cadena L de Ig sérica.



Tabla VI (Continuación). Resumen de las características más significativas del timo de teleósteos.

ESPECIE	AUTOR/ES	Zonas tímicas	Cápsula conectiva	Trabéculas	Lobulación	Células mucosas	Células mioides	Corpúsculos tímicos	CER quísticas	Diversidad de CER	Macrófagos	Melanomacrófagos	Granulocitos	Células secretoras	Células plasmáticas	Infiltrac. capilar	Infil. eritrocítica	Involución	Células con sig	PFC	
<u>Luciogobius guttatus</u>	Tamura y Honma (1974)			+														+			
<u>Cyprinus carpio</u>	Emurich y cols. (1975)																		+ 2		
	Fiebig y Ambrosius (1976)																		+ 1		
	Fiebig y cols. (1977, 1980)																		+ 1		
	Botham y Manning (1981)	+	+	+	+																
	van Loon y cols. (1982)																		+ 1		
	Schneider (1983)														+						
	Secombes y cols. (1983)																		+ 3		
<u>Chaenogobius urotaenia</u>	Tamura y Honma (1975)			+														+			
<u>Lepomis macrochirus</u>	Clem y cols. (1977)																		+ 2		
<u>Salmo salar</u>	Ellis (1977)	-																	+		
<u>Acanthogobius flavimanus</u>	Tamura y Honma (1977)				+	+		+	+										+		
<u>Chasmichthys gulosus</u>			++		+	+		++	+										++		
<u>Carasius auratus</u>	Warr y cols. (1977, 1979)																			+ 1	
<u>Rutilus rutilus</u>	Zapsta (1981)	+	+	+	-	+	++	-	+	-	+			+	+				+		
<u>Morone saxatilis</u>	Groman (1982)	+	+	+				+	+		+		+						+		
<u>Cynolebias adloffii</u>	Cooper y cols. (1983)	-	++				+		+										+		
<u>Nothobranchius guentheri</u>		-	++				+		+										+		

Leyenda:

- ( ) Sin datos. (-) Ausencia. (+) Presencia. (++) Abundancia.
- (1) Anticuerpo policlonal frente a Ig sérica.
- (2) Anticuerpo policlonal frente a cadena L de Ig sérica.
- (3) Anticuerpo monoclonal frente a Ig sérica.
- (4) Anticuerpo monoclonal frente a cadena L de Ig sérica.

Tabla VI (Continuación). Resumen de las características más

significativas del timo de teleósteos.

ESPECIE	AUTOR/ES	Zonas tímicas	Cápsula conectiva	Trabéculas	Lobulación	Células mucosas	Células mioideas	Corpúsculos tímicos	CER quísticas	Diversidad de CER	Macrófagos	Melanomacrófagos	Granulocitos	Células secretoras	Células plasmáticas	Infiltrac. capilar	Infil. eritrocítica	Involución	Células con e18	PFC
<i>Syciases sanguineus</i>	Gorgollón (1983)	Timo externo	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+		-		+	-		
		Timo interno	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+		-					
<i>Zoarcas viviparus</i>	Bly (1985)		+	+		+		-											+	
<i>Lophius piscatorius</i>	Pänge y Pulsford (1985)		-	+	+	+	+	+	+	-	+			+	+				-	
<i>Oncorhynchus kitchutch</i>	Kaattari e Irwin (1985)																			+
<i>Oryzias latipes</i>	Ghoneum y cols. (1986)		+			+														
<i>Sebastes marmoratus</i>	Nakanishi (1986)		+																+	
<i>Ictalurus punctatus</i>	Ellsaesser y cols. (1988)		+			+		+											+	+ 3
<i>Harpagifer antarcticus</i>	O'Neill (1989a, c)		+	++	+	-	++	-	-	-		-						-	+	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	O'Neill (1989b, c)		+	++	+	++	+	+	-	-		+	++				+	-	+	
<i>Pleuragramma antarcticum</i>			+	++	+	-	+	-	-	-		+	+			+	-	++		
<i>Merlangius merlangus</i>	O'Neill (1989c)		+	+	+	-	++	++	-	-		+	++					-	+	
<i>Notothenia neglecta</i>			+	++	++	-	+	-	-	-		-					++	+		
<i>Nototheniops larseni</i>			+	+	+	-	+	-	-	-		-						-	+	
<i>Trematomus newnesi</i>			-	+	+	-	+	-	-	-		+	+					-	+	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Chantanachookhin y cols. (1991)		+			+	-	++											+	
<i>Pragus major</i>			+			+	-												-	
<i>Seriola quiqueradiata</i>			+		++	+	+	+		++		+								-
<i>Sparus aurata</i>	Navarro y cols. (1993)																			+ 4

