

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

**RESPUESTAS DE IgM E IgD EN TRUCHAS
ARCOÍRIS INMUNIZADAS CON
*AEROMONAS SALMONICIDA***

Autora: Claudia García García

Villaviciosa de Odón, **23 de mayo**

Título del Trabajo: Respuestas de *IgM* e *IgD* en truchas arcoíris inmunizadas con *Aeromonas salmonicida*

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Dentro del INIA, he desarrollado mis prácticas en el Grupo de Inmunología y Patología de Peces, ubicado dentro del Departamento de Biotecnología del INIA-CSIC. Este se encuentra liderado por la Dra. Carolina Tafalla, una investigadora con una amplia trayectoria en el estudio del sistema inmunológico en peces teleósteos, con especial intensidad en especies de interés en acuicultura, como es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Tutoras profesionales: Carolina Tafalla Piñeiro y Esther Morel Barcena

Tutor académico: Manuel Olazabal Moran

ÍNDICE

GLOSARIO	1
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1. Importancia de la acuicultura a nivel global.....	5
2. Ventajas y desafíos de la acuicultura	5
3. Patógenos en acuicultura: <i>Aeromonas salmonicida</i>	6
4. Sistema inmunológico innato de los peces.....	6
a. Barreras físicas y químicas	6
b. Células del sistema inmune innato	7
5. Sistema inmunológico adaptativo en peces	7
6. Órganos linfoides en peces vs mamíferos.....	8
a. Diferencias estructurales en la organización de las células B y el tejido linfoide asociado a mucosas	8
b. Inmunoglobulinas en peces y mamíferos: diversidad, afinidad y especialización.....	9
OBJETIVOS	11
METODOLOGÍA	12
Diseño experimental.....	12
Preparación de la bacterina de <i>Aeromonas salmonicida</i>	13
a. Cultivo bacteriano	13
b. Inactivación bacteriana	13
c. Cuantificación bacteriana.....	13
Inmunización con la bacterina de <i>Aeromonas salmonicida</i>	13
Aislamiento de leucocitos.....	14
a. Aislamiento de leucocitos de bazo y branquias.....	14
b. Aislamiento de leucocitos intestinales	14
c. Recuento y ajuste de concentración celular	14
Citometría de flujo	15
Ensayo ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay).....	15
Extracción de ARN y tratamiento con ADNsas.....	16
PCR a tiempo real	16
Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	17
Análisis estadístico.....	17
RESULTADOS	18
1. Análisis de linfocitos B intestinales en trucha arcoíris tras 3 y 8 días de inmunización con <i>A. salmonicida</i>	18
2. Análisis de linfocitos B de branquias de trucha arcoíris tras 3 y 8 días post-inmunización con <i>A. salmonicida</i>	20
3. Análisis de poblaciones de linfocitos B aislados de bazo de trucha arcoíris tras 3 y 8 días post-inmunización con <i>A. salmonicida</i>	21

4. Análisis del número de células B secretoras de IgM en intestino, branquias y bazo de trucha arcoíris inmunizadas con <i>A. salmonicida</i>	22
5. Expresión de IgM e IgD de membrana e IL-1 β en intestinos de trucha arcoíris tras 3 y 8 días post-inmunización con <i>A. salmonicida</i>	23
6. Análisis de linfocitos B intestinales en trucha arcoíris tras 21 días de inmunización con <i>A. salmonicida</i>	25
7. IgM e IgD específica de <i>A. salmonicida</i> en sueros de trucha arcoíris tras 21 días inmunización con la bacteria.	26
<i>DISCUSIÓN</i>	28
<i>CONCLUSIONES</i>	32
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	33

GLOSARIO

ADNsas: desoxirribonucleasas

AEC: 3-amino-9-etilcarbanzol

APC: Aloficocianina (del inglés, *Allophycocyanin*)

APC: Célula Presentadora de Antígenos

APROMAR: Asociación de Productores de Mejillón y Acuicultura de España

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BCR: Receptor de células B (del inglés, *B Cell Receptor*)

BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés, *Bovine Serum Albumin*)

cADN: ADN complementario

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DO: densidad óptica

DPI: días post-inmunización

ELISA: Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzima (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ELISpot: Ensayo de inmunospot enzimático (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*)

ESM: Error Estándar de la Media (del inglés, *Standard Error of the Mean*)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (del inglés, *Food and Agriculture Organization*)

FACS: Clasificación de células activadas por fluorescencia (del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

FBS: Suero fetal bovino (del inglés, *Fetal Bovine Serum*)

FITC: Isotiocianato de fluorescencia (del inglés, *Fluorescein Isothiocyanate*)

GALT: Tejido Linfoide Asociado al Intestino (del inglés, *Gut Associated Lymphoid Tissue*)

IgD: Inmunoglobulina D

IgD mb: Inmunoglobulina D de membrana

IgM: Inmunoglobulina M

IgM mb: Inmunoglobulina M de membrana

IgT (o IgZ): Inmunoglobulina T o Z

IL-1 β : interleuquina 1 beta

LB: Luria-Bertani

MHC-II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II (del inglés, *Major*

Histocompatibility Complex)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*)

PE: Ficoetrina (del inglés, *Phycoerythrin*)

P/S: Penicilina/Estreptomicina (del inglés, *Penicillin/Streptomycin*)

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones (del inglés, *Pattern Recognition Receptors*)

RPM: revoluciones por minuto

rtPCR: PCR en tiempo real

RT: temperatura ambiente (del inglés, *Room Temperature*)

SD: Desviación estándar (del inglés, *Standard Deviation*)

TCR: Receptor de Células T (*del inglés, T Cell Receptor*)

TLR: Receptores *Toll-Like* (*del inglés, Toll-Like Receptors*)

UFC: unidades formadoras de colonias

V/V: volumen por volumen

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por confiar en mí incluso cuando yo misma dudaba, por creer en mí más de lo que yo lo hacía, y por acompañarme siempre con amor y paciencia incondicional. Gracias por ser mi mayor apoyo y por enseñarme que los sueños se alcanzan con esfuerzo y constancia.

A mi hermana Ana, por ser mi guía, mi ejemplo y mi mayor inspiración. Sin ti, nada de esto habría sido posible. Gracias por iluminar mi camino y recordarme siempre quién soy y de dónde vengo.

A Gloria, Lucía y Luli, por convertir estos cuatro años en una etapa tan fácil, bonita y llena de recuerdos imborrables. Gracias por enseñarme el verdadero significado de la amistad y por ser hogar en cada paso del camino. Sé que no habría llegado tan lejos sin nuestras risas, desahogos y abrazos.

A mi tutor de la universidad, Manu, gracias por tu paciencia ante la cantidad de mensajes enviados por teams y por estar siempre dispuesto a ayudarme.

A mi tutora Carolina, por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación durante estas prácticas.

A mi tutora, Esther, por su implicación, cercanía y por hacerme sentir acompañada en cada paso de este proyecto. Gracias por tu dedicación, por enseñarme con paciencia y por creer en mí desde el principio.

A mí misma, por no rendirme, por seguir adelante a pesar de las dudas, y por demostrarme que soy capaz. Este logro también es para la Claudia que lloró, que dudó, pero que siguió luchando.

Y a mi abuela, que no pudo verme llegar hasta aquí, pero cuya fuerza, amor y memoria me han acompañado en cada logro. Esta carrera va dedicada a ti. Gracias por enseñarme a ser valiente incluso cuando el corazón se rompe.

“La ciencia no es solo un conjunto de conocimientos, sino una manera de pensar”

Carl Sagan (1934-1996)

RESUMEN

La acuicultura es un sector clave para la seguridad alimentaria global, pero es importante destacar que cuenta con un gran número de desafíos debido al gran número de enfermedades infecciosas que amenazan a este sector. En este contexto, es esencial conocer la respuesta del sistema inmune adaptativo frente a patógenos como *Aeromonas salmonicida* y, así, poder avanzar en el desarrollo de estrategias inmunoproliféricas eficaces. El presente trabajo se centró en estudiar la respuesta de las células B en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tras la inmunización anal con una bacterina de *A. salmonicida*, un patógeno bacteriano que causa importantes pérdidas económicas en acuicultura. Se realizó el análisis de las diferentes poblaciones de las células B, que se caracterizaron por la expresión de inmunoglobulinas M y D (IgM e IgD), en intestino, branquias y bazo mediante citometría de flujo. Además, también se realizó la cuantificación del número de células productoras de IgM en estos tejidos a diferentes tiempos (3 y 8 días post-inmunización). Los resultados demostraron un aumento en la subpoblación de células B IgD^+IgM^- en las mucosas de intestino y branquia, lo que sugiere una activación local y una interconexión de los sistemas inmunes de mucosas. En el bazo, se vio un ligero aumento de células B *naive* IgM^+IgD^+ a estos mismos tiempos, lo que podría indicar que este órgano podría jugar un papel en la respuesta de mucosas tras la inmunización anal de trucha arcoíris con una bacterina de *A. salmonicida*. Estos hallazgos proporcionan información importante sobre la dinámica de la respuesta inmune en peces teleósteos, así como de la importancia de las mucosas en la defensa contra infecciones bacterianas.

Palabras clave: células B, *Aeromonas salmonicida*, trucha arcoíris, inmunidad mucosal, ELISpot, acuicultura, citometría de flujo, sistema inmune adaptativo.

INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la acuicultura a nivel global

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, del inglés, *Food and Agriculture Organization*) define la acuicultura como el cultivo de organismos acuáticos mediante intervenciones que optimizan su producción. Se trata de una actividad estratégica que combina innovación, sostenibilidad y crecimiento económico, promoviendo a la vez un uso racional de los recursos acuáticos con un impacto ambiental controlado (FAO,2024). Según el informe *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2024*, la producción acuícola superó por primera vez a la pesca de captura en 2022, representando el 51% del total de productos acuáticos, siendo Asia el principal productor. En España, la acuicultura mantiene un papel a destacar dentro del sector primario, con una producción de aproximadamente 330.346 toneladas en 2022, concentradas fundamentalmente en especies como el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) (255.303 toneladas), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (23.924 toneladas), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (15.357 toneladas), y la dorada (*Sparus aurata*) (9.632 toneladas). (APROMAR, 2022).

2. Ventajas y desafíos de la acuicultura

La acuicultura, en comparación con la pesca de captura, trae consigo una serie de ventajas. Entre otras, por ejemplo, la acuicultura ayuda a satisfacer la creciente demanda de alimentos a nivel mundial, implica una producción controlada, contribuye a la conservación de especies en peligro de extinción y puede tener un menor impacto ambiental siempre que se haga de manera sostenible y responsable. Sin embargo, existen también grandes desventajas y desafíos que la acuicultura debe abordar para que esta práctica sea sostenible y se reduzca su impacto negativo en el medio ambiente. El cultivo intensivo genera una gran densidad de peces que se traduce en un aumento de niveles de materia orgánica en el agua, y con ello la consecuente disminución de los niveles de oxígeno. Esta bajada de los niveles de oxígeno disponibles en agua ocasiona un estado de estrés crónico en los peces generando una afección de su sistema inmunitario, haciéndoles más propensos a infecciones por patógenos (Leeuwis et al., 2024). Los patógenos responsables de estas infecciones incluyen bacterias, virus, hongos y parásitos.

