



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN
RODABALLO (*SCOPHTHALMUS MAXIMUS*)
TRAS LA VACUNACIÓN POR INMERSIÓN CON
*PHILASTERIDES DICENTRARCHI***

Antía Moreira Dopazo

MÁSTER OFICIAL INTERUNIVERSITARIO EN ACUICULTURA

JUNIO 2022

Trabajo de Fin de Máster presentado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

Ag: antígeno

ARN: ácido ribonucleico

BCR: receptor de linfocitos B

CTLs: células T citotóxicas

Cks: citocinas

dNTPs: desoxinucleósidos trifosfato

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

Ig: inmunoglobulina

IgM: inmunoglobulina M

IgT: inmunoglobulina T

IL: interleucina

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NK: células natural killer

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: tampón fosfato salino

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones

Pv: post-vacunación

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

rpm: revoluciones por minuto

TBS: solución salina tamponada con tris

T₁TBS: TBS + 0,2 % de Tween 20

T₂TBS: TBS + 0,05 % de Tween 20

Th: linfocitos T colaboradores (T helper)

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

v:v: volumen-volumen

RESUMEN

Philasterides dicentrarchi es el principal agente etiológico de la escuticociliatosis, una enfermedad que causa importantes mortalidades en la acuicultura del rodaballo. Con relación a esto, ha aumentado el interés en conocer los mecanismos de defensa frente a este parásito y desarrollar vacunas eficaces para la prevención de esta enfermedad. Los peces teleósteos, como es el caso del rodaballo, tienen un sistema inmunitario que participa en la inmunidad innata y adquirida. En esta última participan 3 tipos de inmunoglobulinas IgM, IgD e IgT; la primera con una función importante en la inmunidad sistémica, mientras que a la IgT se le atribuye una función especial en la inmunidad de las mucosas. Estudios previos han demostrado que una vacuna administrada por inyección genera protección en rodaballo contra *P. dicentrarchi*, aunque esta vacuna provoca efectos secundarios en el pez, por lo que resulta interesante buscar una alternativa a este método de vacunación. En este trabajo se evaluó la actividad parasiticida del suero y del moco intestinal de rodaballos inmunizados con una vacuna administrada por inmersión que se compone de un adyuvante comercial y de antígeno entero inactivado de *P. dicentrarchi*. Además, se determinó el nivel de anticuerpos IgM e IgT específicos presentes en el suero y en el moco de rodaballos inmunizados mediante un ELISA doble indirecto, y se analizó la expresión génica mediante qPCR en riñón, branquias, piel e intestino de inmunoglobulinas y otros genes relacionados con la respuesta inmunitaria tanto innata como adquirida. Nuestros resultados evidencian una estimulación importante a nivel de las branquias y del intestino, lo que sugiere una respuesta protectora sobre a todo a nivel de las mucosas. En futuros trabajos sería interesante realizar infecciones experimentales con *Philasterides dicentrarchi* para evaluar la protección generada en rodaballo por este método de vacunación.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La acuicultura y el rodaballo	1
1.2. Biología y cultivo del rodaballo.....	1
1.3. Problemas y enfermedades	1
1.3.1. Escuticociliatosis en el rodaballo.....	2
1.4. Respuesta inmunitaria en rodaballo	2
1.4.1. Mecanismos de defensa inespecíficos.....	2
1.4.2. Mecanismos de defensa específicos.....	3
1.4.3. Relación entre el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adquirido.....	4
1.5. Vacunación.....	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Animales de experimentación.....	6
3.2. Parásitos.....	6
3.3. Vacunación de peces.....	6
3.4. Toma de muestras.....	7
3.5. Determinación de la actividad parasiticida del suero y del moco	7
3.6. Determinación del nivel de anticuerpos específicos mediante ELISA en suero y moco	7
3.7. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario.....	8
3.8. Cuantificación de la expresión génica en órganos de rodaballo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	9
3.9. Análisis estadístico	10
4. RESULTADOS.....	10
4.1. Actividad parasiticida del suero y moco de rodaballos inmunizados	10
4.2. Nivel de anticuerpos específicos en suero y moco de rodaballos inmunizados	11
4.3. Expresión de inmunoglobulinas y otros genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón, branquia, piel e intestino de rodaballo tras la vacunación	14
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La acuicultura y el rodaballo

La acuicultura es el sector productor que más ha crecido en los últimos años y su rendimiento ha superado al de la pesca salvaje (FAO 2020).

El rodaballo es una especie de gran importancia en la acuicultura, su producción se sitúa en un 90% del total comercializado mientras que sólo el 10 % restante procede de la pesca extractiva. China es la mayor productora a nivel mundial pero el principal país productor a nivel europeo es España. En 2019, la producción acuícola en España fue de 8258 toneladas (un 10,8% más que la del año anterior) y la producción de juveniles fue de 7.030.150 unidades, siendo Galicia la única comunidad autónoma productora de rodaballo y la total productora de juveniles de esta especie (APROMAR 2020).

1.2. Biología y cultivo del rodaballo

El rodaballo, (*Scophthalmus maximus*), es una especie de teleosteo marino que pertenece al orden de los Pleuronectiformes y a la familia Scophthalmidae, ampliamente distribuida por el Atlántico Norte, incluido el Mar Báltico, el Mar Mediterráneo y el Mar Negro (Nelson et al. 2016). Se trata de un pez plano que presenta el cuerpo redondeado y asimétrico y los ojos situados sobre el lado izquierdo. Carece de escamas, aunque en su lugar presenta unas protuberancias óseas repartidas irregularmente por su parte dorsal y muestra una coloración mimética que le permite camuflarse en el fondo. Es una especie bentónica que habita en los fondos de arena y fango y carnívora, alimentándose los juveniles de crustáceos y moluscos y los adultos principalmente de peces y cefalópodos. Se mueve poco durante el día y captura a sus presas durante la noche (Rodríguez Villanueva 2011).

Actualmente, la mayor parte del cultivo de rodaballo tiene lugar en tanques en tierra, donde se controlan tanto los parámetros fisicoquímicos como la alimentación, y uno de los elementos clave para el correcto desarrollo de este cultivo es la renovación continua del agua (MAPA 2019).

1.3. Problemas y enfermedades

Al inicio de su cultivo, el rodaballo sufrió principalmente enfermedades de etiología bacteriana, fundamentalmente la vibriosis. A medida que se ha intensificado su cultivo surgieron más problemas patológicos y actualmente existen patologías bacterianas controladas con programas de vacunación, pero han aparecido otras más difíciles de controlar como son las asociadas a parásitos (Rodríguez Villanueva 2011).

Entre las enfermedades principales de origen parasitario que afectan al rodaballo se encuentran: la microsporidiosis producida por *Tetramicra brevifilum* (Lom y Dyková 1992), la amebiasis branquial producida por *Paramoeba sp.* (Dyková et al. 1998), la

escuticociliatosis producida por *Philasterides dicentrarchi* (Iglesias et al. 2001; Lamas and Leiro 2020) y la enteromixosis producida por *Enteromyxum scophthalmi* (Palenzuela et al. 2002).

1.3.1. Escuticociliatosis en el rodaballo

Philasterides dicentrarchi (Ciliophora, Scuticociliatia) es el principal agente etiológico de la escuticociliatosis, una enfermedad que causa una elevada mortalidad en los peces de cultivo provocando grandes pérdidas económicas. Se trata de un protozoo de vida libre que bajo determinadas condiciones puede actuar como un patógeno histiófago, muy virulento para los peces planos de cultivo y que se ha convertido en uno de los problemas parasitarios más importantes en el cultivo de rodaballo (Lamas and Leiro 2020).

La vía natural de infección de *P. dicentrarchi* es probablemente a través de lesiones en branquias, opérculos y/o piel, y que debido a su capacidad para penetrar y propagarse por los órganos de los peces puede inducir infecciones sistémicas graves en el rodaballo (Paramá et al. 2003). Aunque los factores de virulencia no son todavía bien conocidos, se ha demostrado que el parásito ataca al pez mediante la liberación de proteasas; estas pueden reducir la inmunidad normal del pez al inactivar proteínas involucradas en la defensa como pueden ser anticuerpos o proteínas del sistema de complemento (Piazzon et al. 2011). La sintomatología de la enfermedad se manifiesta mediante ulceraciones cutáneas, oscurecimiento de la piel, alteración de la natación, exoftalmia y distensión abdominal por acumulación de líquido ascítico en la cavidad del cuerpo (Iglesias et al. 2001).

1.4. Respuesta inmunitaria en rodaballo

El sistema inmunitario de vertebrados se suele dividir en innato y adquirido, aunque ambos actúan conjuntamente en la defensa del organismo. El sistema inmunitario innato está bien conservado en vertebrados, con elementos celulares y humorales comunes, mientras que el adquirido presenta diferencias importantes en el grupo de los agnatos, en el que se encuentran las lampreas.

1.4.1. Mecanismos de defensa inespecíficos

El sistema inmunitario innato protege al organismo frente a los patógenos sin que haya un contacto previo, siendo el primero en actuar. Consta de barreras físicas (superficies mucosas, piel y branquias), la defensa celular formada por células fagocíticas (neutrófilos, monocitos/macrófagos), células citotóxicas inespecíficas y células dendríticas, y defensa humoral asociada a moléculas solubles (Magnadóttir 2006). El sistema inmunitario de la mucosa de los peces tiene la capacidad de servir como mecanismo de defensa de primera línea contra la invasión microbiana, además de responder a la vacunación secretando sustancias útiles para la defensa y anticuerpos como IgM e IgT (Munang'andu et al. 2015).

El inicio de la respuesta inmunitaria innata se produce con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por parte de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Se han caracterizado en peces una serie de PRRs, principalmente receptores tipo Toll (TLR), y se conocen algunas moléculas capaces de funcionar como PAMPs para algunos parásitos de peces. La interacción de los PAMPs con los PRRs da como resultado la activación celular y la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y moléculas antimicrobianas (Pasare and Medzhitov 2004; Medzhitov 2007).

1.4.2. Mecanismos de defensa específicos

El sistema inmunitario adquirido desencadena una respuesta específica frente a un antígeno determinado a la vez que genera una memoria inmunológica. Consta de inmunidad celular formada por linfocitos T colaboradores (Th) y linfocitos T citotóxicos (CTLs), e inmunidad humoral, asociada a la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B.

Las células T presentan un receptor de células T (TCR) que reconoce al antígeno procesado y presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y envía señales al linfocito T para que se active. El MHCI es la molécula clave para presentar antígenos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos-CD8+, y el MHCII presenta antígenos que proceden de fuera de la célula a los linfocitos T colaboradores-CD4+ e inician una respuesta inmunitaria adaptativa (Nakanishi et al. 2015; Soletto et al. 2019). Por lo tanto, según su función existen dos tipos de células T, los linfocitos T citotóxicos (CTLs) que están implicados en matar células infectadas por virus y tumorales y los linfocitos T colaboradores (Th), que en peces pueden dividirse en Th1, Th2 y Th17 y se diferencian entre otras actividades en las citocinas que producen. Th1 actúan activando macrófagos, potencian la presentación de Ag e inducen la activación de células T, los Th2, mejoran la producción de anticuerpos (Romagnani 1999; Zou et al. 2005) y los Th17 están implicados en el control de la protección frente a patógenos extracelulares y en las respuestas autoinmunes (Fischer et al. 2013).