Leyenda:

- ( ) Sin datos. (-) Ausencia. (+) Presencia. (++) Abundancia.
- (1) Anticuerpo policlonal frente a Ig sérica.
- (2) Anticuerpo policlonal frente a cadena L de Ig sérica.
- (3) Anticuerpo monoclonal frente a Ig sérica.
- (4) Anticuerpo monoclonal frente a cadena L de Ig sérica.

### **III. MATERIAL Y METODOS**

### 1. ANIMALES.

El estudio del timo de lubina (Dicentrarchus labrax L.) se ha realizado en 100 ejemplares juveniles, de edades comprendidas entre 1 y 2 años, procedentes de la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Servicio de Pesca y Acuicultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia en San Pedro del Pinatar (Murcia), con un peso comprendido entre 129,0-308,5 gr y una talla de 15-20 cm de longitud total.

Los animales se mantuvieron en condiciones próximas a las de su hábitat natural en tanques de material sintético con una capacidad útil de 450 l y un volumen de trabajo de 400 l. El sistema funcionó en circuito abierto con agua marina, captada directamente del Mar Mediterráneo en el Puerto de San Pedro del Pinatar, con una tasa de renovación del 100%/hora, durante todo el día. La salinidad natural del agua osciló entre 35 y 37‰. También las condiciones de temperatura y el fotoperiodo fueron naturales, siguiendo ambos parámetros las variaciones típicas del área de ubicación de la planta experimental. Los valores anuales de ambos parámetros están recogidos en la tabla VII y en la

figura 3. Los niveles de oxígeno disuelto en el agua se mantuvieron próximos a saturación, mediante un sistema de aireación regulable.

La alimentación fue administrada manualmente, como porcentaje de la biomasa contenida en el tanque, en una toma diaria, usando una dieta seca de pienso comercial M-8 (Trophic SA, España) de tamaño de partícula adecuado, cuya composición se recoge en la tabla VIII.

Tabla VIII. Composición del pienso M-8 (Trophic SA).

---

Proteínas .....	43,8%.
Grasa .....	5,9%.
Cenizas .....	19,2%.
Fibra .....	4,9%.
MELN(*) .....	26,2%.

---

(\*) MELN: Materia extractiva libre de nitrógeno.

Previamente a su estudio los animales fueron aclimatados durante un periodo de 21 días. Antes de cada muestreo los animales fueron mantenidos en condiciones de ayuno durante 24 horas.

Los muestreos se realizaron a lo largo de un año, excepto en épocas de condiciones climáticas adversas. La toma de muestras se hizo entre las 10 y las 12 horas del día, procediendo todas ellas de animales en perfecto

estado de salud.

## 2. OBTENCION DE MUESTRAS.

Previamente a la obtención de muestras, los peces fueron anestesiados y desangrados. La anestesia fue administrada por inmersión de los ejemplares en un recipiente con agua marina que contenía anestésico TMS (Metano sulfonato de tricaina, Crescent Research Chemicals, Phoenix, USA) al 0,01% y bicarbonato sódico al 0,12%.

La extracción del timo, de su localización en el ángulo dorsal-posterior de la cavidad branquial, se hizo según dos variantes de muestreo.

La primera variante, tras la retirada del opérculo y de las branquias, consistió en la ablación del timo de ambas cavidades branquiales, mediante una incisión en sentido antero-posterior descendente en el límite superior del timo seguida de otra incisión en el límite inferior, oblicua al plano sagital y en sentido ventro-dorsal, uniendo los extremos de la primera incisión.

En la segunda variante se practicó la decapitación del animal y posterior disección de la región anterior de la cabeza. La región postorbitaria

---

fue cortada en dos por el plano sagital. Seguidamente, en ambas porciones se procedió a la eliminación del opérculo, radios branquióstegos y de los tejidos circundantes al timo. Así el órgano se mantiene en su emplazamiento, facilitando el estudio posicional.