3. Patógenos en acuicultura: *Aeromonas salmonicida*

La bacteria *Aeromonas salmonicida* es considerada uno de los patógenos más importantes en la acuicultura de salmónidos (Menanteau-Ledouble et al., 2016). Es una bacteria gram-negativa, psicrofílica, anaerobia facultativa y no móvil (Menanteau-Ledouble et al., 2014). *A. salmonicida* es reconocida como el agente etiológico de la furunculosis, una enfermedad sistémica que afecta principalmente a peces salmónidos, entre los que se encuentra la trucha arcoíris (Connors et al., 2019). La enfermedad lleva consigo hemorragias internas y externas, además de una distensión abdominal debido al agrandamiento de órganos internos, como el bazo (Menanteau-Ledouble et al., 2016). Esta infección afecta de manera negativa al sector acuícola ya que genera importantes pérdidas económicas. Para reducir el impacto de enfermedades bacterianas se pueden recurrir a la administración de antibióticos, pero su uso se encuentra altamente restringido y regulado debido al gran impacto ambiental y a la aparición de cepas bacterianas resistentes. Por razones como éstas, en acuicultura se prefieren tratamientos alternativos para conseguir con ello controlar las enfermedades bacterianas. La vacunación es la estrategia más adecuada para prevenir las enfermedades causadas por bacterias desde todos los puntos de vista. Actualmente, existen vacunas disponibles a nivel comercial frente a *A. salmonicida*, basadas en el patógeno inactivado, pero éstas se administran generalmente por inyección, lo que conlleva un gran coste y estrés para los animales (Kumar et al., 2015; Menanteau-Ledouble et al., 2016). Optimizar métodos de vacunación a través de las mucosas (orales o por baño) que permitan una administración en masa es, por lo tanto, una de las principales prioridades del sector.

4. Sistema inmunológico innato de los peces

El sistema inmunitario innato constituye el mecanismo de defensa más antiguo y conservado evolutivamente entre los vertebrados, incluyendo a los peces teleósteos. Este se encarga de actuar como una respuesta rápida y no específica frente a una amplia variedad de agentes patógenos, proporcionando una protección inmediata, lo cual resulta crucial en las primeras etapas de la infección. En los peces, el correcto funcionamiento del sistema inmunitario resulta clave ya que se encuentran expuestos a numerosos microorganismos en el medio acuático.

a. Barreras físicas y químicas

En los peces, el sistema inmune innato comprende tanto barreras físicas como mecanismos moleculares y celulares. La piel constituye la principal barrera física, funcionando como escudo

frente a patógenos del medio externo. Está compuesta por queratinocitos, células epiteliales que recubren las escamas, caracterizadas por su alta movilidad y capacidad fagocítica (Asbakk and Dalmo 1998; Tsuchida and Theriot 2013). Además, la piel está recubierta por una capa de moco rica en moléculas inmunológicas como proteínas y enzimas antimicrobianas, destacando entre ellas la lisozima, que refuerzan la defensa frente a agentes patógenos. Más allá de la piel, los peces poseen otras superficies mucosas especializadas, como las branquias, la cavidad bucal, el intestino y la nasofaringe (Resseguier et al. 2020; Haugarvoll et al. 2008).

b. Células del sistema inmune innato

El sistema inmune innato en peces también incluye una gran diversidad de células especializadas. Tradicionalmente se han considerado fundamentales los macrófagos, células dendríticas y granulocitos, aunque estudios recientes revelan un papel activo de otras poblaciones celulares como son los eritrocitos o los trombocitos. En mamíferos, pero sobre todo en peces, también se incluyen como células que participan en la inmunidad innata, algunas subpoblaciones de linfocitos B y linfocitos T, células comúnmente asociadas con la inmunidad adaptativa.

Los macrófagos son reconocidos por su capacidad fagocítica, pero también pueden actuar como células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen-Presenting Cells*), participando en la activación del sistema adaptativo. Se ha propuesto que existen diferentes fenotipos de macrófagos en peces, en función del tipo de la señal que reciben: clásico, alternativo, regulador e innato (Wentzel et al., 2020). Los granulocitos, principalmente los neutrófilos, que resultan esenciales en procesos inflamatorios gracias a su rápida movilidad y a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteasas (Havixbeck y Barreda, 2015).

Curiosamente, dado que los eritrocitos en peces son nucleados, se ha visto que estas células también pueden jugar un cierto papel inmune, ya que son capaces de expresar genes relacionados con receptores Toll (TLR, del inglés *Toll- Like Receptors*) y ciertas moléculas antivirales (Morera et al., 2011). Por su parte, los trombocitos no solo tienen función hemostática, sino que también cuentan con actividad fagocítica pudiendo, además, actuar como APCs.

5. Sistema inmunológico adaptativo en peces

El sistema inmunológico adaptativo actúa generando una memoria inmunológica que proporciona una protección específica frente a posteriores infecciones. El sistema adaptativo se encarga de desempeñar dos funciones fundamentales: el reconocimiento de antígenos

específicos y el desarrollo de la memoria inmunológica. Los linfocitos B y T son los principales responsables de esta respuesta, permitiendo una detección precisa, así como una eliminación eficaz de los patógenos. Gracias a su especificidad, el sistema inmunológico adaptativo es capaz de generar una respuesta más potente en caso de una segunda exposición frente al mismo agente infeccioso (Gourley et al. 2004).

Los linfocitos B expresan inmunoglobulinas (Igs) las cuales cuando se encuentran ancladas en su membrana se designan como receptores de linfocitos B (BCR, del inglés *B cell receptor*), que les permite reconocer de manera directa antígenos en su forma nativa. Las Igs pueden ser también liberadas al medio extracelular, lo que se designa de forma general como anticuerpos (Björge & Koppang, 2021). En cambio, los linfocitos T expresan receptores específicos denominados receptores de linfocitos T (TCR, del inglés *T cell receptor*), los cuales siempre están anclados a la membrana. A través de estos receptores, únicamente se reconocen fragmentos de antígeno que han sido previamente procesados y presentados en la superficie de otras células mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*).

6. Órganos linfoides en peces vs mamíferos

Los componentes del sistema inmunológico innato y adaptativo se encuentran distribuidos por todo el organismo. En mamíferos, las células de ambos sistemas son producidas en la médula ósea a partir de células progenitoras hematopoyéticas. Los órganos donde los linfocitos inmaduros adquieren los receptores para reconocer los antígenos se denominan tejidos linfoides primarios, mientras que los secundarios son aquellos donde los linfocitos son activados tras el reconocimiento de antígenos. En mamíferos, los órganos linfoides primarios son la médula ósea, donde se originan los linfocitos y el timo, donde se produce la maduración de los linfocitos T (Pabst, 2007). Los tejidos linfoides secundarios en mamíferos son el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, del inglés *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)

a. Diferencias estructurales en la organización de las células B y el tejido linfoide asociado a mucosas

A diferencia de los mamíferos, en los peces las células B no proliferan en folículos ni en centros germinales, que son estructuras características del sistema inmunológico adaptativo en mamíferos (Flajnik, 2018). Se ha planteado la hipótesis de que los centros melanomacrófagos presentes en el bazo y en el riñón cefálico de los peces podrían desempeñar una función análoga

a los centros germinales. Sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido completamente confirmada y constituye una potente línea activa de investigación (Steinel y Bolnick, 2017).

En los mamíferos, las placas de Peyer forman parte del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) y están compuestos por folículos ricos en células B, rodeados por linfocitos T intraepiteliales y otras células inmunitarias. La función principal de estas estructuras es detectar antígenos intestinales y activar respuestas inmunes adaptativas (Bemark et al., 2024). En cambio, los peces teleósteos, como la trucha arcoíris, no presentan placas de Peyer. No obstante, si poseen un GALT funcional, que se encuentra distribuido a lo largo de la mucosa intestinal. Este GALT está formado principalmente por linfocitos intraepiteliales, células presentadoras de antígenos y células B dispersas, especialmente en la lámina propia (Salinas et al., 2021b). A diferencia del GALT mamífero, las células B se encuentran en una menor densidad y no organizadas en folículos bien definidos ni en otras estructuras linfoides secundarias. Esta diferencia estructural implica que, mientras en mamíferos las placas de Peyer facilitan una respuesta inmune adaptativa muy organizada y eficiente en la mucosa intestinal, en peces dicha respuesta es más difusa y menos especializada. Esto podría influir en la eficacia y especificidad de la respuesta inmunológica en el entorno intestinal de los peces.

b. Inmunoglobulinas en peces y mamíferos: diversidad, afinidad y especialización

El sistema inmunitario adaptativo de mamíferos se caracteriza por la producción de una amplia variedad de inmunoglobulinas, entre las que se encuentran IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. Estas moléculas presentan una alta afinidad por los antígenos y una vida media prolongada, lo que contribuye a una respuesta inmune eficiente y duradera frente a patógenos.

En contraste, los peces teleósteos producen un repertorio mucho más limitado de inmunoglobulinas, siendo los tres isotipos principales IgM, IgD e IgT (también conocida como IgZ) (Yu et al., 2020). Estas inmunoglobulinas suelen presentar menor afinidad y una vida media más corta en comparación con las de los mamíferos (Tongsri et al. 2020). No obstante, desempeñan funciones esenciales tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa.

En peces, la IgM representa la principal inmunoglobulina implicada en la respuesta inmune sistémica, siendo la más abundante en suero. Además de su papel en sangre, también se ha detectado en cantidades elevadas en mucosas, como la del intestino, piel y branquia, lo que indica que a pesar de que su principal función se asocia con la inmunidad sistémica, también puede participar activamente en la respuesta inmune mucosal (Yu et al., 2020c).

Se ha visto que en algunas especies y en respuesta a determinados patógenos, la IgT cumple una función especializada en las mucosas, desempeñando un papel análogo al de la IgA en mamíferos (Salinas et al., 2021b). Sin embargo, esto no está tan claro hoy en día, ya que recientemente se han descrito respuestas de IgT fuera de mucosas y respuestas de mucosas sin implicación de IgT (Salinas et al., 2021b).

La IgD ha emergido como una inmunoglobulina relevante, especialmente en contextos de inmunidad mucosal. Aunque no se conoce aún su función exacta, se ha descrito que la IgD se expresa principalmente en linfocitos B asociados a tejidos como intestino, branquia y piel (Salinas et al., 2021c). Esta inmunoglobulina parece desempeñar un papel en la defensa local frente a patógenos en superficies de mucosas, actuando de forma complementaria a otras inmunoglobulinas como la IgM e IgT (Yu et al., 2020c).

En base a las inmunoglobulinas que expresan, las células B en peces pueden clasificarse en cuatro subpoblaciones: células IgT^+ , IgM^+IgD^+ , IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^- . Las células B en los compartimentos sistémicos son fundamentalmente IgM^+IgD^+ . Cuando estas células reconocen al antígeno y se estimulan, empiezan un programa de diferenciación por el que pierden la IgD de membrana, pasando a ser IgM^+IgD^- . En otros casos, y de forma especial en mucosas, las células pierden la IgM de membrana y se convierten en IgD^+IgM^- . Estas células secretan IgD cuya funcionalidad todavía es desconocida.

Comprender las bases del sistema inmunitario de los peces, especialmente su componente adaptativo, resulta fundamental para el desarrollo de estrategias profilácticas eficaces, como las vacunas, que permitan reducir la incidencia de enfermedades infecciosas en acuicultura. La identificación de los principales órganos linfoides, la caracterización de las subpoblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune y el estudio de las inmunoglobulinas especializadas como la IgT o la IgD son claves para el diseño de vacunas eficaces.