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas de reconocimiento altamente especializadas que pueden reconocer diferentes antígenos en organismos causantes de enfermedades y atraer otras células y moléculas para destruir estos patógenos. Se expresan en la superficie de las células B (forma de membrana) como receptores de células B (BCR) o en forma soluble en fluidos corporales (plasma, moco...)(Salinas et al. 2011). En teleósteos, se han identificado hasta el momento 3 tipos de inmunoglobulinas denominadas IgM, IgD e IgT (Parra et al 2013; Bilal et al 2021). IgM e IgD se consideran las más primitivas, posteriormente se describió IgT en trucha arcoíris (Hansen et al. 2005) y en pez cebra (Danilova et al. 2005), llamada IgZ. La IgM es dominante en todos los órganos y tejidos relacionados con el sistema inmunitario, constituyendo una molécula clave en las respuestas inmunitarias tanto sistémicas como mucosas de los teleósteos (Piazzon et al. 2016). La IgT es una inmunoglobulina que juega un papel clave en las respuestas inmunitarias en el intestino (Zhang et al. 2010) en la piel (Xu et al. 2013) y en las branquias (Xu et al. 2016). Inicialmente se le

atribuyó un papel exclusivamente en las respuestas inmunitarias de la mucosa intestinal debido a que la relación IgT/IgM fue mucho mayor en la mucosidad intestinal en comparación con el suero (Zhang et al. 2010), pero estudios posteriores han demostrado que IgT también tiene un papel en las respuestas inmunitarias sistémicas (Castro et al. 2013). La inmunoglobulina IgD se ha encontrado en todas las especies de teleosteos examinadas (Salinas et al. 2021). Con respecto a su papel en la inmunidad, se describió que la IgD secretada cubre una porción significativa de la microbiota de las branquias de los peces (Xu et al. 2016) o del intestino (Perdiguero et al. 2019), aunque menor que la de IgM o IgT. Sin embargo, otros estudios revelaron ausencia de niveles específicos de IgD en el suero y el moco de la trucha en respuesta a una infección bacteriana (Zhang et al. 2021). De todas formas, aunque el papel en la defensa del huésped todavía no está claro, es posible que la IgD juegue un papel en la regulación homeostática de la microbiota de los peces (Perdiguero et al. 2019).

1.4.3. Relación entre el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adquirido

El sistema inmunitario innato y adquirido están fuertemente interrelacionados. Cuando se detecta cualquier señal de peligro se desencadena una respuesta inmunitaria innata, esta señal es clave para la posterior respuesta de los mecanismos de inmunidad específicos (Cooper and Alder 2006). Las citocinas constituyen un amplio grupo de proteínas solubles de bajo peso molecular que son secretadas permitiendo la interacción principalmente entre células del sistema inmunitario (Secombes et al. 2011), ejercen su acción porque son liberadas por una célula activada y recibidas por otra célula a través de receptores específicos que van a mediar los mecanismos de transducción celular. Por lo tanto, atendiendo a su función fisiológica o tipo de respuesta que inducen podemos clasificarlas como: interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF) y quimiocinas (CC), entre otras.

Las interleucinas son aquellas citocinas que se encargan de la relación entre leucocitos y tienen funciones tanto inflamatorias como promotoras de la inmunidad innata o adaptativa. Las interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-18 son importantes mediadores de la inflamación (Zou and Secombes 2016). Entre las citocinas implicadas en respuestas adaptativas tenemos las interleucinas IL-4, que son citocinas que participan en respuestas Th2 (Li et al. 2007) y por tanto ayudan en la respuesta humoral promoviendo la síntesis de inmunoglobulinas en los linfocitos B y la interleucina IL-12, son citocinas que participan en respuestas Th1 e influyen en la producción del IFN- γ por parte de las células T-CD8+ (Henry et al. 2008).

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citocina proinflamatoria expresada por macrófagos y linfocitos activados que juega un papel importante en la regulación de la inflamación como respuesta del huésped a una exposición patógena. Además induce otras respuestas como necrosis, apoptosis o la regulación de células inmunitarias (Rahman and McFadden 2006; Hong et al. 2013).

Los interferones son citocinas que juegan un papel importante en la defensa, en peces se han descrito dos tipos: el interferón tipo I que participa en respuestas asociadas a virus y el interferón tipo II, que incluye el IFN- γ que actúa activando macrófagos para matar microorganismos intracelulares y que promueve por tanto, una actividad fagocítica mayor (Zou et al. 2005).

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas (atraen células), en respuesta a una exposición patógena regulan las respuestas inmunitarias al promover la migración de leucocitos. También desempeñan un papel clave en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa mediante el reclutamiento de neutrófilos, monocitos/macrófagos y células asesinas naturales (NK) (Esche et al. 2005). Una quimiocina importante en teleósteos es la CXCL8 (también llamada interleucina 8 o IL-8) que tiene un papel clave en la migración de neutrófilos al sitio de inflamación (de Oliveira et al. 2013; Havixbeck and Barreda 2015).

1.5. Vacunación

El objetivo general de la vacunación en la acuicultura es reducir las pérdidas asociadas a enfermedades.

La vacunación de los peces se puede realizar por varias vías, incluidas las vacunas por inyección, las vacunas por inmersión o baño y las vacunas orales (Lillehaug 2014). En general, el método de vacunación por inyección tiene mayor duración y eficacia, aunque aumenta el estrés de los peces y puede no ser adecuado para peces pequeños. Sin embargo, la vacunación por inmersión tiene un atractivo en acuicultura porque es más fácil de aplicar, menos invasivo y reduce el estrés de la manipulación. Este tipo de vacuna puede estimular todos los MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) externos pero requiere un uso de altas cantidades de vacuna (Brudeseth et al. 2013; Makesh et al. 2015).

La vacunación por inmersión es un método que expone las superficies de los peces (branquias, piel y tracto digestivo) a la vacuna diluida y es en estas superficies donde se produce la captación del antígeno. La vacuna generalmente se diluye 1:10 (v:v) y el pez se sumerge en el agua. Los tiempos de exposición pueden ser baños cortos que duran de 30 a 60 segundos en soluciones de vacunas concentradas, o baños más largos, más de un minuto en baños más diluidos (Lillehaug 2014).

En el caso particular de la escuticociliatosis, se ha demostrado que este ciliado expresa algunos antígenos de superficie que mediante una infección natural o por medio de protocolos de inmunización pueden inducir protección en el rodaballo mediante la producción de anticuerpos contra estos antígenos (Iglesias et al. 2003). Además, se sabe que es posible aumentar la resistencia del rodaballo a *P. dicentrarchi* inyectando por vía intraperitoneal una vacuna que contiene antígeno y adyuvante (Lamas et al. 2008; Sanmartín et al. 2008), indicando así la importancia del uso del adyuvante en vacunas para aumentar la respuesta inmunitaria frente al antígeno y prolongarla en el tiempo (Tafalla et al. 2013), así como la posibilidad de evitar infecciones naturales.

A pesar de que existen vacunas que inducen protección en rodaballo frente a *P. dicentrarchi* administradas mediante inyección intraperitoneal (Lamas et al. 2008), estas vacunas suelen causar daños importantes en la cavidad y afectar al crecimiento de los peces (Noia et al. 2014), por lo que parece interesante buscar otros métodos de administración alternativos. En este estudio se ha testado una vacuna administrada por inmersión, utilizando un adyuvante comercial, para evaluar la respuesta inmunitaria generada en rodaballo, abriendo perspectivas para el desarrollo de estudios posteriores destinados a estimar la protección generada utilizando esta vía de vacunación.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es analizar la respuesta inmunitaria generada en el rodaballo por una vacuna administrada por inmersión que contiene un adyuvante comercial y antígeno entero inactivado de *P. dicentrarchi*. Para ello, se analizará la actividad parasiticida en el suero y en el moco del rodaballo, se determinará el nivel de IgM e IgT específicas en suero y en moco, y se analizará la expresión génica de genes relacionados con el sistema inmunitario en diferentes órganos mediante qPCR.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Los rodaballos (*Scophthalmus maximus* (L.)), de aproximadamente 40-60 g de peso, fueron aclimatados a las condiciones del acuario de la Universidad de Santiago de Compostela, donde se mantuvieron en tanques de 250 L con recirculación de agua de mar aireada a 16 °C y alimentándose diariamente con piensos comerciales. Los peces se anestesiaron por inmersión en una disolución de 100 mg/l de metanosulfonato de triclaína (MS-222) (Sigma-Aldrich) en agua de mar. Una vez extraída la sangre, los peces fueron sacrificados por decapitación.

3.2. Parásitos

Para producir un gran número de ciliados para el desarrollo de la vacuna, los parásitos se cultivaron a 20 °C en matraces Erlenmeyer de 1 L que contenían 150 ml de medio L-15 y extracto de hígado de rodaballo. Posteriormente, se concentraron por centrifugación a una concentración de 10^7 ciliados por ml y se lisaron por ultrasonidos.

3.3. Vacunación de peces

Los rodaballos fueron vacunados por inmersión dos veces, con 15 días de diferencia, con una mezcla 1:1 (v:v) de adyuvante (Montanide™ IMS 1312 VG; Seppic, París, Francia) y de ciliado lisado por ultrasonidos (100 ml con 10^7 ciliados/ml en PBS). Para ello, primeramente se procedió a mezclar el adyuvante y el antígeno (1:1, v:v); la mezcla se agitó vigorosamente utilizando un agitador y se dejó reposar durante una

hora antes de su uso. Posteriormente, la mezcla (200 ml) se diluyó en dos litros de agua de mar y se llevó a cabo la vacunación por inmersión:

- a) Grupo 1: 2 minutos y medio (**Vac 2,5**). 10 peces
- b) Grupo 2: 5 minutos (**Vac 5**). 10 peces
- c) Grupo 3: Los peces control fueron manipulados (10 peces) de la misma manera, pero utilizando sólo agua de mar en la inmersión.

3.4. Toma de muestras

Quince días después de la segunda inmersión se extrajo la sangre mediante punción de la vena caudal y se dejó coagular durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se recogió el suero. El suero se diluyó en glicerol 1:1 (v:v) y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Posteriormente, se extrajeron los órganos (branquias, bazo, piel, intestino y riñón) para expresión génica y se guardaron en un congelador a -80 °C.

Se obtuvieron también muestras de moco intestinal. Para ello, se abrió el intestino y se retiraron las heces mediante un lavado suave con PBS frío y posteriormente se extrajo el moco añadiendo más PBS y realizando un raspado suave del líquido generado con una espátula de laboratorio conteniendo una microcuchara. Este líquido se recogió en un eppendorf, que se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se diluyó en glicerol 1:1 (v:v) y se guardó a -20 °C hasta su uso.