#### **2.1. PROCESADO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA OPTICA.**

Las muestras fueron fijadas "in toto" durante 24 horas en líquido fijador de Bouin, en formaldehído al 10% o en líquido fijador de Carnoy.

Las muestras de timo procedentes de la disección de la cabeza, tras ser fijadas, fueron hidratadas por sucesivos pasos en concentraciones decrecientes de etanol y sometidas a un proceso de descalcificación en solución de citrato de sodio al 10% en una mezcla 1:1 de ácido fórmico y etanol al 70% durante 30 días. Cada 5 días se renovó la solución descalcificadora.

A continuación, todas las muestras fueron deshidratadas en gradientes crecientes de etanol, tratadas con iso-amilo acetato y mantenidas durante una noche en Paraplast Plus (Monoject Scientific Inc., Kildare, Irlanda) líquido a 55°C. Seguidamente se realizaron los bloques, dándole a las muestras la correcta orientación (sagital, frontal y transversal) para su posterior estudio.

En los bloques se realizaron secciones seriadas de 3-4  $\mu\text{m}$  de espesor con un microtomo de rotación MICROM HM 330 (Microm GmbH, Heidelberg, Alemania).

### **2.1.2. METODOS DE TINCION PARA MICROSCOPIA OPTICA.**

Para la identificación y descripción microscópica óptica de los tipos celulares y estructuras presentes en el timo, las muestras desparafinadas fueron sometidas a las siguientes técnicas:

#### **1.- Hematoxilina-Eosina (Hansen, 1895).**

Como tinción de rutina.

Las secciones fueron teñidas con hematoxilina de Hansen durante 4 minutos y con eosina durante 30 segundos.

#### **2.- Tricrómico de Mallory (Gabe, 1968).**

Para la visualización de las fibras colágenas.

Secciones de timo fueron tratadas con solución de Lugol (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 5 minutos y a continuación con una solución acuosa de hiposulfito sódico al 5%. Posteriormente, fueron teñidas en una solución de fucsina ácida al 0,5% durante 10 minutos y con una mezcla compleja formada por azul de anilina, orange G y ácido fosfotúngstico durante 40



minutos.

### **3.- Impregnación argéntica de Gomori (Gabe, 1968).**

Para poner de manifiesto las fibras de reticulina.

Las muestras se mantuvieron durante 1 minuto en solución de permanganato potásico al 0,5%, a continuación en solución de metabisulfito potásico al 2% durante 1 minuto, seguida de un tratamiento de 1 minuto con sulfato férrico amónico al 2%. Posteriormente, fueron teñidas con una solución de plata amoniacal formada por una mezcla compleja de nitrato de plata al 10%, hidróxido potásico al 10% e hidróxido amónico al 28%, seguido de un baño en formaldehído al 20% durante 3 minutos, un tratamiento con cloruro de oro al 1% durante 10 minutos y de un baño en metabisulfito potásico al 2% durante 1 minuto, para finalizar con un tratamiento de 1 minuto en tiosulfato sódico al 2%.

### **4.- Resorcina de Weigert (Gabe, 1968).**

Para visualizar fibras elásticas.

Las secciones fueron teñidas con una solución de fucsina básica y de resorcina (1 gr de fucsina básica y 2 gr de resorcina en 100 ml de agua destilada y 12,5 ml de cloruro férrico al 30%, se filtran y el precipitado se disuelve en etanol al 95%, añadiendo 2 ml de ácido clorhídrico) durante 1 hora a 56°C y contrastadas con eosina durante 30 segundos.

### **5.- Verde metil-pironina (Vacca, 1985).**

Para poner de manifiesto las células plasmáticas.

Las secciones de timo fijadas en líquido fijador de Carnoy fueron teñidas en una solución de verde de metil-pironina (7,5 ml de solución de verde de metilo al 2%, 12,5 ml de pironina GS al 2% en agua destilada y 30 ml de agua destilada) durante 15 minutos. A continuación se eliminó el exceso de colorante mediante pasos en t-butanol y etanol en proporción 3:1. Las muestras fueron aclaradas en t-butanol durante 1 minuto.

Posteriormente, todas las muestras fueron lavadas, deshidratadas en soluciones crecientes de etanol, aclaradas en xileno y montadas en DPX medio de montaje (Probus SA, Badalona, España).