OBJETIVOS

1. Determinar la respuesta de células IgM e IgD local (intestino) tras una inmunización anal de trucha arcoíris con una bacterina de *Aeromonas salmonicida*.
2. Determinar si los sistemas inmunes de mucosas están interconectados en trucha arcoíris analizando la respuesta de branquia tras la inmunización anal con una bacterina de *A. salmonicida*.
3. Determinar el posible papel del bazo sobre la respuesta de mucosas tras la inmunización anal de trucha arcoíris con una bacterina de *A. salmonicida*

Preparación de la bacterina de *Aeromonas salmonicida*

Aeromonas salmonicida (CECT4237) se encontraba congelada en medio Luria-Bertani (LB) que está compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl, suplementado con un 30% de glicerol. Las bacterias se dejaron descongelar a 25°C durante toda la noche.

a. Cultivo bacteriano

Los ensayos con *A. salmonicida* se realizan en fase exponencial, cuando el crecimiento de la bacteria es óptimo. Para ello, se midió la turbidez del cultivo bacteriano a una densidad óptica (DO) de 600 nm con un espectrofotómetro, considerándose en esta bacteria la densidad optima cercana a 0,6. Tras la incubación se recogió 1 ml de cultivo bacteriano y se pasó a un matraz con 1 L de medio LB, que se dejó durante toda la noche en agitación a 22-25°C.

b. Inactivación bacteriana

Pasado este tiempo, se dividió el contenido del matraz en dos botellas de 500 ml y se procedió a la inactivación bacteriana depositando estas botellas en un baño a 60°C durante 3 h. Después, el volumen se dividió en 20 tubos Falcon de 50 ml que se centrifugaron a 3000 x g durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, los pellets bacterianos resultantes se unificaron en un único Falcon, resuspendiéndose en un volumen final de 50 ml en medio LB estéril.

c. Cuantificación bacteriana

Para estimar la concentración de bacteriana, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta una dilución final de 1:10⁸. De cada dilución se sembraron 100 µl por duplicado en placas Petri con medio LB. Las placas se incubaron a 22-25°C durante 48 h para permitir el crecimiento bacteriano y el posterior recuento de colonias.

Inmunización con la bacterina de *Aeromonas salmonicida*

Se inmunizaron analmente 30 truchas arcoíris (*O. mykiss*) con 100 µl de *A. salmonicida* inactivada (bacterina), a una concentración final de 1,12 x 10⁹ UFC/ml, suspendida en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate-Buffered Saline*). Para el procedimiento, las truchas fueron capturadas con una red y anestesiadas en un cubo que contenía agua mili-Q con una dosis de benzocaína mínima no letal (30-50 mg/l) con el objetivo de facilitar su manejo sin llegar a causar la muerte. A continuación, se realizó la inoculación anal con una pipeta. Una vez inmunizadas, las truchas fueron transferidas a otro cubo con agua mili-Q sin anestésico que

contaba con un aireador, para favorecer su recuperación. Posteriormente, se distribuyeron en dos tanques que contenían cada uno 15 truchas. El grupo control estuvo compuesto por otras 30 truchas, que recibieron 100 µl de PBS por vía anal, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el grupo inmunizado. Estas truchas fueron también distribuidas en dos tanques (15 truchas por tanque) destinados exclusivamente al grupo control.

Aislamiento de leucocitos

Las truchas fueron sacrificadas mediante sobredosis de benzocaína (100-200 mg/L) para aislar leucocitos de bazo, branquias e intestino a 3 dpi y 8 dpi.

a. Aislamiento de leucocitos de bazo y branquias

Se prepararon suspensiones celulares filtrando el tejido por coladores de 100 µm (*cell strainer*) usando medio L-15 suplementado con heparina (100 µl/ml), P/S (penicilina/estreptomicina, del inglés *Penicillin/Streptomycin*) y 2% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal bovine serum*). Los leucocitos se separaron mediante un gradiente de Percoll 30/50%, seguido de una centrifugación a 300 x g durante 30 min a 4°C sin freno. En el caso de las branquias, se realizó previamente una centrifugación a 500 x g durante 10 minutos para eliminar el exceso de células muertas y mucus.

b. Aislamiento de leucocitos intestinales

Se trituró la región intestinal posterior a los ciegos pilóricos y anterior al ano, filtrándose directamente en un *cell strainer* sin utilizar gradiente de Percoll. El medio de resuspensión fue L-15 suplementado con heparina (100 µl/ml), P/S y 2% de FBS. Al igual que en el caso de las branquias, se realizó una centrifugación a 500 x g durante 10 minutos para eliminar el exceso de células muertas y mucus, pero no se procedió a la separación de leucocitos mediante gradiente de Percoll.

c. Recuento y ajuste de concentración celular

El recuento celular se realizó mediante tinción Azul Tripán y cámara de Neubauer. Finalmente, todas las suspensiones celulares se ajustaron a 2×10^6 células/ml en medio L-15 con P/S y 5% FBS.

Citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó con el fin de analizar los porcentajes de células B y los niveles de MHC-II (del inglés *Major Histocompatibility Complex class II*) en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B. Para ello, se incubaron 200 µl de suspensión celular en placas de 96 pocillos con fondo en V con anticuerpos monoclonales de trucha conjugados a diferentes fluorocromos: anti-IgM conjugado con PE (*Phycoerythrin*), anti-IgD con APC (*Allophycocyanin*) y anti-MHC-II con FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*). Los anticuerpos se diluyeron en *Staining Buffer* (SB), que es medio L-15 sin rojo fenol, P/S y 2% FBS, a las concentraciones finales de 0,25 µg/ml, 5 µg/ml y 1,5 µg/ml respectivamente, y se incubaron a 4°C durante 1 h en oscuridad. Posteriormente, se realizaron lavados con SB mediante centrifugación (500 x g, 5 min, 4°C) y las células se resuspendieron en 200 µl de SB para realizar su análisis en el citómetro de flujo FACSCelesta™, BD. Las células fueron contrateñidas con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2'-fenilindol (DAPI) para excluir células muertas, y el análisis de los datos se llevó a cabo con el software FlowJo® v10.

Ensayo ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay)

Se empleó la técnica de ELISpot para cuantificar el número de células B secretoras de IgM total en cultivos provenientes de leucocitos de bazo, intestino y branquia. Las placas de ELISpot cuentan con membranas Immobilon-P (Millipore) que se activaron con etanol al 70% y se lavaron con agua mili-Q estéril. Posteriormente, se recubrieron estas membranas con el anticuerpo monoclonal anti-IgM de trucha (1 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 4°C. Tras cinco lavados con PBS, se bloquearon las membranas con PBS 2% BSA (del inglés, *Bovine Serum Albumin*) durante 2 h a temperatura ambiente.

Se sembraron 10.000 o 100.000 células (dependiendo del órgano) por pocillo (en duplicado) y se incubaron a 20°C durante 24 h. A continuación, y tras 5 lavados con 200 µl de PBS por pocillo, se añadieron anticuerpos anti-IgM biotinilados (1.14) (1 µg/ml) y se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavaron los pocillos con 200 µl de PBS y se añadieron 100 µl de estreptavidina-HRP (100 ng/ml) por pocillo para su incubación y durante otra hora en agitación horizontal. Finalmente, y tras otra ronda de lavados, se realizó el revelado con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, Sigma-Aldrich) durante 30 min en oscuridad. Las placas se lavaron, secaron y los spots se cuantificaron mediante el sistema AID iSpot Reader.

Extracción de ARN y tratamiento con ADNsas

Se extrajo ARN total de las muestras de intestino obtenidas a los 3 dpi y 8 dpi de truchas control e inmunizadas, utilizando TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras fueron homogenizadas en 1 ml de TRIzol. Una vez homogenizado, se añadieron 500 µl de cloroformo y se centrifugaron (15700 x g, 15 min a 4°C). Se recuperó la fase acuosa (unos 500 µl) y el ARN se precipitó con isopropanol que contenía GlycoBlue™ (ThermoFisher Scientific) para facilitar la visualización del pellet de ARN. Tras lavar con etanol al 75%, las muestras se secaron y resuspendieron en agua libre de nucleasas. La concentración y pureza se determinaron mediante espectrofotometría NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific). Con el fin de eliminar el posible ADN (Ácido desoxirribonucleico) presente en las muestras, se realizó un tratamiento previo con ADNsas (desoxirribonucleasas) siguiendo las instrucciones del kit ADN-sas de ThermoFisher. La síntesis de ADNc (ADN complementario) se llevó a cabo mediante el kit *RevertAid First Strand cADN Synthesis Kit* (ThermoFisher Scientific). Se mezclaron 10 µl de ARN con 3,2 µl de oligo (dT) (10 µM), incubándose a 70°C durante 2 min y enfriándose en hielo. Posteriormente, se añadieron 7 µl de mezcla de reacción (4 µl de tampón 5X, 2 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de transcriptasa reversa a 200 U/µl) y se incubaron en el termociclador: 42°C 1 h, 45°C 30 min, 50°C 30 min, 90°C 5 min. Una vez obtenidos los ADNc se diluyeron en 60 µl de agua libre de nucleasas y se guardaron las muestras a -20°C hasta su posterior uso.

PCR a tiempo real

La expresión génica se evaluó por PCR a tiempo real (rtPCR, del inglés *real time PCR*) con SYBR Green I Master Mix (Roche) en placas de 96 pocillos, utilizando 2 µl de ADNc, 5 µl de SYBR Green, 0,6 µl de mezcla de cebadores (10 µM) y 2,4 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones se realizaron por duplicado en LightCycler® 96 System (Roche). Para la normalización de la expresión se utilizó el gen constitutivo de *β-actina*. El análisis se realizó mediante el método $2^{-\Delta Ct}$ y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante Microsoft Excel, calculando la media y el error estándar de la media (ESM). La secuencia de todos los cebadores empleados se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cebadores usados en la PCR a tiempo real.

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>b-actina</i>	TCCTTCCTCGGTATGGAGTCT	TTACGGATGTCCACGTACAC
<i>igm</i> <i>membrana</i>	CCTTAACCAGCCGAAAGGG	CCAACGCCATACAGCAGAG
<i>igd</i> <i>membrana</i>	CAGGAGGAAAGTTCGGCATCA	CCTCAAGGAGCTCTGGTTTGA
<i>il1b</i>	CCGTCCCCATTGAGACTAAAG	TGTCGCTCTGCTGGCTGA

Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se extrajo sangre de 6 truchas del grupo control y 6 del grupo inmunizado a los 21 dpi con el objetivo de evaluar en los sueros la presencia o ausencia de anticuerpos IgM o IgD específicos de *A. salmonicida* mediante la técnica de Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*). Para ello, se recubrieron placas de 96 pocillos con *A. salmonicida* inactivada diluida 1:2 en tampón carbonato y se incubaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron con PBS-T (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline con Tween-20*) y se bloquearon con PBS-T + 1% de BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se añadieron los sueros en duplicado, diluidos 1:20 (para la detección de IgM) y 1:2 (para la detección de IgD) en PBS, y se incubaron durante 1 h a RT. Tras lavar, se añadieron los anticuerpos biotinilados anti-IgM o anti-IgD (1 µg/ml) y se procedió a su incubación durante 1 h. Posteriormente se añadió estreptavidina-HRP diluida 1 µg/ml en PBS, incubando también durante 1 h a RT. Finalmente se añadió OPD (del inglés, *Ortho-Phenylenediamine*) como sustrato y se detuvo la reacción con 25 µl de H₂SO₄. En cada placa se incluyeron controles positivos y negativos. La lectura se realizó en un lector de placas FLUO Star omega.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism 8*. Los resultados se expresaron como media ± error estándar de la media (ESM) y se consideró significación estadística cuando $p \leq 0,05$. Con el fin de evaluar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. En aquellos datos que seguían una distribución normal se aplicó la prueba de *t*-Student para aquellas muestras independientes de dos colas. En caso de no seguir una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