3.5. Determinación de la actividad parasiticida del suero y del moco

Los ensayos para determinar la actividad parasiticida del suero, las muestras de sueros se diluyeron en medio L-15 (diluciones 1/2, desde 1/2 hasta 1/48) y se añadieron a placas de 96 pocillos (25 µl por pocillo). Los ciliados se lavaron utilizando medio L-15 y se añadieron a los pocillos (25 µl, 1×10^3 ciliados/pocillo). Tras 24 h de incubación, se determinó para cada muestra la máxima dilución de suero que mataba a todos los ciliados.

Para determinar la actividad parasiticida del moco, se incubaron 25 µl de las muestras de moco (concentración final 1/4) con 25 µl de ciliados (1×10^3 ciliados/pocillo) en placas de 96 pocillos a 20 °C. Tras 30 y 60 min de incubación, se determinó la viabilidad al microscopio invertido.

3.6. Determinación del nivel de anticuerpos específicos mediante ELISA en suero y moco

El nivel de IgM e IgT específicas contra *P. dicentrarchi* tras la administración de la vacuna fue evaluado mediante ELISA doble indirecto. Se utilizaron microplacas de fondo plano de 96 pocillos (Thermo Scientific™) que se tapizaron con 100 µl de antígeno de membrana soluble (cepa S6.1) en tampón de acoplamiento y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa se lavó dos veces con tampón tris salino (TBS) (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) y se bloqueó con TBS con 0,2% de Tween 20

(T₁TBS) + 5% de leche en polvo desnatada durante 2h a T^a ambiente. Posteriormente, se añadieron 100 µl por pocillo de suero de rodaballo y 100 µl por pocillo de moco de rodaballo respectivamente, diluidos ambos en T₁TBS con 1% de leche en polvo desnatada y se dejaron a 4 °C durante toda la noche. Después, se realizaron 5 lavados con 200 µl por pocillo de TBS con 0,05% de Tween 20 (T₂TBS).

Para la detección de las IgM específicas, se añadieron 100 µl por pocillo de una dilución 1:500 de anti-IgM de rodaballo hecha en ratón (UR3) en T₁TBS + 1% de leche desnatada y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Para la detección de las IgT específicas, se añadieron 100 µl por pocillo de una dilución 1:500 de anti-IgT de rodaballo hecho en conejo en T₁TBS + 1% de leche desnatada y se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Después, se realizaron 5 lavados con 200 µl por pocillo de T₂TBS.

A su vez, para detectar estos anticuerpos, se añadieron 100 µl por pocillo de una dilución 1:1000 de anticuerpo de conejo antiratón IgG en T₁TBS + 1% de leche desnatada, marcado con peroxidasa (DAKO). Para detectar IgT, se añadieron 100 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo de cerdo anticonejo IgG (DAKO) marcado con peroxidasa en T₁TBS + 1% de leche desnatada. Después, se realizaron 5 lavados con 200 µl por pocillo de T₂TBS. La peroxidasa que llevan conjugada permite su cuantificación por medio de una reacción colorimétrica.

Finalmente, las muestras se incubaron con TMB (Sigma-Aldrich) durante 20 min mostrando la aparición de un color amarillo de intensidad variable en función del nivel de anticuerpos presentes en el pocillo y la reacción se detuvo añadiendo 100 µl por pocillo de H₂SO₄ 0,18 M. Las placas se leyeron a 450 nm con lector automático de placas (BioTek®).

3.7. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

El ARN se extrajo con TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se secó, se resuspendió en agua libre de RNAsas y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoVue Plus (Biochrom™). Para eliminar la posible contaminación con ADN genómico, el ARN total se trató con ADNasa I (Thermo Scientific) en tampón de reacción y se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se eliminó la ADNasa I mediante el DNasa removal reagent (Thermo Scientific).

La síntesis del ADNc se realizó con 20 ng/µL de hexámeros aleatorios (Nzytech), 0,5 mM de cada nucleósido trifosfato (dNTP; Nzytech), 20 U de inhibidor de ribonucleasas (Nzytech), 200 U de transcriptasa inversa M-MuLV (Nzytech) en tampón de reacción (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 8,3) (Nzytech), y 1 µg de la muestra de ARN.

Los parámetros del termociclador fueron: hibridación de hexámeros durante 10 min a 25 °C, transcripción reversa durante 50 min a 37 °C e inactivación de la reacción durante 15 min a 70 °C.

3.8. Cuantificación de la expresión génica en órganos de rodaballo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La amplificación del ADNc se llevó a cabo con la mezcla de reacción para qPCR (Nzytech) y 0,3 µM de cada cebador específico (Tabla 1).

Las mezclas se incubaron durante 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de incubación (15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C) y un ciclo de disociación en 0,05 s a 95 °C, 0,05 s a 55 °C y 0,05 s a 95 °C. Todas las incubaciones de la PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador CFX Connect™ Real- Time System (Bio-Rad). La expresión normalizada de los genes se determinó mediante el método CT comparativo utilizando como gen control constitutivo el *e1-alpha* en todas las RT-qPCR.

Tabla 1.- Secuencias específicas de cebadores para la qPCR. *eef1a*: factor de elongación eucariótico 1α; *igd*: inmunoglobulina D; *migm*: inmunoglobulina M (forma de membrana); *migt*: inmunoglobulina T (forma de membrana); *mhcii*: molécula de histocompatibilidad de tipo 2; *sigm*: inmunoglobulina M (forma secretada); *sigt*: inmunoglobulina T (forma secretada); *tnfa* (factor de necrosis tumoral α); *il1β* (interleucina 1β); *il4a* (interleucina 4A); *il4b* (interleucina 4B); *il8* (interleucina 8); *il12b* (interleucina 12B).

Gen	Secuencia (5'→3') Directo	Secuencia (5'→3') Reverso
<i>eef1a</i>	GGAGGCCAGCTCAAAGATGG	ACAGTTCCAATACCGCCGATTT
<i>igd</i>	AGTAAACCTTCGGCCACCTT	CTCTTGCTTTTGTGGGGTTC
<i>il1β</i>	CACACAAACACAACCTCCTCCTC	TGTTGCTCCACATCTCGCTC
<i>il4a</i>	ACACAATTCAACCTGCACCA	CAATCGGTCAGGCTTTTCAT
<i>il4b</i>	CCCTCCATGACAACACCACT	TTTTGCTCTGCAAAACACA
<i>il8</i>	TGCCGCTGCATCGAGACAGA	ATGACTCTCTCACCCACGG
<i>il12b</i>	GTGAGAGGGAGTGCGACAG	GCTGAGGAGGAGGAGAATCA
<i>migm</i>	AGGGTGCTGTATGAAAGGACTACTGAAATC	AGAGTGATGAGGAAGAGAAGGATGAAGGT
<i>migt</i>	CTGAGCTGCACAGAAGATGCCATTGAA	AGAAATATGAAGGAGGAGGTTGTGGACCA
<i>mhcii</i>	TCGCTTGTGCCTCAGTGTC	TGTTGACGAGGTCAGCAAAC
<i>sigm</i>	TTTCGTGTCTTGGCTTGTTG	TACCCAGTGGATCGGACAAT
<i>sigt</i>	GCCTGCTGGCAGCAATAATTCC	CTATTTACATTCAAGGGCGTAACCCATACC
<i>tnfa</i>	CACTCCAGCTTGTCTCTGTGA	GAAAACAGATCCCCACTCCA

3.9. Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Duncan. Las diferencias se consideraron significativas con $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Actividad parasitica del suero y moco de rodaballos inmunizados

La actividad parasitica del suero y moco se determinó incubando diferentes diluciones de suero (1/4, 1/6, 1/8, 1/12, 1/16, 1/24, 1/32 y 1/48) y moco (1/4) con los ciliados y estimando la dilución que mata el 100% de los ciliados.

No se observaron diferencias significativas en la actividad parasitica del suero entre los diferentes grupos (Fig. 1).

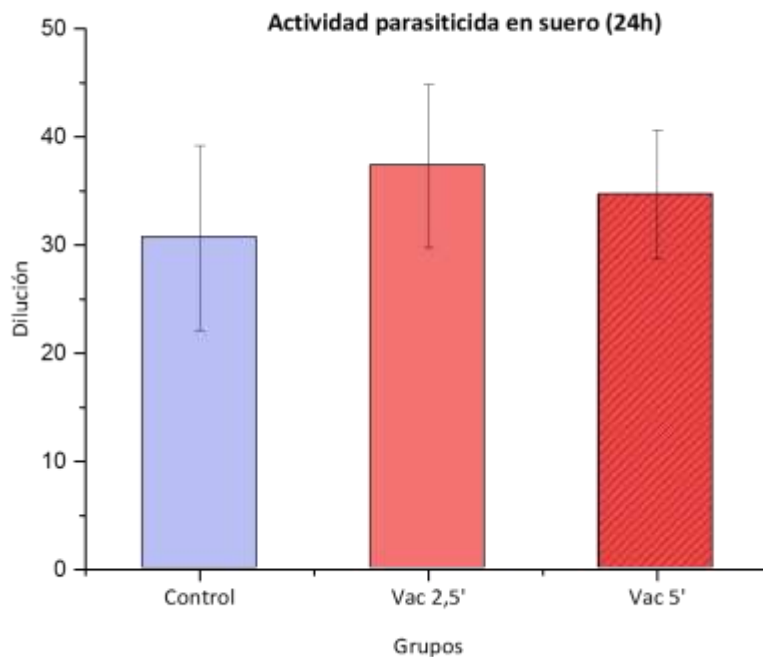


Figura 1.- Actividad parasitica del suero obtenidos de los peces control y vacunados (inmersión durante 2,5 min (Vac 2,5') o durante 5 min (Vac 5')). En el eje de ordenadas se indica la dilución del suero que mata el 100% de los ciliados.

La actividad parasitica del moco se determinó incubando las muestras diluidas 1/4 con los ciliados, observándose que el moco de la mitad de los peces vacunados con Vac 5 mataba a todos los ciliados a esa concentración, un efecto no observado en los grupos control y Vac 2,5 (Tabla 2).

Tabla 2.- Efecto de moco de rodaballos control y vacunados diluidos 1/4 sobre la viabilidad del parásito *P. dicentrarchi*. El moco fue obtenido a las dos semanas tras la última inmunización.

Muestra	Control	Vac 2,5	Vac 5
1	> 25	> 25	TM ^a
2	> 25	2	TM ^a
3	> 25	> 25	> 25
4	> 25	> 25	TM ^a
5	> 25	> 25	> 25
6	> 25	> 25	> 25
7	> 25	2	TM ^a
8	> 25	> 25	> 25
9	> 25	> 25	> 25
10	> 25	> 25	TM ^a

^a TM (Todos muertos)

4.2. Nivel de anticuerpos específicos en suero y moco de rodaballos inmunizados

Se vacunaron los rodaballos a los días 0 y 15. Para saber si la vacuna ha generado producción de inmunoglobulinas contra *P. dicentrarchi* hemos determinado los niveles de IgM e IgT específicas en suero y moco mediante un ELISA a las dos semanas desde la última inmunización.