### **2.1.3. METODOS CITOQUIMICOS PARA MICROSCOPIA OPTICA.**

Se han aplicado técnicas citoquímicas microscópicas ópticas para poner de manifiesto la presencia de mucopolisacáridos neutros y ácidos y de pigmentos.

#### **2.1.3.1. Métodos citoquímicos para polisacáridos.**

**1.- Acido peryódico de Schiff (PAS) (Gabe, 1968).**

La reacción de PAS contrastada o no con hematoxilina se ha empleado como tinción general de polisacáridos.

Las secciones desparafinadas y lavadas de timo fueron tratadas con una solución acuosa de ácido peryódico al 0,5% durante 5 minutos, teñida con reactivo de Schiff durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente y transferidas a tres baños sucesivos de 2 minutos de duración de metabisulfito sódico al 0,5%. Las preparaciones fueron contrastadas con hematoxilina de Hansen durante 4 minutos.

Para indicar la presencia de glucógeno, las secciones fueron pretratadas con  $\alpha$ -amilasa salival en tampón fosfato, pH 6, durante 1 hora a una temperatura de 37°C.

#### **2.- Azul alción (Scott y Dorling, 1965).**

Esta técnica se ha realizado a pH 1, para la detección de mucosustancias fuertemente ácidas (sulfatadas), y a pH 2,5, para mucosustancias débilmente ácidas (carboxiladas) y algunas fuertemente ácidas.

Las preparaciones fueron desparafinadas y tratadas con ácido acético glacial al 3% durante 2 minutos. Seguidamente se tiñeron en una solución de azul alción al 1% en ácido clorhídrico 0,1N para la reacción a pH 1 y en una solución de azul alción al 1% en ácido acético al 3% para la reacción a pH 2,5. Finalmente se contrastaron con hematoxilina de Hansen.

Para poder diferenciar las mucinas ácidas de las neutras hemos

aplicado la técnica conjunta de azul alcian a pH 2,5 y PAS (Mowry, 1956). Para ello las preparaciones fueron teñidas durante 5 minutos en una solución de azul alcian al 1% en ácido acético al 3%. A continuación se lavaron y se trataron con una solución acuosa de ácido peryódico al 1% durante 5 minutos. Tras lavar se tiñeron con reactivo de Schiff durante 15 minutos.

### **2.1.3.2. Métodos citoquímicos para pigmentos.**

#### **1.- Azul de Prusia de Perls (PERLS) (Vacca, 1985).**

Para poner de manifiesto iones férricos y hemosiderina.

Las muestras de timo fijadas en líquido fijador de Carnoy fueron tratadas con una solución de ferrocianuro potásico al 10% durante 10 minutos y seguidamente con una mezcla 3:7 de ácido clorhídrico al 10% y ferrocianuro potásico al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas y seguidamente contrastadas con rojo nuclear al 0,1% en una solución de sulfato de aluminio al 5%.

#### **2.- Técnica para melaninas de Gomori (Gabe, 1964).**

Para demostrar la presencia de pigmentos de melanina.

Las preparaciones fueron sumergidas en una solución de plata amoniacal durante 12 horas, lavadas en agua destilada, tratadas durante 1 minuto con cloruro de oro al 0,2% y a continuación con disulfito sódico al 5% durante

5 minutos. Parte de las muestras fueron contrastadas con hematoxilina durante 1 minuto.

Como control en algunas preparaciones los pigmentos de melanina fueron blanqueados antes de la tinción, tratando las secciones desparafinadas con permanganato potásico al 0,25% durante 20 minutos, seguido de un breve lavado en agua y una total decoloración en ácido oxálico al 1%.

### **3.- Método del azul de Turnbull (Vacca, 1985).**

Para poner de manifiesto la presencia de lipofucsina y melanina.

Las secciones fueron teñidas con una solución de ferricianuro, consistente en una dilución 1:1 de cloruro férrico al 1% y ferricianuro potásico al 1%, durante 20 minutos.