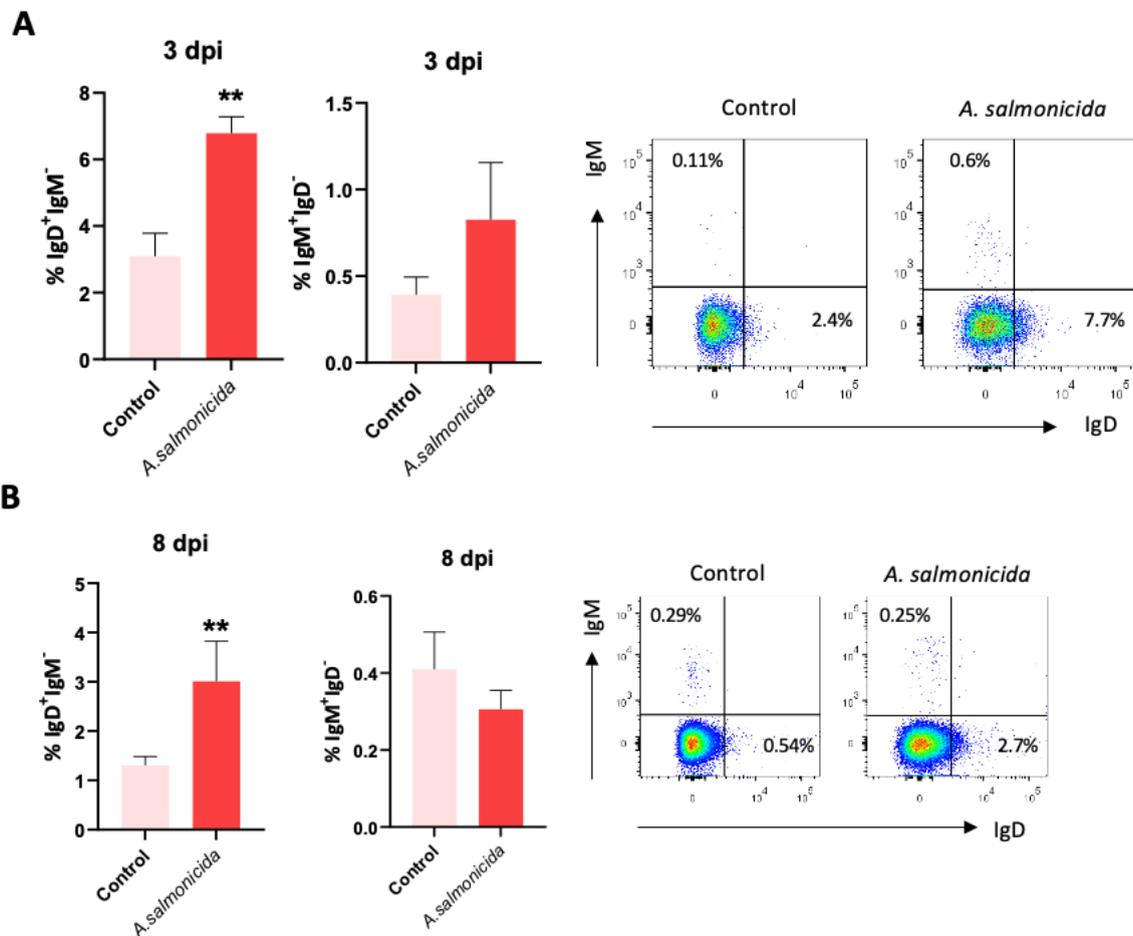
RESULTADOS

1. Análisis de linfocitos B intestinales en trucha arcoíris tras 3 y 8 días de inmunización con *A. salmonicida*

Para estudiar la respuesta IgM e IgD en mucosas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) tras una inmunización con una bacteria inactivada (bacterina) de *A. salmonicida*, se inmunizaron por vía anal 30 truchas con la bacterina y se obtuvieron suspensiones celulares de los intestinos a 3 y 8 días post-inmunización (dpi) para su estudio mediante citometría de flujo. Como control, se inmunizaron y se muestrearon en cada tiempo truchas con el mismo volumen de medio HBSS 1x (medio en el que se diluye la bacterina para inmunizar las truchas) sin la presencia de la bacterina. En las suspensiones celulares obtenidas de los intestinos se estudiaron las frecuencias relativas de células B IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^- mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales específicos de IgM e IgD conjugados a diferentes fluorocromos (anti-IgM-PE y anti-IgD-APC). Anteriormente se describió que las células B del linaje IgM/D presentes en mucosas de trucha arcoíris corresponden a células que han iniciado una diferenciación hacia células plasmáticas y son, por lo tanto, células B IgD^+IgM^- o IgM^+IgD^- (Perdiguero et al., 2019c y J. G. Herranz-Jusado et al., 2023b). En intestino específicamente, la población de células B IgD^+IgM^- es más abundante que la de células B IgM^+IgD^- (Perdiguero et al., 2019c). Para determinar si esto estaba ocurriendo también en nuestro grupo control, comparamos los porcentajes de células B IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^- en las suspensiones celulares obtenidas de los intestinos control. Como muestran los gráficos y *dot plots* representativos de la **Figura 2**, las frecuencias de células B IgD^+IgM^- en intestinos control a 3 dpi (~3%) y 8 dpi (~1.5%) siempre fueron superiores a las de células B IgM^+IgD^- (~0.4% a 3 dpi y 8 dpi). Para conocer si la frecuencia de células B IgD^+IgM^- en los intestinos de truchas inmunizadas seguía siendo superior a la de células B IgM^+IgD^- como ocurría en el grupo control, se analizaron también los porcentajes de estas subpoblaciones en el grupo inmunizado. Como muestran los gráficos y *dot plots* representativos en la **Figura 2**, en intestino de truchas inmunizadas con la bacterina se observó la misma tendencia que en el grupo control; los porcentajes de células B IgD^+IgM^- a 3 dpi (~7%) y 8 dpi (~3%) siempre fueron superiores a los de células B IgM^+IgD^- a 3 dpi (~0.7%) y 8 dpi (~0.3%). A continuación, se quiso analizar si los porcentajes de ambas subpoblaciones (IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^-) cambiaban en función de si las suspensiones celulares provenían de intestinos control o inmunizados. Como muestra la **Figura 2**, se observó un incremento significativo de células B IgD^+IgM^- en intestinos de truchas inmunizadas con respecto a intestinos control tanto

a 3 dpi como a 8 dpi. Cuando se compararon los porcentajes de células B IgM^+IgD^- en ambos grupos se observó un ligero incremento de esta subpoblación en intestinos de truchas inmunizadas, pero sólo a 3 dpi y a diferencia de la subpoblación IgD^+IgM^- este incremento no fue significativo (**Figura 2A, derecha**). Es interesante mencionar que a 8 dpi no sólo no se observó un incremento de células B IgM^+IgD^- en los intestinos de truchas inmunizadas respecto a intestinos control, sino que se observó una disminución de esta subpoblación aunque no fue nunca significativa (**Figura 2B, derecha**).

Figura 2. Frecuencia de linfocitos B IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^- en intestinos de trucha arcoíris a los 3 y 8 días



post-inmunización con una bacterina de *A. salmonicida*. Se obtuvieron suspensiones celulares de intestinos de truchas control e inmunizadas con una bacterina de *A. salmonicida* a 3 dpi y 8 dpi, se marcaron con anticuerpos específicos anti-IgM-PE y anti-IgD-APC y se analizaron las muestras mediante citometría de flujo. Dot plots representativos junto con gráficos que muestran la media de los porcentajes de cada subtipo celular (IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^-) en suspensiones celulares obtenidas de intestinos de truchas control e inmunizadas a 3 dpi (**A**) y 8 dpi (**B**) (media + ESM; n=6 peces independientes). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas no pareada cuando los datos se distribuían de manera normal, y mediante el test Mann-Whitney cuando los datos no se distribuían de manera normal. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes entre los grupos control e inmunizado como se indica (** $p \leq 0.01$).

2. Análisis de linfocitos B de branquias de trucha arcoíris tras 3 y 8 días post-inmunización con *A. salmonicida*.

En algunos organismos se ha descrito que los tejidos inmunes asociados a mucosas están interconectados, en lo que se ha venido a denominar un *common mucosal immune system* (Zapata, 2022c). Como consecuencia, cuando una mucosa se estimula, otra mucosa no estimulada directamente que se encuentra alejada físicamente también experimenta efectos. Para determinar si en trucha arcoíris también se da este fenómeno, y si las mucosas del intestino y la branquia están interconectados, se aislaron leucocitos de branquias obtenidas de truchas control e inmunizadas analmente con la bacterina y se procedió a su estudio mediante citometría de flujo. Al igual que en las suspensiones celulares obtenidas de intestinos, en las suspensiones de leucocitos obtenidos de branquias se estudiaron las frecuencias de células B IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^- mediante el marcaje con los mismos anticuerpos monoclonales usados en el apartado anterior (anti-IgM-PE y anti-IgD-APC).

Se ha descrito que, dentro del linaje IgM/IgD, las subpoblaciones de células B IgD^+IgM^- y IgM^+IgD^- son las mayoritarias en branquias de trucha arcoíris y que sus porcentajes son muy similares entre ellos (J. G. Herranz-Jusado et al., 2023b). Por tanto, lo primero que quisimos determinar es si esto estaba ocurriendo en las branquias obtenidas de nuestros grupos control e inmunizado a los dos tiempos estudiados. Como muestran los gráficos y *dot plots* representativos de la **Figura 3**, los porcentajes de células B IgD^+IgM^- aisladas de branquias control a 3 dpi (~1.2%) y 8 dpi (~2.5%) fueron muy similares a los de células B IgM^+IgD^- (~2% a 3 dpi y ~2.7% a 8 dpi). Esto mismo ocurría cuando comparábamos las frecuencias de células B IgD^+IgM^- (~2.3% y 3.5% a 3 y 8 dpi respectivamente) e IgM^+IgD^- (~2.5% y 3.4% a 3 y 8 dpi respectivamente) de branquias de truchas inmunizadas a ambos tiempos.

Cuando se compararon los porcentajes de células B IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^- en las suspensiones de leucocitos aislados de branquias de ambos grupos (control e inmunizado) se observó, al igual que en el caso de los intestinos, un incremento de la subpoblación de linfocitos B IgD^+IgM^- en intestinos de truchas inmunizadas en comparación con intestinos control tanto a 3 dpi como a 8 dpi (**Figura 3**). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en intestino, en branquia este incremento sólo resultó significativo a 3 dpi (**Figura 3A**). Por el contrario, al comparar los porcentajes de células B IgM^+IgD^- en branquias de controles e inmunizados no se observaron diferencias, siendo las frecuencias ~2.3% y ~3% a 3 dpi y ~2.7% y ~3.4% a 8 dpi respectivamente (**Figura 3**).