No hubo diferencias significativas en los niveles séricos de IgM e IgT (Fig. 2) ni en los niveles de IgM e IgT en moco (Fig. 3) entre los grupos control y vacunados.

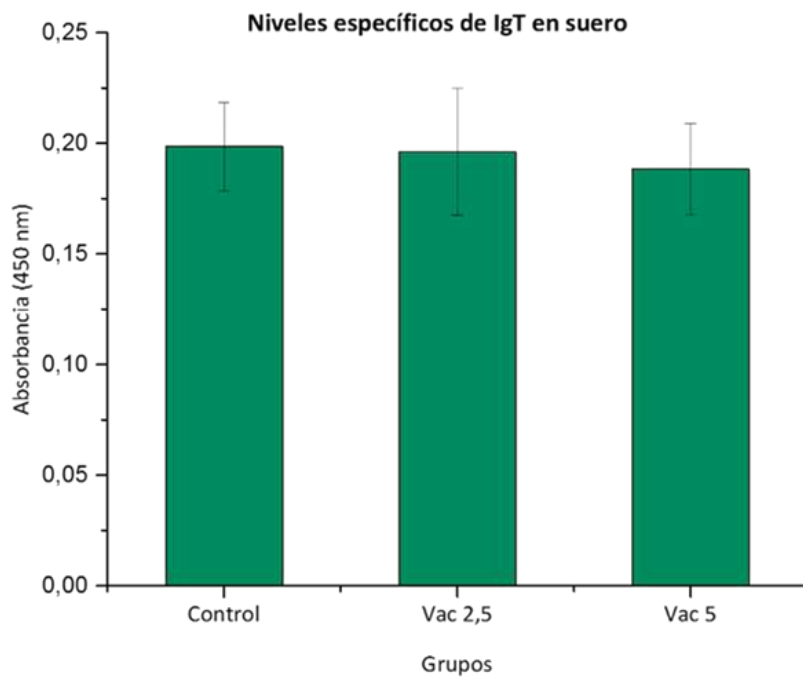
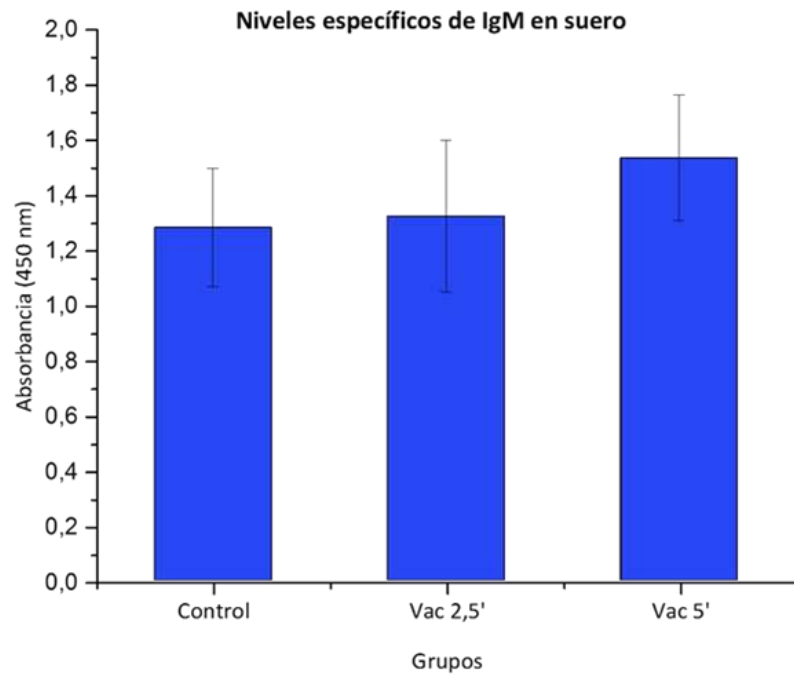


Figura 2.- Niveles de IgM e IgT específicas en suero, obtenidos mediante ELISA y medidos como absorbancia, en sueros de rodaballos inmunizados con una vacuna administrada por inmersión (antígeno + adyuvante). En la figura se muestran los valores medios \pm desviación típica obtenidos a las dos semanas tras la administración de la segunda dosis.

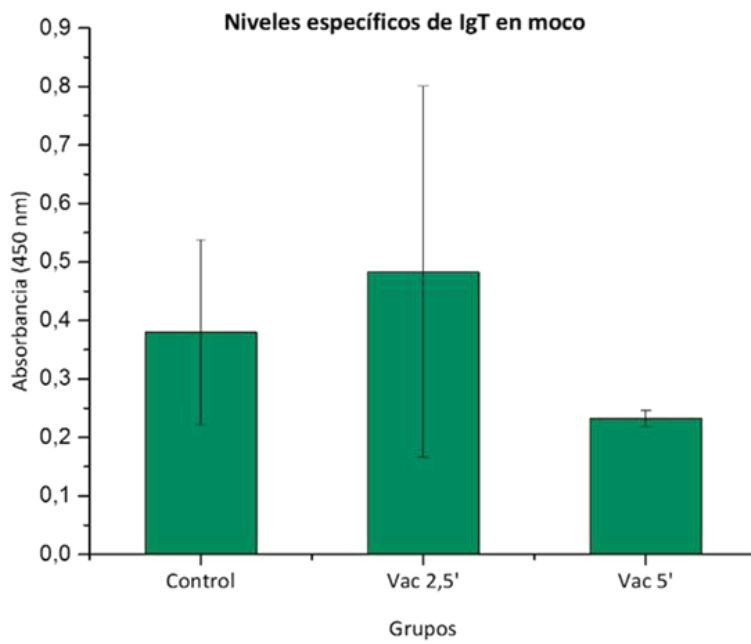
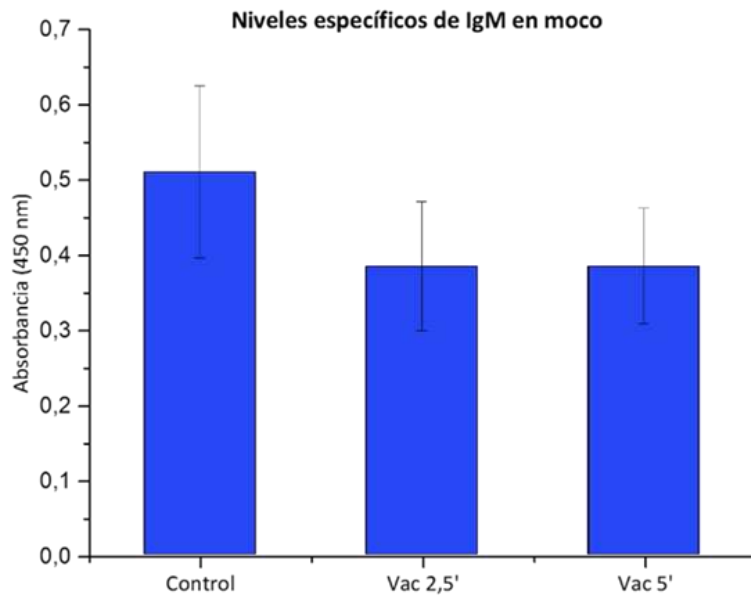


Figura 3.- Niveles de IgM e IgT específicas en moco, obtenidos mediante ELISA y medidos como absorbancia, en muestras de moco de rodaballos inmunizados con una vacuna administrada por inmersión (antígeno + adyuvante). En la figura se muestran los valores medios \pm desviación típica obtenidos a las dos semanas tras la administración de la segunda dosis.

4.3. Expresión de inmunoglobulinas y otros genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón, branquia, piel e intestino de rodaballo tras la vacunación

Para determinar la respuesta de estos genes frente a la vacunación, se ha analizado la expresión génica de inmunoglobulinas (Igs) y otros genes relacionados con el sistema inmunitario mediante qPCR en riñón, piel, branquia e intestino.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de *migm* y *sigm*, ni tampoco de *igd* en ninguno de los órganos estudiados (Figs. 4, 5 y 8). Por el contrario, si se ha observado un incremento en la expresión de *migt* y *sigt* en las branquias de los peces vacunados y una regulación negativa en el riñón (Figs. 6 y 7).

Además, se han analizado otros genes relacionados con el sistema inmunitario como *mhcii* (asociado a la presentación de antígeno), *tnfa*, *il1b* e *il8* (citocinas asociadas a respuestas proinflamatorias), *il4a* e *il4b* (citocinas asociadas con la inmunidad adaptativa, a respuestas Th2) e *il12b* (citocina asociada a respuestas Th1).

El grupo de peces vacunados mostró un aumento en la expresión de la citocina proinflamatoria *tnfa* en branquia e intestino, sin embargo, esta se regula negativamente en la piel (Fig. 9). Otra citocina proinflamatoria como es el caso de *il1b* mostró una infraexpresión en la branquia (Fig. 11), esta disminución en la expresión también se ha observado en el gen asociado a la presentación de antígeno *mhcii* (Fig.10). En cambio, se observa una regulación positiva de *il8* en el riñón (Fig. 12). Al analizar la expresión de las citocinas asociadas con la inmunidad adaptativa no se observaron diferencias significativas en la expresión de *il4b* en ninguno de los órganos estudiados (Fig. 14). Por el contrario, *il4a* presentó un aumento de su expresión en las branquias de peces vacunados (Fig. 13) y en el caso de *il12b*, relacionado con respuestas Th1, se ha observado una regulación positiva de su expresión en el riñón del grupo vacunado (Fig. 15).