### **2.1.4. OBSERVACION MICROSCOPICA.**

El estudio microscópico de las muestras incluidas en parafina y de los cortes semifinos de muestras incluidas en resinas epoxi, se realizó en un fotomicroscopio Leitz Orthoplan (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Alemania). Las preparaciones fueron fotografiadas con película Agfachrome 50RS Professional en el caso de fotografías en color, utilizando un filtro de compensación azul y con Negrapan 100 ASA en el caso de fotografías en blanco y negro, utilizando

un filtro de compensación verde.

## **2.2. PROCESADO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.**

### **2.2.1. OBTENCION DE MUESTRAS.**

Muestras de timo obtenidas como se detalló en el apartado III.2 fueron seccionados en cubos de aproximadamente 1 mm de arista.

### **2.2.2. FIJACION, INCLUSION, SECCION Y CONTRASTE.**

La fijación se realizó en glutaraldehido (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, USA) al 2% en tampón cacodilato (Sigma, St. Louis, USA) 0,1M, pH 7,2-7,4, durante 5 horas a una temperatura de 4°C. Posteriormente, las muestras se introdujeron en una solución de lavado compuesta por sacarosa al 0,85% en tampón cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4, durante 16 horas. Las muestras fueron postfijadas en una solución de tetróxido

de osmio (BDH, Gran Bretaña) al 1% en tampón cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4, durante 2 horas y media a 4°C en oscuridad y lavadas durante 15 minutos en solución de lavado. Para aumentar el contraste de las estructuras celulares, se introdujeron las muestras en una solución al 4,8% de acetato de uranilo en tampón veronal, pH 7,2-7,4, (Michaelis, 1931) durante 2 horas a 4°C. Las muestras fueron deshidratadas en una serie de baños de etanol de concentraciones crecientes durante 15 minutos en cada uno de ellos. Tras la deshidratación se sometieron a dos baños de 30 minutos en óxido de 1,2-propileno y a continuación se introdujeron durante 1 hora en cada una de las siguientes diluciones 2:1, 1:1 y 1:2 en volumen de óxido de 1,2-propileno y resina epoxi, formada por la mezcla 9:7:5:0,4 en volumen de Epon 812, DDSA, MNA y DPM-30 (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Alemania); manteniendo los tubos en los que se realizaba la inclusión abiertos, con el fin de que el óxido de 1,2-propileno se evaporara lentamente y favoreciese la correcta impregnación de las muestras. Por último, las muestras se dejaron en mezcla epoxi pura durante una noche a temperatura ambiente.

Para la realización de los bloques se emplearon como moldes cápsulas de gelatina tamaño OO (nivel 2), previamente deshidratadas durante 24 horas a 40°C. Las cápsulas fueron mantenidas 72 horas a 70°C para favorecer la polimerización de la resina epoxi.

Las secciones semifinas de 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor se obtuvieron con un

---

ultramicrotomo Ultracut E Reichert-Jung (Reichert-Jung, Viena, Austria) usando cuchillas de vidrio de 45° de ángulo, confeccionadas con un Knifemaker II Reichert-Jung (Reichert-Jung, Viena, Austria). Las secciones semifinas fueron teñidas con azul de toluidina al 0,5% en una solución de borato sódico al 1% y montadas con DPX.

La selección de los campos interesantes para la realización de secciones ultrafinas se efectuó con el estudio microscópico óptico de los cortes semifinos.

Las secciones ultrafinas de 600-900 Å de espesor realizadas con cuchilla de diamante (Diatome Ltd., Bienne, Suecia) fueron recogidas sobre rejillas de cobre de malla 100 y contrastadas con acetato de uranilo al 4% en alcohol metílico (Watson, 1958) durante 5 minutos y citrato de plomo (Reynolds, 1963) durante 1 minutos.

### **2.2.3. OBSERVACION MICROSCOPICA.**

El examen de los cortes y la obtención de electronografías se llevo a cabo en dos microscopios electrónicos, Zeiss EM-10C y EM-109, trabajando a 60 y 80 kV, respectivamente. Las imágenes se obtuvieron sobre placas fotográficas Kodac Electron Image Film.



### **2.3. PROCESADO PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.**

#### **2.3.1. OBTENCION DE MUESTRAS.**

Las muestras de timo obtenidas por disección de la cabeza según la segunda variante descrita en el apartado III.2 fueron seccionadas siguiendo planos paralelos y perpendiculares a la superficie externa del órgano.