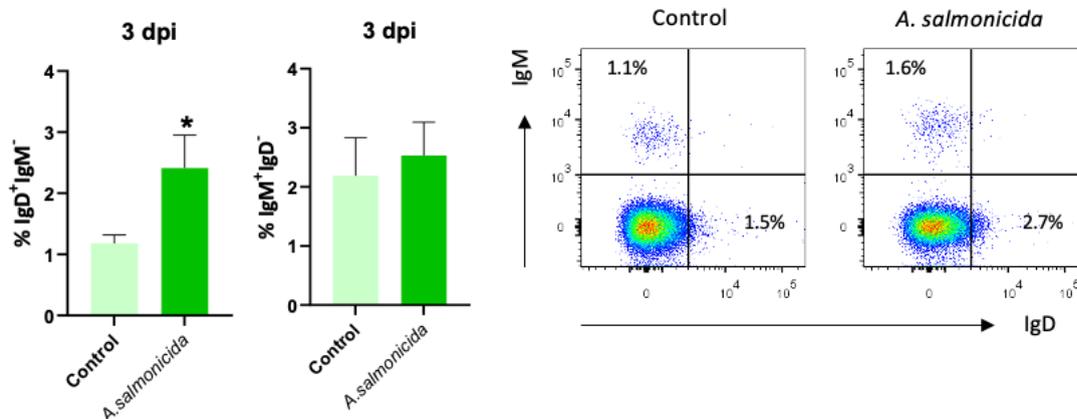
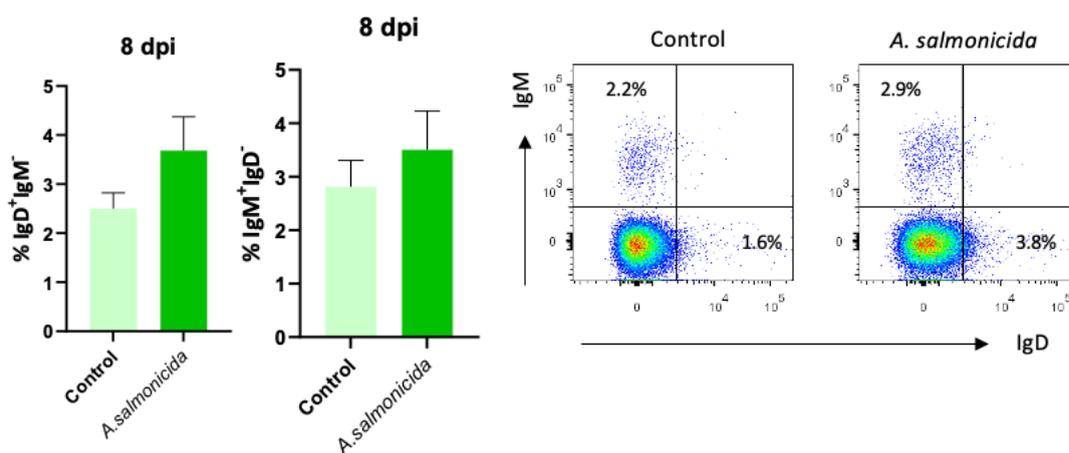
A**B**

Figura 3. Frecuencia de linfocitos B IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^- en branquias de trucha arcoíris a los 3 y 8 días post-inmunización con una bacterina de *A. salmonicida*. Se obtuvieron leucocitos de branquias de truchas control e inmunizadas con una bacterina de *A. salmonicida* a 3 dpi y 8 dpi, se marcaron con anticuerpos específicos anti-IgM-PE y anti-IgD-APC y se analizaron las muestras mediante citometría de flujo. Dot plots representativos junto con gráficos que muestran la media de los porcentajes de cada subtipo celular (IgD^+IgM^- e IgM^+IgD^-) en cultivos de leucocitos aislados de branquias de truchas control e inmunizadas a 3 dpi (A) y 8 dpi (B) (media + ESM; n=6 peces independientes). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas no pareada cuando los datos se distribuían de manera normal, y mediante el test Mann-Whitney cuando los datos no se distribuían de manera normal. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes entre los grupos control e inmunizado como se indica (* $p \leq 0.05$).

3. Análisis de poblaciones de linfocitos B aislados de bazo de trucha arcoíris tras 3 y 8 días post-inmunización con *A. salmonicida*.

Con el propósito de determinar el posible papel que el bazo, el principal órgano linfoide secundario en peces, pueda tener sobre la respuesta de mucosas tras una inmunización con una bacterina de *A. salmonicida*, se aislaron leucocitos de bazos obtenidos de truchas control e inmunizadas tras 3 dpi y 8 dpi y se analizaron los porcentajes de células B IgM^+IgD^+ mediante citometría de flujo. Esta subpoblación IgM^+IgD^+ corresponde principalmente a linfocitos B *naive* o en estado de reposo, es decir, que aún no han sido activados por el antígeno. Como muestra la **Figura 4**, tanto a 3 dpi (**Figura 4A**)

como a 8 dpi (**Figura 4B**) se detectó un ligero aumento en la proporción de células B *naive* IgM⁺IgD⁺ en bazo del grupo inmunizado comparado con el control, aunque en ninguno de los dos casos las diferencias resultaron ser estadísticamente significativas.

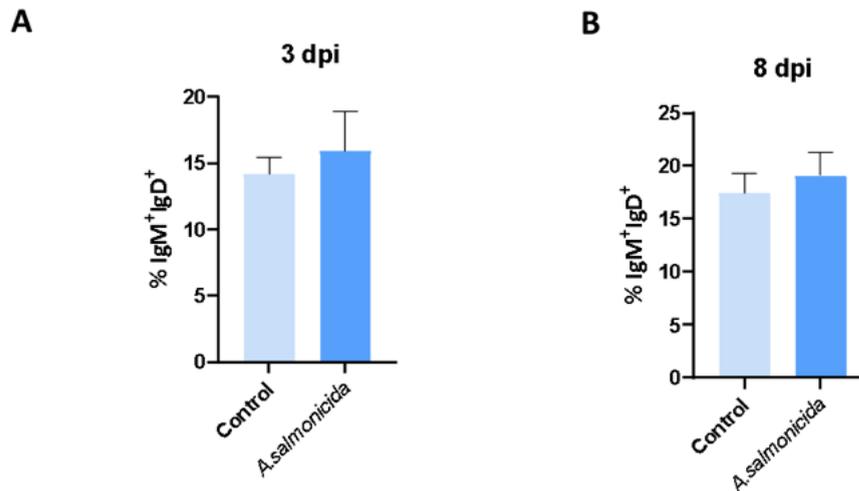


Figura 4. Frecuencia de linfocitos B IgM⁺IgD⁺ en bazo de trucha arcoíris a los 3 y 8 días post-inmunización con una bacterina de *A. salmonicida*. Se obtuvieron leucocitos de bazo de truchas control e inmunizadas con una bacterina de *A. salmonicida* a 3 dpi y 8 dpi, se marcaron con anticuerpos específicos anti-IgM-PE y anti-IgD-APC y se analizaron las muestras mediante citometría de flujo. Dot plots representativos junto con gráficos muestran la media de los porcentajes de linfocitos B IgM⁺IgD⁺ en cultivos de leucocitos aislados de bazo de truchas control e inmunizadas a 3 dpi (**A**) y 8 dpi (**B**) (media + ESM; n=6 peces independientes).

4. Análisis del número de células B secretoras de IgM en intestino, branquias y bazo de trucha arcoíris inmunizadas con *A. salmonicida*.

Con el fin de evaluar si el número de células B productoras de IgM cambia tras la inmunización con la bacterina, se aislaron linfocitos de intestino, branquia y bazo de truchas control e inmunizadas a los 3 dpi y 8 dpi y se analizó el número de células secretoras de IgM mediante la técnica ELISpot. En el intestino, se observó un aumento no significativo del número de células secretoras de IgM en los peces inmunizados respecto a los controles a los 3 dpi (**Figura 5A**), aunque con una gran variabilidad entre individuos. Sin embargo, a los 8 dpi (**Figura 5B**) el número de células productoras se mantuvo similar entre ambos grupos. En las branquias, a los 3 dpi no se observaron diferencias en el número de células secretoras de IgM entre ambos grupos (**Figura 5A**), pero sí hubo un aumento significativo de esta población en branquias de truchas inmunizadas respecto a truchas control a los 8 dpi (**Figura 5B**).

En el bazo, se observó un aumento significativo en el número de células secretoras de IgM en el grupo inmunizado en comparación con el grupo control a los 3 dpi (**Figura 5A**), mientras que a los 8 dpi la dinámica cambió de manera notable observándose una disminución

significativa de esta subpoblación en el grupo inmunizado con respecto al control (**Figura 5B**).

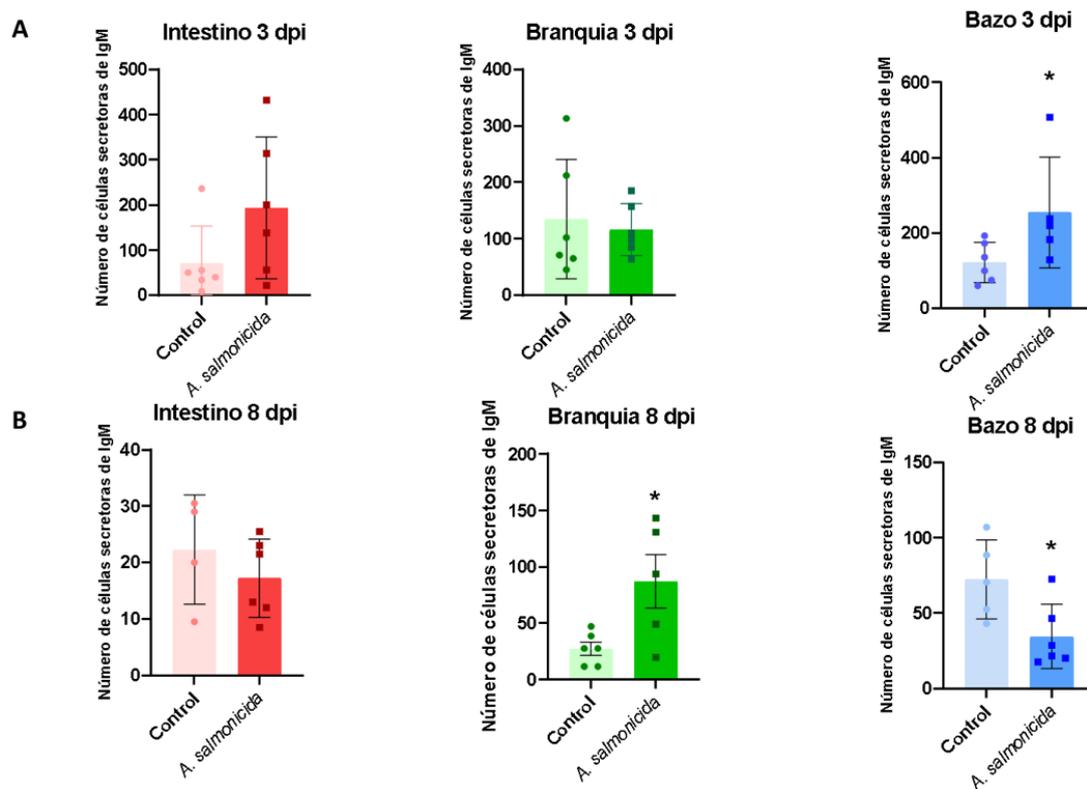


Figura 5. Número de células productoras de IgM en intestino, branquias y bazo de trucha arcoíris tras la inmunización con una bacterina de *A. salmonicida*. Se aislaron leucocitos de intestino, branquias y bazo de trucha arcoíris inmunizadas o no con una bacterina de *A. salmonicida* tras 3 dpi (A) y 8 dpi (B), y se evaluó el número de células B secretoras de IgM en los cultivos mediante la técnica de ELISpot. Se sembraron 10.000 células por pocillo en el caso de los cultivos de leucocitos obtenidos de bazo y branquia, y 100.000 células por pocillo en el caso de los cultivos celulares obtenidos de intestino. Los gráficos muestran la media del número de células productoras de IgM en los grupos control e inmunizado a 3 dpi (A) y 8 dpi (B) (media \pm ESM; n=4-6 peces independientes). En todos los casos se sembraron las células de cada órgano por triplicado y cada punto representa la media del triplicado para cada pez. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas no pareado. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes entre los grupos control e inmunizado como se indica (* $p \leq 0.05$).