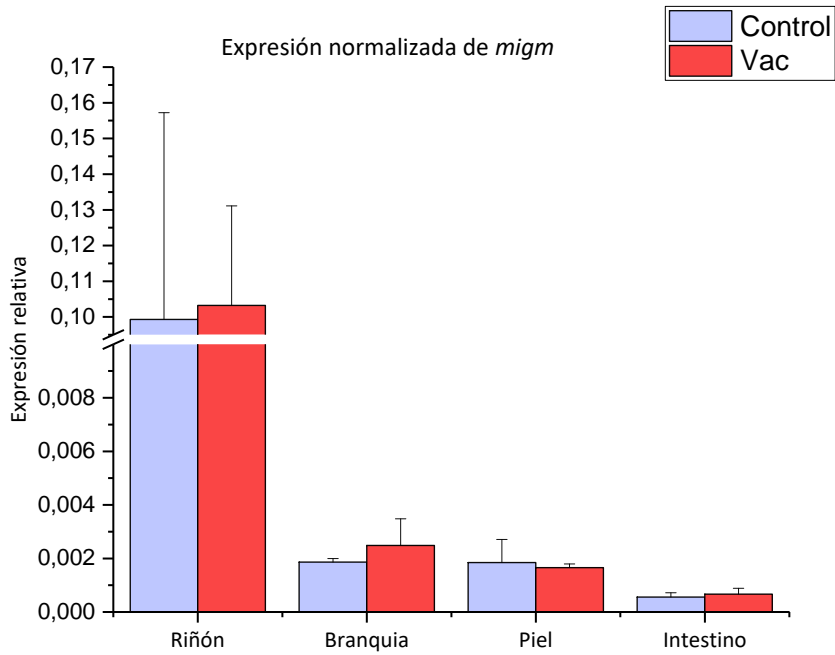


Figura 4.- Expresión normalizada del gen *migm* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

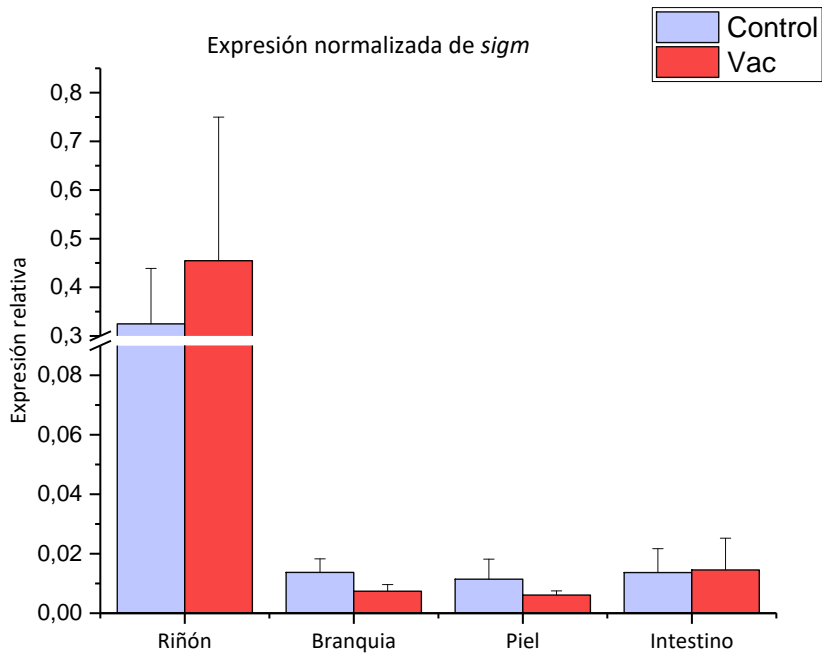


Figura 5.- Expresión normalizada del gen *sigm* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

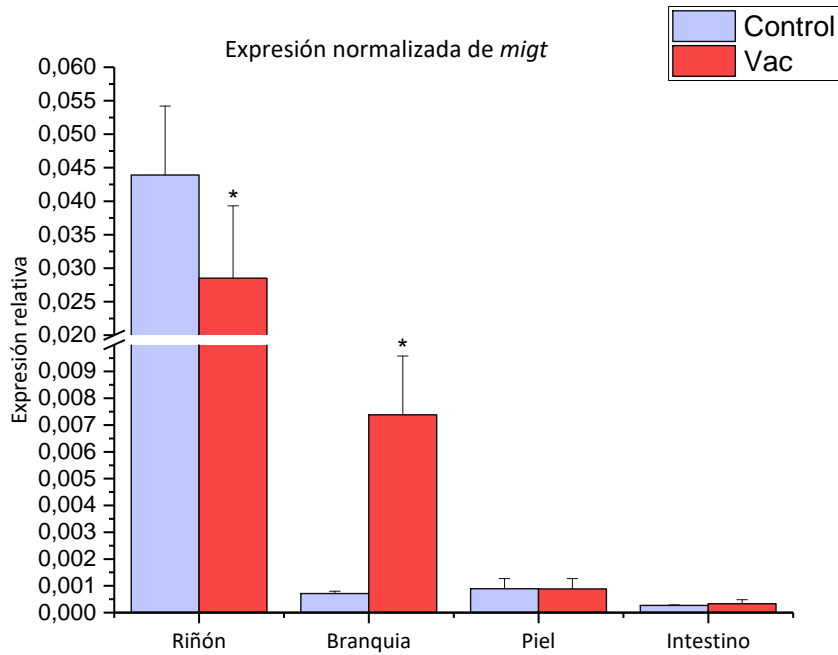


Figura 6.- Expresión normalizada del gen *mig* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ee1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

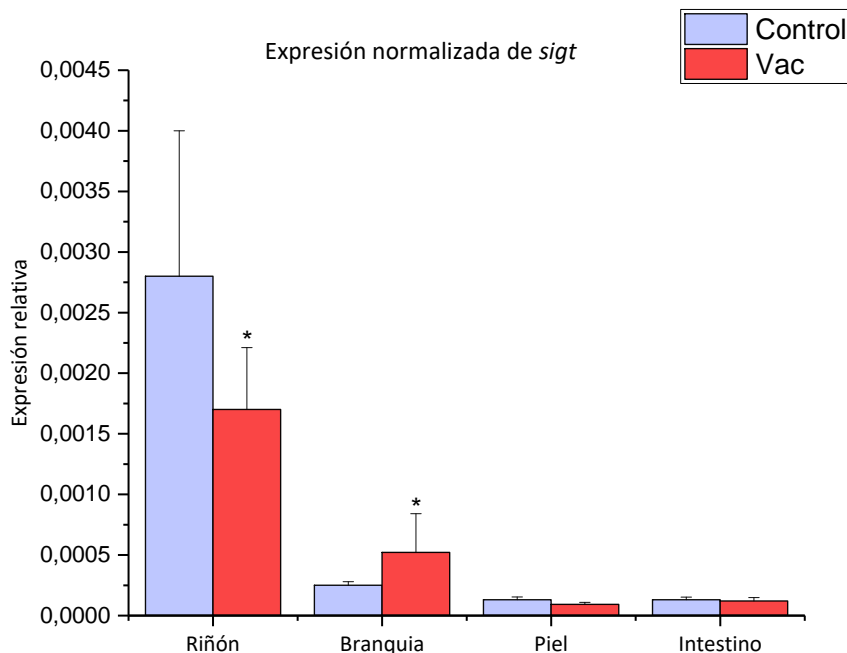


Figura 7.- Expresión normalizada del gen *sigt* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ee1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

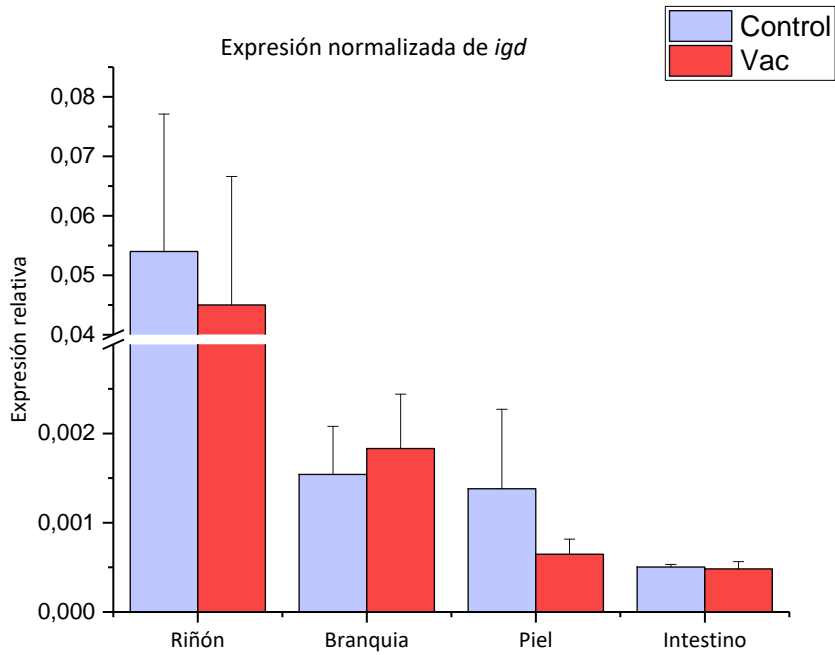


Figura 8.- Expresión normalizada del gen *igd* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ee1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

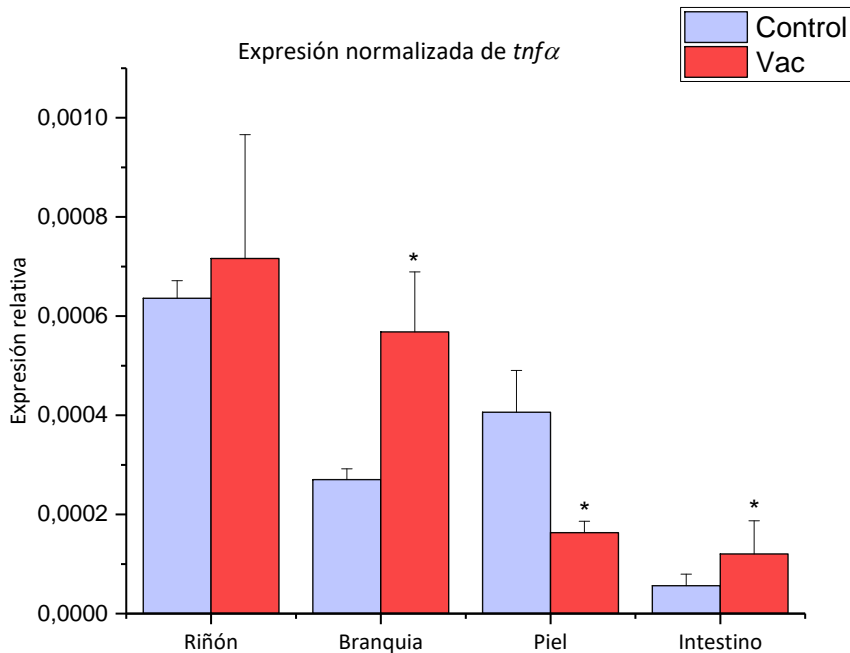


Figura 9.- Expresión normalizada del gen *tnfa* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ee1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

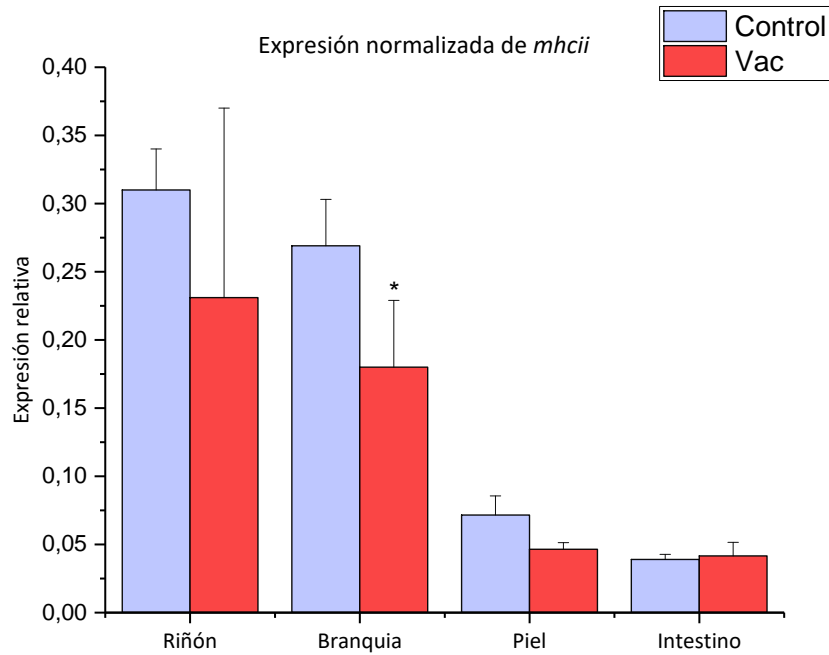


Figura 10.- Expresión normalizada del gen *mhcii* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