#### **2.3.2. INCLUSION Y METALIZACION.**

Las muestras fueron introducidas en tampón cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4, a 4°C, para lavar y retirar las células muertas y la mucosidad del epitelio faríngeo que recubre el timo. Seguidamente, se fijaron según lo descrito en el apartado III.2.2.2 para microscopía electrónica de transmisión y fueron deshidratadas en gradiente creciente de acetona y desecadas mediante la realización del punto crítico en un desecador CPD 020 (Balzers Union, Liechtenstein, USA). Las muestras fueron orientadas y pegadas sobre soportes

y metalizadas con una fina capa de oro.

### **2.3.3. OBSERVACION MICROSCOPICA.**

El estudio de las muestras se realizó en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM T-300 trabajando a 30 kV. Las imágenes fueron recogidas sobre placas fotográficas AGFAPAN AAPX 100.

### **2.4. AISLAMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DE TIMO.**

Para estudiar las poblaciones de células libres se obtuvieron suspensiones celulares del timo y se aplicaron métodos inmunocitoquímicos.

#### **2.4.1. PREPARACION DE MUESTRAS.**

Fragmentos de timo fueron depositados en una placa Petri que contenía medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco Life Technologies Ltd., Paisley,

Gran Bretaña) complementado con cloruro sódico al 0,25%, heparina 50UI al 0,2% y azida sódica al 0,1%, a este medio de cultivo lo denominamos medio SRPMI, a 4°C. A continuación fueron tamizados a través de una malla de nylon. La suspensión celular obtenida fue recolectada en SRPMI a 4°C y lavada dos veces en el mismo medio por centrifugación a 700 g durante 10 minutos a 4°C.

#### **2.4.2. PREPARACION DEL GRADIENTE.**

Se utilizaron gradientes continuos al 60% v/v de Percoll (Pharmacia LKB, Biotechnology AB, Uppsala, Suecia), que contenían un 6,6% de Dulbeccos MEM 10x (Gibco Life Technologies Ltd., Paisley, Gran Bretaña) y un 33,3% de medio SRPMI en Percoll. Seguidamente, se centrifugaron a 18.000 g durante 45 minutos a 4°C. Los gradientes siempre fueron hechos el mismo día de su empleo y fueron conservados a 4°C hasta ser usados.

#### **2.4.3. SEPARACION CELULAR.**

Las suspensiones celulares fueron colocadas sobre los gradientes previamente formados, con ayuda de una pipeta Pasteur. A continuación los

---

tubos fueron centrifugados a 850 g durante 30 minutos a 4°C, las células presentes en las distintas bandas se recolectaron con una pipeta Pasteur y se lavaron en medio SRPMI.

#### **2.4.4. VIABILIDAD CELULAR.**

Las células viables presentes en las suspensiones celulares de cada banda fueron contadas en un hemocitómetro de Neubauer y ajustadas a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml y de  $5 \times 10^6$  células/ml, según fueran a ser estudiadas mediante citometría de flujo o microscopía electrónica, respectivamente.

#### **2.4.5. REACCION INMUNOCITOQUIMICA.**

Seguidamente se resuspendieron e incubaron a 4°C durante 45 minutos en 500  $\mu$ l de medio SRPMI con anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ig sérica de Sparus aurata (WSI-5) (Navarro y cols., 1993) diluido en proporción 1:500 y 1:100 para los tubos con  $3 \times 10^6$  células/ml y  $5 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. También se hicieron suspensiones control, sin tratamiento con

WSI-5.

#### **2.4.5.1. Citometría de flujo.**

Para las muestras que serían estudiadas mediante citometría de flujo se procedió a su resuspensión e incubación en 500  $\mu$ l de anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca) diluido en una proporción 1:100 durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Seguidamente, las células fueron lavadas, resuspendidas en 250  $\mu$ l de medio SRPMI y analizadas mediante citometría de flujo.

#### **2.4.5.2. Inmunocitoquímica ultraestructural.**

Las muestras que serían estudiadas mediante microscopía electrónica fueron resuspendidas e incubadas en 100  $\mu$ l de medio SRPMI con anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con oro coloidal de 15 nm de diámetro de partícula (Janssen Life Sciences Products, Olen, Bélgica) a una dilución de 1:5 durante 45 minutos a 4°C. Las suspensiones celulares fueron lavadas y el sobrenadante retirado.