5. Expresión de IgM e IgD de membrana e IL-1 β en intestinos de trucha arcoíris tras 3 y 8 días post-inmunización con *A. salmonicida*.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraban un incremento significativo en la frecuencia de linfocitos B IgD⁺IgM⁻ en intestinos de truchas inmunizadas en comparación con el grupo control tanto a 3 dpi como a 8 dpi. Por tanto, el siguiente paso que nos planteamos fue determinar si estos cambios a nivel expresión de la proteína de membrana podían reflejarse también a nivel transcripcional. Para ello, se obtuvieron muestras de intestino de ambos grupos

a 3 dpi y 8 dpi y se analizó la expresión del ARNm de *igm* e *igd de membrana* en este tejido intestinal. Además, con el fin de evaluar el entorno inflamatorio generado tras la inmunización con la bacterina, se evaluó la expresión de *il1b*, una citoquina pro-inflamatoria clave en la respuesta inmune innata (Lopez-Castejon & Brough, 2011). Los resultados no muestran cambios en la expresión de *igm* de membrana en intestinos de truchas control e inmunizadas a 3 dpi (**Figura 6A**). Sin embargo, a 8 dpi se detectó una disminución significativa en la expresión de esta Ig en el grupo inmunizado en comparación con el control (**Figura 6B**). Respecto a la expresión de *igd* de membrana, se observó una tendencia al aumento de expresión de esta Ig en intestinos de truchas inmunizadas a 3 dpi y 8 dpi en comparación con truchas control, aunque este aumento no alcanzó significación estadística en ninguno de los tiempos. Aun así, esta tendencia concuerda con los datos obtenidos mediante citometría de flujo, donde se detectaba un aumento en la frecuencia de células B IgD⁺IgM⁻ en intestinos de truchas inmunizadas respecto a truchas control (**Figura 2**).

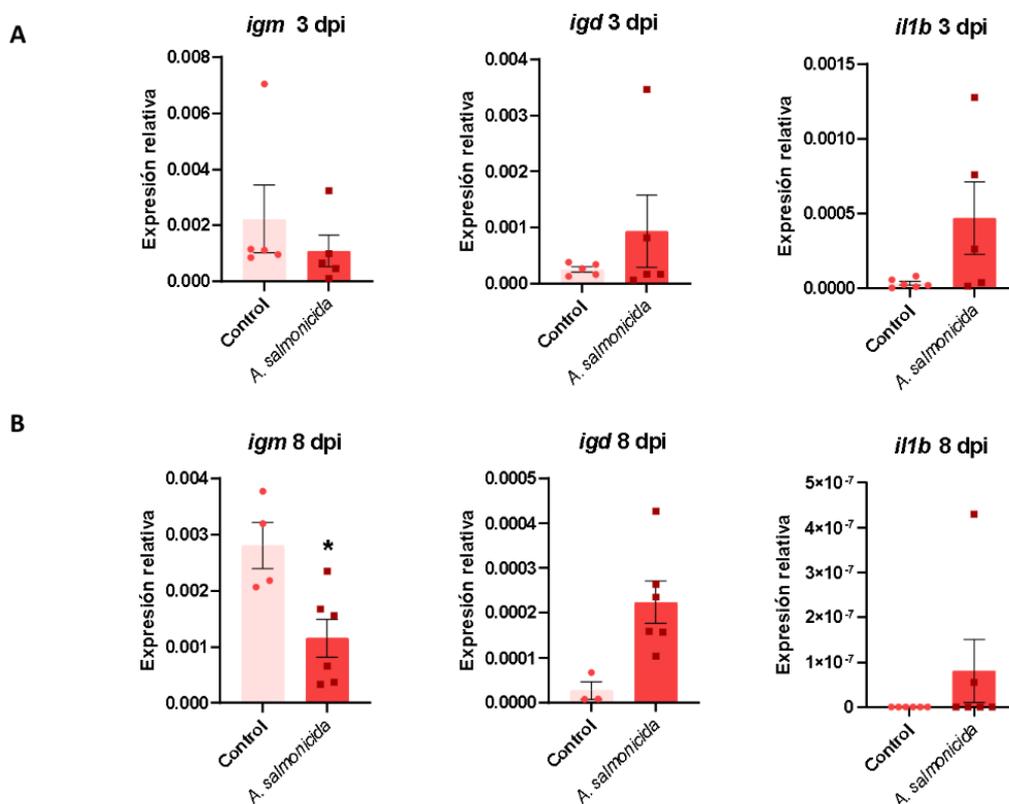


Figura 6. Expresión relativa de los genes *igm* e *igd de membrana* e *il1b* en intestinos de trucha arcoíris tras la inmunización con una bacterina de *A. salmonicida*. Se extrajo ARN total de intestinos de truchas control e inmunizadas con una bacterina de *A. salmonicida* a 3 dpi (**A**) y 8 dpi (**B**), y se analizó la expresión relativa de los genes *igm* e *igd de membrana* e *il1b* mediante rtPCR. Los niveles de expresión se normalizaron frente al gen de referencia *efla*. Los gráficos muestran la media \pm ESM de 3-6 peces independientes por grupo. En todos los casos se realizaron triplicados, y cada punto de las gráficas representa la media del triplicado para cada gen en cada pez.

Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas no pareada cuando los datos se distribuían de manera normal, y mediante el test de Mann-Whitney cuando no seguían una distribución normal. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes entre los grupos control e inmunizado como se indica (* $p \leq 0.05$).

Finalmente, los resultados muestran un aumento en la expresión del gen *illb* en intestinos aislados de truchas inmunizadas en comparación con truchas control a 3 dpi y 8 dpi, aunque en ninguno de los casos este incremento fue estadísticamente significativo (**Figura 6**).

6. Análisis de linfocitos B intestinales en trucha arcoíris tras 21 días de inmunización con *A. salmonicida*

A continuación, se quiso determinar si las frecuencias de células B IgD⁺IgM⁻ en intestinos de truchas inmunizadas seguían siendo superiores a las de truchas control a tiempos más tardíos de la inmunización. Para ello se aislaron cultivos celulares de intestinos de truchas de ambos grupos a 21 dpi y se analizó la expresión de IgM, IgD, así como los niveles de expresión de MHC II de membrana, mediante el marcaje con anticuerpos específicos por citometría de flujo. Como muestra la **Figura 7A**, se observó un ligero incremento en la frecuencia de células IgD⁺IgM⁻ en intestinos de truchas inmunizadas en comparación con truchas control, aunque este aumento fue mínimo y no alcanzó significación estadística. Sin embargo, la expresión de MHC II en esta subpoblación de linfocitos B IgD⁺IgM⁻ disminuyó significativamente en respuesta a la inmunización (**Figura 7A**), lo que concuerda con estudios previos que describen una población de células B IgD⁺IgM⁻ en branquia y piel con fenotipo de célula B plasmáticas que expresa niveles muy bajos de MHC II en membrana (J. G. Herranz-Jusado et al., 2023). Con relación a los porcentajes de linfocitos B IgM⁺IgD⁻ y los niveles de MHC II de membrana en esta subpoblación se observó la misma tendencia que en células B IgD⁺IgM⁻, de forma que la frecuencia de células B IgM⁺IgD⁻ aumentó ligeramente en intestinos de truchas inmunizadas tras 21 dpi con respecto a truchas control y, de igual manera, disminuyeron aunque no significativamente los niveles de MHC II de membrana en estas células B (**Figura 7B**).

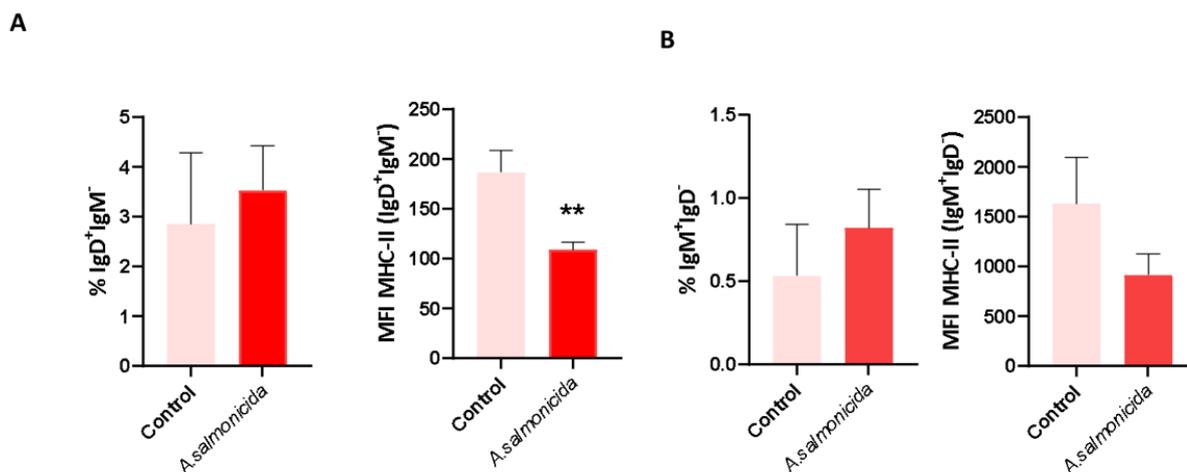


Figura 7. Frecuencia de linfocitos B IgD⁺IgM⁻ e IgM⁺IgD⁻ en intestinos de trucha arcoíris a 21 días post-inmunización con una bacterina de *A. salmonicida*. Se obtuvieron suspensiones celulares de intestinos de truchas control e inmunizadas con una bacterina de *A. salmonicida* a 21 dpi, se marcaron con anticuerpos específicos anti-IgM-PE, anti-IgD-APC y anti-MHCII-FITC y se analizaron los porcentajes de linfocitos B IgD⁺IgM⁻ (A) e IgM⁺IgD⁻ (B) y la expresión de MHC-II en estas subpoblaciones mediante citometría de flujo. La expresión de MHC-II se evaluó como la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés *Mean Fluorescence Intensity*). Los gráficos que muestran la media de los porcentajes de linfocitos B IgD⁺IgM⁻ (A) e IgM⁺IgD⁻ (B) en suspensiones celulares de intestinos de truchas control e inmunizadas a 21 dpi (media + ESM; n=6 peces independientes). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas no pareada. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes entre los grupos control e inmunizado como se indica (** $p \leq 0.01$).

7. IgM e IgD específica de *A. salmonicida* en sueros de trucha arcoíris tras 21 días inmunización con la bacteria.

Para comprobar si la inmunización con una bacteria de *A. salmonicida* genera respuesta humoral específica frente al patógeno y, por tanto, memoria inmunológica, se obtuvieron sueros de truchas control e inmunizadas a 21 dpi, y se analizó la presencia de anticuerpos de isotipo IgM e IgD específicos frente a *A. salmonicida* mediante ELISA. Como muestra la **Figura 8A**, en el suero de truchas inmunizadas tras 21 días de la inmunización se observó un aumento significativo de la cantidad de IgM específica de *A. salmonicidas* en comparación con sueros control. Sin embargo, en el caso la IgD específica de *A. salmonicidas* (**Figura 8B**), aunque sí se apreció una tendencia a una mayor cantidad de esta en sueros de truchas inmunizadas, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (Salinas et al., 2021b).