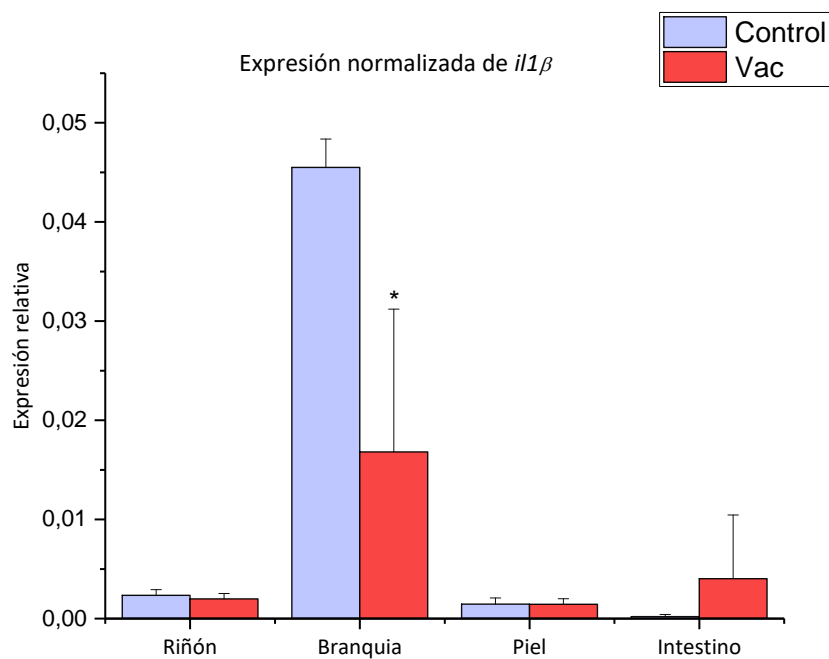


Figura 11.- Expresión normalizada del gen *il1b* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

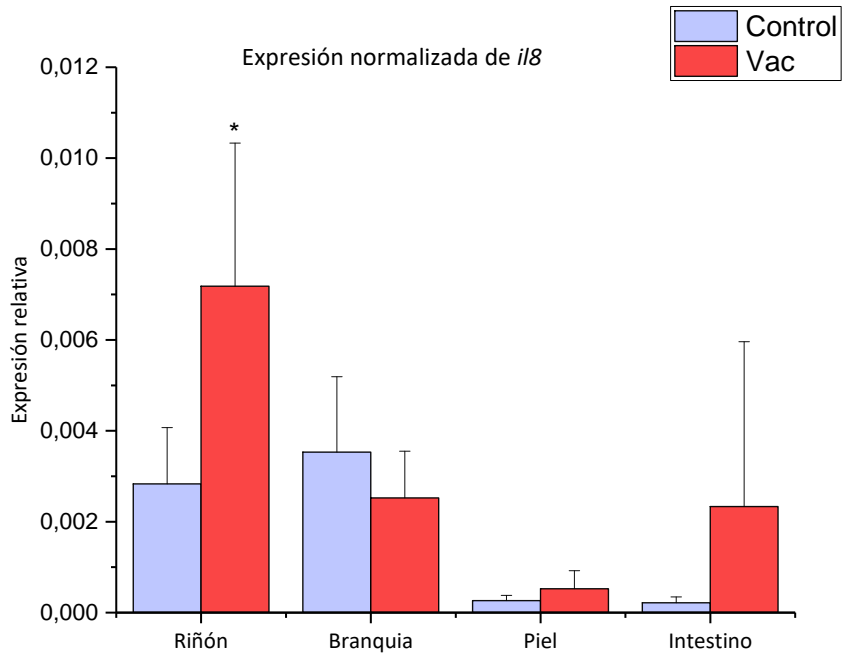


Figura 12.- Expresión normalizada del gen *il8* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

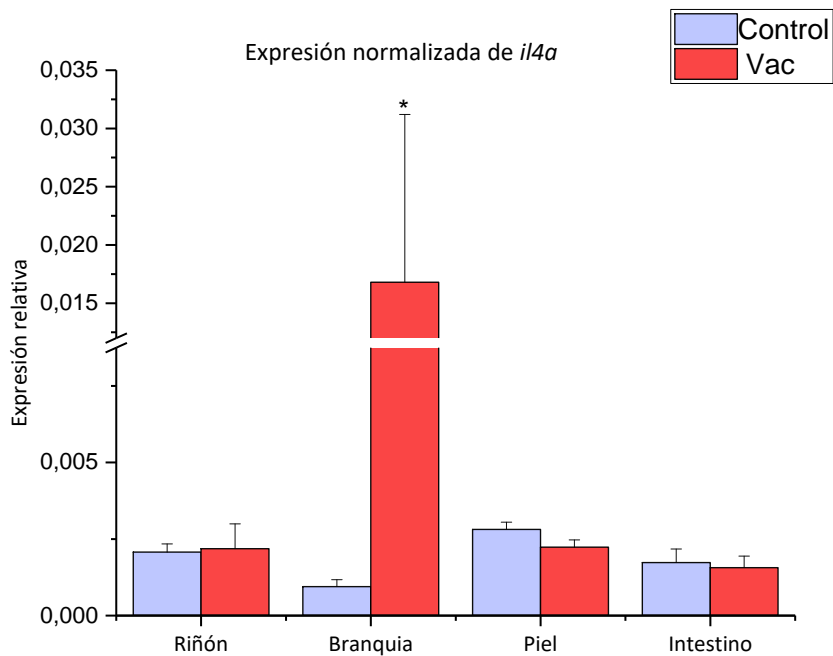


Figura 13.- Expresión normalizada del gen *il4a* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *ef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

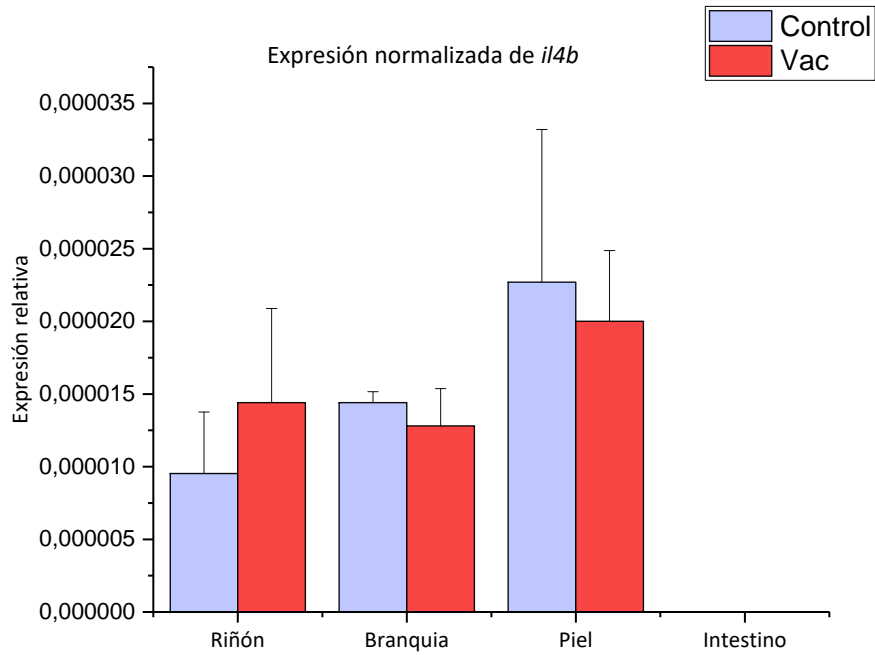


Figura 14.- Expresión normalizada del gen *il4b* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *eef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

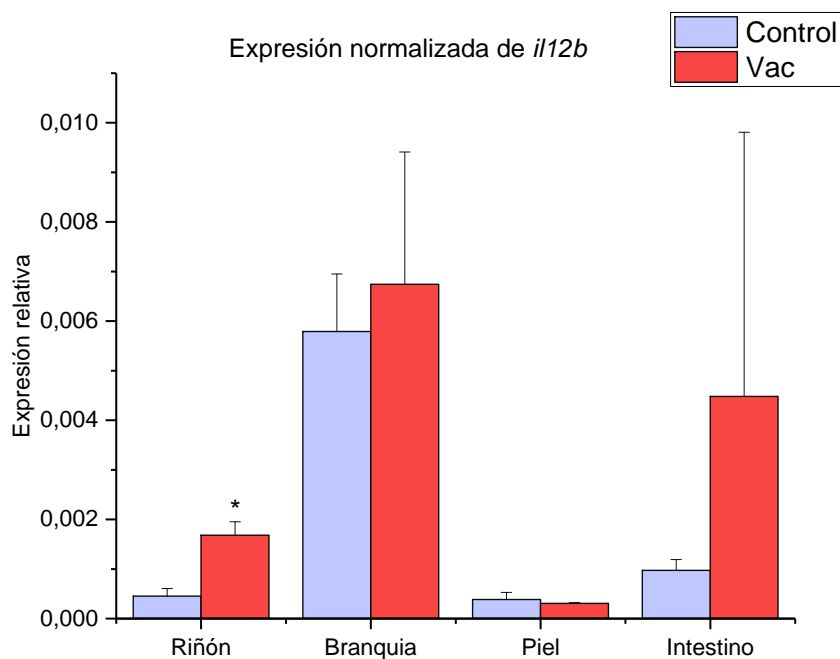


Figura 15.- Expresión normalizada del gen *il12b* en varios órganos de rodaballo obtenida mediante qPCR. La expresión se ha normalizado con respecto al gen *eef1a* (gen control) en las mismas muestras. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

5. DISCUSIÓN

Condiciones intensivas como la acuicultura provocan un incremento en la mortalidad asociada a infecciones, tanto por la elevada concentración de peces en los tanques, favoreciendo una elevada transmisión, como por el efecto del cultivo, a menudo asociado a un aumento del estrés, lo que tiende a debilitar las respuestas inmunitarias. En este sentido, la vacunación puede ayudar a prevenir enfermedades y reducir las pérdidas asociadas a enfermedades causadas por patógenos. Los teleósteos junto con los peces cartilagosos, son los primeros organismos vivos que presentan un sistema inmunitario adquirido basado en la producción de inmunoglobulinas en células B y de receptores de células T (Sunyer 2013). En este trabajo hemos analizado la respuesta inmunitaria en rodaballo frente a una vacuna de inmersión con el parásito *P. dicentrarchi*, centrándonos en la actividad parasiticida y el nivel de anticuerpos específicos en suero y moco tras la vacunación y evaluando la regulación de la expresión de inmunoglobulinas IgM, IgT e IgD y otros genes relacionados tanto con respuestas innatas como adaptativas.