El procedimiento de fijación, inclusión y contraste es el mismo que

el detallado en el apartado III.2.2.2 con las siguientes excepciones: Usando 200  $\mu$ l de fijador durante 1 hora y eliminando del proceso de inclusión el paso de contraste en acetato de uranilo.

El proceso de seccionamiento de los bloques obtenidos fue igual al descrito en el apartado III.2.2.2, excepto en el tiempo de contrastado de las rejillas que fue reducido a la mitad. La observación microscópica fue idéntica también a la descrita en el apartado III.2.2.3.

#### **2.4.6. ANALISIS MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.**

El análisis de las suspensiones celulares por citometría de flujo se hizo en un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, USA) equipado con un laser de ion de argón emitiendo a una longitud de onda de 488 nm a una potencia de 15 mW. Un detector de silicona en estado sólido fue usado para captar la dispersión frontal de luz (FSC) y tres tubos fotomultiplicadores para detectar la dispersión ortogonal de luz (SSC) y la señal de fluorescencia. La fluorescencia verde (FITC) fue recogida a través de un filtro de paso de banda de 530/30 nm. Las señales de FSC, SSC y la fluorescencia de FITC fueron amplificadas logarítmicamente. La adquisición de datos se realizó con el FACScan Rearch Software.

Los parámetros de FSC, SSC y fluorescencia se determinaron para cada una de las células y almacenados en un listado de archivos de datos. Cada medida de suspensión celular de tino consistió en un archivo de 10.000 eventos. Los datos fueron analizados usando el programa informático LYSIS II versión 1.0 (Becton Dickinson).

Las células muertas fueron excluidas rutinariamente del análisis en base a la dispersión de luz frontal y ortogonal.

Para el análisis de los datos de las diferentes poblaciones celulares encontradas en base a sus características de FSC y SSC fueron situadas ventanas alrededor de ellas. El análisis mediante histogramas de fluorescencia de FITC fue realizado para cada una de las ventanas.

La optimización del aislamiento celular y de los procedimientos de tinción de las suspensiones celulares permitieron el uso de ventanas idénticas a través de los experimentos.

## **2.5. ANALISIS ESTADISTICO.**

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se ha realizado con el programa informático STATISTIX versión 3.5 (Analytical Software, St.

---

Paul, USA). La significación estadística de los resultados obtenidos se evaluó mediante la aplicación de diferentes pruebas estadísticas:

1.- Test de Wilk-Shapiro: para analizar la normalidad de los datos.

2.- Test F de Sperman: para analizar la igualdad de las variancias.

3.- Métodos paramétricos:

3a) Prueba T de parejas de muestras: para comprobar las diferencias entre las medias de dos grupos en los que las muestras se han tomado a la par.

3b) Prueba T de dos muestras: para analizar en muestras independientes la igualdad de las medias en las poblaciones de origen.

3c) Análisis de la variancia: permite comparar las medias en muestras múltiples.

4.- Métodos no paramétricos:

4a) Prueba T de Wilcoxon: (ídem 3a).

4b) Prueba de Mann-Whitney: (ídem 3b).

4c) Prueba de Kruskall-Wallis: (ídem 3c).



Tabla VII. Parámetros ambientales anuales (año 1989).

MES	TEMPERATURA (°C)		INSOLACION TOTAL MENSUAL (horas)
	Máxima	Mínima	
Enero	13,9±1,4	11,4±1,0	153,3
Febrero	14,6±1,2	12,6±2,7	148,1
Marzo	17,0±1,3	15,0±1,1	177,1
Abril	18,9±1,0	16,0±1,0	182,4
Mayo	21,8±1,2	18,7±1,5	226,6
Junio	25,0±1,9	22,3±1,5	253,5
Julio	29,0±0,9	26,5±1,2	244,5
Agosto	30,2±1,2	27,4±0,9	204,0
Septiembre	27,0±1,3	24,4±0,8	183,0
Octubre	23,3±1,3	20,3±1,0	180,8
Noviembre	19,0±1,2	16,7±1,2	95,1
Diciembre	16,0±1,0	13,7±1,2	110,9

Figura 3. Parámetros ambientales (temperatura e insolación) en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Servicio de Pesca y Acuicultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia en San Pedro del Pinatar (Murcia).