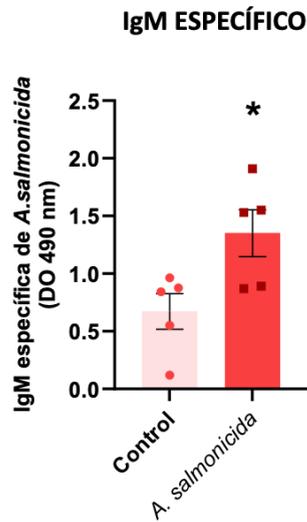
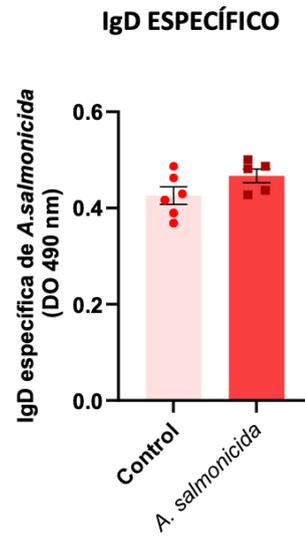
A**B**

Figura 8. Niveles de anticuerpos IgM e IgD específicos frente a *A. salmonicida* en sueros de truchas inmunizadas analmente con una bacterina de *A. salmonicida* y muestreados 21 dpi. Se recogieron sueros de truchas control e inmunizadas y se determinó la cantidad de anticuerpos IgM e IgD específicos frente a la bacteria mediante ELISA. Los gráficos muestran los valores de absorbancia media a 490 nm \pm ESM obtenidos en sueros diluidos 1:20 para la determinación de IgM específica frente a la bacteria (**A**) y diluidos 1:2 para la determinación de IgD específica frente a la bacteria (**B**) en 6 peces independientes de cada grupo. En todos los casos se hicieron triplicados, y cada punto de las gráficas representa la media del triplicado para cada suero de cada trucha analizada. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas no pareada. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes entre los grupos control e inmunizado como se indica (* $p \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Las superficies mucosas están continuamente expuestas a elevadas cantidades de microorganismos presentes en el medio acuático y, por lo tanto, son las primeras barreras inmunológicas encargadas de prevenir la entrada de patógenos al huésped. La primera línea de defensa se encuentra dirigida por el sistema inmunológico innato, siendo el primero en actuar ante la detección de agentes patógenos en el huésped. Los elementos inmunitarios adaptativos presentes en los diferentes tejidos mucosos también contribuyen a esta eliminación inicial del patógeno (Salinas et al., 2021c). Sin embargo, como los peces no cuentan con estructuras linfoides organizadas como las que presentan los mamíferos en las diferentes mucosas, se plantea la pregunta de cómo puede ser que las células B organicen respuestas adaptativas en la mucosa en ausencia de estructuras que permiten la interacción de las células B y T.

En este trabajo se inmunizó a los peces de forma anal para determinar los efectos sobre la mucosa intestinal. De esta forma, nos aseguramos de que la mucosa intestinal está activada, sin necesidad de proteger el antígeno en su paso por el estómago. En el pasado este tipo de inmunización ha sido utilizado como modelo para determinar estos efectos (Martín-Martín et al., 2020). Uno de los principales hallazgos de este estudio ha sido determinar que la inmunización anal con una bacterina de *A. salmonicida* modula un efecto significativo sobre las poblaciones de IgD⁺IgM⁻ presentes en esta mucosa. En ambos tiempos analizados (3 y 8 días post inmunización, dpi), se muestra un aumento significativo en el porcentaje de dichas células en el grupo inmunizado frente al grupo control.

Se ha descrito que las células IgD⁺IgM⁻, al igual que las IgM⁻IgD⁺, en condiciones de homeostasis están presentes en diversas mucosas además de intestino (Perdiguero et al., 2019c y J. G. Herranz-Jusado et al., 2023b). Este es el caso de piel y branquias, donde se ha demostrado que tienen niveles más altos de distintos marcadores específicos de células plasmáticas que las células *naive* de sangre, tales como *prdm1a-1*, *prdm1a-2*, *prdm1c-1*, *prdm1c-2* (genes homólogos a los que codifican para el gen *blimp1* en mamíferos) e *irf4* (Herranz-Jusado et al., 2023). Además de este perfil transcripcional compatible con el de células que han comenzado la diferenciación hacia plasmoblastos, se ha demostrado que estas células IgD⁺IgM⁻, al igual que las IgM⁻IgD⁺, en piel y branquia tienen capacidad secretora de IgD (J. G. Herranz-Jusado et al., 2023b). Por otra parte, también sabemos que, en mucosas como la branquia o la piel, las células IgM⁺IgD⁻ son capaces de diferenciarse todavía más hacia células plasmáticas tras una infección con la bacteria *Yersinia ruckeri*, ya que en respuesta a la infección se observó una clara sobreexpresión de genes relacionados con la diferenciación

plasmocitaria (Herranz-Jusado et al., 2023). Sin embargo, en respuesta a la infección por baño con *Y. ruckeri*, no se observaron cambios en las frecuencias de células B IgD⁺IgM⁻. Por otra parte, existen estudios que demuestran que tanto la IgM como la IgT de los teleósteos recubren la microbiota intestinal (Zhang et al., 2010), y estudios más recientes muestran que las bacterias intestinales de trucha también pueden recubrirse de IgD, además de IgM, y que esta unión incrementa los niveles de IgD e IgM secretados respectivamente en el intestino de las truchas (Perdiguero et al., 2019).

Por el contrario, la subpoblación IgM⁺IgD⁻ no mostró numerosos cambios relevantes en intestino en los diferentes tiempos evaluados. Esto parece indicar que, en la respuesta en el intestino frente a la bacterina, las células podrían no tener que estar directamente implicadas o ser activadas en otra fase de la respuesta inmune. Este patrón de activación diferencial se ve reforzado por los datos obtenidos en ensayos de ELISpot, donde se detectó un aumento en el número de células productoras de IgM en cultivos celulares provenientes de intestinos de truchas inmunizadas a 3 dpi y un descenso de estas mismas células a 8 dpi, aunque es cierto que este aumento/descenso no resultaron significativos en ninguno de los dos casos. Dicha tendencia resulta coherente con los datos obtenidos en los ensayos de citometría, donde se observó un aumento moderado de la frecuencia de células B IgM⁺IgD⁻ a 3 dpi y un descenso de esta población a 8 dpi en intestinos de truchas inmunizadas respecto a truchas control. Estos resultados podrían explicarse con una posible migración de estas células a otros órganos como puede ser la branquia, lo que apoyaría a la hipótesis de la existencia de la comunicación funcional entre diferentes compartimentos mucosos (Zapata, 2022b).

Los datos de expresión génica obtenidos en intestino ofrecen información complementaria a los resultados obtenidos por citometría de flujo y ELISpot. En primer lugar, se observó un aumento en la expresión de *igd* de membrana en intestinos aislados de truchas inmunizadas a 3 dpi y 8 dpi, lo cual es compatible con el aumento en la frecuencia de células B IgD⁺IgM⁻ en intestinos de truchas inmunizadas a estos dos tiempos en comparación con intestinos control. En el caso de *igm* de membrana se vio una disminución significativa en su expresión en intestinos de truchas inmunizadas a 8 dpi en comparación con intestinos control, lo que podría explicar la ligera disminución de la frecuencia de células B IgM⁺IgD⁻ en cultivos celulares obtenidos de intestinos de truchas inmunizadas. Además, los niveles de expresión de la citoquina proinflamatoria *il1b* en intestinos de truchas inmunizadas aumentaron en ambos tiempos, indicando la activación de una respuesta inflamatoria local en el tejido estudiado (Staats & Ennis, 1999; Mulder et al., 2007).

El análisis de la branquia potencia la posibilidad de interconexión entre las diferentes mucosas. A los 3 dpi, se observó un aumento significativo en la frecuencia de células IgD^+IgM , lo que sugiere que la inmunización anal puede desencadenar también una respuesta inmune a nivel branquial a pesar de que esta mucosa no haya estado en contacto directo con el antígeno (bacterina). Esta respuesta sistémica es mantenida a los 8 dpi, aunque es cierto que no alcanza la significación estadística, pero se ve un cierto aumento que sugiere un posible mantenimiento de la activación. Además, a diferencia de lo visto en intestino, en la branquia también es visible un pequeño aumento en la subpoblación de células IgM^+IgD^- tras la inmunización. Este hecho es interesante ya que coincide con lo descrito en estudios previos donde tras la inmunización por baño con *Yersinia ruckeri* se observó un papel relevante de ambas subpoblaciones en la respuesta de la mucosa branquial (Xu et al., 2020).

En cuanto al papel del bazo, los resultados indican que este órgano no parece desempeñar un papel muy relevante en la respuesta frente a la inmunización anal con la bacterina de *A. salmonicida*, o por lo menos a los tiempos de muestreo estudiados (3 dpi y 8 dpi). A los 3 dpi sí se observó un incremento significativo del número de células productoras de IgM en los bazos de truchas inmunizadas respecto a los bazos control, algo que no ocurrió a los 8 dpi donde disminuyó de forma significativa esta población secretora de IgM . El análisis por citometría reveló un ligero aumento en la frecuencia de la subpoblación IgM^+IgD^+ a 3 dpi y 8 dpi en el grupo inmunizado, pero sin alcanzar una significación estadística. Esto podría sugerir que el bazo no actúa como un órgano efector inmediato en esta inmunización por vía mucosas, lo cual coincide con lo descrito en el estudio de Xu et al. (2020) frente *Y. ruckeri*, donde tampoco se observó una activación clara a nivel de expresión génica de ningún tipo de inmunoglobulinas (IgM , IgD e IgT) en este órgano tras la exposición a la bacteria.

Finalmente, el análisis realizado a 21 dpi aporta información sobre la evolución de la respuesta inmunitaria en el tiempo. A este tiempo, ya no se observó un aumento en la frecuencia de la subpoblación IgD^+IgM^- en intestinos de truchas inmunizadas. Sin embargo, es interesante mencionar que las células IgD^+IgM^- presentes en intestinos de truchas inmunizadas a este tiempo sí presentaron una reducción significativa en los niveles de expresión de MHC-II de membrana, lo que indicaría una diferenciación hacia un estado más maduro o plasmático (Perdiguero et al., 2019d; Herranz-Jusdado et al., 2023). Este fenómeno ha sido recientemente descrito por Zhai et al. (2023), quienes proponen que perder MHC-II en la membrana de células B de mucosas podría estar relacionado con su especialización funcional como células secretoras, especialmente en peces, donde los mecanismos de diferenciación de las células B aún no están caracterizados completamente.

Cabe destacar que el desarrollo de proyectos relacionados con el desarrollo de medidas profilácticas para animales ampliamente utilizados en ganadería tiene una gran relevancia social. Concretamente, este proyecto forma parte de las perspectivas de sostenibilidad de la agenda 2030, contribuyendo a diferentes objetivos de desarrollo sostenible (ODS) como el ODS 2 (Hambre 0), el ODS 3 (Salud y Bienestar) y el ODS 14 (Vida Submarina), ya que esta investigación es clave para potenciar el desarrollo de vacunas efectivas frente a *A. salmonicida* que reduzcan el uso de antibióticos en acuicultura y que puedan administrarse a través de las mucosas.