Los peces teleósteos presentan tres tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgD e IgT. IgM e IgD se han identificado en todos los teleósteos examinados, así como en vertebrados con mandíbula (Parra et al. 2013) e IgT, que está relacionada con la inmunidad de las mucosas (Zhang et al. 2010). En la mayoría de las especies de teleósteos, la expresión basal de IgM es dominante, seguida de IgT e IgD, que siempre resultó tener la expresión más baja (Tian et al. 2009). En este estudio hemos observado que el moco del grupo vacunado presenta mayor actividad parasiticida frente al ciliado al ser el único grupo que presenta todos los ciliados muertos a la misma dilución, esto puede deberse a la liberación de inmunoglobulinas y complemento por lo que parece indicar que hay una respuesta mucosa tras la inmunización por inmersión. A la hora de analizar el nivel de anticuerpos específicos, no se observaron diferencias significativas en los niveles de IgM e IgT en el suero y en el moco de rodaballos inmunizados, una respuesta que depende de la ruta de inmunización o del tiempo post-vacunación (Piazzon et al. 2016). Aun así, se puede observar una respuesta escasa de IgT en suero siendo mucho mayor los niveles de IgM y los niveles de IgT en el moco intestinal. En concordancia con estos resultados, estudios en peces teleósteos demostraron que el moco posee una proporción mucho mayor de IgT/IgM que el suero (Yu et al. 2020).

Con la intención de evaluar los cambios en la expresión génica de genes relacionados con las respuestas inmunitarias, hemos estudiado detalladamente mediante qPCR la regulación de su expresión. Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas en la expresión de *migm*, *sigm* e *igd* en ninguno de los órganos de estudio; en cambio, se muestra una sobreexpresión de *migt* y *sigt* en las branquias del grupo vacunado, lo que puede deberse a que haya un incremento en el número de células B IgT⁺ presentes en la branquia y evidenciando también una estimulación de las mucosas. Se ha demostrado que las células B IgT⁺ se encuentran principalmente en el revestimiento de las laminillas branquiales atribuyendo un papel clave de esta Ig en la defensa mucosa contra patógenos (Olsen et al. 2011). Aunque no existen hasta el

momento vacunas frente a parásitos que se administren por inmersión, estudios previos con bacterias demuestran que la vacunación por inmersión tiende a incrementar la inmunidad de las mucosas y confiere protección al inducir una respuesta inmunitaria adaptativa. En un estudio en rodaballo mediante una inmunización por inmersión con *Vibrio anguillarum* se ha demostrado una respuesta más potente de IgT en órganos locales como branquias, intestino y piel en comparación con la inmunización por inyección (Tang et al. 2018). De manera similar, otros estudios también con bacterias pero en este caso realizados en trucha arcoíris, detectaron una regulación positiva de IgT en las branquias e intestino, sin embargo, no se indujo una respuesta sistémica de IgM tras una vacuna de inmersión con *F. psychrophilum* (Makesh et al. 2015). Además, se observaron pocos cambios en la expresión de *igd*, no obstante, se conoce poco sobre la función de la misma. Aunque se ha demostrado en diversos trabajos que IgD se induce transcripcionalmente durante infecciones de diferente etiología, estudios recientes en trucha han manifestado la ausencia de niveles específicos de IgD en el suero y en el moco en respuesta a una infección parasitaria y bacteriana (Yu et al. 2019; Zhang et al. 2021). Por lo tanto, todavía existe mucha variabilidad en los niveles de expresión de IgD y su papel en la defensa todavía no está claro.

El MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) es un componente esencial en el reconocimiento y presentación de antígenos extraños, concretamente las moléculas MHC de clase II (MHCII) son responsables de presentar el antígeno extracelular a células T-CD4+ para activar y regular la respuesta inmunitaria (Monzón-Argüello et al. 2014; Wilson 2017). En nuestros resultados, el gen *mhcii* se regula negativamente en las branquias del grupo vacunado, esto puede deberse al movimiento celular. Estudios demuestran un aumento significativo de su regulación con niveles máximos poco tiempo después de la inmersión en los tejidos de la mucosa (Leya et al 2021), del mismo modo, en otro estudio tras una inmunización por inmersión con *Edwardsiella tarda* también se observó una rápida regulación positiva del gen *mhcii* en branquias y piel al poco tiempo de la vacunación por inmersión (Du et al 2017).

En general, el nivel de expresión de las citocinas es bajo y presenta pocos cambios en los órganos analizados, a excepción del gen *tnfa* o *il4a*. Esta baja expresión puede deberse a que no sabemos el estado del pez o a que la cantidad de muestras puede que sea muy baja para determinar el nivel de citocinas. Entre las citocinas implicadas en respuestas proinflamatorias estarían TNF α , IL-1 β e IL-8. El factor de necrosis tumoral α es una citocina multifuncional implicada en la inflamación, regulación de la apoptosis o en la homeostasis del sistema inmunitario entre otras funciones (Zhu et al. 2013). En nuestros resultados observamos una sobreexpresión del gen *tnfa* en branquia e intestino y una regulación negativa en la piel. La inducción de una respuesta inflamatoria después de la inmunización juega un papel clave en la activación de las defensas del huésped; la baja regulación en la piel puede deberse a que la piel presenta barreras mucho más potentes para defenderse como la producción y eliminación continua de moco para evitar la adherencia de patógenos o sirviendo como vehículo para varios factores inmunitarios que incluyen lisosomas,

fosfatasa alcalina, complemento, inmunoglobulinas o lectinas (Gomez et al. 2013). Otras citocinas proinflamatorias como IL-1 β , son de respuesta temprana y tienen un papel importante en la regulación inmunitaria, como por ejemplo en la migración de leucocitos o en la mejora de actividades fagocíticas de macrófagos (Hong et al 2003; Zhu et al. 2013). En nuestros resultados se observa una regulación negativa de *il1 β* en la branquia, otros estudios realizados para evaluar la respuesta inmune en trucha arcoíris tras una vacuna de inmersión con *F. psychrophilum* observaron también que *il1 β* presentaba una regulación negativa en las branquias el día 2 post-vacunación (pv), en cambio, observaron un incremento de su regulación en el riñón a las 4h pv, evidenciando la respuesta temprana de su activación (Hoare et al 2017). IL-8 es una citocina quimiotáctica que juega un papel clave en la movilización de neutrófilos al sitio de inflamación (Havixbeck and Barreda 2015), en este estudio presenta un aumento de su expresión en el riñón. En relación con lo que hemos observado, se sabe que la captación de Ag de la mucosa está relacionada con la expresión de diferentes citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α o IL-8 en el intestino (Munang'andu et al. 2015).

Cuando analizamos la expresión de citocinas relacionadas con respuestas Th durante la vacunación, nos encontramos que *il12b* se regula positivamente en riñón. IL-12 induce protección de tipo Th1 y es fundamental en la defensa contra parásitos, virus y bacterias intracelulares, estimula la secreción de IFN γ para promover la inmunidad mediada por células (Øvergand et al. 2010), estudios han demostrado protección de este tipo en la defensa contra patógenos intracelulares (Wang et al. 2014). Las citocinas asociadas con la inmunidad humoral (IL-4) son importantes para las respuestas Th2, especialmente para la defensa contra parásitos (Takizawa et al. 2011). Los peces teleósteos tienen dos genes de la familia IL-4, IL-4A e IL-4B, en nuestros resultados no se observaron diferencias significativas en *il4b*, en cambio, *il4a* está regulada positivamente en las branquias, sugiriendo su participación en la respuesta a la estimulación de las mucosas. De todas formas, sería necesario realizar investigaciones detalladas para dilucidar el papel de las citocinas en la mejora del rendimiento de la vacuna ya que presentan variabilidad de su función en diferentes especies.

6. CONCLUSIONES

En vista a los resultados obtenidos en este trabajo, se observó un efecto positivo sobre la actividad parasiticida del moco de rodaballo inmunizado, y los análisis detallados de expresión génica mostraron el efecto de la vacunación sobre todo a nivel de la branquia y a nivel del intestino, destacando el papel de IgT y otros genes relacionados con las respuestas inmunitarias. Por lo tanto, parece indicar que hay una estimulación de las mucosas mediante esta vía de inmunización, por lo que sería interesante realizar estudios posteriores para testar esta vacuna mediante una infección experimental con *Philasterides dicentrarchi* para determinar la protección que genera.

7. BIBLIOGRAFÍA

- APROMAR (2020). Informe anual de la Acuicultura en España por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España.
- Bilal, S., Etayo, A., and Hordvik, I. (2021). Immunoglobulins in teleosts. *Immunogenetics* 73 (1): 65–77. doi.org/10.1007/s00251-020-01195-1.
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., and Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology* 35 (6): 1759–68. doi.org/10.1016/J.FSI.2013.05.029.
- Castro, R., Jouneau, L., Pham, H.P., Bouchez, O., Giudicelli, V., Lefranc, M.P., Quillet, E., et al. (2013). Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection." *PLOS Pathogens* 9 (1): e1003098. doi.org/10.1371/journal.ppat.1003098.
- Cooper, M.D., and Alder M.N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124 (4): 815–22. doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., and Steiner, L.A. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature Immunology* 6 (3): 295–302. doi.org/10.1038/ni1166.
- De Oliveira, S., Reyes-Aldasoro, C.C., Candel, S., Renshaw, S.A., Mulero, V., and Calado, A. (2013). Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (8): 4349–59. doi.org/10.4049/jimmunol.1203266.
- Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., and Zhan, W. (2017). The influence of concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin and immersion time on antigen uptake and expression of immune-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microbial pathogenesis*, 103, 19-28. doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.011.
- Esche, C., Stellato, C., and Beck, L.A. (2005). Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology* 125 (4): 615–28. doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23841.x.
- Fischer, U., Koppang, E.O., and Nakanishi, T. (2013). Teleost T and NK cell immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 35 (2): 197–206. doi.org/10.1016/J.FSI.2013.04.018.
- Gomez, D., Sunyer, J.O., and Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & Shellfish Immunology* 35 (6): 1729–39. doi.org/10.1016/J.FSI.2013.09.032.
- Hansen, J.D., Landis, E.D., and Phillips, R.B. (2005). Discovery of a unique ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19), 6919-6924.