En resumen, este trabajo evidencia que la inmunización anal con una bacterina de *A. salmonicida* induce una activación temprana y específica del sistema inmunitario mucoso intestinal en trucha arcoíris, destacando el papel de las células B IgD⁺IgM⁻. La disminución de la expresión de MHC-II de membrana en esta población en intestinos de truchas inmunizadas tras 21 dpi refuerza la hipótesis de que estas células han comenzado la diferenciación hacia plasmoblastos. Además, el aumento en la frecuencia de esta subpoblación de células B IgD⁺IgM⁻ en branquia sugiere la existencia de una red inmunitaria mucosal interconectada. En contraste, el bazo no parece tener, al menos a los tiempos estudiados, un papel relevante sobre la respuesta de mucosas tras la inmunización anal de trucha arcoíris con una bacterina de *A. salmonicida*.

CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo ha sido estudiar la respuesta inmune adaptativa en truchas arcoíris tras realizar una inmunización anal con una bacterina de *A. salmonicida*, centrándose en la caracterización de células B IgM^+IgD^- , IgD^+IgM^- y IgM^+IgD^+ en diferentes órganos implicados en la inmunidad mucosal y sistémica, como el intestino, la branquia y el bazo.

- En primer lugar, se ha visto una respuesta local en el intestino, donde aumenta la frecuencia de células B IgD^+IgM^- en truchas inmunizadas con respecto a truchas control, así como en el número de células productoras de IgM. Estos resultados muestran que la inmunización anal es capaz de inducir una activación de la inmunidad local, reforzando con ello el papel del intestino como un tejido inmunológicamente competente.
- Por otro lado, el análisis realizado en la branquia mostró un incremento en la frecuencia de células B IgD^+IgM^- en truchas inmunizadas con respecto a truchas control, lo que sugiere interconexión entre las diferentes mucosas. Esto apoya la hipótesis de que la estimulación local puede inducir respuestas en otros tejidos mucosos más alejados.
- Por último, el ligero aumento en la frecuencia de células B IgM^+IgD^+ en bazo de truchas inmunizadas con respecto a truchas control indica un posible papel de este órgano como modulador de la respuesta inmunitaria mucosal.

BIBLIOGRAFÍA

- Amoretti, M., Amsler, C., Bonomi, G., Bouchta, A., Bowe, P., Carraro, C., Cesar, C. L., Charlton, M., Collier, M. J. T., Doser, M., Filippini, V., Fine, K. S., Fontana, A., Fujiwara, M. C., Funakoshi, R., Genova, P., Hangst, J. S., Hayano, R. S., Holzscheiter, M. H., . . . Van Der Werf, D. P. (2002). Production and detection of cold antihydrogen atoms. *Nature*, **419**(6906), 456-459. <https://doi.org/10.1038/nature01096>
- Asbakk K, Dalmo RA (1998) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) epidermal Malpighian cells – motile cells clearing away latex beads in vitro. *J Mar Biotechnol*
- Bemark, M., Pitcher, M. J., Dionisi, C., & Spencer, J. (2024). Gut-associated lymphoid tissue: a microbiota-driven hub of B cell immunity. *Trends In Immunology*, **45**(3), 211-223. <https://doi.org/10.1016/j.it.2024.01.006>
- Bjørgen H, Koppang EO (2021) Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenet* **73**(1):53–63
- Bjørgen, H., & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, **73**(1), 53-63. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01196-0>
- Bruno A, Sandionigi A, Panio A, Rimoldi S, Orizio F, Agostinetti G, Hasan I, Gasco L, Terova G, Labra M. Aquaculture ecosystem microbiome at the water-fish interface: the case-study of rainbow trout fed with *Tenebrio molitor* novel diets. *BMC Microbiol.* 2023 Sep 6;**23**(1):248. doi: 10.1186/s12866-023- 02990-y. PMID: 37674159; PMCID: PMC10481543.
- Charette, S. J. (2021). Microbe Profile: *Aeromonas salmonicida*: an opportunistic pathogen with multiple personalities. *Microbiology*, **167**(5). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001052>
- Connors, E., Soto-Dávila, M., Hossain, A., Vasquez, I., Gnanagobal, H., & Santander, J. (2019). Identification and validation of reliable *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* reference genes for differential gene expression analyses. *Infection Genetics And Evolution*, **73**, 314-321. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.011>
- Dijkstra, J. M., Grimholt, U., Leong, J., Koop, B. F., & Hashimoto, K. (2013). Comprehensive analysis of MHC class II genes in teleost fish genomes reveals dispensability of the peptide-loading DM system in a large part of vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, **13**(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-260>
- FAO. (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024: La transformación azul en acción. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/publications/sofia/2024/es/>
- Flajnik MF (2018) A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **18**(7):438–453
- Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R (2004) Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* **16**:323–333
- Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R (2004) Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* **16**:323–333
- Haugarvoll E, Bjerås I, Nowak BF, Hordvik I, Koppang EO (2008) Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J Anat* **213**(2):202–209
- Havixbeck JJ, Barreda DR (2015) Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. *Biology (Basel)* **4**(4):715–734. <https://doi.org/10.3390/biology4040715>
- Herranz-Jusado, J. G., Morel, E., Simón, R., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2023). Teleost IgD+IgM– B cells in gills and skin have a plasmablast profile, but functionally

and phenotypically differ from IgM+IgD⁻ B cells in these sites. *iScience*, **26**(8), 107434. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107434>

- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, **46**, 103.
- Leeuwis, R. H., Hall, J. R., Zanuzzo, F. S., Smith, N., Clow, K. A., Kumar, S., Vasquez, I., Goetz, F. W., Johnson, S. C., Rise, M. L., Santander, J., & Gamperl, A. K. (2024). Climate change can impair bacterial pathogen defences in sablefish via hypoxia-mediated effects on adaptive immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, **156**, 105161. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2024.105161>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **22**(4), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Martín-Martín, A., Simón, R., Abós, B., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2020). Rainbow trout mount a robust specific immune response upon anal administration of thymus-independent antigens. *Developmental & Comparative Immunology*, **109**, 103715. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103715>
- Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Saleh M, El-Matbouli M. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Dis Aquat Organ*. 2016 Jun 15;**120**(1):49-68. doi: 10.3354/dao03006. PMID: 27304870.
- Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2016). *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. *Diseases of Aquatic Organisms*, **120**, 49–68.
- Menanteau-Ledouble, S., Soliman, H., Kumar, G., & El-Matbouli, M. (2014). Use of in vivo induced antigen technology to identify genes from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* that are specifically expressed during infection of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *BMC Veterinary Research*, **10**(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0298-0>
- Morera D, Roher N, Ribas L, Balasch JC, Donate C, Callol A, Boltana S, Roberts S, Goetz G, Goetz FW, MacKenzie SA (2011) RNA-Seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes. *PLoS One* **6**(10):e26998
- Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, Kiyono H, Hamada H, Ishikawa H (2005) Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches, and isolated lymphoid follicles. *J Immunol* **174**:1906–1912
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2005). La acuicultura y las pesquerías basadas en el cultivo. En *La situación mundial de la pesca y la acuicultura 2004* (Capítulo 8). FAO. <https://www.fao.org/4/y5751s/y5751s08.htm>
- Paludan SR, Pradeu T, Masters SL, Mogensen TH (2020) Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0391-5>
- PROMAR. (2023). *La acuicultura en España 2023*. Asociación Empresarial de Acuicultura de España. https://apromar.es/wpcontent/uploads/2023/09/La_acuicultura_Espana_2023_Apromar_v2.pdf
- Puente-Marin S, Nombela I, Chico V, Ciordia S, Mena MC, Coll J, Mercado L, Ortega-Villaizan MDM (2018) Rainbow trout erythrocytes ex vivo transfection with a DNA vaccine encoding VHSV glycoprotein G induces an antiviral immune response. *Front Immunol* **9**:2477
- Redivo, B., Derôme, N., Kestemont, P., & Cornet, V. (2023). The Pathogen *Aeromonas salmonicida* achromogenes Induces Fast Immune and Microbiota Modifications in Rainbow Trout. *Microorganisms*, **11** (2), 539. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020539>

- Resseguier J, Dalum AS, Pasquier LD, Zhang Y, Koppang EO, Boudinot P, Wiegertjes GF (2020) Lymphoid tissue in teleost gills: variations on a theme. *Biology (Basel)* **9**(6)
- Resseguier J, Dalum AS, Pasquier LD, Zhang Y, Koppang EO, Boudinot P, Wiegertjes GF (2020) Lymphoid tissue in teleost gills: variations on a theme. *Biology (Basel)* **9**(6)
- Salinas, I., Fernández-Montero, Á., Ding, Y., & Sunyer, J. O. (2021b). Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances. *Developmental & Comparative Immunology*, **121**, 104079. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104079>
- Salinas, I., Zhang, Y., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**(12), 1346-1365. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009>
- Scapigliati, G., Fausto, A. M., & Picchietti, S. (2018). Fish Lymphocytes: An Evolutionary Equivalent of Mammalian Innate-Like Lymphocytes? *Frontiers In Immunology*, **9**. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00971>
- Silva-Sanchez, A., & Randall, T. D. (2019). Anatomical Uniqueness of the Mucosal Immune System (GALT, NALT, iBALT) for the Induction and Regulation of Mucosal Immunity and Tolerance. En *Elsevier eBooks* (pp. 21-54). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811924-2.00002-x>
- Staats, H. F., & Ennis, F. A., Jr (1999). IL-1 is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadministered with protein immunogens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **162**(10), 6141–6147
- Steinel NC, Bolnick DI (2017) Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Front Immunol* **8**:827
- Stosik MP, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W (2019) Melanomacrophages and melanomacrophage centres in Osteichthyes. *Cent Eur J Immunol* **44**(2):201–205. <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.87072>
- Tsuchida MA, Theriot JA (2013) An elastic actomyosin network in motile fish keratocytes. *Biophys J* **104**(2):318a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.1763>
- Tsuchida MA, Theriot JA (2013) An elastic actomyosin network in motile fish keratocytes. *Biophys J* **104**(2):318a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.1763>
- Vidal, E. (2017). “Citoquinas en tejido asociado a mucosa de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y dorada (*Sparus aurata*). Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Murcia, Murcia
- Wentzel AS, Janssen JJE, de Boer VCJ, van Veen WG, Forlenza M, Wiegertjes GF (2020) Fish macrophages show distinct metabolic signatures upon polarization. *Front Immunol* **11**:152. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00152>
- Wentzel, A. S., Janssen, J. J. E., De Boer, V. C. J., Van Veen, W. G., Forlenza, M., & Wiegertjes, G. F. (2020). Fish macrophages show distinct metabolic signatures upon polarization. *Frontiers In Immunology*, **11**. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00152>
- Wentzel, A. S., Janssen, J. J. E., De Boer, V. C. J., Van Veen, W. G., Forlenza, M., & Wiegertjes, G. F. (2020b). Fish macrophages show distinct metabolic signatures upon polarization. *Frontiers In Immunology*, **11**. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00152>
- Xu, Z., Takizawa, F., Casadei, E., Shibasaki, Y., Ding, Y., Sauters, T. J. C., Yu, Y., Salinas, I., & Sunyer, J. O. (2020). Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution. *Science Immunology*, **5**(44). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aay3254>
- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. *Frontiers In Immunology*, **11**. <https://doi.org/10.3389/f33immu.2020.567941>
- Zapata, A. G. (2022b). Lympho-Hematopoietic Microenvironments and Fish Immune System. *Biology*, **11**(5), 747. <https://doi.org/10.3390/biology11050747>
- Zapata, A. G. (2023). The fish spleen. *Fish & Shellfish Immunology*, **144**, 109280. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109280>

- Zhang, Y., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, *11*(9), 827-835. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>