- Havixbeck, J.J., and Barreda, D.R. (2015) Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. *Biology* 4: 715–34. doi.org/10.3390/biology4040715.
- Henry, C. J., Ornelles, D.A., Mitchell, L.M., Brzoza-Lewis, K.L., and Hiltbold E.M. (2008). IL-12 produced by dendritic cells augments CD8 + T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17 . *The Journal of Immunology* 181 (12): 8576–84. doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8576.
- Hoare, R., Ngo, T.P., Bartie, K.L., and Adams, A. (2017). Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Onchorynchus mykiss* L.). *Veterinary research*, 48(1), 1-13. doi.org/10.1186/s13567-017-0448-z.
- Hong, S., Li, R., Xu, Q., Secombes, C.J., and Wang, T. (2013). Two types of TNF- α exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF-A3 in rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Immunology* 191 (12): 5959–72. doi.org/10.4049/jimmunol.1301584.
- Hong, S., Peddie, S., Campos-Pérez, J.J., Zou, J., and Secombes, C.J. (2003). The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1 β on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 27(9), 801-812. doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00056-9.
- Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, M.F., Leiro, J., Ubeira, F.M and Sanmartín, L.M. (2003). *Philasterides Dicantrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology* 126 (2): 125–34. doi.org/10.1017/S0031182002002688.
- Iglesias, R., Paramá A., Alvarez, M.F., Leiro, J., and J Fernández, J. (2001). *Philasterides dicantrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain) .” *Diseases of Aquatic Organisms* 46 (1): 47–55. doi.org/10.3354/dao046047.
- Lamas, J., and Leiro, J.M. (2020). Scuticociliatosis. *Climate Change and Infectious Fish Diseases*; Woo, PTK, Leong, JA, Buchmann, K., Eds, 319-348.
- Lamas, J., Sanmartín, M.L., Paramá, A.I., Castro, R., Cabaleiro, S., Ruiz de Ocenda, M.V., Barja, J.L., and Leiro J. (2008). Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. *Aquaculture* 278 (1–4): 22–26. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.015.
- Leya, T., Ahmad, I., Valappil, R.K., Kurcheti, P.P., Tripathi, G., Sharma, R., and Bedekar, M.K. (2021). Development of species-specific IgM antibodies and elevation of mucosal immune response in *Labeo rohita* using recombinant bicistronic nano DNA vaccine priming. *Fish & Shellfish Immunology*, 113, 185-195. doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.008.
- Li, J.H., Shao, J.Z., Xiang, L.X., and Wen, Y. (2007). Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Molecular Immunology* 44 (8): 2078–86.

doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.010.

- Lillehaug, A. (2014). Vaccination strategies and procedures. *Fish Vaccination* 9780470674: 140–52. doi.org/10.1002/9781118806913.ch12.
- Magnadóttir, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20:137–51. Academic Press. doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006.
- Makesh, M., Sudheesh, P.S., and Cain, K.D. (2015). Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. *Fish & Shellfish Immunology* 44 (1): 156–63. doi.org/10.1016/J.FSI.2015.02.003.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449 (7164): 819–26. doi.org/10.1038/nature06246.
- Monzón-Argüello, C., Garcia de Leaniz, C., Gajardo, G., and Consuegra, S. (2014). “Eco-immunology of fish invasions: the role of MHC variation.” *Immunogenetics* 66 (6): 393–402. doi.org/10.1007/s00251-014-0771-8.
- Munang’andu, H.M., Mutoloki, S., and Evensen, Ø. (2015). A review of the immunological mechanisms following mucosal vaccination of finfish. *Frontiers in Immunology* 6 (AUG): 1–11. doi.org/10.3389/fimmu.2015.00427.
- Nakanishi, T., Shibasaki, Y., and Matsuura, Y. (2015). T cells in fish. *Biology* 4: 640–63. doi.org/10.3390/biology4040640.
- Noia, M., Domínguez, B., Leiro, J., Blanco-Méndez, J., Luzardo-Álvarez, A., Lamas, J. (2014). Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant containing vaccines in turbot. *Fish & Shellfish Immunology* 38: 244–254. doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.020.
- Olsen, M.M., Kania, P.W., Heinecke, R.D., Skjoedt, K., Rasmussen, K.J., and Buchmann, K. (2011). Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius multifiliis* infections: molecular and immunohistochemical studies. *Fish & Shellfish Immunology* 30 (3): 859–69. doi.org/10.1016/J.FSI.2011.01.010.
- Øvergård, A.C., Nepstad, I., Nerland, A.H., and Patel, S. (2012). Characterisation and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-12 β and IFN γ . *Molecular biology reports*, 39(3), 2201–2213. doi.org/10.1007/s11033-011-0969-x.
- Palenzuela, O., Redondo, M.J., and Álvarez-Pellitero, P. (2002). Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124 (4): 369–79. doi.org/10.1017/S0031182001001354.
- Paramá, A., Iglesias, R., Álvarez, M.F., Leiro, J., Aja, C., Sanmartín, M.L. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): Experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 217: 73–80. doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00523-9.

- Parra, D., Takizawa, F., and Sunyer, J.O. (2013). Evolution of B cell immunity. *Annual Review of Animal Biosciences* 1 (1): 65–97. doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103651.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity." *Microbes and Infection* 6 (15): 1382–87. doi.org/10.1016/J.MICINF.2004.08.018.
- Perdiguero, P., Martín-Martín, A., Benedicenti, O., Díaz-Rosales, P., Morel, E., Muñoz-Atienza, E., García-Flores, M., et al. (2019). Teleost IgD+ IgM– B cells mount clonally expanded and mildly mutated intestinal IgD responses in the absence of lymphoid follicles. *Cell Reports* 29 (13): 4223-4235.e5. doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.101.
- Piazzon, M. C., Galindo-Villegas, J., Pereiro, P., Estensoro, I., Calduch-Giner, J. A., Gómez-Casado, E., Novoa, B., Mulero V., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J. (2016). Differential modulation of IgT and IgM upon parasitic, bacterial, viral, and dietary challenges in a perciform fish. *Frontiers in immunology*, 7, 637. doi.org/10.3389/fimmu.2016.00637.
- Piazzon, C., Lamas, J., and Leiro, J.M. (2011). Role of scuticociliate proteinases in infection success in turbot, *Psetta maxima* (L.) *Parasite Immunology* 33 (10): 535–44. doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01310.x.
- Rahman, M.M., and McFadden, G. (2006). Modulation of Tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathogens* 2 (2): 0066–0077. doi.org/10.1371/journal.ppat.0020004.
- Rodríguez Villanueva, J.L. (2011). Cultivo del rodaballo : (*Scophthalmus maximus*). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflammatory Bowel Diseases* 5(4):285-294. doi.org/10.1097/00054725-199911000-00009.
- Salinas, I., Fernández-Montero, A., Ding, Y., and Sunyer, J.O. (2021). Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances. *Developmental and Comparative Immunology* 121. doi.org/10.1016/j.dci.2021.104079.
- Salinas, I., Zhang, Y.A., and Sunyer, J.O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35 (12): 1346–65. doi.org/10.1016/J.DCI.2011.11.009.
- Sanmartín, M.L, Paramá, A., Castro, R., Cabaleiro, S., Leiro, J., Lamas, J., and Barja J.L. (2008). Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Diseases*, 31(2), 135-140. doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00876.x.
- Secombes, C.J., Wang, T., and Bird, S. (2011). The Interleukins of Fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35 (12): 1336–45. doi.org/10.1016/J.DCI.2011.05.001.
- Soletto, I., Granja, A.G., Simón, R., Morel, E., Díaz-Rosales, P., and Tafalla, C. (2019). Identification of CD8α+ dendritic cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- intestine. *Fish and Shellfish Immunology* 89 (June): 309–18. doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.001.
- Sunyer, J.O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology* 14 (4): 320–26. doi.org/10.1038/ni.2549.
- Takizawa, F., Koppang, E.O., Ohtani, M., Nakanishi, T., Hashimoto, K., Fischer, U., and Dijkstra, J.M. (2011). Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular Immunology* 48 (12–13): 1360–68. doi.org/10.1016/j.molimm.2011.02.014.
- Tang, Xiaoqian, Yang Du, Xiuzhen Sheng, Jing Xing, and Wenbin Zhan. 2018. “Molecular Cloning and Expression Analyses of Immunoglobulin Tau Heavy Chain (IgT) in Turbot, *Scophthalmus Maximus*.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 203 (January): 1–12. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.07.011.
- Tian, J., Sun, B., Luo, Y., Zhang, Y., and Nie, P. (2009). Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation. *Aquaculture* 288 (1–2): 14–21. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.023.
- Wang, T., Husain, M., Hong, S., and Holland J.W. (2014). differential expression, modulation and bioactivity of distinct fish IL-12 isoforms: implication towards the evolution of Th1-like immune responses. *Molecular Immunology* 44: 1541–51. doi.org/10.1002/eji.201344273.
- Wilson, A.B. (2017). MHC and adaptive immunity in teleost fishes. *Immunogenetics* 69 (8): 521–28. doi.org/10.1007/s00251-017-1009-3.
- Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y.A., Von Gersdorff Jørgensen, L., Rasmus Demuth Heinecke, R., Buchmann, K., LaPatra, S., and Sunyer, J.O. (2013). Teleost Skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (32): 13097–102. doi.org/10.1073/pnas.1304319110.
- Xu, Z., Takizawa, F., Parra, D., Gómez, D., Von Gersdorff Jørgensen, L., Lapatra, S.E., and Sunyer, J.O. (2016). Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. *Nature Communications* 7. doi.org/10.1038/ncomms10728.
- Yu, Y.Y., Kong, W.G., Xu, H.Y., Huang, Z.Y., Zhang, X.T., Ding, L.G., Dong, S., et al. (2019). Convergent evolution of mucosal immune responses at the buccal cavity of teleost fish. *iScience* 19 (September): 821–35. doi.org/10.1016/j.isci.2019.08.034.
- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., and Xu, Z. 2020. Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish. *Frontiers in Immunology* 11 (October): 1–14. doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941.
- Zhang, X.T., Yu, Y.Y., Xu, H.Y., Huang, Z.Y., Liu, X., Cao, J.F., Meng, K.F., et al. (2021). Prevailing role of mucosal Igs and B cells in teleost skin immune responses to

- bacterial infection. *The Journal of Immunology* 206 (5): 1088 LP – 1101. doi.org/10.4049/jimmunol.2001097.
- Zhang, Y.A, Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., and Sunyer, J.O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology* 11 (9): 827–35. doi.org/10.1038/ni.1913.
- Zhu, L.Y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L.X., and Shao, J.Z. (2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology* 39 (1–2): 39–62. doi.org/10.1016/J.DCI.2012.04.001.
- Zou, J., Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J.M., Yoshiura, Y., Bols, N., and Secombes, C. (2005). Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *The Journal of Immunology* 175 (4): 2484–94. doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2484.
- Zou, J., and Secombes, C.J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology* 5 (2). doi.org/10.3390/biology5020023.
- [Sin autores] FAO (2020) The state of world fisheries and aquaculture 2020. En: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>.
- [Sin autores] Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) (2006). Información sobre el rodaballo y su cultivo. En: <http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Rodaballo.pdf>.